



Ministero della Salute

DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE SANITARIA

UFFICIO 5 - PREVENZIONE DELLE MALATTIE TRASMISSIBILI E PROFILASSI INTERNAZIONALE

Gabinetto Ministro - GAB - Prot. Ingresso N.0030542 del 10/05/2017

Prevenzione e controllo delle malattie batteriche invasive
prevenibili con vaccinazione

Dal punto di vista clinico, tali malattie presentano una sintomatologia scarsamente specifica per singolo agente. L'accertamento della loro eziologia è, quindi, di estrema importanza non solo a fini terapeutici ma anche per l'eventuale necessità di profilassi dei contatti, diretta a prevenire possibili casi secondari. La conoscenza delle infezioni causate da questi patogeni e la distribuzione per sierotipi/sierogruppi è utile, nel medio/lungo periodo, anche per stimare la quota di casi prevenibili e l'impatto delle strategie vaccinali. Infine, l'accertamento eziologico risponde anche all'istanza di armonizzare i dati di sorveglianza tra i diversi Stati Membri dell'Unione Europea.

Ad esempio, l'esperienza derivata dalla sorveglianza delle infezioni da Hib ha mostrato l'importanza di continuare il monitoraggio dei casi di malattia dopo l'avvio di programmi estesi di vaccinazione^{4,5}. Infatti, la maggioranza dei casi di infezione invasiva da emofilo è attualmente causata da ceppi diversi dal tipo b e in particolare da ceppi non capsulati (anche noti come non tipizzabili) verso i quali il vaccino non è protettivo. In modo analogo, la sorveglianza delle malattie invasive da pneumococco ha evidenziato, in parallelo all'uso della vaccinazione anti-pneumococcica con vaccino glicoconjugato 7-valente e successivamente con vaccino glicoconjugato 13-valente, un incremento del numero di casi di infezioni invasive dovute a sierotipi non inclusi nel vaccino (fenomeno definito di "replacement" o rimpiazzo vaccinale)^{6,7}.

Nel contesto europeo, l'Italia risulta un Paese a bassa incidenza di malattie invasive da meningococco, pneumococco ed emofilo⁸.

Sebbene i dati aggiornati siano disponibili nei rapporti trimestrali della sorveglianza⁹ consultabili all'indirizzo <http://www.iss.it/mabi/index.php?lang=1&id=5&tipo=16>, in Tabella 1 vengono riportati il numero dei casi confermati e i tassi d'incidenza di malattia batterica invasiva da meningococco (tutti i sierogruppi, sierogruppo C e B), da pneumococco (tutti i sierotipi) e da emofilo (tutti i sierotipi e sierotipo b) nella popolazione generale e nella fascia di età 0-4 anni, in cui l'incidenza è massima^{8,9}, relativi agli anni 2008 e 2016. In base all'osservazione di importanti differenze nell'incidenza tra le Regioni, verosimilmente attribuibili a fenomeni di sotto-notifica e di sotto-diagnosi in alcune aree del Paese, sono state riportate sia le incidenze calcolate sulla base di tutte le segnalazioni pervenute al sistema di sorveglianza (sulla popolazione generale), sia le incidenze calcolate in una selezione di Regioni/PP.AA in cui sono state riscontrate le incidenze più elevate per i tre patogeni, probabilmente per la presenza di sistemi di sorveglianza e diagnosi più efficienti e/o per una maggiore attitudine alla notifica.

Confrontando le incidenze calcolate nei due periodi è apprezzabile una riduzione delle malattie batteriche invasive da pneumococco e da meningococco B nel bambino. Il calo dell'incidenza delle infezioni da meningococco C nel bambino, dovuto all'aumento delle coperture vaccinali nel Paese, non è chiaramente visibile sui dati nazionali a causa dell'aumento registrato in Toscana nel biennio 2015-2016. L'impatto della vaccinazione è, invece, visibile nei dati relativi al gruppo di regioni selezionate (Tabella 1).

Non si può ignorare l'aumento delle segnalazioni di malattia invasiva da pneumococco nell'anziano (dato non riportato in tabella), presumibilmente determinato da un miglioramento della diagnosi eziologica e

Raccomandazioni 1

- Disseminare presso i servizi di igiene pubblica e gli ospedali le informazioni sulla sorveglianza e sull'obbligatorietà della notifica, il protocollo della sorveglianza e i suoi aggiornamenti
- Ottimizzare la tempestività della segnalazione dei casi sospetti di meningite da qualunque agente batterico/sepsi da meningococco per le vie brevi, e della trasmissione/caricamento delle informazioni sui casi confermati sulla piattaforma della sorveglianza MIB, come da protocollo, anche in caso di invio attraverso il sistema routinario di notifica delle malattie infettive
- Aumentare la completezza del dato (in particolare stato vaccinale, esito, eventuali sequele a distanza di mesi), anche mediante successivi aggiornamenti
- Migliorare la diagnosi eziologica mediante identificazione microbiologica del patogeno

Considerazioni generali sulla diagnosi etiologica

Le tecniche microbiologiche tradizionali, quali l'esame microscopico e la coltura, mantengono un ruolo fondamentale nell'indagine dei casi sospetti. Tuttavia, i metodi molecolari sviluppati negli ultimi anni sono determinanti per migliorare sia la tempestività della diagnosi, al fine di un trattamento più rapido e appropriato, sia la sensibilità, permettendo la caratterizzazione di casi negativi alla coltura. È importante, quindi, favorire l'utilizzo dei metodi molecolari. Avere a disposizione i ceppi ottenuti dalla coltura è un vantaggio da molti punti di vista, primo tra tutti la possibilità di moltiplicare il ceppo e averlo a disposizione per caratterizzazioni e studi successivi.

La coltura da sangue, liquor o altro sito sterile rappresenta, quindi, l'esame di conferma ottimale in quanto consente la determinazione del sierogruppo/sierotipo, la valutazione della sensibilità agli antibiotici e la tipizzazione molecolare.

L'identificazione del sierogruppo/sierotipo è essenziale, come già ricordato, per interventi di sanità pubblica, per stimare la quota dei casi prevenibili con vaccinazione, per valutare l'andamento epidemiologico e per evidenziare eventuali fallimenti vaccinali. La valutazione della sensibilità agli antibiotici è importante per rilevare la circolazione di ceppi resistenti agli antibiotici utilizzati in terapia e in chemioprophilassi, come, ad esempio, ceppi di meningococco a diminuita sensibilità alle cefalosporine già segnalati in altri Paesi Europei, modulando la terapia antibiotica necessaria al fine anche della prevenzione dell'antimicrobico-resistenza, particolarmente elevata nel nostro Paese. Infine, la tipizzazione molecolare consente di evidenziare cloni emergenti e particolarmente virulenti e di ricostruire la catena di trasmissione in caso di focolai epidemici¹⁰ ("outbreak").

La possibilità di ottenere una conferma di laboratorio aumenta prelevando gli opportuni campioni clinici non appena possibile, prima della somministrazione degli antibiotici. Al fine di ridurre la sotto-diagnosi, è importante eseguire più di un metodo diagnostico, includendo, oltre alla coltura, anche metodi molecolari o altri test rapidi per una corretta diagnosi etiologica. Tuttavia, è sempre raccomandato eseguire una coltura, che mantiene un ruolo fondamentale come esame di conferma ottimale.

Si raccomanda, pertanto, l'identificazione a livello regionale o inter-regionale di un laboratorio di riferimento, dove sia possibile effettuare una diagnosi etiologica di conferma, se già non eseguita, ed realizzare successive caratterizzazioni (es. determinazione del sierogruppo o sierotipo). È, altresì, indispensabile procedere all'accreditamento e al controllo di qualità delle strutture di laboratorio abilitate per la diagnosi microbiologica e per la diagnosi molecolare.

Raccomandazioni 2

- Identificare a livello regionale o inter-regionale un laboratorio di riferimento dove sia possibile effettuare una diagnosi di conferma e/o saggi di determinazione del sierogruppo/sierotipo e comunicarlo al Ministero della Salute e ai referenti della sorveglianza presso l'Istituto Superiore di Sanità
- Le Regioni dovrebbero accreditare i laboratori abilitati alla diagnosi microbiologica e molecolare e monitorarne la qualità con programmi di audit specifici
- Invitare i laboratori a inviare i ceppi isolati e, laddove previsto, il campione al laboratorio di riferimento identificato
- Trasmettere i dati e i risultati di laboratorio (diagnosi e determinazione del sierogruppo/sierotipo) al sistema di sorveglianza MIB, anche mediante un aggiornamento della scheda di segnalazione

- Rilevamento di antigeni di *Neisseria meningitidis* nel liquido cerebrospinale
- Rilevamento di diplococchi Gram-negativi nel liquido cerebrospinale mediante microscopia

MALATTIA INVASIVA DA *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Classificazione del Caso

Caso possibile: non applicabile

Caso probabile: non applicabile

Caso Confermato: qualsiasi caso confermato con uno dei sottoelencati criteri di laboratorio

Criteri di laboratorio

Almeno uno dei seguenti:

- Isolamento di *Streptococcus pneumoniae* da un sito normalmente sterile
- Rilevamento della presenza di acido nucleico di *Streptococcus pneumoniae* in un sito normalmente sterile
- Rilevamento di antigeni di *Streptococcus pneumoniae* in un sito normalmente sterile (ad eccezione del sangue)

MALATTIA INVASIVA DA *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

Classificazione del Caso

Caso possibile: non applicabile

Caso probabile: non applicabile

Caso Confermato: qualsiasi caso confermato con uno dei sottoelencati criteri di laboratorio

Criteri di Laboratorio

Almeno uno dei seguenti:

- Isolamento di *Haemophilus Influenzae* da un sito normalmente sterile
- Rilevamento della presenza di acido nucleico di *Haemophilus Influenzae* in un sito normalmente sterile

MENINGITI DA ALTRO AGENTE BATTERICO

Classificazione del Caso

Caso Confermato: qualsiasi caso confermato con uno dei sottoelencati criteri di laboratorio

Criteri di Laboratorio

Almeno uno dei seguenti:

- Isolamento di un agente batterico da liquor
- presenza di acido nucleico di un agente batterico nel liquor.

preliminari al marzo 2017 mostrano più casi nel 2017 da meningococco B rispetto al C. A partire dal 2011⁹ si registra un lieve trend in aumento dei casi da sierogruppi W e Y.

Tabella 2 - Numero di casi di malattia meningococcica invasiva per fascia di età in Italia (Fonte ISS- Sistemi MIB, 2014-2017)

	Sierogruppo	n.d.	0	1-4	5-9	10-14	15-24	25-64	> 64	TOTALE (N)	TOTALE %
2014	A	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1%
	B	0	14	11	5	4	3	15	3	55	48%
	C	0	3	1	1	3	5	12	11	36	31%
	W	0	0	1	1	1	3	1	1	8	7%
	Y	0	1	2	1	1	1	6	3	15	13%
	TOTALE tipizzati (N,%)	0	18	15	8	9	13	34	18	115	
			86%	60%	73%	60%	72%	64%	86%	70%	
2015	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
	B	0	11	7	4	3	8	11	5	49	34%
	C	0	5	2	1	3	17	28	8	64	45%
	W	0	2	0	0	1	2	0	2	7	5%
	Y	0	1	1	0	2	4	10	5	23	16%
	TOTALE tipizzati (N,%)	0	19	10	5	9	31	49	20	143	
			86%	56%	71%	90%	79%	72%	80%	76%	
2016	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
	B	0	12	8	3	1	14	23	6	67	36%
	C	0	1	7	3	2	17	40	10	80	43%
	W	0	2	1	1	2	2	4	2	14	8%
	Y	0	2	0	5	5	5	4	2	23	13%
	TOTALE tipizzati (N,%)		17	16	12	10	38	71	20	184	
			74%	67%	75%	100%	72%	85%	91%	79%	
2017*	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
	B	0	1	5	1	0	5	9	2	23	40%
	C	0	0	1	0	2	3	11	3	20	35%
	W	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2%
	Y	0	1	1	1	0	3	5	2	13	23%
	TOTALE tipizzati (N,%)	0	2	7	2	2	11	26	7	57	
			67%	88%	50%	67%	100%	90%	100%	88%	

(*dati al 3 aprile 2017)

Gestione dei casi e dei focolai epidemici e misure di controllo per evitare casi secondari

Poiché il meningococco è potenzialmente in grado di generare focolai epidemici, in presenza di un sospetto clinico di malattia invasiva meningococcica, è necessario giungere prima possibile a una diagnosi eziologica e avviare tempestivamente specifiche azioni di Sanità Pubblica per prevenire casi secondari nei contatti,

Sebbene non sia possibile trovare una definizione univoca e adattabile a tutti i contesti epidemiologici, in linea generale si può sospettare un focolaio quando ci sono due o più casi di malattia invasiva da

singola comunità; se si riscontrano tali condizioni sarà necessario classificare tutti i bambini e gli insegnanti come contatti stretti

c) chi abbia dormito o mangiato spesso nella stessa casa del malato

d) le persone che nei sette giorni precedenti l'esordio abbiano avuto contatti con la saliva del malato (attraverso baci, stoviglie, spazzolini da denti, giocattoli)

e) gli operatori sanitari che siano stati direttamente esposti alle secrezioni respiratorie del paziente (per esempio durante manovre di intubazione o respirazione bocca a bocca, manovre assistenziali ravvicinate che possono generare aerosolizzazioni in ambienti ristretti come le autoambulanze). Gli operatori sanitari che non siano stati esposti alle secrezioni del paziente non sono da considerare contatti stretti e non necessitano di chemioprophilassi (contatti casuali)³. Si ricorda, comunque, che i sanitari devono sempre usare gli appositi dispositivi di protezione individuali per minimizzare l'esposizione a saliva e/o secrezioni respiratorie del paziente

f) persone che per qualsiasi motivo siano venute a contatto con saliva o altre secrezioni respiratorie. Si precisa che l'essere stati seduti accanto o l'aver parlato a distanza ravvicinata per brevi periodi (<8 ore, per esempio in autobus, treno, aereo, cinema, ristorante) di per sé non contribuisce alla identificazione quale contatto stretto (contatti casuali).

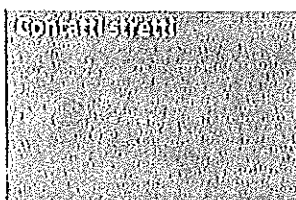
Raccomandazioni 3

- Le ASL e le Regioni devono preparare linee guide operative sulla base di questa circolare per la gestione tempestiva ed efficace dei casi di malattia invasiva meningococcica e dei contatti stretti
- I soggetti candidati alla chemioprophilassi devono essere individuati sulla base dell'indagine epidemiologica: solo i soggetti esposti a rischio reale nei 7 giorni antecedenti l'esordio clinico del caso vanno trattati, sulla base dei criteri esplicitati in precedenza
- La linea di demarcazione tra i soggetti da sottoporre a chemioprophilassi e vaccinazione e coloro che non necessitano di alcun trattamento non è sicuramente netta, quindi la valutazione va fatta tenendo presente un principio di prudenza, ma senza eccessi. Si ricorda che un uso immotivato di antibiotici, in soggetti al di fuori della definizione di contatto stretto, può:
 - aumentare i costi senza alcun beneficio
 - favorire il fenomeno dell'antibiotico-resistenza anche nei confronti di altri patogeni
 - esporre il soggetto a inutili rischi di eventuali reazioni avverse all'antibiotico, come riportato in letteratura

Quindi, la chemioprophilassi non deve essere somministrata ai contatti casuali o indiretti

- I contatti casuali hanno un rischio di malattia estremamente basso
- Eventuali sospette reazioni avverse attribuibili alla chemioprophilassi vanno prontamente segnalate al sistema di farmacovigilanza

Tabella 3 - Definizioni di contatto nel caso di malattia meningococcica da utilizzare per valutare chemioprophilassi e vaccinazione



Soggetti che frequentano "regolarmente" (quotidianamente) il paziente, conviventi (coloro che condividono con il paziente la stessa abitazione), partner sessuali, compagni di classe, compagni di lavoro che condividono la stessa stanza, operatori sanitari esposti, persona seduta accanto per almeno 8 ore (ad esempio nella poltrona accanto di un volo aereo intercontinentale).

È, inoltre, importante condurre la sorveglianza sanitaria dei contatti stretti almeno per 10 giorni (considerando il periodo di incubazione della malattia di 2-10 giorni) dall'esordio dei sintomi del caso indice, per avviare ulteriori accertamenti diagnostici in chi dovesse presentare febbre, in modo da trattare rapidamente eventuali casi secondari.

È, infine, raccomandata, al momento della dimissione ospedaliera, l'offerta attiva del vaccino anti-meningococcico, contenente il sierogruppo identificato, al caso confermato di malattia invasiva, indipendentemente dal suo precedente stato vaccinale²⁴. Il numero di dosi e l'intervallo tra le stesse dipenderà dal tipo di vaccino e dall'età del caso. La vaccinazione anti-meningococcica B è indicata solo nei soggetti non vaccinati in precedenza²⁴.

La vaccinazione dei contatti va effettuata utilizzando il vaccino che include il sierogruppo che ha causato la malattia nel caso indice.

L'uso di un vaccino multi-valente è indicato nel soggetto candidato, per età o altre condizioni di rischio, a ricevere il vaccino quadrivalente secondo il calendario vaccinale attualmente vigente.

Tabella 5 - Indicazioni per la vaccinazione dei contatti stretti di casi da Meningococco A, C, Y, W-135, B

Età	Stato vaccinale precedente	Raccomandazione
0-12 mesi	Non vaccinato	Una dose del vaccino subito dopo il completamento della chemioprophilassi. Completare la schedula vaccinale in base all'età e al tipo di vaccino. La vaccinazione anti-meningococcica B è indicata solo nei soggetti non vaccinati in precedenza o che non abbiano completato il ciclo vaccinale ²⁴ .
0-12 mesi	Vaccinato (ha ricevuto in passato almeno 1 dose del vaccino)	Rivaccinare con una dose del vaccino subito dopo il completamento della chemioprophilassi, qualora siano trascorse almeno 4 settimane dall'ultima dose. Completare la schedula vaccinale in base all'età e al tipo di vaccino. La vaccinazione anti-meningococcica B è indicata solo nei soggetti non vaccinati in precedenza o che non abbiano completato il ciclo vaccinale ²⁴ .
> 12 mesi) alto (ascendenti) adulti	Non vaccinato	Una dose del vaccino subito dopo il completamento della chemioprophilassi. Completare la schedula vaccinale in base all'età e al tipo di vaccino. La vaccinazione anti-meningococcica B è indicata solo nei soggetti non vaccinati in precedenza o che non hanno completato il ciclo vaccinale ²⁴ .
> 12 mesi) alto (ascendenti) adulti	Vaccinato (ha ricevuto in passato almeno 1 dose del vaccino)	Se il soggetto non ha ricevuto nessuna dose dopo i 12 mesi di vita, oppure è un soggetto a rischio per patologia preesistente e siano trascorse almeno 4 settimane dall'ultima dose, rivaccinare con una dose di vaccino subito dopo il completamento della chemioprophilassi. Negli altri casi, rivaccinare se è trascorso almeno 1 anno dall'ultima dose. La vaccinazione anti-meningococcica B è indicata solo nei soggetti non vaccinati in precedenza o che non hanno completato il ciclo vaccinale ²⁴ .

- b. Ricerca dell'antigene sui campioni clinici (fornisce una conferma in pazienti con una presentazione clinicamente compatibile).
4. **Determinazione del sierogruppo capsulare**
 Si esegue sui ceppi isolati mediante antisieri specifici disponibili in commercio e/o mediante metodi molecolari. Questi ultimi possono essere utilizzati anche sui campioni clinici risultati negativi alla coltura. Qualora il Laboratorio periferico e/o il Laboratorio di Riferimento Regionale, ove presente, non riescano ad identificare il sierogruppo capsulare, il Laboratorio di Riferimento Nazionale presso il Dipartimento di Malattie Infettive dell'Istituto Superiore di Sanità potrà eseguire la determinazione.
5. **Ulteriori caratterizzazioni microbiologiche dei ceppi di *N. meningitidis***
 Sui ceppi batterici, per una completa caratterizzazione, è possibile eseguire il saggio di antibiotico-sensibilità e la tipizzazione molecolare per l'identificazione del gruppo clonale di appartenenza. Quest'ultima può essere eseguita anche sul campione clinico coltura-negativo. Il Laboratorio di Riferimento Regionale, ove presente, in grado di eseguire questi approfondimenti, può inviare i risultati al Laboratorio di Riferimento Nazionale presso l'Istituto Superiore di Sanità per una raccolta completa dei dati. In una apposita sezione di questa circolare sono riportati i contatti per il Laboratorio di Riferimento Nazionale.

Streptococcus pneumoniae (pneumococco)

Caratteristiche del patogeno e quadro clinico

Streptococcus pneumoniae (pneumococco) è l'agente più comune di malattia batterica invasiva. Può causare quadri clinici invasivi anche gravi, come meningite e sepsi, o meno gravi, come batteriemia o polmoniti batteriemiche. Inoltre, è frequentemente responsabile di quadri localizzati come polmonite, infezione delle prime vie respiratorie, otite. Lo stato di portatore è comune nei bambini al di sotto dei 5 anni di età (30-60%)²⁶⁻²⁷, ma è presente anche nella popolazione adulta, sebbene con percentuali inferiori (1,5-30%)²⁸⁻²⁹. Sono noti più di 90 tipi diversi di pneumococco (sierotipi), una parte dei quali prevenibile con vaccinazione.

Epidemiologia

Nel 2015 sono stati segnalati 1.462 casi di malattia invasiva da pneumococco; il numero assoluto di casi è quindi aumentato rispetto al 2013 (977 casi), al 2014 (955) e al 2015 (1.250). Mentre in Lombardia, in cui si era verificato nel 2015 un incremento consistente dei casi, il numero si è quasi stabilizzato (da 354 casi nel 2014 a 532 nel 2015 e 576 nel 2016), si sono verificati aumenti nel 2016 in Veneto, Campania e Lazio. L'incremento numerico necessita di una lettura cauta, in attesa di potere discriminare tra aumento reale della numerosità e, più probabilmente, migliorata sensibilità della diagnosi per l'uso di metodiche molecolari o maggiore attenzione alla segnalazione dei casi.

Persiste, comunque, un numero di casi segnalati relativamente basso in alcune grandi regioni (Campania, Lazio, Puglia, Sicilia, Toscana); poiché una certa quota di malattie invasive da pneumococco è attesa in ogni regione malgrado l'utilizzo dei vaccini glicoconjugati, un numero di casi molto basso fa ipotizzare un problema di sotto-notifica (mancata trasmissione della segnalazione) o sotto-diagnosi (mancata diagnosi eziologica).

In tabella 6 sono state calcolate le incidenze per fascia di età e per anno; per ottenere un dato più accurato, il calcolo è stato effettuato sia a livello nazionale (considerando i casi segnalati al sistema di sorveglianza da tutte le regioni), sia in un gruppo di regioni con maggiore attitudine alla notifica (Piemonte, P.A. Trento, P.A. Bolzano, Lombardia, Veneto, Friuli-Venezia Giulia, Emilia-Romagna).

Diagnosi

In casi sospetti di malattia invasiva da *S. pneumoniae*, la diagnosi eziologica effettuata presso i laboratori diagnostici di microbiologia prevede l'utilizzo di una serie di metodiche che comprendono esami colturali e/o non colturali su campioni clinici provenienti da siti normalmente sterili (sangue, liquor, o più raramente da altri siti sterili quali liquido pleurico, pericardico, peritoneale o sinoviale).

1. Identificazione di *S. pneumoniae* mediante coltura

L'isolamento di *S. pneumoniae* prevede l'utilizzo di un terreno contenente sangue ed incubazione per 16-24 ore a 37°C in atmosfera contenente 5% di CO₂. La crescita di colonie α-emolitiche, con tipica morfologia a pedina di dama, è indicativa di *S. pneumoniae*. L'identificazione presuntiva di specie può essere effettuata mediante test di laboratorio quali sensibilità all'optochina o solubilità alla bile, e confermata con sistemi automatizzati, spettrometria di massa (MALDI-TOF), o metodiche molecolari.

2. Identificazione di *S. pneumoniae* mediante metodi molecolari

La metodica molecolare maggiormente utilizzata per la rilevazione di acidi nucleici di *S. pneumoniae* in campioni di liquor, sangue o altro sito normalmente sterile è rappresentata dalla PCR convenzionale o dalla Real-Time PCR. Il marker molecolare riconosciuto per *S. pneumoniae* è il gene *lytA*, codificante l'autolisina A di pneumococco. Attualmente esistono in commercio diversi kit per la diagnosi molecolare.

3. Identificazione di *S. pneumoniae* mediante altri metodi diagnostici non colturali

L'esame microscopico dopo colorazione di Gram da campione clinico viene utilizzata per una preliminare indicazione diagnostica, soprattutto per il sedimento liquorale, ma anche per altri campioni da siti normalmente sterili, eccetto il sangue. La sola rilevazione di diplococchi Gram-positivi extra-cellulari NON può essere utilizzata come conferma di caso per la sorveglianza.

La rilevazione di antigeni di pneumococco in campioni di liquor, o altro sito normalmente sterile (ad eccezione del sangue), può avvenire mediante test di agglutinazione al lattice oppure metodi immunocromatografici, entrambi disponibili in commercio. Questi metodi possono fornire una diagnosi eziologica, tuttavia, è sempre raccomandato procedere con la coltura per confermare la diagnosi. Il test immunocromatografico per la rilevazione dell'antigene di pneumococco in campioni di urina (antigene urinario), che è utilizzato per la diagnosi di polmonite pneumococcica, non discrimina tra polmonite batteriemia, che fa parte delle malattie invasive pneumococciche, e polmonite non batteriemia, che non è considerata una malattia invasiva. Pertanto, una positività dell'antigene pneumococcico nelle urine NON può essere utilizzata come indicativa di malattia invasiva pneumococcica.

4. Determinazione del sierotipo

La determinazione del sierotipo di pneumococco può essere effettuata tramite metodi fenotipici, che prevedono la disponibilità del ceppo batterico, o genotipici che possono essere applicati anche al campione clinico. Nel primo caso la tipizzazione capsulare viene effettuata utilizzando antisieri poli e mono-specifici, disponibili in commercio, mediante la reazione di Quellung (rigonfiamento capsulare, che richiede l'uso del microscopio) o l'agglutinazione al lattice (solo per alcuni sierotipi). La tipizzazione mediante antisieri permette di identificare in maniera univoca tutti i sierotipi riconosciuti di pneumococco. I metodi genotipici maggiormente in uso prevedono saggi in PCR multipla sia convenzionale che in Real-Time, o saggi basati su analisi di sequenza quali il Capsular Sequence Typing (CST)³⁰. Al momento, i metodi genotipici non sono in grado di discriminare in maniera univoca tutti i sierotipi finora descritti ed in alcuni casi forniscono una indicazione cumulativa per gruppi di sierotipi.

La tabella 8 mostra i sierotipi relativi ai casi dal 2011 al 2017. I casi prevenibili con vaccino, grazie all'alta copertura vaccinale, sono ormai pochissimi e la maggior parte di questi interessano soggetti anziani o non vaccinati. Questo dato supporta l'elevata efficacia del vaccino contro l'Hib.

Tabella 7 - Casi e incidenza di malattia invasiva da *Haemophilus influenzae* per età e anno, in Italia e in un gruppo di Regioni (2011-2017).

Italia																
	0		1-4		5-9		10-14		15-24		25-64		>64		TOTALE	
	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000
2011	3	0,54	2	0,09	1	0,04	1	0,04	2	0,03	18	0,05	22	0,18	49	0,08
2012	7	1,32	1	0,05	2	0,07	1	0,04	0	0,00	22	0,07	30	0,24	63	0,11
2013	4	0,76	3	0,14	3	0,11	0	0,00	1	0,02	29	0,09	38	0,30	78	0,13
2014	12	2,36	7	0,32	4	0,14	1	0,04	0	0,00	33	0,10	49	0,38	106	0,17
2015	12	2,42	7	0,32	2	0,07	2	0,07	1	0,02	45	0,14	62	0,47	131	0,22
2016	18	3,75	7	0,33	1	0,04	1	0,04	1	0,02	42	0,13	70	0,52	140	0,23
2017*	0		0		2		0		0		4		14		20	

Emilia-Romagna, Friuli-Venezia Giulia, Lombardia, PA Trento, PA Bolzano, Piemonte, Veneto																
	0		1-4		5-9		10-14		15-24		25-64		>64		TOTALE	
	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000	N	Incidenza x 100.000
2011	3	1,23	2	0,20	1	0,08	1	0,09	1	0,04	15	0,10	18	0,33	41	0,16
2012	6	2,58	1	0,10	1	0,08	0	0,00	0	0,00	20	0,14	28	0,51	56	0,22
2013	3	1,31	3	0,31	3	0,25	0	0,00	0	0,00	22	0,16	31	0,55	62	0,24
2014	10	4,51	5	0,52	2	0,16	1	0,08	0	0,00	25	0,17	45	0,78	88	0,34
2015	8	3,70	4	0,43	2	0,16	2	0,17	0	0,00	37	0,26	55	0,94	108	0,41
2016	16	7,67	6	0,66	0	0,00	0	0,00	0	0,00	29	0,20	55	0,93	106	0,41
2017*	0		0		1		0		0		0		7		8	

*2017 dati provvisori al 3 aprile 2017

Tabella 8 - Distribuzione per sierotipo e per anno dei ceppi di *Haemophilus influenzae* isolati da infezioni invasive e inviati per tipizzazione all'Istituto Superiore di Sanità o tipizzati da altri laboratori (2011-2017)

Sierotipo		2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017*
Capsulato	A	0	0	0	0	1	1	0
	B	0	6	5	7	4	12	2
	C	0	0	1	0	0	0	0
	D	1	0	0	0	0	0	0
	E	2	3	1	0	1	1	0
	F	4	1	3	1	2	2	0
	non-b	0	1	1	0	0	4	3
Non capsulato		23	24	46	38	71	56	2
Non tipizzabile		1	0	0	0	0	0	0
Non tipizzato		18	28	21	60	52	64	13

Bambini di 12 anni o più grandi e adulti: 1g IM o IV al giorno per 2 giorni

Bambini <12 anni: 50mg/kg IM o IV (fino a un massimo di 1 g) al giorno per 2 giorni.

La profilassi antibiotica dovrebbe essere offerta sino a 30 giorni dal contatto con il caso indice³³.

È, inoltre, importante la sorveglianza dei conviventi a rischio per identificare chi dovesse presentare febbre, in modo da diagnosticare e trattare rapidamente eventuali ulteriori casi. Questa sorveglianza è prevista per 60 giorni dall'esordio dei sintomi del caso indice³³.

Infine, è raccomandata, al momento della dimissione ospedaliera, l'offerta attiva del vaccino anti-Hib al caso confermato di malattia invasiva causata dallo stesso sierotipo, indipendentemente dal suo precedente stato vaccinale²⁴.

Poiché è possibile che la sierotipizzazione dell'isolato di *H. Influenzae* non sia disponibile in tempi brevi, è opportuno, comunque, avviare specifiche azioni di controllo in attesa del risultato della sierotipizzazione. Si suggerisce, pertanto, di prendere in considerazione per la chemioprophilassi e la vaccinazione, oltre ai casi di Hib confermato (e relativi contatti), anche i casì probabili di Hib (e relativi contatti), ovvero i casi che presentino una sintomatologia clinica di epiglottite con isolamento di HI da un sito sterile (sangue) oppure casi di meningite con positività al test latex per Hib su liquor, anche in mancanza della sierotipizzazione³³.

Raccomandazioni 5

- Identificare in tempi brevi il sierotipo di HI responsabile del caso, in modo da intraprendere le azioni di chemioprophilassi e vaccinazione solo in presenza di caso da Hib
- In attesa di sierotipizzazione, vanno considerati come probabili casi da Hib, in presenza dei quali sono indicate la chemioprophilassi e la vaccinazione, quelli con positività al test latex per Hib su liquor e i casi di malattia invasiva con presentazione clinica di epiglottite ed isolamento di HI da sito sterile, anche se non ancora sierotipizzati³³
- I candidati alla chemioprophilassi sono esclusivamente i conviventi di casi di malattia invasiva da Hib nei 7 giorni antecedenti l'esordio clinico del caso, in presenza di bambini <10 anni o soggetti immunodepressi o asplenetici, che devono essere individuati in base all'indagine epidemiologica e trattati secondo i criteri esplicitati in precedenza
- La chemioprophilassi non è raccomandata nei casi di malattia invasiva dovuta a ceppi non capsulati o capsulati diversi dal tipo b e non deve essere somministrata nelle circostanze non previste dalla presente circolare
- Anche nel caso di malattia da Hib, i contatti casuali hanno un rischio di malattia estremamente basso e non è raccomandata la chemioprophilassi
- Offrire la vaccinazione ai conviventi a rischio di casi di malattia invasiva da Hib, come esplicitato in precedenza
- Sottoporre a sorveglianza i conviventi per 60 giorni dall'esordio dei sintomi del caso
- Offrire la vaccinazione al caso di malattia invasiva da Hib al momento della dimissione ospedaliera, indipendentemente dal suo precedente stato vaccinale
- Eventuali sospette reazioni avverse attribuibili alla chemioprophilassi e alla vaccinazione vanno prontamente segnalate al sistema di farmacovigilanza

3. Identificazione di *H. influenzae* tramite altri metodi diagnostici non colturali

Il test di agglutinazione al lattice (latex) per *H. influenzae* di tipo b non è da considerarsi appropriato come test diagnostico per *H. influenzae*, soprattutto in ragione del fatto che la grande maggioranza dei casi di malattia invasiva è causata, oggi, da *H. influenzae* non capsulato (anche noto come non tipizzabile) negativo al test di agglutinazione al lattice. Ai fini della chemioprophilassi, il test al lattice può essere utilizzato come test presuntivo per la presenza di *H. influenzae* di tipo b nel liquor, da confermare successivamente mediante le altre metodiche qui riportate.

4. Determinazione del sierotipo capsulare

La determinazione del sierotipo capsulare è un passaggio essenziale per lo studio dell'epidemiologia della malattia e per l'eventuale identificazione dei casi di fallimento vaccinale (definito come un caso di malattia invasiva causato da un ceppo di tipo b in un soggetto in precedenza vaccinato con almeno 2 dosi di vaccino se <1 anno di età o con 1 dose se ≥1anno). La tipizzazione capsulare si esegue su ceppi isolati di *H. influenzae* mediante antisieri specifici (determinazione del fenotipo capsulare) e/o mediante metodi molecolari (determinazione del genotipo capsulare). La sierotipizzazione mediante antisieri occasionalmente può dar luogo a risultati inaccurati, pertanto è opportuno che i Laboratori di Riferimento Regionale e/o Nazionale eseguano un test di conferma molecolare del genotipo capsulare. Sono in uso protocolli diversi; il più comune prevede PCR multiple in grado di amplificare, oltre a regioni capsulari specifiche, anche un target specie-specifico (gene ompP2), utile per la conferma di specie *H. influenzae*.

5. Ulteriori caratterizzazioni microbiologiche dei ceppi di *H. influenzae*

Sul ceppi isolati di *H. influenzae* è opportuno eseguire i saggi di sensibilità agli antibiotici, con particolare riferimento agli antibiotici beta-lattamici. In casi particolari, qualora sia necessario investigare le relazioni filogenetiche tra ceppi e/o definire cloni circolanti in un determinato territorio o a livello nazionale, possono essere impiegati metodi di tipizzazione genetica dei singoli ceppi di *H. influenzae*, quali Multilocus Sequence Typing (MLST) o Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).

Laboratori di Riferimento Nazionali/Regionali

Presso l'Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Malattie Infettive, vi è il Coordinamento delle attività di sorveglianza delle MIB, la raccolta dei dati e i Laboratori di Riferimento Nazionali per il supporto alla diagnosi e alle caratterizzazioni più avanzate per meningococco, pneumococco ed emofilo.

È importante che in ogni Regione venga individuato un Laboratorio di Riferimento Regionale o interregionale per i tre patogeni, in grado di supportare i laboratori diagnostici nella diagnosi e nella identificazione del sierogruppo/sierotipo, oltre a facilitare la raccolta e l'invio dei ceppi/campioni all'Istituto Superiore di Sanità.

Le Regioni, una volta identificato il laboratorio di riferimento regionale (o inter-regionale) per meningococco, pneumococco ed *H. influenzae*, dovranno comunicare il nominativo del referente, e i relativi contatti, al Ministero della Salute e all'Istituto Superiore di Sanità, rispettivamente agli indirizzi PEC dgprev@postacert.sanita.it e dmi@pec.iss.it.

Punti di contatto e siti web di riferimento

Per la tempestiva segnalazione dei casi sospetti di meningite da qualunque agente batterico e di sepsi da meningococco:

malinf@sanita.it

dmi@pec.iss.it

Allegato 1

SCHEDA DI SEGNALAZIONE
**SORVEGLIANZA DELLE MALATTIE INVASIVE DA MENINGOCOCCO,
PNEUMOCOCCO, EMIOFILO e DELLE MENINGITI BATTERICHE**

Questa scheda va utilizzata per segnalare al Servizio di Igiene pubblica di competenza (entro 12 ore dalla diagnosi) i casi di malattie batteriche invasive causate da *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus Influenzae* e di meningite batterica da altro agente.

L'invio di questo modello non esonera dall'obbligo di segnalazione mediante il modello 15 del sistema di notifiche delle malattie infettive attualmente in vigore in Italia (il decreto 15/12/1990 prevede in classe II la segnalazione delle meningiti da *N. meningitidis* e in classe V le altre malattie batteriche invasive).

Dati relativi compilatore

Regione: _____

Data compilazione: ___/___/___

Ospedale: _____

Comune: _____

Segnalato da: Sig/Dr: _____

Telefono: ___/___/___ Fax: ___/___/___

E-mail: _____@_____

Dati del paziente:

Nome: _____ Cognome: _____

Sesso: M F Data di nascita: ___/___/___ Comune di residenza: _____

Codice fiscale o STP: _____ Nazionalità: _____

Data inizio sintomi: ___/___/___ Comune inizio sintomi: _____ Provincia: _____

Quadro Clinico: sepsi meningite polmonite batteriemia cellulite epiglottite
(anche più di uno)

peritonite pericardite artrite settica/osteomielite

Ricoverato: Sì No se sì Data di Ricovero ___/___/___

Agente eziologico:

Neisseria meningitidis *Streptococcus pneumoniae* *Haemophilus Influenzae*

Altro agente eziologico causante meningite batterica:

Micobatterio tubercolare Streptococco di gruppo B Listeria

Altro agente batterico (specificare): _____

Non identificato (solo meningiti con liquor torbido o purulento)

Diagnosi di laboratorio

Persona di contatto nel laboratorio di diagnosi: _____ Tel. _____

Email: _____ @ _____

Ospedale/laboratorio: _____

Data prelievo del primo campione risultato positivo : ___/___/___

Diagnosi eseguita (test positivi) su:

<i>Neisseria meningitidis</i>			
<input type="checkbox"/> liquor	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> ricerca antigene	<input type="checkbox"/> PCR
	<input type="checkbox"/> esame microscopico diretto		
<input type="checkbox"/> sangue	<input type="checkbox"/> coltura		<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> liquido pleurico	<input type="checkbox"/> coltura		<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> liquido peritoneale	<input type="checkbox"/> coltura		<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> liquido pericardio	<input type="checkbox"/> coltura		<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> liquido sinoviale	<input type="checkbox"/> coltura		<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> placenta	<input type="checkbox"/> coltura		<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> petecchie cutanee	<input type="checkbox"/> coltura		<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> materiale autoptico da sito sterile	<input type="checkbox"/> coltura		<input type="checkbox"/> PCR

<i>Streptococcus pneumoniae</i>			
<input type="checkbox"/> liquor	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> ricerca antigene	<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> sangue	<input type="checkbox"/> coltura		<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> liquido pleurico	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> ricerca antigene	<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> liquido peritoneale	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> ricerca antigene	<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> liquido pericardio	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> ricerca antigene	<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> liquido sinoviale	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> ricerca antigene	<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> placenta	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> ricerca antigene	<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> materiale autoptico da sito sterile	<input type="checkbox"/> coltura		<input type="checkbox"/> PCR

<i>Haemophilus influenzae</i>		
<input type="checkbox"/> liquor	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> sangue	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> liquido pleurico	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> liquido peritoneale	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> liquido pericardio	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> liquido sinoviale	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> placenta	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> materiale autoptico da sito sterile	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> PCR

<i>Qualunque altro agente causante meningite batterica</i>		
<input type="checkbox"/> liquor	<input type="checkbox"/> coltura	<input type="checkbox"/> ricerca antigene
		<input type="checkbox"/> PCR

Note: la voce PCR include anche altre metodiche molecolari disponibili commercialmente

E' stata eseguita la tipizzazione? (solo se malattia invasiva da *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*)

SI NO se SI siero gruppo/sierotipo _____

In quale laboratorio è stata effettuata?

Laboratorio Riferimento regionale

Altro, specificare (_____)

Stato vaccinale (solo se malattia invasiva da *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*)

Vaccinato per l'agente in causa? No Sì regolarmente o parzialmente Informazione non disponibile

Se "Sì regolarmente o parzialmente", compilare la tabella seguente solo per la vaccinazione contro l'agente responsabile del caso.

N. della dose	Data somministrazione	Nome commerciale

Note relative alla vaccinazione:

Vaccinato regolarmente si intende un individuo che ha effettuato il ciclo completo di vaccinazione e i relativi richiami (se necessari) e che si ritiene quindi potenzialmente protetto. L'informazione deve essere controllata sull'anagrafe vaccinale o equivalente. In caso di dubbio inserire nelle note.

Fattori predisponenti malattie batteriche invasive:

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Asplenia anatomica/funzionale | <input type="checkbox"/> Diabete mellito |
| <input type="checkbox"/> Immunodeficienza congenita | <input type="checkbox"/> Epatopatia |
| <input type="checkbox"/> Leucemie/linfomi | <input type="checkbox"/> Cardiopatie |
| <input type="checkbox"/> Altre neoplasie | <input type="checkbox"/> Asma/enfisema |
| <input type="checkbox"/> Terapie immuno-soppressive | <input type="checkbox"/> Tossicodipendenza e.v. |
| <input type="checkbox"/> Trapianto d'organo o di midollo | <input type="checkbox"/> Alcolismo |
| <input type="checkbox"/> Implanto cocleare | <input type="checkbox"/> Tabagismo |
| <input type="checkbox"/> Fistole liquorali | <input type="checkbox"/> Deficit fattori del complemento |
| <input type="checkbox"/> Immunodeficienza acquisita | <input type="checkbox"/> Emoglobinopatie |
| <input type="checkbox"/> Insuffic. renale cronica/Dialisi | <input type="checkbox"/> Altre malattie polmonari, Croniche |
| <input type="checkbox"/> Altra Condizione (_____) | |

- ¹⁹ Munford RS, De Taunay A, De Morais JS, Fraser DW, Feldman RA. Spread of meningococcal infection within households. *Lancet* 1974; i: 1275-8.
- ²⁰ Scholten R, Bijlmer HA, Dankert J, Valkenburg HA. Secondary cases of meningococcal disease in the Netherlands, 1989-90. A reappraisal of chemoprophylaxis. *Ned Tijdschr Geneesk* 1993; 137:1505-8.
- ²¹ Meningococcal Disease Surveillance Group. Analysis of endemic meningococcal disease by serogroup and evaluation of chemoprophylaxis. *J Infect Dis* 1976; 134(2): 201-4.
- ²² Davison KL, Andrews N, White JM, Ramsay M.E, Crowcroft NS, Rushdy AA et al. Clusters of meningococcal disease in school and preschool settings in England and Wales: What is the risk? *Arch Dis Child* 2004; 89: 256-60.
- ²³ Centers for Disease Control and Prevention. Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases Chapter 8: Meningococcal Disease. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 2014.
- ²⁴ HSE. Meningococcal Infection. September 2016. Ultimo accesso 26 marzo 2017
<http://www.hse.ie/eng/health/immunisation/hcpinfo/guidelines/chapter13.pdf>
- ²⁵ Public Health England. Invasive meningococcus capsular group B (MenB); preventing secondary cases. 2014.
https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/328835/invasive_meningococcus_secondary_case_prevention_April_2014.pdf Ultimo accesso 26 marzo 2017
- ²⁶ Camilli R., Daprai L., Cuvrini F., Lombardo D., D'Ambrosio F., Del Grosso M., Vescio M.F., Landini M.P., Pascucci M.G., Torresani E., Garlaschi M.L., Sambri V., Pantosti A. Pneumococcal carriage in young children one year after introduction of the 13-valent conjugate vaccine in Italy. *PLoS ONE*, 2013; 8(10):e76309.
- ²⁷ Pasinato A., Indolfi G., Marchisio P., Valleriani C., Cortimiglia M., Spancvello V., Chlamenti G., Buzzetti R., Resti M., Azzari C.; Italian Group for the Study of Bacterial Nasopharyngeal Carriage in Children. Pneumococcal serotype distribution in 1315 nasopharyngeal swabs from a highly vaccinated cohort of Italian children as detected by RT-PCR. *Vaccine*, 2014; 32(12):1375-81.
- ²⁸ Orsi A., Ansaldi F., Trucchi C., Rosselli R., Icardi G. Pneumococcus and the Elderly in Italy: A Summary of Available Evidence Regarding Carriage, Clinical Burden of Lower Respiratory Tract Infections and On-Field Effectiveness of PCV13 Vaccination. *Int. J Mol Sci*, 2016; 17, 1140.
- ²⁹ Esposito S., Mari D., Bergamaschini L., Orenti A., Terranova L., Ruggiero L., Icardi V., Gambino M., Croce F.D., Principi N. Pneumococcal colonization in older adults. *Immun Ageing*, 2016; 13:2.
- ³⁰ Errico G., Lucarelli C., D'Ambrosio F., Del Grosso M., Ingrosso L., Pantosti A., Camilli R. Application of capsular sequence typing (CST) to serotype non-viable *Streptococcus pneumoniae* isolates from an old collection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016; DOI 10.1007/s10096-016-2755-0.
- ³¹ Public Health Agency of Canada. *Haemophilus influenzae*. <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-rsss/haemophilus-influenzae-eng.php> Ultimo accesso 26/03/2017.
- ³² PHE. The Green Book. *Haemophilus influenzae* type b (Hib) Chapter 16..
https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/147953/Green-Book-Chapter-16.pdf
- ³³ PHE. Revised recommendations for the prevention of secondary *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease. 1 July 2013.
https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/231009/Revised_recommendations_for_the_prevention_of_secondary_Haemophilus_influenzae_type_b_disease.pdf Ultimo accesso 31/03/2017
- ³⁴ Ministero della Salute. Piano Nazionale Prevenzione Vaccinale. PNPV 2017-2019.
http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2571_allegato.pdf
- ³⁵ Ministero della salute. Circolare Aspetti operativi per la piena e uniforme implementazione del nuovo PNPV 2017-2019 e del relativo Calendario Vaccinale. 9 marzo 2017
<http://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormisanPdf?anno=2017&codLeg=58583&parte=1%20&serie=nu>
Il Ultimo accesso 26/03/2017