

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA



TESI DI LAUREA

**Influenza stagionale nel setting dell’Ospedale
Policlinico S. Martino di Genova: un’analisi
epidemiologica, virologica e filogenetica di
otto stagioni influenzali.**

Relatore:

Prof. Andrea Orsi

Correlatrice:

Dott.ssa Elisabetta Costa

Candidato:

Giovanni Chiodi

Anno accademico 2021-2022

ABSTRACT

Obiettivo dello studio: verificare la circolazione dei virus influenzali prima e durante la pandemia Covid-19. Abbiamo condotto un'analisi retrospettiva sui risultati di test effettuati su tamponi naso-/orofaringei di pazienti afferenti al Policlinico San Martino di Genova con ARI durante otto stagioni consecutive (2014-2022). I risultati ottenuti sono stati elaborati suddividendoli per stagione su base mensile, per età (< o > 65 anni) e per tipo di virus influenzale.

Dal database iniziale di 12461 test abbiamo selezionato i campioni analizzati per influenza, ottenendo 12193 esiti: 5471 di soggetti <65 anni e 6709 di soggetti > 65 anni.

Nel complesso si è evidenziata una maggior circolazione virale di tipo A ad eccezione della stagione 2017-2018, caratterizzata dalla preponderanza del tipo B ed anche dalla maggior prevalenza stagionale di infezione. La positività per influenza è risultata maggiore nella popolazione ultrasessantacinquenne. Nel periodo pandemico la stagione 2020-2021 è caratterizzata da assenza di positivi, mentre in quella successiva (2021-2022) le prime positività risalgono a febbraio con picco a marzo 2022. L'analisi genetica condotta sui campioni della stagione 2021-2022 ha evidenziato la prevalenza di virus di tipo A ascrivibili al clade 3C.2a1b.2a.2. Nel periodo pre-pandemico, pur con differenze inter-stagionali, i virus influenzali hanno mantenuto una circolazione stagionale (range 2,1%-14,5%), invece nella stagione 2020-2021, nonostante il "bias" del numero di campioni analizzati (quasi esclusivamente quelli non Covid-19 in pazienti ospedalizzati per patologia respiratoria acuta) non si è avuta alcuna positività, con ripresa da febbraio e picco a marzo 2022. Questi dati consentono di ipotizzare che le misure adottate per fronteggiare la pandemia Covid-19 abbiano condizionato la circolazione dei virus influenzali; serviranno inoltre a pianificare strategie preventive efficaci, fortemente necessarie nella nuova situazione epidemiologica.

Objective of the study: to verify the circulation of influenza viruses before and during the Covid-19 pandemic. We have conducted a retrospective analysis on the results of the tests carried out on nasal/oropharyngeal swabs of patients belonging to the Policlinico San Martino di Genova with ARI during eight consecutive seasons (2014-2022). The obtained results were processed by dividing them by season on a monthly basis, by age (< or > 65 years) and by type of influenza virus.

From the initial database of 12461 tests we selected the samples analyzed for influenza, obtaining 12193 outcomes: 5471 of subjects <65 years and 6709 of subjects > 65 years.

Overall, there was a prevalence of type A viral circulation with the exception of the 2017-2018 season, characterized by the preponderance of type B and also by the higher seasonal prevalence of infection. Influenza positivity was higher in the over 65-year-old population. During the pandemic period, the 2020-2021 season is characterized by the absence of positives, whereas in the following one (2021-2022) the first positives date back to February with a peak in March 2022. The genetic analysis conducted on the samples of the 2021-2022 season highlighted the prevalence of type A viruses attributable to the 3C.2a1b.2a.2 clade. In the pre-pandemic period, even with inter-seasonal differences, the influenza viruses maintained a seasonal circulation (range 2.1% -14.5%); on the contrary, in the 2020-2021 season, despite the "bias" in the number of samples analyzed (almost exclusively those not Covid-19 in patients hospitalized for acute respiratory disease) there was no positivity, with a resumption from February and peak in March 2022. These data allow us to hypothesize that the measures adopted to limit the Covid-19 pandemic have affected the circulation of influenza viruses; they will also serve to plan effective preventive strategies, strongly needed in the new epidemiological situation.

INDICE

1 INTRODUZIONE.....	5
1.1 <i>Aspetti generali sull'influenza</i>	5
1.2 <i>I virus influenzali</i>	6
1.3 <i>Cenni storici</i>	10
1.4 <i>Epidemiologia</i>	13
1.5 <i>Definizione di caso</i>	15
1.6 <i>Diagnosi</i>	17
1.7 <i>Patogenesi, manifestazioni cliniche e complicanze</i>	17
1.8 <i>Terapia</i>	19
1.9 <i>Misure di contrasto</i>	19
1.9.1 <i>Norme igieniche</i>	20
1.9.2 <i>Vaccinazioni</i>	20
1.9.3 <i>Sorveglianza dell'influenza</i>	24
2 DISEGNO DELLO STUDIO	27
3 MATERIALI E METODI	28
4 RISULTATI	30
5 CONCLUSIONI	42
BIBLIOGRAFIA.....	44
INDICE DELLE FIGURE.....	48
INDICE DELLE TABELLE	48
RINGRAZIAMENTI	48

1 INTRODUZIONE

1.1 Aspetti generali sull'influenza

L'influenza è una malattia infettiva acuta delle vie respiratorie ad andamento epidemico che si manifesta prevalentemente nel corso delle stagioni fredde, dovuta a virus influenzali (tipo A, B, C), virus a RNA appartenenti alla famiglia degli Orthomixovirus.¹

È una patologia molto contagiosa e globalmente, ogni anno, si stima che il virus influenzale colpisca tra il 5 e il 15% della popolazione adulta (vale a dire da 350 milioni a 1 miliardo di persone), incidenza che nei bambini sale fino al 20-30%²; è ritenuta essere, inoltre, una delle prime cause di assenza dal lavoro o dalla scuola. Nell'ambito delle malattie infettive, l'influenza, oltre ad essere una delle condizioni più frequenti, costituisce anche una delle poche condizioni che, di fatto, vengono sperimentate da ciascun individuo più volte nel corso della propria vita.

Si comprende da ciò, dunque, il rilevante impatto di tale condizione dal punto di vista epidemiologico, clinico ed economico ed il motivo per cui l'influenza costituisca un serio problema di sanità pubblica.³ Rappresenta una rilevante fonte di costi sia diretti che indiretti per la gestione clinica dei casi di malattia e delle eventuali complicanze, nonché per l'attuazione di misure di sorveglianza sanitaria (rete InFluNet) e di prevenzione mediante campagne di sensibilizzazione sulle norme da seguire per ridurre il rischio di contagio e dunque la circolazione del virus. Altrettanto cospicuo è l'impegno economico necessario alla realizzazione delle campagne vaccinali annuali, fondamentale strumento di prevenzione primaria.

In Europa ed in generale nelle regioni caratterizzate da un clima temperato l'influenza si presenta con epidemie annuali durante la stagione invernale mentre casi sporadici si possono verificare anche nei mesi estivi seppure in tale periodo la circolazione del virus si riduca drasticamente.³

La trasmissione avviene per via aerea e dopo un breve periodo di incubazione si delinea il quadro clinico della patologia con i primi sintomi a carico dell'apparato respiratorio superiore, frequentemente accompagnati da sintomi sistemici.

La guarigione avviene, senza complicanze, nella maggior parte dei casi, nell'arco di circa una settimana. Le persone a maggior rischio di complicanze correlate all'influenza sono adulti e bambini con malattie di base, persone di età superiore ai 65 anni, residenti in strutture di assistenza cronica, bambini molto piccoli, donne in gravidanza e alcune categorie professionali (operatori sanitari, lavoratori dei servizi essenziali, ecc.).

Seppur sporadicamente, si evidenziano casi gravi di malattia anche in individui sani senza particolari fattori di rischio o condizioni morbose preesistenti.

Si hanno a disposizione differenti farmaci antivirali seppur essi non vengano utilizzati di routine nella pratica medica e la gestione terapeutica di tale condizione è basata principalmente su terapie sintomatiche.

Di fondamentale importanza per ridurre l'incidenza, la prevalenza e la circolazione del virus specie nei mesi invernali è il vaccino antinfluenzale.^{4,5}

1.2 I virus influenzali

Il virus influenzale è l'unico Orthomyxovirus ad essere in grado di determinare l'insorgenza di patologia nella specie umana. Le particelle virali, dette anche virioni, hanno un aspetto grossolanamente sferico od ovoidale ed un diametro medio di 90-100 nm.

I virioni appaiono ricoperti da un involucro esterno costituito da un doppio strato lipidico acquisito durante la fase di gemmazione dalla membrana plasmatica della cellula infettata. Inserite nell'involucro si trovano due glicoproteine, l'emoagglutina (HA) e la neuraminidasi (NA), che aggettando all'esterno della superficie virale formano proiezioni radiali visibili in microscopia ottica.

Le proiezioni formate da trimeri di HA (circa 1000 per virione) rappresentano il sito di legame del virus alla cellula ospite.

Le due glicoproteine di superficie esplicano funzioni differenti: l'emoagglutinina si lega ai residui di acido sialico delle glicoproteine e dei glicopeptidi della cellula ospite formando una piccola tasca nella molecola; la neuraminidasi stacca l'acido sialico (N-acetilneuraminico) dalle glicoproteine virali in fase di sintesi e dalle glicoproteine di membrana della cellula ospite facilitando presumibilmente la gemmazione virale dalla cellula infetta.

All'interno dell'involucro si trova poi uno strato proteico, denominato matrice che a sua volta circonda il nucleo-capside contenente i filamenti di RNA virale, proteine e RNA polimerasi.

In base a differenze a carico di nucleoproteine e matrice i virus influenzali vengono distinti in virus influenzale A, virus influenzale B, virus influenzale C.

In seguito all'infezione, gli antigeni H ed N, riconosciuti dal sistema immunitario dell'ospite, permettono la produzione di anticorpi, diretti verso di essi, che esplicano un'azione protettiva, interferendo, quindi, con l'ingresso del virus nella cellula e con la fuoriuscita di virioni, in seguito alla replicazione, dalle cellule infettate.⁶

Alle diverse tipologie di virus influenzale si possono ricondurre differenti manifestazioni cliniche: I virus di tipo A e B sono responsabili, nell'uomo, della sintomatologia influenzale classica, il tipo C, rilevato molto più raramente, è di scarsa rilevanza clinica e si associa solitamente ad infezioni asintomatiche.^{7,8}

Ogni tipologia di virus influenzale condivide gli stessi antigeni interni rappresentati dall'antigene nucleoproteico e la proteina "M" mentre può presentare differenze riguardo gli antigeni HA e NA.

Ad oggi sono stati identificati 16 sottotipi di emoagglutinina e 9 di neuraminidasi tra i virus di tipo A, mentre i tipo B e C non vengono classificati in sottotipi in base ad H e N.⁶

Un'ulteriore differenza tra le tipologie di virus influenzale risiede nella capacità di infettare diverse specie animali: il virus A, il più rappresentato per quanto riguarda

l'infezione umana è capace di infettare anche uccelli, cavalli, suini, etc. mentre i virus di tipo B e C sono presenti solo nell'uomo.

In merito ai virus influenzali che possono infettare gli uccelli, si è osservato come questi siano in grado di effettuare riarrangiamenti molecolari con i virus influenzali che tipicamente infettano l'uomo determinando l'apparizione di nuovi virus che sporadicamente possono infettare l'essere umano, vanno a tal riguardo ricordati i virus H5N1, H7N9, H7N7, H7N3.

Per convenzione internazionale, stabilita dall'OMS, i virus influenzali che vengono isolati sono identificati tramite una nomenclatura standard attraverso la quale viene indicato il tipo di virus, la locazione geografica dove è stato isolato per la prima volta, il numero sequenziale di isolamento, l'anno di isolamento e i sottotipi HA e NA.¹

Il peculiare andamento epidemiologico dell'influenza è giustificato dalla marcata tendenza di tali virus a variare, cioè ad acquisire variazioni della struttura chimica degli antigeni di superficie (H e N). Tali mutazioni possono talora essere anche molto modeste, ma sono comunque spesso sufficienti a rendere meno efficiente l'azione neutralizzante degli anticorpi prodotti nei confronti dei virus influenzali precedentemente incontrati dall'organismo.

L'elevata circolazione del virus e la conseguente notevole diffusione degli anticorpi costituiscono una pressione di selezione abbastanza forte per favorire la selezione di nuovi virus meno facilmente neutralizzabili che a loro volta diffondono tra la popolazione provocando nuove manifestazioni epidemiche.

Per tale ragione i virus influenzali che si isolano durante le varie manifestazioni epidemiche differiscono sempre leggermente da quelli isolati nelle manifestazioni precedenti. Occasionalmente le modificazioni nella struttura degli antigeni di superficie possono essere abbastanza rilevanti per cui il nuovo virus non è più neutralizzato, neppure parzialmente, dagli anticorpi preesistenti nella specie umana, sicché la sua diffusione non incontra alcun ostacolo e si osserva allora una epidemia che coinvolge rapidamente tutti i paesi del globo (pandemia).⁶

Le mutazioni, che riguardano essenzialmente i virus influenzali di tipo A e B, possono avvenire secondo due meccanismi distinti che sono la deriva antigenica (antigenic drift) e lo spostamento antigenico (antigenic shift). I virus di tipo C sono invece antigenicamente stabili.

- 1) L'*antigenic drift* consiste in modificazioni minori a livello degli antigeni di superficie e si verifica soprattutto nei virus di tipo A, in misura minore anche in quelli di tipo B. Tale fenomeno è dovuto a variazioni di uno o pochi amminoacidi nella sequenza amminoacidica degli antigeni H e N.

Le variazioni minori si verificano ogni 2-5 anni e sono responsabili della comparsa di nuovi ceppi nell'ambito del medesimo sottotipo; la popolazione risulta essere, pertanto, solo parzialmente immune con un gran numero di individui suscettibili al nuovo ceppo in quanto le nuove varianti diventano sufficientemente irricognoscibili agli anticorpi.

In virtù di ciò si comprende come l'*antigenic drift* sia il responsabile della comparsa di focolai a carattere epidemico e del perché sia così importante che il vaccino antinfluenzale venga aggiornato annualmente.

- 2) L'*antigenic shift*, consiste, invece, in modificazioni sostanziali a carico degli antigeni di superficie e riguarda esclusivamente i virus influenzali di tipo A. Tale fenomeno è dovuto alla sostituzione totale del gene che codifica per le relative catene polipeptidiche, il che si verifica, con ogni probabilità, per ricombinazione tra virus umani ed animali (aviari o suini) o per trasmissione diretta di virus non-umani all'uomo (l'esempio più recente è quello verificatosi ad Hong Kong nel 1997).

Le variazioni maggiori si verificano ad intervalli di tempo relativamente lunghi, anche di decenni e oltre, e determinano la comparsa nell'uomo di nuovi ceppi virali con una proteina di superficie (H e/o N) appartenente a un sottotipo diverso da quelli comunemente circolanti nell'uomo.

Poiché la popolazione non ha mai incontrato prima questi antigeni, non è immunizzata verso di essi, e, in determinate circostanze, questi cambiamenti sono alla base di una diffusione epidemica e talvolta pandemica dell'infezione.

Le pandemie si possono verificare soprattutto quando l'antigenic shift riguarda i caratteri dell'emoagglutinina in quanto gli anticorpi diretti contro di essa sono molto più efficaci nel neutralizzare l'infettività del virus.⁹

Di queste variazioni molecolari va tenuto conto nella preparazione dei vaccini, la cui composizione deve essere aggiornata tutti gli anni ed in questo le attività di sorveglianza sono fondamentali per selezionare i ceppi specifici da inserire sulla base del grado di differenza epidemiologica e sierologica rispetto a ciò che ha circolato nelle stagioni precedenti.^{1,6,7}

1.3 Cenni storici

A seguito dell'intrinseca variabilità i virus influenzali sono stati responsabili delle più note e memorabili pandemie della storia contemporanea, provocando milioni e milioni di morti.

Nel ventesimo secolo hanno avuto luogo ben tre pandemie influenzali: nel 1918, 1957, e 1968, che sono state denominate in base alla presunta area di origine; rispettivamente in Spagnola, Asiatica e Hong Kong.

L'agente eziologico responsabile è stato, in tutti e tre i casi, un virus influenzale di tipo A, rispettivamente H1N1, H2N2 e H3N2.

Sempre nello scorso secolo vanno ricordate, poi, due importanti epidemie che si verificarono nel 1947, la cosiddetta "pseudo pandemia" da H1N1, e nel 1977 l'epidemia "Russa" sempre da H1N1.²⁰

La “Spagnola”, conosciuta anche come “la grande influenza”, viene considerata come la pandemia più severa della storia contemporanea causata dal virus A (H1N1). Il virus si diffuse molto rapidamente in tutto il globo andando ad infettare, secondo alcune stime, addirittura un terzo della popolazione mondiale.

Vennero interessate anche popolazioni molto isolate delle regioni artiche e di alcune remote isole del Pacifico. Nella popolazione esquimese, ad esempio, probabilmente priva di qualsiasi esperienza immunitaria fino ad allora, la morbosità raggiunse il 90% con punte di letalità elevatissime addirittura dell’85%.

Tre furono le principali ondate: la prima nella primavera del 1918, la seconda in estate-autunno dello stesso anno e una terza ondata si verificò nella primavera del 1919. In alcuni territori la pandemia si protrasse fino al 1920, ma non è chiaro se l’agente eziologico responsabile fosse lo stesso.²²

La malattia fu particolarmente severa con una letalità, complessivamente, superiore al 2,5%. La curva della mortalità in relazione all’età fu molto differente rispetto al tipo di curva che si era abituati ad osservare per l’influenza.

Solitamente l’andamento è ad “U” con un primo picco di mortalità nei bambini molto piccoli e un secondo picco negli individui di età molto avanzata. Nel corso della “Spagnola”, invece si ebbe una curva a “W” incompleta, simile cioè a quella ad “U”, ma con in più un picco di mortalità nei giovani adulti di età compresa tra i 25 e i 45 anni.

Dei circa 50 milioni di morti si stima addirittura che il 99% di essi furono individui di età inferiore ai 65 anni, cosa che poi non si è più verificata nelle pandemie successive. La maggioranza dei decessi avveniva per complicanze respiratorie, estensione dell’infezione al parenchima polmonare e alla pleura, sovrapposizioni batteriche o broncopolmoniti emorragiche.

Da allora virus simili all’ A/H1N1 continuarono a circolare in modo endemico o epidemico negli uomini e nei maiali, ma senza avere la stessa patogenicità del virus del 1918.

Un aspetto particolare da tenere in considerazione e che in parte spiega l’elevatissimo numero di morti, è che in quegli anni non si avevano a disposizione né

i vaccini antinfluenzali, utili per prevenire l'infezione e ridurre il numero dei casi clinicamente severi, né gli antibiotici per trattare eventuali infezioni batteriche secondarie, scoperti solo dopo, nel 1928, da Fleming. Le misure di contenimento della pandemia messe in atto consistettero esclusivamente in isolamenti, quarantene e uso di disinfettanti.

Per tutti gli anni trenta, quaranta e cinquanta l'influenza ritornò al suo andamento abituale fino al 1957, anno in cui ebbe inizio una nuova pandemia. Trattasi dell'"Asiatica", infezione causata di nuovo da un virus di tipo A, un H2N2, diffusosi a partire dall'Asia orientale nel biennio 1957-58. Fu segnalato per la prima volta a Singapore nel febbraio 1957, a Hong Kong nell'aprile 1957 e negli Stati Uniti nell'estate del 1957. Si stima che il numero di morti in tutto il mondo a causa di tale virus nel corso di questi due anni si aggiri attorno a 1,1 milioni di persone con un tasso di letalità compreso tra lo 0,1 e lo 0,5%.

A seguito dell'isolamento e dell'identificazione del virus, fu preparato un vaccino che arginò, in parte, l'epidemia. Anche grazie a questo, il numero complessivo delle vittime è risultato essere decisamente inferiore rispetto a quello della pandemia del 1918.

In contrasto a quanto osservato nel 1918, le morti si verificarono soprattutto nelle persone affette da malattie croniche e meno colpiti furono i soggetti giovani e sani. Altra particolarità è che, a differenza di quanto si fosse visto fino ad allora, il virus H2N2 fu responsabile di un gran numero di polmoniti primariamente virali oltre che alle classiche polmoniti batteriche secondarie che si conoscevano essere una delle possibili complicanze dell'influenza.²⁰

Nel 1968 si diffuse a partire dal Sud Est Asiatico una nuova pandemia causata dal virus influenzale H3N2, responsabile di quella che oggi viene ricordata come Influenza di Hong Kong.

Il virus fu poi introdotto nella costa occidentale degli USA con elevati tassi di mortalità, contrariamente all'Europa dove l'epidemia, nel 1968-1969, non si associò

ad una elevata mortalità. In Italia fu responsabile di circa 20 mila decessi, perlopiù per le complicanze polmonari.

Globalmente la pandemia durò due anni e vennero infettate milioni di persone. Il numero dei decessi è stimato attorno ad un milione e il tasso di letalità registrato, inferiore allo 0,2%, fu più contenuto di quello calcolato per le pandemie precedenti forse per una parziale immunità acquisita nel corso del tempo dalla popolazione.²³

Sempre nel corso dello scorso secolo si verificarono due eventi quasi pandemici. Il primo, verificatosi nel 1947, fu la cosiddetta pseudo pandemia da H1N1. Tale virus si diffuse a partire dalla fine del 1946 in estremo oriente tra le truppe americane e successivamente si diffuse a livello globale. Per tale motivo può essere considerata una pandemia lieve mentre il numero di morti, a livello mondiale, fu relativamente basso.

Si verificò, in questo caso, il completo fallimento del vaccino antinfluenzale basato su un ceppo H1N1 che circolava nelle stagioni precedenti dato che il virus del 1947 si osservò essere molto diverso da quelli responsabili delle epidemie degli anni passati. Infine, si ricorda l'epidemia dell'influenza Russa da H1N1 diffusasi nel 1977. In questo caso vennero colpiti in particolar modo i giovani di età inferiore ai 25 anni con manifestazioni cliniche lievi. Il numero dei morti totale, a livello mondiale, si pensa sia stato inferiore ad un milione.^{20,24}

1.4 Epidemiologia

La patologia, diffusa in tutto il mondo, interessa individui di ogni età e colpisce senza sostanziali differenze di incidenza entrambi i sessi. A seconda del sierotipo di virus influenzale implicato, la malattia può presentare un andamento più o meno impattante.

Poiché nell'emisfero boreale e in quello australe l'inverno giunge in periodi dell'anno diversi, esistono due diverse stagioni influenzali ogni anno. L'OMS raccomanda, quindi, due diverse formulazioni di vaccino all'anno, una per il nord e una per il sud. Annualmente, a livello mondiale, si stima che siano colpiti dal virus influenzale da 350 milioni a 1 miliardo di persone, di esse, sono tra 3 e 5 milioni i casi di influenza che evolvono in complicanze con il decesso che avviene del 10% dei casi. L'incidenza è più elevata nei bambini in quanto non hanno una protezione immunitaria indotta da pregresse infezioni mentre le complicanze e la mortalità sono particolarmente elevate negli anziani e nei soggetti ad alto rischio.

Complessivamente sono ogni anno circa da 250 a 500 mila i pazienti che muoiono per le complicanze dell'infezione; sono spesso pazienti con pregressi fattori di rischio: individui di età superiore ai 65 anni, bambini sotto i 5 anni e persone affette da patologie croniche.²

In Europa, l'European Centre for Disease Prevention and Control (Ecdc) stima che siano circa 50 milioni i casi di influenza sintomatica ogni anno ed il numero di decessi per le complicanze dell'infezione si aggira tra i 15 e 70 mila.¹⁰

In Italia, generalmente va incontro alla patologia influenzale circa il 9% della popolazione, con oscillazioni stagionali, da valori esigui (4%), come osservato nella stagione 2005-06, ad un massimo del 15% registrato nella stagione 2017-18.¹¹

Nel nostro Paese il picco influenzale avviene ogni anno in inverno e, osservando i dati relativi alle diverse stagioni influenzali, si può evidenziare come il numero di casi inizi a crescere nel corso delle ultime settimane dell'anno, ed il picco stagionale venga raggiunto alla fine del mese di gennaio dell'anno successivo, con una drastica riduzione del numero dei casi che si realizza in genere nel mese di marzo. Casi sporadici possono verificarsi anche al di fuori delle normali stagioni influenzali, ma l'incidenza di questi casi è trascurabile.¹²

Le ragioni per cui il picco epidemico avvenga in inverno sembra che siano molteplici: Innanzitutto, una possibile spiegazione risiede nel fatto che nei mesi freddi le persone trascorrono maggior tempo in luoghi chiusi e questo facilita la trasmissione interpersonale del virus.

Un'altra spiegazione si basa sulla possibilità che le basse temperature rendendo l'aria più secca determinino la riduzione dell'idratazione mucosale impedendo la normale clearance muco-ciliare e quindi l'efficace clearance delle particelle virali. Inoltre, sembra che le basse temperature favoriscano la persistenza del virus sulle superfici.^{13,14}

Diversamente a quanto avviene nella nostra regione, nelle aree caratterizzate da clima tropicale, non essendo presente una vera e propria stagione invernale, i casi di influenza vengono riscontrati nel corso di tutto l'anno con epidemie più irregolari e meno prevedibili.

Complessivamente, ai tropici, l'incidenza delle sindromi influenzali risulta essere decisamente inferiore rispetto a quella che si riscontra nei paesi a clima più freddo.

1.5 Definizione di caso

Al fine di stimare l'impatto della patologia influenzale è fondamentale operare una diagnosi differenziale tra i casi certi e le infezioni da altri virus respiratori come il rinovirus, il virus respiratorio sinciziale, la parainfluenza e l'adenovirus che possono presentarsi come malattia simil-influenzale (ILI).

Per perseguire questo fine è di primaria importanza definire cosa si intenda per sindrome simil-influenzale e come individuare i casi certi di infezione da virus influenzale.

Per garantire la massima omogeneità di rilevazione, a partire dalla stagione influenzale 2014-2015, la definizione clinica di "sindrome influenzale" utilizzata dal sistema di sorveglianza nazionale Influnet per definirne i casi è stata modificata per renderla omogenea a quella adottata in Europa dall'ECDC.

In particolare, può essere definito come caso di sindrome simil-influenzale un qualsiasi soggetto che presenti un improvviso e rapido insorgere di almeno uno tra i seguenti sintomi generali:

- febbre o febbricola
- malessere/spossatezza
- mal di testa
- dolori muscolari

Associato ad almeno uno tra i seguenti sintomi respiratori:

- tosse
- mal di gola
- respiro affannoso.²⁵

In alcuni casi l'influenza si può presentare con manifestazioni cliniche gravi e complicanze respiratorie che definiscono il quadro di Sari (Severe Acute Respiratory Infection), mentre, nei casi ancora più gravi, si parla di Ards (sindrome da distress respiratorio acuto).

Il paziente con un quadro di Sari è un individuo ospedalizzato di qualunque età con almeno un segno o sintomo respiratorio (tosse, mal di gola, difficoltà respiratorie) presente al momento del ricovero o che compare nelle 48 ore successive associato ad almeno un segno o sintomo sistemico (febbre, cefalea, mialgia, malessere generalizzato) o ad un deterioramento delle condizioni generali (astenia, perdita di peso, anoressia o confusione e vertigini).²⁶

Per quanto riguarda la diagnosi clinica di influenza nel bambino bisogna tener conto del fatto che soprattutto quelli più piccoli non sono in grado di descrivere la sintomatologia sistemica, e, a differenza dell'adulto, manifestano più spesso sintomi come irritabilità, pianto e inappetenza. Frequente, soprattutto nel lattante, anche vomito e diarrea.²⁵

1.6 Diagnosi

Per la diagnosi di certezza dell'influenza è necessaria una conferma laboratoristica. È possibile effettuare l'isolamento del virus mediante coltura di campioni di secreto nasofaringeo; tuttavia, i risultati non sono sufficientemente rapidi per poter instaurare una terapia antivirale tempestivamente.

Attualmente si hanno a disposizione anche alcuni test di immunofluorescenza diretta che permettono di porre una diagnosi più precoce mediante dimostrazione di antigeni specifici virali sulle cellule epiteliali della mucosa delle alte vie respiratorie. Altre possibilità sono i test rapidi immunoenzimatici per l'identificazione di anticorpi antinfluenzali da tampone nasale.

Infine, possono essere applicate anche tecniche di biologia molecolare come la reazione polimerasica a catena (PCR).¹

1.7 Patogenesi, manifestazioni cliniche e complicanze

L'influenza è una malattia molto contagiosa che si trasmette per contagio interumano diretto per via aerea per mezzo di secrezioni rinofaringee emesse dal soggetto malato con colpi di tosse e starnuti. Gli adulti possono essere in grado di diffondere l'influenza ad altri da un giorno prima dell'inizio dei sintomi a circa cinque giorni dopo l'inizio dei sintomi.

Inizialmente l'infezione interessa le cellule dell'epitelio ciliato che riveste le alte vie respiratorie, poi, successivamente, in seguito alla lisi delle cellule infettate, avviene la liberazione e la conseguente disseminazione locale dei virioni. Il danneggiamento dell'epitelio respiratorio da parte del virus espone il paziente anche ad un aumentato rischio di superinfezioni batteriche, una delle principali complicanze della malattia.

Dopo un breve periodo di incubazione di soli due o tre giorni l'esordio clinico è spesso brusco con comparsa di febbre, faringodinia, tosse, artromialgie, astenia, cefalea. Specialmente nei bambini possono poi verificarsi anche nausea, vomito e diarrea. Nella maggior parte dei casi non si verificano complicanze e la guarigione avviene spontaneamente in non più di una settimana.¹

Nei pazienti con condizioni generali più scadenti possono verificarsi complicanze talvolta anche molto gravi associate ad un tasso di letalità ben più alto rispetto alla popolazione generale.²⁷

Una delle principali è sicuramente la polmonite che può essere di tre tipi diversi: primitiva virale, secondaria batterica o mista virale e batterica.

La polmonite virale primitiva è la complicanza più severa ma meno comune. In questo caso, i sintomi, in un paziente con influenza acuta, tendono a persistere più a lungo e ad associarsi anche a sintomi più severi a carico dell'apparato respiratorio come dispnea, tachipnea e nei casi più gravi ipossia e ipercapnia.

In questi pazienti si ha anche un aumentato rischio di polmoniti secondarie batteriche specialmente da *S. Pneumoniae* e da *S. Aureus*; In tal caso avviene una ripresa della febbre e dei sintomi respiratori dopo un iniziale miglioramento.

Altre comuni complicanze dell'influenza sono l'otite media, bronchiti, sinusiti; più raramente, invece, si possono sviluppare miocarditi, pericarditi ed encefaliti.²⁸

Infine, va ricordata la sindrome di Reye, condizione grave che può riguardare bambini e adolescenti in seguito ad un'infezione da parte del virus influenzale di tipo B. Si verifica solitamente dopo l'assunzione di acido acetilsalicilico e si manifesta con nausea, vomito, epatomegalia fino a sintomi dati dal coinvolgimento del SNC come letargia e coma.¹

1.8 Terapia

La gestione terapeutica dell'influenza si basa sull'impiego di farmaci per la terapia sintomatica e, in alcuni casi, su farmaci antivirali specifici.

Possono essere utilizzati per la gestione dei sintomi farmaci come antipiretici, sedativi della tosse, decongestionanti nasali e FANS. I salicilati, specialmente nei bambini, andrebbero evitati perché associati al rischio di insorgenza della sindrome di Reye.

Si hanno poi a disposizione alcuni farmaci antivirali che per essere efficaci devono essere somministrati entro 48 ore dalla comparsa dei sintomi.

Gli inibitori M2 sono dei bloccanti dei canali ionici virali e comprendono molecole come l'amantadina e la rimantadina; questi farmaci oggi non sono più utilizzati a causa della comparsa di ceppi virali resistenti.

Attualmente la terapia antivirale si basa sugli inibitori della neuraminidasi come Zanamivir e l'Oseltamivir (nome commerciale Tamiflu) che agiscono bloccando la liberazione dei virioni e quindi la diffusione dell'infezione determinando una riduzione della durata e della gravità dei sintomi.

Nel caso in cui il paziente dovesse sviluppare complicanze come polmoniti batteriche secondarie va ovviamente considerata la terapia antibiotica, la quale può essere anche presa in considerazione come profilassi nei soggetti particolarmente defedati.^{1,28,29}

1.9 Misure di contrasto

Ogni anno il Ministero della Salute predispone una circolare contenente le indicazioni per la prevenzione e il controllo dell'influenza stagionale: sorveglianza epidemiologica e virologica, prevenzione dell'influenza attraverso la vaccinazione e le misure di igiene e protezione individuale. Nella circolare sono indicate anche le

categorie di persone per le quali è raccomandata e offerta gratuitamente la vaccinazione.

Il Ministero della Salute monitora, inoltre, l'andamento delle vaccinazioni, pubblica i dati delle coperture vaccinali e promuove il sistema nazionale di sorveglianza epidemiologica e virologica dell'influenza, Influnet e la sorveglianza dei casi gravi e severi.

1.9.1 Norme igieniche

Come sappiamo la trasmissione del virus influenzale avviene per via aerea attraverso i droplets espulsi in seguito a starnuti, colpi di tosse, o anche semplicemente parlando. Va ricordato, però, che il contagio può avvenire anche attraverso il contatto diretto o indiretto con le secrezioni respiratorie contaminate. Si comprende in questo modo il rationale delle norme igieniche raccomandate dall'ECDC per prevenire il contagio da virus influenzali.

Viene consigliato, innanzitutto, di lavare regolarmente le mani e asciugarle correttamente; in assenza di acqua i disinfettanti per le mani a base alcolica costituiscono una valida alternativa.

Molto importante è anche coprire bocca e naso quando si starnutisce o si tossisce e successivamente lavarsi le mani. Coloro che presentano sintomi influenzali dovrebbero isolarsi volontariamente a casa e indossare mascherine chirurgiche in caso di contatto con altre persone. È fondamentale, quindi, evitare contatti stretti e prolungati con individui che presentano sintomi influenzali e altrettanto importante è evitare di toccarsi con le mani occhi, naso e bocca.²⁷

1.9.2 Vaccinazioni

La vaccinazione è la forma più efficace di prevenzione primaria. Grazie ai vaccini antinfluenzali si riduce drasticamente l'incidenza e la mortalità dell'influenza. Questo

vuol dire che viene aumentata la probabilità di non contrarre la malattia, mentre, nel caso in cui essa venga comunque contratta, la sintomatologia clinica è solitamente più lieve e le complicanze molto più rare.

Gli obiettivi della campagna vaccinale stagionale contro l'influenza sono molteplici: innanzitutto, la riduzione del rischio individuale di malattia, delle ospedalizzazioni e dei decessi, ma anche la riduzione del rischio di trasmissione del virus a soggetti ad alto rischio di complicanze o ospedalizzazione; infine, la riduzione dei costi sociali connessi con morbosità e mortalità.

Tali obiettivi sono perseguibili a condizione che si riesca a raggiungere una copertura vaccinale elevata nei gruppi di popolazione target. L'obiettivo minimo corrisponde ad avere una copertura del 75%, mentre una copertura ottimale sarebbe il 95%.²⁷

Il sito del Ministero della Salute rende disponibili i dati relativi alla copertura del vaccino antinfluenzale e da essi si evince che nella popolazione generale, per la stagione 2020/2021, la copertura vaccinale è stata del 23,7%, molto più alta rispetto a quella della stagione precedente (16,8%). Tale aumento è spiegato dalla maggiore consapevolezza diffusasi nella popolazione riguardo l'importanza dei vaccini nella prevenzione di malattie infettive in seguito all'avvento della pandemia da COVID-19. Per quanto riguarda, invece, l'andamento dei dati di copertura del vaccino antinfluenzale nella popolazione over65 si evidenzia, a partire dai primi anni del 2000, un trend positivo fino alla stagione 2009/2010 in cui si è osservato un drastico calo fino ad un valore minimo di copertura registrati nella stagione 2014/2015 pari al 48,6%. Dalla stagione successiva è ripreso un trend positivo arrivando ad una copertura del 65,3% nella scorsa stagione.¹⁷

La Circolare annuale "Circolare Prevenzione e controllo dell'influenza: raccomandazioni per la stagione 2021-2022" va a definire quali siano le categorie target. Il vaccino antinfluenzale è indicato per tutti i soggetti a partire dai sei mesi di vita che desiderino evitare la malattia influenzale e che non presentino specifiche controindicazioni. Il vaccino, nei bambini di età inferiore ai sei mesi, non è raccomandato in quanto sarebbe poco immunogenico e non conferirebbe una

sufficiente protezione. Per i soggetti che corrono un rischio maggiore di andare incontro a complicanze in caso di influenza, la vaccinazione è offerta ogni anno gratuitamente. Nei gruppi a rischio con massima priorità vi rientrano, per la stagione 2021-2022, operatori sanitari e adulti anziani.

Gli operatori sanitari, sia ospedalieri sia quelli delle strutture extra-ospedaliere di lungodegenza, sono considerati uno dei gruppi di massima priorità a cui somministrare il vaccino, in modo da ridurre il rischio di trasmissione dell'influenza a pazienti vulnerabili, l'assenteismo dovuto alla malattia e in generale viene ridotto l'impatto dell'influenza sul sistema sanitario. Altra categoria target sono gli adulti anziani e in particolare coloro che sono ricoverati in strutture di assistenza a lungo termine.

Vengono poi identificati ulteriori gruppi a rischio che dovrebbero ricevere il vaccino in via prioritaria. Fra questi vanno ricordate innanzitutto le donne in gravidanza, tutte le persone con patologie di base che aumentano il rischio di complicanze da influenza, quali diabete, ipertensione, HIV/AIDS, asma e altre malattie croniche cardiache o polmonari ed infine i bambini, specialmente quelli di età compresa tra i 6 mesi e i due anni, che presentano un rischio aumentato di sviluppare forme gravi di influenza.²⁷

Data l'elevata mutabilità del virus, come già spiegato, la composizione del vaccino antinfluenzale viene aggiornata annualmente sulla base delle informazioni epidemiologiche e virologiche raccolte dalla rete globale dei centri che si occupano della sorveglianza dell'influenza. È compito della sorveglianza virologica, in particolare, andare ad individuare quali siano i ceppi virali maggiormente circolanti in una determinata stagione e selezionare, appunto, quelli da inserire nella composizione dei vaccini per la stagione successiva. Tali raccomandazioni sono generalmente emanate ogni anno dall'OMS nel mese di febbraio.

Tutti i vaccini antinfluenzali disponibili in Italia sono stati autorizzati dall'Agenzia Europea del Farmaco (EMA) e/o dall'Agenzia italiana del Farmaco (AIFA). Tuttavia, non tutti i vaccini autorizzati per l'uso sono necessariamente disponibili sul mercato dato che è compito delle Regioni andare a stabilire mediante gare regionali,

annualmente, quali saranno i vaccini acquistati e quindi utilizzati in una data regione.^{30,31}

Per quanto riguarda la composizione del vaccino quadrivalente per l'emisfero settentrionale nella stagione 2021/2022 è la seguente:

Vaccini ottenuti in uova embrionate di pollo

- A/Victoria/2570/2019 (H1N1)pdm09-like virus
- A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)-like virus
- B/Washington/02/2019-like virus (lineaggio B/Victoria)
- B/Phuket/3073/2013-like virus (lineaggio B/Yamagata)

Nel caso dei vaccini trivalenti, l'OMS raccomanda l'inserimento del ceppo B/Washington/02/2019-like virus (lineaggio B/Victoria), in aggiunta ai due ceppi di tipo A sopra menzionati.

Vaccini ottenuti su colture cellulari

- A/Wisconsin/588/2019 (H1N1)pdm09-like virus
- A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)-like virus
- B/Washington/02/2019-like virus (lineaggio B/Victoria)
- B/Phuket/3073/2013-like virus (lineaggio B/Yamagata)

Nel caso dei vaccini trivalenti, l'OMS raccomanda l'inserimento del ceppo B/Washington/02/2019-like virus (lineaggio B/Victoria), in aggiunta ai due ceppi di tipo A sopra menzionati.³²

Per quanto riguarda l'efficacia dei vaccini antinfluenzali, essa varia di anno in anno in base ad una serie di fattori come innanzitutto le caratteristiche delle persone vaccinate (età e stato di salute), oltre che in base al grado di "match" tra i ceppi di

virus inclusi nel vaccino e quelli circolanti. In ogni caso, il vaccino si dimostra efficace nel ridurre il rischio di contrarre la malattia e le forme gravi di essa.³³

Nonostante la comprovata efficacia e sicurezza del vaccino antinfluenzale vanno comunque definite alcune controindicazioni. Il vaccino, innanzitutto, non può essere somministrato a bambini di età inferiore ai sei mesi, ad individui che abbiano manifestato una reazione allergica grave dopo la somministrazione di una precedente dose e ad individui con malattia acuta di media o grave entità in corso. Infine, non va somministrato ad individui che abbiano sviluppato una sindrome di Guillain Barré nelle sei settimane successive ad una precedente vaccinazione.

Come ogni farmaco, anche il vaccino antinfluenzale può causare effetti indesiderati che sono comunque rari e di lieve entità. Tra le reazioni avverse più comuni vanno ricordate le seguenti: gonfiore-arrossamento nella sede dell'iniezione, malessere generale, febbre e dolori muscolari. Possono infine verificarsi, seppur molto raramente, reazioni allergiche talvolta anche molto gravi.²⁷

1.9.3 Sorveglianza dell'influenza

La sorveglianza epidemiologica delle malattie è uno strumento di prevenzione molto importante basato su una rete di notifica degli eventi e su un sistema di raccolta ed analisi dei dati.

L'OMS ha avviato, a partire dagli anni '50, un programma internazionale di sorveglianza per l'influenza. Il centro di sorveglianza principale è il Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) che rappresenta un importante meccanismo di allerta globale per la comparsa di virus influenzali con potenziale pandemico.

Il sistema nazionale di sorveglianza epidemiologica e virologica dell'influenza in Italia si chiama InFluNet e fa capo all'Istituto Superiore di Sanità. Il suo principale obiettivo è quello di funzionare da sistema di allerta in grado di rilevare un eventuale aumento

improvviso di incidenza settimanale delle sindromi simil-influenzali a livello locale e individuare i principali ceppi circolanti. Il sistema InluNet si articola in una sorveglianza epidemiologica e in una virologica.

Innanzitutto, per quanto riguarda la sorveglianza epidemiologica, possiamo affermare che ha come principale obiettivo quello di andare a monitorare l'andamento dell'incidenza delle ILI nel corso delle stagioni influenzali. In particolare, ha il compito di andare a stimare la settimana di inizio, la durata, l'intensità dell'epidemia stagionale oltre che l'incidenza per fascia di età e per settimana. Tutti questi dati vengono poi condivisi con l'ECDC.

Il sistema di monitoraggio è basato su una rete di circa mille medici "sentinella" comprendente sia medici di Medicina Generale (MMG) sia Pediatri di Libera scelta (PLS) che vengono reclutati a livello regionale e hanno il compito di rilevare e segnalare settimanalmente i casi di sindrome simil influenzale (ILI) osservati tra i loro assistiti. Nell'eventualità in cui non dovessero essere rilevati casi per una specifica settimana è comunque necessario che il medico comunichi l'assenza di casi.

Per ottenere dei dati solidi riguardo l'andamento delle ILI sull'intero territorio nazionale è necessario arruolare un campione di medici sentinella sufficiente a garantire la sorveglianza di almeno il 4% della popolazione.

I dati vengono rilevati dalla 42^a settimana alla 17^a settimana dell'anno successivo (da ottobre ad aprile) e vengono analizzati dall'Istituto Superiore di Sanità che ha anche il compito di pubblicare ogni settimana nel rapporto InluNet i risultati relativi all'andamento Nazionale dell'influenza. Al termine di ogni stagione viene pubblicato un rapporto conclusivo con i dati dell'intero periodo suddivisi per settimana, per regione e per età.

Per quanto riguarda la sorveglianza virologica, invece, si prefigge come obiettivo quello di monitorare la circolazione dei diversi tipi (A e B) e sottotipi di virus influenzali nelle diverse aree geografiche e nei diversi periodi della stagione epidemica. È di fondamentale importanza anche la valutazione dell'omologia

antigenica tra ceppi epidemici e ceppi vaccinali oltre che la valutazione della suscettibilità dei virus influenzali in circolazione agli antivirali, con particolare riferimento ai farmaci inibitori della neuraminidasi. L'identificazione dei ceppi virali circolanti è estremamente utile anche per definire la composizione vaccinale utilizzabile nella stagione successiva.

La sorveglianza virologica inizia ogni anno a partire dalla 46^a settimana e si protrae per l'intero periodo di sorveglianza.

A partire dal 2020, con l'inizio della pandemia da COVID-19 tuttora in corso, i laboratori della rete Influnet sono stati invitati a testare sullo stesso tampone la presenza dei virus influenzali e del SARS-CoV-2. A tal fine viene impiegato un test di multiplex real-time PCR per la ricerca in contemporanea di Influenza A, B e di SARS-CoV-2. Il campione viene prelevato dal medico sentinella durante la fase acuta di malattia e non oltre il settimo giorno dall'esordio dei sintomi e viene inviato al laboratorio di riferimento che lo utilizzerà.

A partire dalla stagione 2009/2010 viene effettuata in Italia anche la sorveglianza delle forme gravi e complicate di influenza stagionale. Si intendono quei casi in cui il paziente, con una diagnosi di influenza confermata dal laboratorio, sviluppa delle complicanze della malattia tali per cui necessita del ricovero in un'Unità di terapia intensiva (UTI) e/o il ricorso alla terapia in Ossigenazione extracorporea a membrana (ECMO).

È proprio grazie all'integrazione di questi diversi sistemi di sorveglianza che si riesce a monitorare la circolazione dei virus influenzali durante i periodi epidemici e valutare l'efficacia delle misure di prevenzione e di contenimento della diffusione del virus messe in atto.

Inoltre, durante le fasi inter-pandemiche, viene redatto e costantemente aggiornato il Piano strategico-operativo nazionale di preparazione e risposta a una pandemia influenzale (PanFlu).^{25,27}

2 DISEGNO DELLO STUDIO

Il nostro studio si inserisce in un contesto di sorveglianza epidemiologica dei patogeni respiratori all'interno del setting di cura ospedaliero.

I dati raccolti considerano un ampio periodo di studio ed offrono la possibilità di effettuare un confronto tra la modalità di circolazione del virus influenzale nel periodo pre pandemico e durante la pandemia Covid-19. Scopo dello studio è stato quello di stimare la prevalenza e l'andamento epidemiologico dei virus influenzali (complessiva e per sottotipo), rilevati in campioni afferenti al laboratorio di Igiene del Policlinico San Martino di Genova, nel corso delle stagioni influenzali comprese tra il 2014 ed il 2022.

Inoltre, è stata eseguita la tipizzazione dei virus influenzali individuati nel corso della stagione influenzale 2021-22, al fine di individuare le caratteristiche specifiche dei sottotipi attualmente circolanti.

3 MATERIALI E METODI

Abbiamo condotto un'analisi retrospettiva di un database relativo a 12461 episodi, contenente i risultati di laboratorio di test effettuati su aliquote naso-/orofaringee di adulti (18-64 anni) e ultrasessantacinquenni (>65 anni) afferenti al Policlinico S. Martino di Genova nel corso di otto stagioni invernali successive (2014-2022). Inoltre, i campioni positivi per influenza di aliquote naso-/orofaringee (conservate a -80 °C) raccolte durante la stagione invernale 2021-22 e ritenuti adeguati per l'analisi, sono stati sottoposti a sequenziamento genico.

Il rilevamento dei virus respiratori nel corso delle stagioni di cui sopra è stato eseguito utilizzando il pannello Allplex Respiratory Panel Assays 1-4 (Seegene Inc., South Korea), secondo le istruzioni del produttore.

Allplex Respiratory Panel Assays 1-4 utilizzano una tecnologia PCR multiplex per rilevare simultaneamente più patogeni respiratori in campioni raccolti con tampone nasofaringeo (NPS). Essendo basato sulla tecnologia MuDT™ di Seegene, questo test permette di rilevare valori di soglia di ciclo (Ct) multipli degli analiti positivi. In totale, 20 patogeni virali (RSV-A, RSV-B, SARS-CoV-2, A(H1N1), A(H1N1) pdm09, A(H3N2), influenza B, Adenovirus, Enterovirus, Metapneumovirus, Parainfluenza virus (PIV) 1, PIV-2, PIV-3, PIV-4, Bocaviruses 1-4, Coronaviruses 229E, NL63, OC43 e rhinovirus) e 7 patogeni batterici (*Streptococcus pneumoniae*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*) sono testati. I campioni con valori di Ct <40 sono generalmente considerati positivi.

Nell'ambito di questo studio verrà considerata esclusivamente l'indagine per virus influenzale ed i pannelli saranno utilizzati per stimare la prevalenza e l'andamento epidemiologico dei virus influenzali sia complessivamente che per sottotipo.

In seguito all'estrazione dal database, i dati di ogni stagione influenzale sono stati elaborati su base stagionale e su base mensile, tabulandoli nei fogli di calcolo Excel (Microsoft Corp).

I seguenti parametri mensili sono stati esaminati:

- il numero dei campioni naso-/orofaringei analizzati
- il numero dei campioni positivi all'influenza nella popolazione totale di riferimento e per classi di età 18–64, ≥ 65 anni;

Le curve epidemiche influenzali sono state visualizzate e caratterizzate tramite grafici a linee.

È stata in seguito calcolata la prevalenza dell'infezione da virus influenzali sia cumulativa sia per fasce di età.

I risultati sono stati espressi come il numero di campioni positivi per influenza A o B sul totale dei campioni.

Le differenze nel timing delle epidemie influenzali sono state descritte narrativamente.

Nell'analisi descrittiva i dati sono stati presentati separatamente per il sottotipo virale.

4 RISULTATI

Il database iniziale comprendeva 12461 esiti di test effettuati su aliquote naso-/orofaringee di pazienti afferenti al Policlinico San Martino di Genova con sintomatologia di ARI nel corso di otto stagioni invernali successive (2014-2022).

Abbiamo eseguito una selezione dei campioni isolando quelli testati per influenza, ottenendo così un database che contava 12193 esiti.

Nella tabella sottostante (tabella 1) si possono apprezzare i risultati relativi al tasso di positività per virus influenzali riscontrati nel periodo di studio.

STAGIONE ANALIZZATA	N° CAMPIONI TESTATI PER INFLUENZA	Positività (%)						
		NOVEMBRE	DICEMBRE	GENNAIO	FEBBRAIO	MARZO	APRILE	TOTALE STAGIONE
STAGIONE 14-15	1174	1,8	2,7	10,8	12,1	8,1	1,2	7,3
STAGIONE 15-16	1055	0,0	0,0	1,5	3,6	3,7	2,3	2,1
STAGIONE 16-17	1490	0,0	13,4	20,3	15,3	1,9	1,0	10,7
STAGIONE 17-18	1991	0,8	15,5	30,8	10,3	6,9	0,7	14,5
STAGIONE 18-19	2387	2,6	5,4	14,7	20,9	8,6	4,5	11,5
STAGIONE 19-20	2267	0,0	1,8	6,2	12,2	6,2	0,0	6,5
STAGIONE 20-21	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
STAGIONE 21-22	1709	0,0	0,0	0,0	0,5	11,7	7,6	2,7

Tabella 1 - Tasso di positività per virus influenzali riscontrati nel periodo di studio.

Il tasso stagionale di positività ai virus influenzali riscontrato sui campioni di soggetti afferenti al nostro Ospedale è così descritto:

- stagione 2014-2015: sono stati analizzati 1174 campioni dei quali 86 positivi per influenza; il picco di incidenza è stato raggiunto tra gennaio e febbraio 2015 con tasso di positività pari al 10.73% e 12.08%, rispettivamente.
- stagione 2015-2016: la stagione è stata caratterizzata da un tasso di positività per influenza esiguo, con 22 campioni positivi su 1055 esaminati e tasso di positività massimo registrato tra febbraio e marzo 2016 pari a 3.63% e 3.65% rispettivamente.
- stagione 2016-2017: sono stati analizzati 1490 campioni dei quali 160 positivi per influenza; il picco di incidenza è stato raggiunto anticipatamente rispetto alle stagioni precedenti; elevati valori di positività sono stati registrati da dicembre 2016 a febbraio 2017 (tassi di positività 13.36%, 20.30%, 15.32%)
- stagione 2017-2018: sono stati analizzati 1991 campioni dei quali 289 positivi per influenza; la stagione si è caratterizzata per un insolito tasso di positività per virus influenzale di tipo B (177/289 pari al 61.2% del totale); il tasso di positività complessivo è stato massimo nel mese di gennaio 2018 raggiungendo il 30% dei campioni testati.
- stagione 2018-2019: sono stati analizzati 2387 campioni dei quali 275 positivi per influenza; la stagione si è caratterizzata per la totale assenza di isolati di virus influenzali di tipo B; il picco del tasso di positività complessivo è stato raggiunto nel mese di febbraio 2019 con valori del 20.86% dei campioni testati.

- stagione 2019-2020: sono stati analizzati 2267 campioni dei quali 148 positivi per influenza; la stagione si è caratterizzata per esigui campioni positivi ai virus influenzali e il tasso di positività complessivo maggiore è stato raggiunto nel mese di febbraio 2020 con valori del 12.18 % dei campioni testati.
- stagione 2020-2021: sono stati analizzati 120 campioni per influenza con nessuna positività riscontrata; la stagione ha coinciso con la pandemia da Sars-Cov-2, pertanto l'attività diagnostica è stata maggiormente indirizzata al rilevamento di tale agente patogeno; a seguito di ciò nella stagione influenzale 2020-2021 il numero di campioni testati per influenza è stato esiguo e sebbene questo potrebbe rappresentare un bias, la stagione si è caratterizzata per l'assenza di circolazione dei virus influenzali.
- stagione 2021-2022: sono stati analizzati 1709 campioni, 49 dei quali positivi per influenza; la stagione è stata caratterizzata da un picco di incidenza tardivo raggiunto nel mese di marzo 2022 con valori del 11.68%.

Nella figura 1 viene rappresentata la curva epidemica influenzale. Tale grafico mostra come sia stato variabile il tasso di positività nel corso delle diverse stagioni ed i relativi picchi di incidenza.

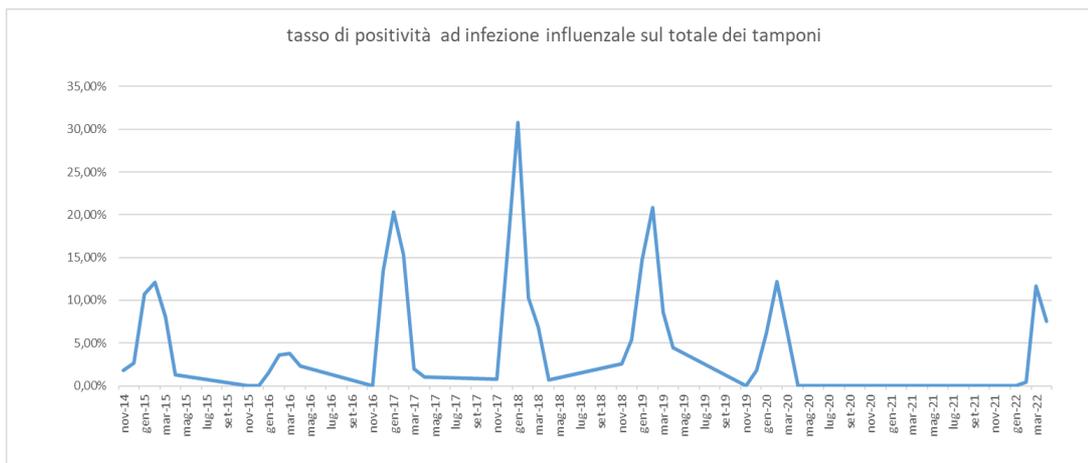


Figura 1 - Curva epidemica influenzale relativa al Policlinico San Martino nel periodo di studio.

Di seguito, nella figura 2, viene rappresentato l'andamento della circolazione del virus influenzale A e del virus influenzale B registrata nel corso delle ultime otto stagioni su base mensile.

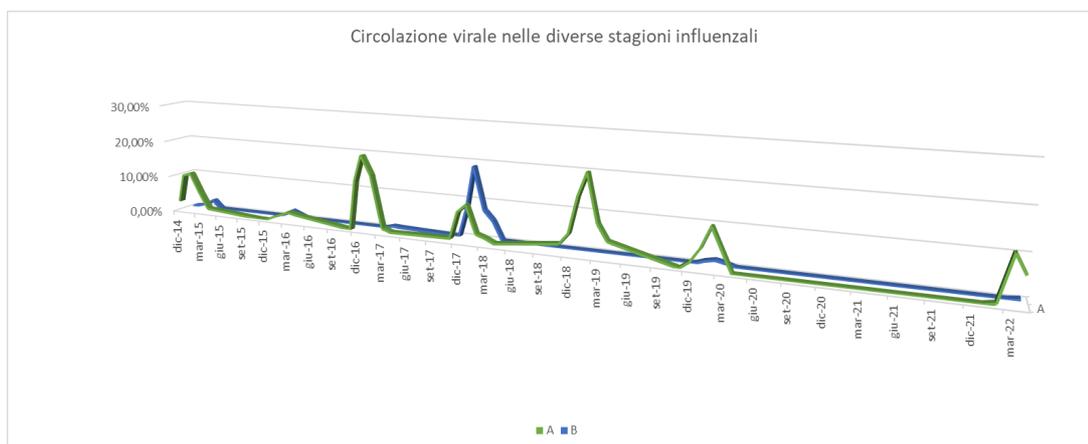


Figura 2 - Circolazione di virus influenzale A e virus influenzale B registrata.

La stratificazione del tasso di positività per influenza all'interno delle due popolazioni di studio (<65 anni e >65 anni) mostra nel complesso una maggiore circolazione virale di tipo A ed un maggior numero di campioni positivi tra i soggetti ultrasessantacinquenni.

Di seguito, nella tabella 2 e tabella 3 sono rappresentati i numeri grezzi stagionali su base mensile e la rappresentazione degli stessi in tassi percentuali e grafico (figura 3).

stagione	NOV			DIC			GEN			FEB			MAR			APR		
	N' test	FLU A	FLU B	N' test	FLU A	FLU B	N' test	FLU A	FLU B	N' test	FLU A	FLU B	N' test	FLU A	FLU B	N' test	FLU A	FLU B
14-15	110	2	0	150	4	0	223	23	1	273	30	3	259	15	6	159	2	0
15-16	138	0	0	160	0	0	194	2	1	220	4	4	213	6	2	130	3	0
16-17	103	0	0	232	31	0	389	79	0	274	42	0	301	4	2	191	1	1
17-18	123	1	0	277	22	21	591	71	111	339	9	26	379	7	19	282	2	0
18-19	192	5	0	349	19	0	536	79	0	580	121	0	441	38	0	289	13	0
19-20	252	0	0	392	7	0	580	31	5	673	73	9	370	20	3	0	0	0
20-21	21	0	0	16	0	0	25	0	0	22	0	0	18	0	0	18	0	0
21-22	231	0	0	432	0	0	211	0	0	216	1	0	214	25	0	304	22	1

Tabella 2 - Numeri assoluti stagionali su base mensile dei test positivi per virus influenzale di tipo A e B.

	<u>stagione 14-15</u>		<u>stagione 15-16</u>		<u>stagione 16-17</u>		<u>stagione 17-18</u>		<u>stagione 18-19</u>		<u>stagione 19-20</u>		<u>stagione 20-21</u>		<u>stagione 21-22</u>	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<65 aa	30	5	10	3	67	3	48	57	110	0	11	2	0	0	19	0
>65aa	46	5	5	4	90	0	64	120	165	0	120	15	0	0	28	1

Tabella 3 - Numeri assoluti stagionali dei test positivi per virus influenzale stratificati per tipologia virale (A o B) e classe di età.

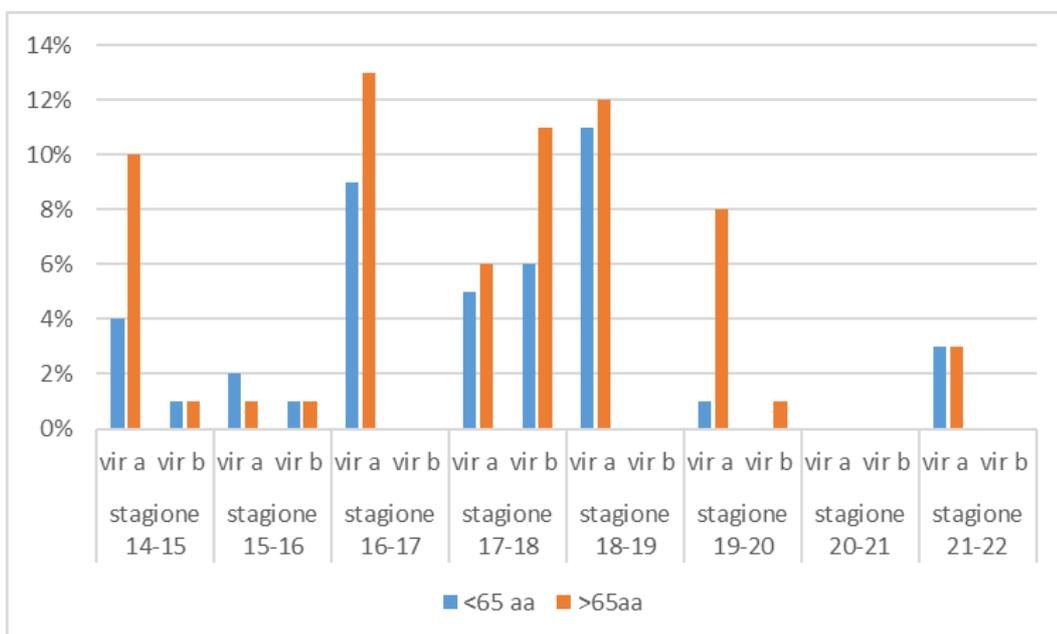


Figura 3 - Tasso di positività per sottotipo influenzale nelle due popolazioni di studio.

Nel complesso il profilo epidemiologico rilevato dal nostro studio durante il periodo preso in esame (figura 4) ricalca quanto osservato a livello nazionale, come si può notare dal confronto tra la figura 4 e figura 5.

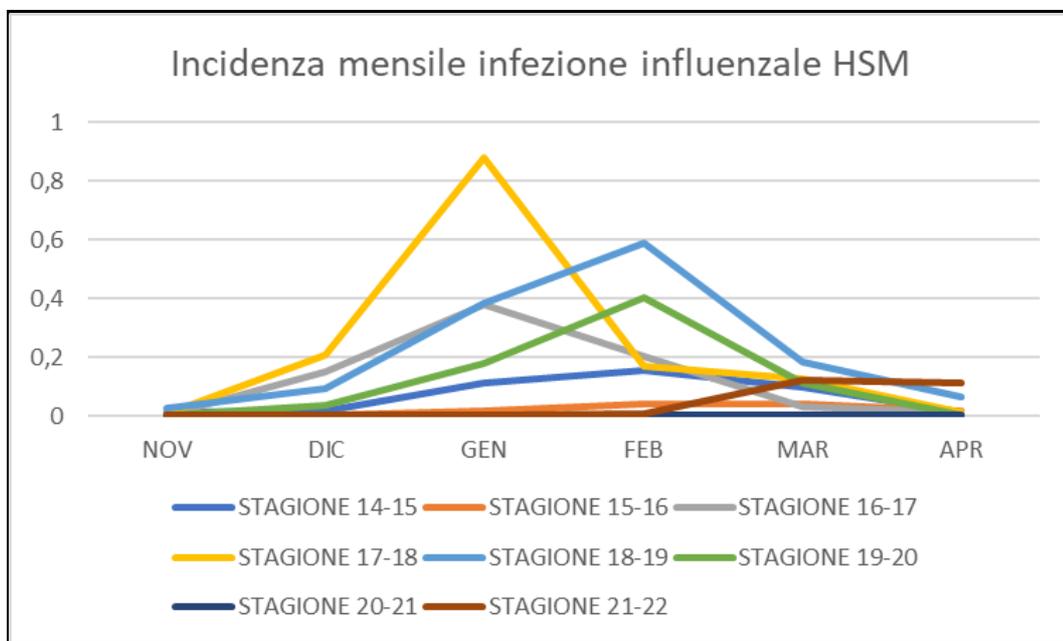


Figura 4 - Profilo epidemiologico Policlinico San Martino.

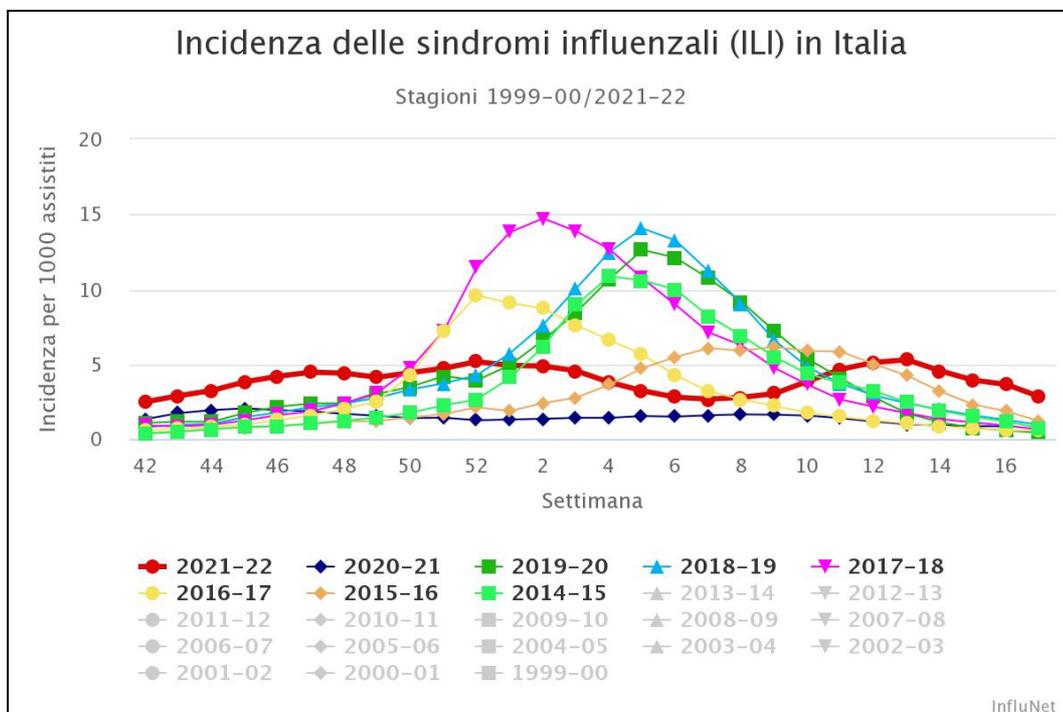


Figura 5 - Incidenza nazionale ILI.

Dati degni di particolare attenzione che emergono dal nostro studio riguardano le stagioni influenzali 2017-2018, 2020-2021 e 2021-2022.

Nella stagione 2017-2018 si è registrata la maggior prevalenza stagionale di infezione (14,2%), con il picco a gennaio 2018 (30%).

Questo dato è in linea con l'andamento nazionale e vede, a differenza delle altre stagioni, come dominante il virus di tipo B (figura 6 e figura 7).

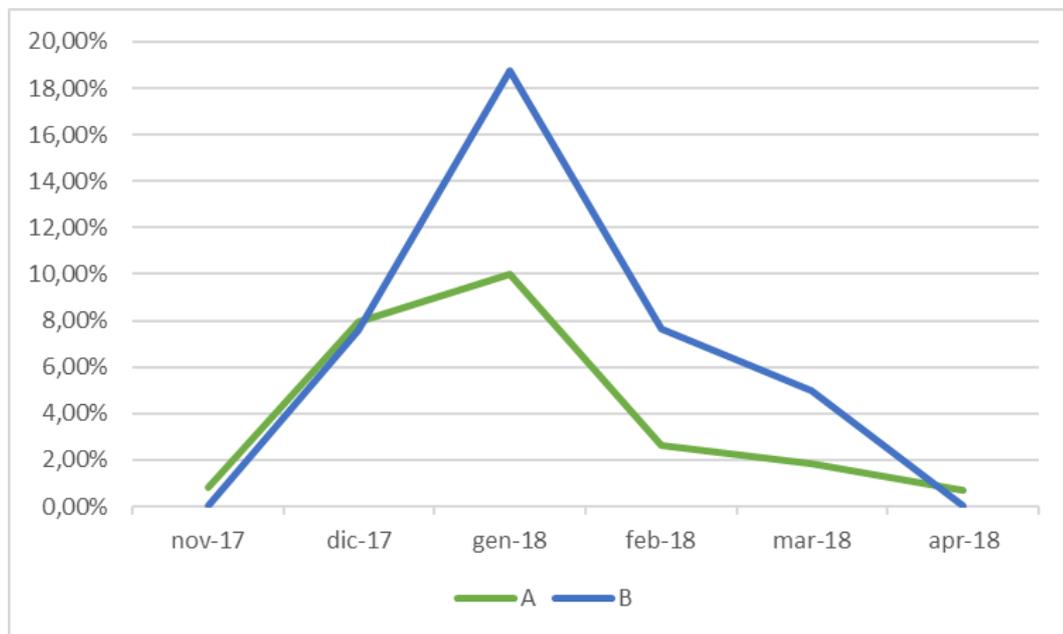


Figura 6 - Rappresentazione grafica della tipizzazione virale relativa alla stagione 2017-18 nei campioni oggetto dello studio.

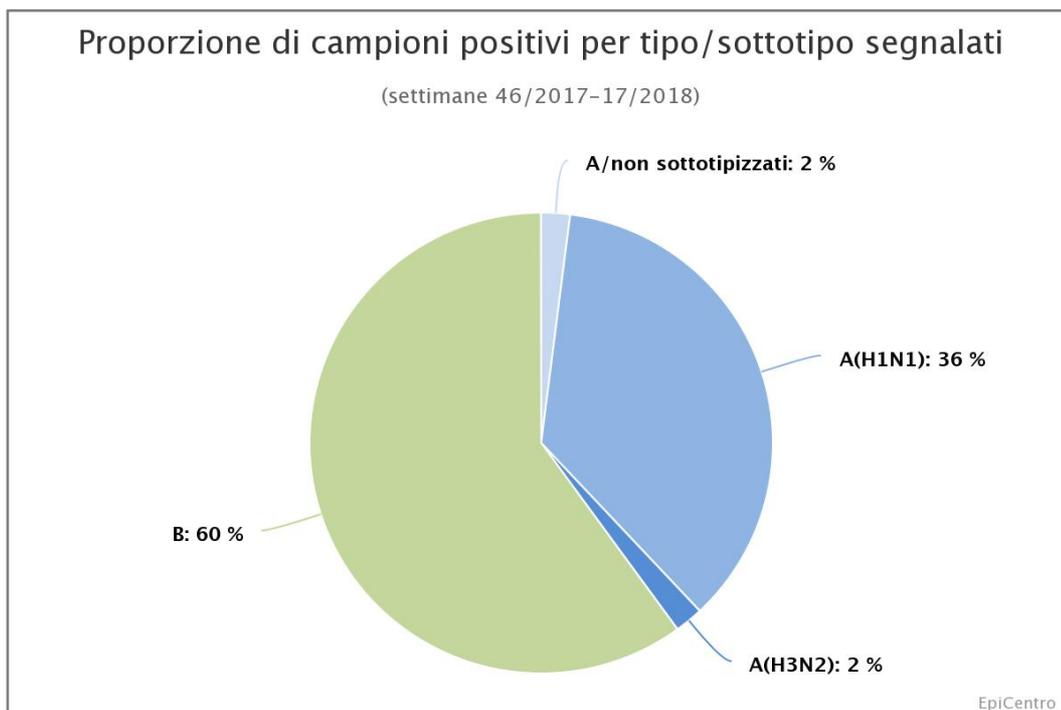


Figura 7 - Rappresentazione grafica della tipizzazione virale relativa alla stagione 2017-18 in Italia.

Altro dato degno di attenzione è l'assenza di campioni positivi per influenza (nonostante il bias dei pochi test eseguiti) nella stagione 2020-2021; la stagione, coincisa con la prima fase del periodo pandemico Covid-19 ha visto infatti la totale scomparsa della circolazione del virus influenzale (figura 8) analogamente a quanto osservato a livello nazionale (figura 9).

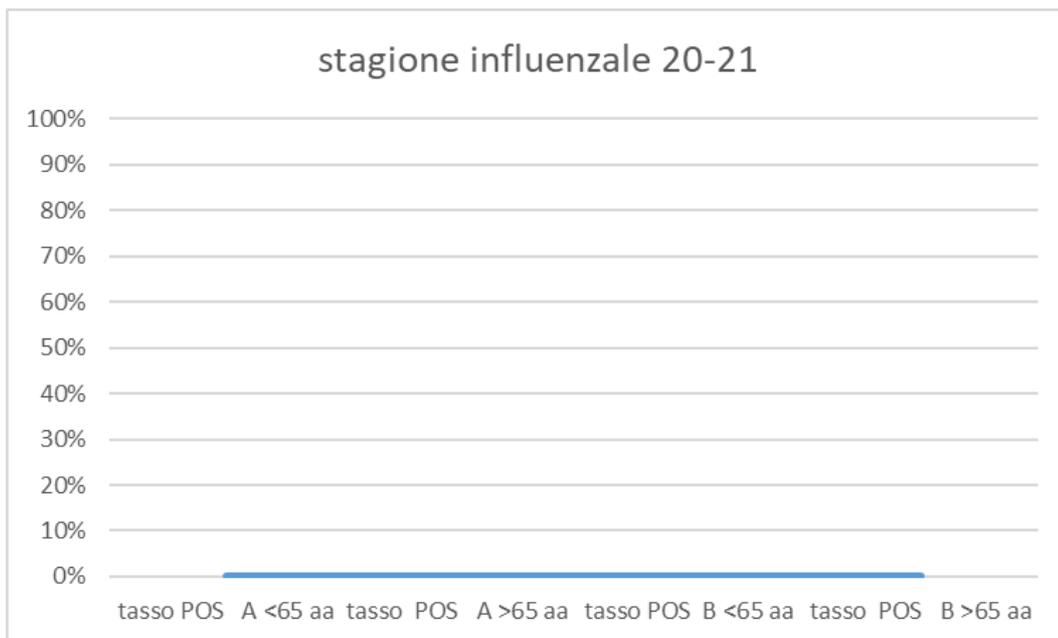


Figura 8 - Assenza di circolazione virale nella stagione 2020-2021.

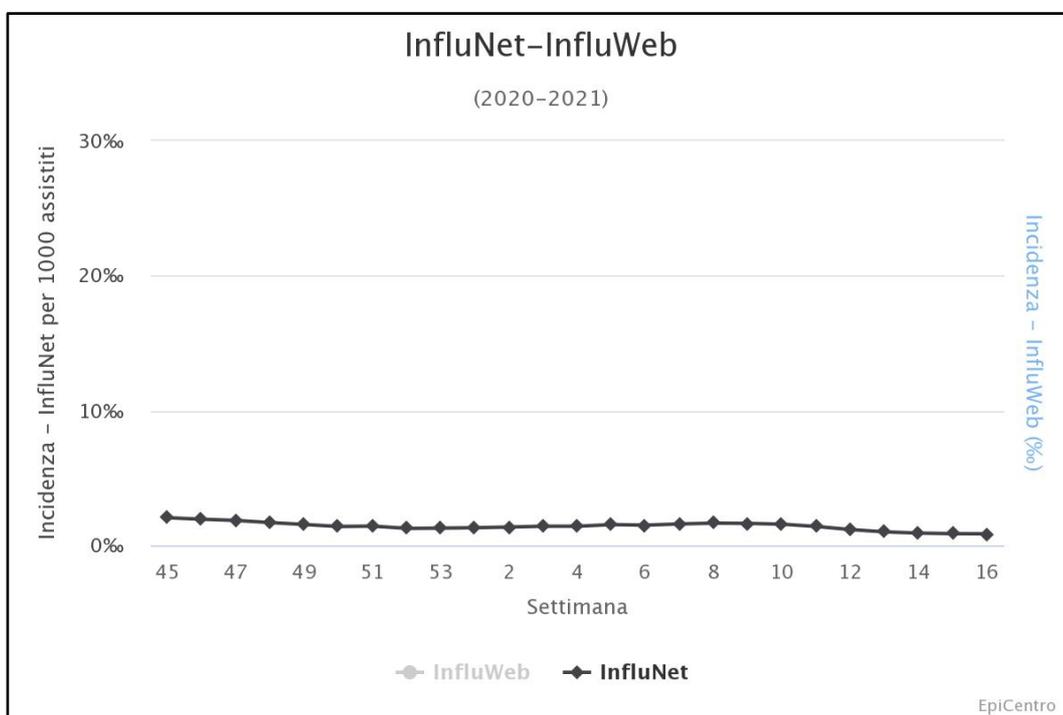


Figura 9 - Incidenza nazionale influenza/1000 assistiti nella stagione 2020-2021.

Nella stagione 2021-2022 l'infezione influenzale è riapparsa con le prime positività registrate a febbraio 2022 e con un picco registrato nel mese di marzo (figura 4). Tale profilo si è verificato anche su scala nazionale con circolazione dei virus influenzali, nel complesso, più limitata rispetto alle stagioni pre-Covid-19 (figura 10).

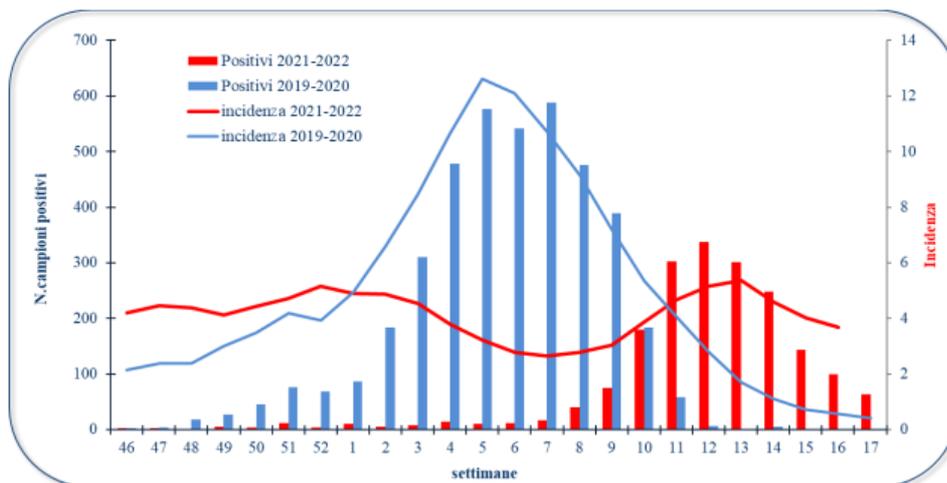


Figura 10 - Influnet: Andamento settimanale dei campioni positivi della presente stagione rispetto alla stagione 2019/2020.³⁷

Caratteristiche peculiari della stagione sono state un avvio ritardato ed una predominante presenza del virus influenzale di tipo A, in particolare appartenente al sottotipo H3N2 per il 99% degli isolati.

Le analisi di caratterizzazione delle HA di tali virus evidenziano nella maggior parte dei casi l'appartenenza del ceppo al sottogruppo 3C.2a1b.2a.2 mentre solo un numero esiguo di virus, isolati nella prima parte della stagione, appartengono al subclade 3C.2a1b.2a.1 (ceppo di riferimento: A/Cambodia/e0826360/2020, contenuto nel vaccino 2021/2022 per l'emisfero nord) e nel subclade 3C.2a1b.1a (ceppo di riferimento: A/Denmark/3264/2019).³⁷

Analogamente a quanto evidenziato a livello nazionale, la caratterizzazione dei virus influenzali individuati nell'ultima stagione del nostro studio mostra una pressoché

totale circolazione di virus influenzale A appartenente al sottotipo H3N2 (22/23 campioni) ed un solo campione positivo per virus B con una netta sostituzione del subclade 3C.2a1b.2a.1 con il subclade 3C.2a1b.2a.2.

Nella figura sottostante (figura 11) si può apprezzare l'albero filogenetico relativo ai campioni esaminati.

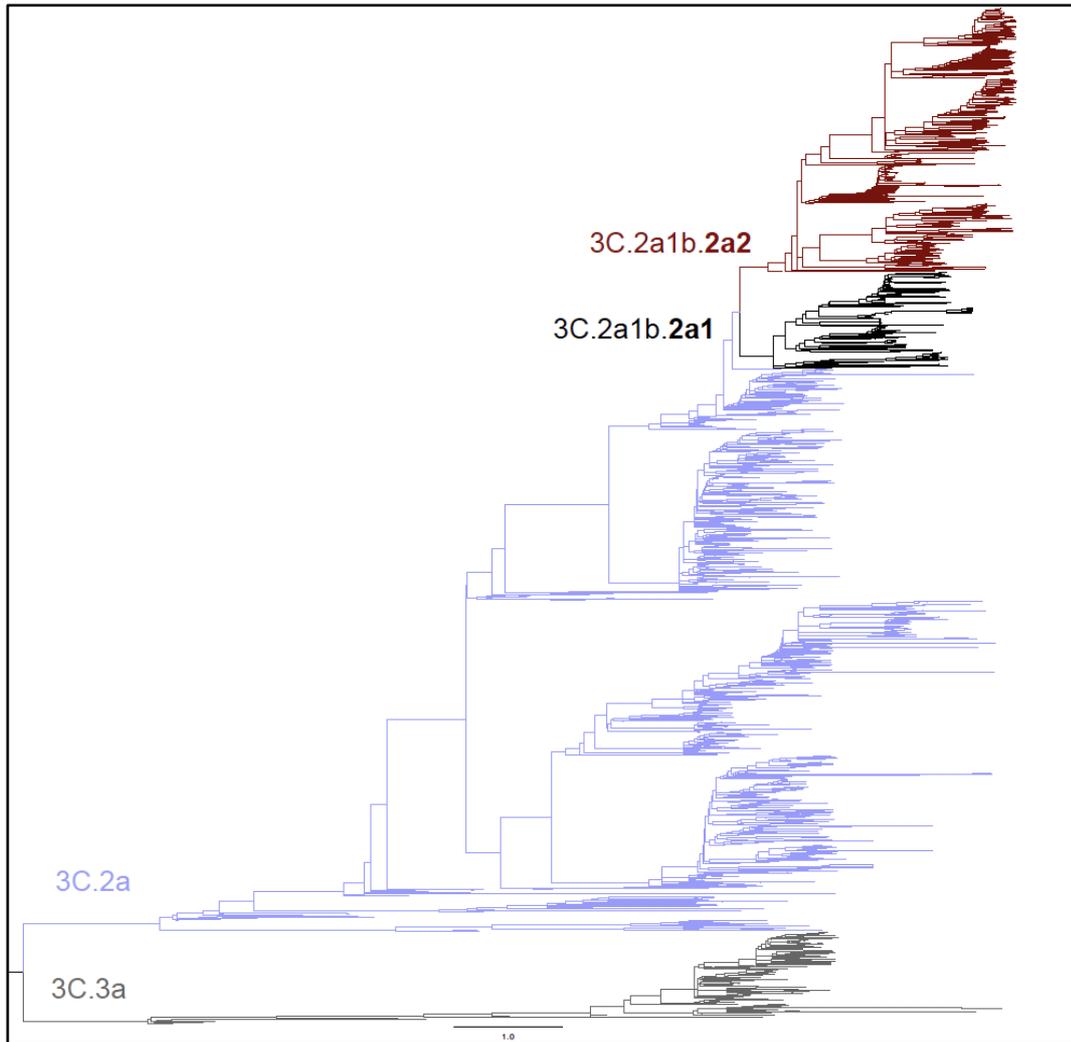


Figura 11 - Albero filogenetico, isolati Policlinico San Martino.

5 CONCLUSIONI

La pandemia globale da COVID-19, e le norme comportamentali messe in atto su scala mondiale al fine di fronteggiarla, hanno profondamente variato l'epidemiologia dei virus respiratori.

In particolare, in Europa, durante la stagione invernale 2020-2021, sono stati segnalati rispetto alla stessa settimana dell'anno precedente, solo 168 casi di Influenza rispetto ai 11978 casi dell'anno precedente, e solo 30 casi di RSV rispetto ai 3895 casi.³⁸

È tuttavia possibile che i test di laboratorio in uso nel periodo pandemico, principalmente tarati sulla rilevazione di SARS-CoV-2, abbiano sottostimato la reale prevalenza di altri patogeni respiratori.

Dall'inizio della pandemia Covid-19, gli studi di sorveglianza mirati all'individuazione di possibili co-circolazioni tra virus influenzali e Sars-Cov-2 sono stati pochi³⁹, e il nostro studio, nell'esaminare l'andamento epidemico dei virus influenzali nel corso di otto stagioni consecutive, ha evidenziato sia l'impatto determinato dalla circolazione di differenti tipologie virali sia il peso esercitato dalle misure di protezione utilizzate con l'avvento della pandemia da sars-cov-2 sulla circolazione del virus influenzale.

È interessante, da un punto di vista epidemiologico, esaminare come si sia modificata la curva epidemica dell'infezione da virus influenzali con l'avvento della pandemia da COVID-19. Nel nostro Paese, in linea con il resto del mondo, si è osservato, a partire da tale periodo, una drastica riduzione del numero dei casi di sindromi influenzali.

L'incidenza, per la stagione influenzale 2020-2021, è rimasta sotto il valore soglia di 3,16 casi per 1.000 assistiti. Questo risultato dimostra che il periodo epidemico per la suddetta stagione non sia mai iniziato.

A fine gennaio 2021 l'incidenza era pari a 1,4 casi per 1.000 assistiti, mentre nella stagione precedente (2019/2020), nello stesso periodo, era di 12,6 casi per 1.000 assistiti.

La circolazione del virus, probabilmente, è stata condizionata dalle misure di prevenzione messe in atto per contrastare la pandemia in corso da COVID-19, dalla limitata introduzione di virus influenzali nei Paesi a causa delle restrizioni di viaggio e chiusura delle frontiere, dalla copertura vaccinale antinfluenzale raggiunta nella popolazione e dalla competizione virale.

Nell'esaminare la mancata circolazione influenzale va considerata, inoltre, l'elevata copertura vaccinale antinfluenzale registrata nella stagione 2020-2021.¹⁵

Nell'autunno 2020 si è vaccinato il 23,7% degli italiani, quasi sette punti percentuale in più rispetto all'anno precedente (16,8%), grazie anche all'intensa campagna informativa condotta. L'aumento della copertura vaccinale ha riguardato tutte le fasce di età, e, in particolar modo, quelle pediatriche, in cui è sempre stata molto bassa. Il maggior incremento si osserva nella fascia di età 2-4 anni, in cui si è passati dal 4,2% al 19,0%.^{16,17}

Per quanto riguarda la stagione influenzale 2021-2022, si può osservare come l'incidenza sia maggiore rispetto a quella dell'anno precedente sebbene si mantenga a livelli inferiori a quelli che si avevano nel periodo pre-Covid-19.

Questo aumento di incidenza si pensa sia dovuto all'allentamento delle misure di contenimento della pandemia da SARS-CoV-2.

Questi dati dovranno essere ulteriormente esaminati al fine di trarre conclusioni accurate e aggiornate, fondamentali per pianificare ed impostare strategie preventive efficaci, che, soprattutto nella nuova era epidemiologica (pandemica e post-pandemica), saranno fortemente necessarie.

BIBLIOGRAFIA

1. Moroni, Antinori, Vullo et al. Manuale di Malattie Infettive. Milano: Edra, 2017.
2. ISS, Epicentro ISS - Aspetti epidemiologici nel mondo. <https://www.epicentro.iss.it/influenza/epidemiologia-mondo>.
3. Ministero della Salute. Prevenzione e controllo dell'influenza. <https://www.salute.gov.it/portale/influenza/dettaglioContenutiInfluenza.jsp?lingua=italiano&id=685&area=influenza&menu=vuoto>.
4. ISS, Epicentro ISS - Informazioni generali. <https://www.epicentro.iss.it/influenza/influenza#writers>.
5. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, Palese P, Shaw ML, Treanor J, Webster RG, García-Sastre A. Influenza. Nat Rev Dis Primers. 2018 Jun 28;4(1):3.
6. La Placa M. Principi di microbiologia medica, Scuola ed. Esculapio, X edizione, 2005.
7. ISS, Epicentro ISS - I virus influenzali e i loro mutamenti. <https://www.epicentro.iss.it/influenza/tec>.
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Types of influenza viruses. <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>.
9. Velislava N. Petrova & Colin A. Russell. The evolution of seasonal influenza viruses. Nature Reviews Microbiology volume 16, pages 47–60 (2018).
10. ISS, Epicentro ISS - Aspetti epidemiologici in Europa. <https://www.epicentro.iss.it/influenza/epidemiologia-europa>.
11. ISS, Epicentro ISS - Aspetti epidemiologici in Italia. <https://www.epicentro.iss.it/influenza/epidemiologia-italia>.
12. Ryu S, Cowling BJ. Human Influenza Epidemiology. Cold Spring Harb Perspect Med. 2021 Dec 1;11(12):a038356.
13. Lowen, Anice C., et al. "Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature." PLoS pathogens 3.10 (2007): e151.

14. Moriyama M, Hugentobler WJ, Iwasaki A. Seasonality of Respiratory Viral Infections. *Annu Rev Virol.* 2020 Sep 29;7(1):83-101.
15. Vijaykrishna Dhanasekaran, Sheena Sullivan, Kimberly M. Edwards, Ruopeng Xie, Arseniy Khvorov, Sophie A. Valkenburg, Benjamin J. Cowling & Ian G. Barr. Human seasonal influenza under COVID-19 and the potential consequences of influenza lineage elimination. *Nature Communications* 13, Article number: 1721 (2022).
16. Greco D, Rizzo C, Puzelli S, Caraglia A, Maraglino F, Bella A. L'impatto dei virus influenzali in Italia nella stagione 2020-21 durante la pandemia di COVID-19. *Boll Epidemiol Naz* 2021; 2(2):1-6.
17. Ministero della Salute. Influenza: dati copertura vaccinale. <https://www.salute.gov.it/portale/influenza/dettaglioContenutiInfluenza.jsp?lingua=italiano&id=679&area=influenza&menu=vuoto>.
18. Istituto Superiore di Sanità (ISS). Influnet. Sorveglianza Epidemiologica. <https://w3.iss.it/site/RMI/influnet/pagine/rapportoInflunet.aspx>.
19. Istituto Superiore di Sanità (ISS). Influnet. Sorveglianza Virologica. <https://w3.iss.it/site/RMI/influnet/pagine/rapportoInflunet.aspx>.
20. ISS, Epicentro ISS - Le Pandemie Influenzali del Ventesimo Secolo. <https://www.epicentro.iss.it/passi/storiePandemia>.
21. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1918 Pandemic (H1N1 virus). <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/1918-pandemic-h1n1.html>
22. Vanni P, Pandolfi M. Fourth International meeting on the history of medicine (2007).
23. Cockburn WC, Delon PJ, Ferreira W. Origin and progress of the 1968-69 Hong Kong influenza epidemic. *Bull World Health Organ.* 1969;41(3):345-8.
24. Belli, F. "100 anni di epidemie influenzali, dalla Spagnola ad oggi;... e domani?." *Atti della Accademia Lancisiana. Anno Accademico 2018-2019 Vol. LXIII, N. 1 Gennaio Marzo 2019 I: 6-22.*

25. InluNet: Protocollo Operativo InluNet & CovidNet Stagione 2021-22.
Disponibile su: <https://w3.iss.it/site/RMI/influnet/pagine/Documenti.aspx>.
26. ISS, Epicentro ISS - Definizione di caso.
<https://www.epicentro.iss.it/influenza/definizione-caso>.
27. Ministero della Salute. Prevenzione e controllo dell'influenza: raccomandazioni per la stagione 2021-2022.
<https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2021&codLeg=79647&parte=1%20&serie=null>.
28. Kellerman, Rakel, Conn's Current Therapy 2022. Elsevier, 2021.
29. Gaitonde DY, Moore FC, Morgan MK. Influenza: Diagnosis and Treatment. Am Fam Physician. 2019 Dec 15;100(12):751-758.
30. Nypaver C, Dehlinger C, Carter C. Influenza and Influenza Vaccine: A Review. J Midwifery Womens Health. 2021 Jan;66(1):45-53.
31. ISS, Epicentro ISS - Vaccini disponibili.
<https://www.epicentro.iss.it/influenza/vaccini-disponibili>.
32. WHO, Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2021-2022 northern hemisphere influenza season.
<https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2021-2022-northern-hemisphere-influenza-season>.
33. ISS, Epicentro ISS - Efficacia e sicurezza del vaccino antinfluenzale.
<https://www.epicentro.iss.it/influenza/efficacia-sicurezza>.
34. InluWeb. Disponibile su: www.influweb.it.
35. Calabrò, G. E. B. S., Del Riccio, M., Ninci, A., Manzi, F., Bechini, A., & Bonanni, P. Valutazione di health technology assessment (HTA) del vaccino antinfluenzale Quadrivalente da coltura cellulare: Flucelvax tetra. Italian Journal of Public Health, 8 (2019).
36. Gallo Gianni, Vaccinazione contro l'influenza: fortemente consigliata per molti, utile per tutti, articolo, Epicentro, 15 marzo 2017.

37. InluNet: Rapporto Influnet Virologico 2022-17.
https://www.salute.gov.it/portale/temi/documenti/virologica/Influnet_Virol_2022-17.pdf.
38. Binns E, Koenraads M, Hristeva L, Flamant A, Baier-Grabner S, Loi M, Lempainen J, Osterheld E, Ramly B, Chakakala-Chaziya J, Enaganthi N, Simó Nebot S, Buonsenso D. Influenza and respiratory syncytial virus during the COVID-19 pandemic: Time for a new paradigm? *Pediatr Pulmonol*. 2022 Jan;57(1):38-42.
39. Marshall, N.C., Kariyawasam, R.M., Zelyas, N. *et al*. Broad respiratory testing to identify SARS-CoV-2 viral co-circulation and inform diagnostic stewardship in the COVID-19 pandemic. *Virology* 18, 93 (2021).

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1 - Curva epidemica influenzale relativa al Policlinico San Martino nel periodo di studio.	33
Figura 2 - Circolazione di virus influenzale A e virus influenzale B registrata.	33
Figura 3 - Tasso di positività per sottotipo influenzale nelle due popolazioni di studio.	35
Figura 4 - Profilo epidemiologico Policlinico San Martino.	36
Figura 5 - Incidenza nazionale ILI.	36
Figura 6 - Rappresentazione grafica della tipizzazione virale relativa alla stagione 2017-18 nei campioni oggetto dello studio.	37
Figura 7 - Rappresentazione grafica della tipizzazione virale relativa alla stagione 2017-18 in Italia.	38
Figura 8 - Assenza di circolazione virale nella stagione 2020-2021.	39
Figura 9 - Incidenza nazionale influenza/1000 assistiti nella stagione 2020-2021. ...	39
Figura 10 - Influnet: Andamento settimanale dei campioni positivi della presente stagione rispetto alla stagione 2019/2020. ³⁷	40
Figura 11 - Albero filogenetico, isolati Policlinico San Martino.	41

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1 - Tasso di positività per virus influenzali riscontrati nel periodo di studio.	30
Tabella 2 - Numeri assoluti stagionali su base mensile dei test positivi per virus influenzale di tipo A e B.	34
Tabella 3 - Numeri assoluti stagionali dei test positivi per virus influenzale stratificati per tipologia virale (A o B) e classe di età.	35

RINGRAZIAMENTI

Mi è doveroso dedicare questo spazio del mio elaborato alle persone che hanno contribuito, con il loro instancabile supporto, alla realizzazione dello stesso.

Innanzitutto, ringrazio il mio relatore Andrea Orsi e la mia correlatrice Elisabetta Costa, sempre pronti a darmi le giuste indicazioni in ogni fase della realizzazione dell'elaborato. Grazie a voi ho accresciuto le mie conoscenze e le mie competenze.

Ringrazio di cuore i miei genitori e mia sorella. Grazie per avermi sempre sostenuto e per avermi permesso di portare a termine gli studi universitari. Grazie a mia nonna, recentemente scomparsa, per aver sempre creduto in me.

Vorrei ringraziare tutti i miei amici: da quelli che porto nel mio cuore dall'infanzia a quelli che ho incontrato nel mio cammino e che hanno deciso di camminare al mio fianco e di portarmi fino a qui.

Un grazie speciale va anche ai miei coinquilini e ai miei compagni di corso che sono sempre stati di sostegno in questi lunghi anni.

Infine, dedico questa tesi a me stesso, ai miei sacrifici e alla mia tenacia che mi hanno permesso di arrivare fin qui.

Grazie infinite a tutti voi.

Giovanni Chiodi.