



**Sorveglianza dell'epatite E in Italia:
malattia emergente nei paesi industrializzati
(Sorveglianza integrata epidemiologica, virologica, ambientale)**

Istituto Superiore di Sanità

**Protocollo
Gennaio 2014**

Responsabile Scientifico: Dr.ssa Maria Elena Tosti
Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute
Istituto Superiore di Sanità
Viale Regina Elena 299, 00161 Roma
Tel 06 49904167
Fax 06 49904170
e-mail: mariaelena.tosti@iss.it

INTRODUZIONE

L'epatite E, infezione nota per essere, in molti Paesi in via di sviluppo, un'infezione endemica a trasmissione feco-orale, nei Paesi industrializzati oggi si presenta invece come malattia emergente: è in aumento infatti il numero di casi autoctoni, nonostante sia sempre stata considerata rara in questi Paesi e confinata ai viaggiatori provenienti da aree endemiche (1, 2, 3, 4).

In Italia, nonostante valori alti di prevalenza di anticorpi anti-HEV nell'uomo, riportati da diversi studi condotti negli anni '90 (dell'1-3% circa nel Centro-Nord e del 3-6% nel Sud e nelle Isole), l'effettivo numero di casi di epatite acuta E diagnosticati e notificati al sistema di sorveglianza dell'Istituto Superiore di Sanità SEIEVA (Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta), è relativamente basso (4-9). Questa sottostima dei casi di epatite E in Italia è dovuta a quattro fattori principali: (a) carattere spesso sub-clinico dell'infezione, per la diffusione di ceppi di virus HEV a bassa patogenicità (4, 10, 11); (b) mancata esecuzione delle indagini sierologiche specifiche per l'HEV in molti centri clinici: nel periodo 2007-2010 solamente il 22,8% dei casi notificati di epatiti acute nonA-nonC o "non classificate" è stato saggiato per la presenza di IgM anti HEV (dati SEIEVA); (c) mancanza di un'adeguata standardizzazione delle metodiche diagnostiche sierologiche, che dà luogo ad un numero imprecisato di falsi negativi; (d) assenza di un saggio di rilevamento del genoma virale commerciale, necessario in quei casi in cui la comparsa delle IgM nel siero non sia rilevabile. A ciò si aggiunge il fatto che le fonti di infezione e le modalità di trasmissione dell'infezione autoctona da HEV In Italia, come negli altri Paesi industrializzati, non siano ben definite.

Si conoscono 4 genotipi e diversi sottotipi del virus HEV che differiscono tra loro per distribuzione geografica, ospiti suscettibili di infezione e pattern di infezione, sebbene siano sierologicamente simili (12). Studi recenti di epidemiologia molecolare in aree non endemiche riportano che la maggior parte delle infezioni autoctone è causata da virus HEV genotipo 3 che, insieme al genotipo 4, ha un'alta prevalenza anche in alcuni animali, principalmente i maiali in cui dà un'infezione asintomatica, ma anche i cinghiali, i cervi, le manguste e i bivalvi (10-15). La maggior parte delle infezioni autoctone è autolimitante, asintomatica e/o anitterica, ma si presenta persistente e più severa in pazienti immunodepressi, e interessa maggiormente individui d'età ≥ 60 anni (10, 15). Un recente studio condotto in Italia riporta una prevalenza del virus HEV nei maiali di quasi il 30% (13). Inoltre la conferma di una stretta omologia genetica tra ceppi HEV umani e ceppi HEV infettanti gli animali, i maiali in particolare, fa riconoscere l'epatite E come possibile zoonosi, stimolando una maggiore attenzione a tale problema (14, 15). L'alta prevalenza di anticorpi anti-HEV nei Paesi industrializzati potrebbe derivare quindi da infezioni inapparenti con ceppi HEV di origine animale. I maiali, anche se apparentemente sani, in modo particolare potrebbero rappresentare una fonte d'infezione per l'uomo e la trasmissione potrebbe avvenire per un'esposizione occupazionale (ad esempio per gli allevatori di maiali, per lavoratori in industrie che preparano prodotti alimentari a base di carne di maiale o per i veterinari) (11, 13, 15) attraverso il contatto diretto con secreti, escreti o organi contaminati con materiale fecale contenente il virus, o attraverso l'ingestione di prodotti alimentari contaminati a base di carne di maiale, consumati crudi o poco cotti. E' anche possibile la contaminazione con HEV delle acque superficiali con un rischio importante per la salute pubblica (16, 17).

Nonostante le recenti evidenze sierologiche, cliniche e di genetica molecolare a supporto dell'ipotesi dell'epatite E come possibile zoonosi, sarebbe opportuno confermare ulteriormente l'associazione tra infezioni autoctone da HEV ed i suddetti fattori di rischio, valutare il reale burden dell'infezione ed organizzare, avvalendosi della rete SEIEVA già esistente, una rete di sorveglianza per monitorare l'infezione da HEV.

OBIETTIVO GENERALE

L'obiettivo generale del presente studio è quello di valutare la diffusione dell'infezione da HEV in Italia ed in particolare di stimare l'incidenza di epatite E per area geografica, età e sesso. Eventuali

focolai epidemici individuati verranno studiati, in collaborazione con le ASL di pertinenza, con metodologia caso-controllo e di coorte.

OBIETTIVI SPECIFICI

1. Analisi della viremia HEV in soggetti con epatite acuta nonA-nonC afferenti alla rete SEIEVA. Analisi delle IgM ed IgG anti-HEV nel caso la ASL non possa eseguire direttamente tali test.
2. Stima della proporzione di casi d'importazione ed autoctoni, mediante stima delle proporzioni di diversi genotipi HEV circolanti in Italia con l'impiego di tecniche di caratterizzazione molecolare (sequenziamento del genoma virale ed analisi filogenetica).
3. Definizione dei fattori di rischio per HEV e caratterizzazione clinica.
4. Incentivazione, attraverso la rete SEIEVA, dell'esecuzione dei test diagnostici sierologici.
5. Sorveglianza della diffusione ambientale del virus HEV e correlazione con le infezioni autoctone ed importate nell'uomo, utilizzando un network di 30-40 impianti di depurazione distribuiti in tutte le regioni italiane.

DISEGNO DELLO STUDIO

Preliminarmente all'inizio dello studio il centro di coordinamento dell'ISS provvederà a invitare a partecipare allo studio tutte le ASL della rete SEIEVA con relativa scheda di adesione, in cui saranno indicati il/i centro clinico afferente alla specifica ASL che parteciperà al progetto, i nominativi ed i recapiti telefonici dei Responsabili per lo studio del reparto del centro clinico partecipante, nonché i nominativi ed i recapiti telefonici dei Responsabili e degli incaricati del trattamento dei dati. La lettera di invito per le ASL verrà utilizzata anche come strumento per promuovere a livello territoriale l'esecuzione delle indagini di diagnosi sierologica per l'epatite E.

Popolazione in studio

La popolazione in studio sarà costituita da due sottogruppi di pazienti con epatite acuta ricoverati presso i centri clinici partecipanti, indicati dalle ASL che aderiscono allo studio:

1. Casi di **epatite E** individuati dai centri clinici suddetti e notificati al SEIEVA attraverso la specifica scheda epidemiologica
2. Casi di **epatite nonA-nonC** notificati dalle ASL i cui centri clinici afferenti non sono in grado di eseguire le analisi sierologiche (ricerca delle IgM anti-epatite E e, in caso di positività, ricerca ed eventuale caratterizzazione del virus).

Criterio di inclusione

- Tutti i casi confermati di epatite E
- Tutti i casi di epatite nonA-nonC individuati dalle ASL per cui non viene eseguita la ricerca delle IgM anti epatite E

Criteri di esclusione

- Età inferiore ai 18 anni.
- Incapacità di intendere e di volere.
- Mancanza del consenso informato allo studio ed al prelievo/conservazione/utilizzazione del materiale biologico.

Raccolta delle informazioni

Le ASL/centri clinici aderenti allo studio dovranno prontamente segnalare al centro di Coordinamento presso l'ISS la notifica di tutti i casi di epatite E o, per i centri che non eseguono direttamente la ricerca degli anticorpi anti epatite E, di epatite nonA-nonC, attraverso l'invio del questionario epidemiologico SEIEVA.

Ad ogni soggetto incluso nello studio verrà somministrato tale questionario contenente informazioni socio-demografiche quali età, sesso, luogo di residenza, attuale occupazione, quadro clinico ed

informazioni sui fattori di rischio quali il consumo di frutti di mare e di acqua di pozzo, nonché i viaggi effettuati nel periodo precedente all'insorgenza dei sintomi.

Oltre al questionario SEIEVA verrà somministrata anche una scheda predisposta *ad hoc* per lo studio, che conterrà informazioni non incluse nel questionario SEIEVA e specifiche per l'epatite E (dati clinici, fattori di rischio).

Entrambi i questionari verranno somministrati a tutta la popolazione arruolata: casi di epatite E e di epatite nonA-nonC.

Per quanto riguarda i dati virologici, tutte le analisi verranno eseguite presso le seguenti unità operative del progetto: Dipartimento MIPI dell'ISS e Dipartimento di Sanità Pubblica-Microbiologia-Virologia dell'Università di Milano. I sieri verranno analizzati presso uno dei due laboratori in base alla collocazione geografica della ASL di notifica: presso il Dipartimento MIPI dell'ISS i sieri inviati dalle ASL del Centro-Sud e presso il Dipartimento di Sanità Pubblica-Microbiologia-Virologia dell'Università di Milano quelli provenienti dalle ASL del Nord.

Tutti i campioni di siero congelato dovranno essere spediti in ghiaccio secco.

Per i test eseguiti a livello centrale, le positività agli stessi verranno comunicate al centro di coordinamento dell'ISS che provvederà a rendere noti i risultati alle ASL.

Articolazione del progetto e tempi di realizzazione

Lo studio prevede una durata di 24 mesi.

SORVEGLIANZA AMBIENTALE

Durante il corso dello studio sarà effettuata una sorveglianza ambientale, utilizzando un network georeferenziato (http://www.pcrilab.net/depuratori/Depuratori_ProgettoCCM_2012_list.php) di impianti di depurazione di acque reflue urbane tramite la collaborazione delle ARPA (Agenzie Regionali per la Protezione Ambientale) locali o per diretta collaborazione del gestore. Il Reparto di Microbiologia e Virologia Ambientale e Wellness dell'ISS si occuperà della identificazione e caratterizzazione molecolare di HEV in acque reflue urbane. Per la ricerca di HEV in reflui urbani verranno raccolti per un anno, con cadenza mensile o bimensile, campioni da tutte le regioni italiane, utilizzando un network ambientale di circa 30-40 impianti di depurazione dislocati in tutta Italia (Fig. 1).

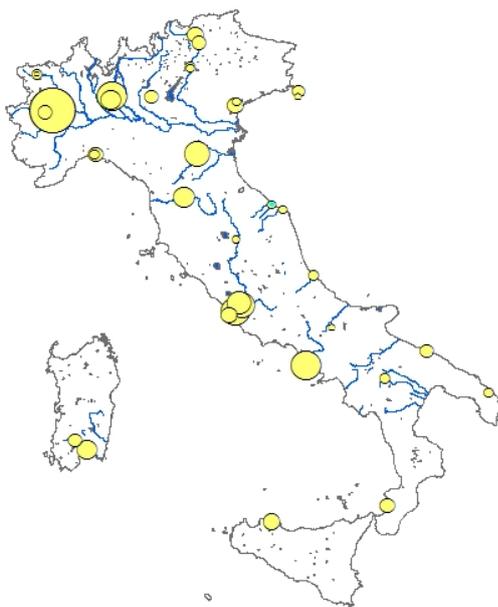


Figura 1. Mappa georeferenziata del network di campionamenti di acque reflue urbane.

Il sistema semiautomatico NucliSENS™ miniMAG sarà utilizzato per l'estrazione degli acidi nucleici con silice magnetica sui campioni purificati. Verranno utilizzati diversi sistemi diagnostici molecolari *broad-range* e genotipo-specifici (RT-PCR di tipo nested o eminested), già testati su campioni ambientali e clinici. I ceppi di HEV saranno caratterizzati attraverso analisi delle sequenze delle regioni polimerasica (ORF1) e capsidica (ORF2). Opportuni controlli interni (calicivirus fenino e/o norovirus murino) saranno utilizzati per monitorare l'intero processo, dalla purificazione alla amplificazione degli acidi nucleici. I dati molecolari acquisiti permetteranno di costituire una collezione georeferenziata di sequenze nucleotidiche, disponibile per il confronto con ceppi (umani e animali) riscontrati in paesi e periodi diversi depositate su GenBank.

SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA

Il centro di coordinamento dell'ISS opererà un monitoraggio continuo dei dati e fornirà un quadro epidemiologico aggiornato dei casi di epatite E, con particolare riferimento all'incidenza per area geografica, età e sesso. Valuterà inoltre la distribuzione dei fattori di rischio.

Grazie alla collaborazione dei centri clinici afferenti alle ASL che segnaleranno i casi di epatite E, sarà possibile una più accurata descrizione dell'espressività clinica dell'infezione.

SORVEGLIANZA VIROLOGICA

I sieri inviati a livello centrale (ISS e Univ. Milano) saranno sottoposti a:

1. determinazione della presenza di IgM ed IgG anti-HEV mediante saggi commerciali (qualora non effettuata dalla ASL);
2. determinazione della viremia mediante metodica standardizzata di Real-Time PCR;
3. caratterizzazione molecolare del virus mediante sequenziamento ed analisi filogenetica, per i campioni risultati positivi per HEV RNA.

ELABORAZIONE DATI

Il calcolo delle incidenze verrà fatto utilizzando, come denominatore dei casi osservati, la somma popolazione delle ASL che hanno fornito i casi. Le incidenze verranno calcolate nel complesso e divise per fasce di età, sesso ed area geografica.

Per quanto riguarda lo studio dei fattori di rischio verrà fatta un'analisi descrittiva di quelli riportati dai casi di epatite E. Per lo studio di quei fattori di rischio che sono riportati sulla scheda SEIEVA, verrà predisposto uno studio di tipo caso-controllo per il quale verranno utilizzati come controlli i casi di epatite B notificati al SEIEVA nello stesso periodo di notifica dei casi di epatite E e dalle stesse ASL che collaborano al presente studio.

RISULTATI ATTESI E POTENZIALITÀ APPLICATIVE

I risultati che emergeranno dalla collaborazione scientifica di tutte le UU.OO. partecipanti a questo progetto permetteranno di acquisire fondamentali informazioni e conoscenze sulla diffusione dell'infezione da HEV in Italia: verrà fornito un quadro epidemiologico aggiornato dei casi di epatite E con rappresentazione GIS (Geographic Information System), con particolare riferimento all'incidenza per area geografica, età e sesso e verrà valutata inoltre la distribuzione dei fattori di rischio. Inoltre con la collaborazione dei centri clinici afferenti alle ASL che segnaleranno i casi di epatite E, sarà possibile una più accurata descrizione dell'espressività clinica dell'infezione.

Il sistema di sorveglianza consentirà di promuovere a livello territoriale l'esecuzione delle indagini di diagnosi sierologica. Tutto ciò comporterà un'importante ricaduta in Sanità Pubblica, in quanto sarà possibile suggerire più efficaci e mirate strategie preventive e di controllo dell'infezione (come ad esempio il trattamento delle acque e dei prodotti alimentari) che potranno concretizzarsi in un'ulteriore riduzione della diffusione delle Epatiti virali acute in Italia, da attendersi già a breve termine dalla loro attuazione.

Al contempo si provvederà ad una standardizzazione dei test di diagnosi virologica (Real Time PCR vs. Nested PCR) e sierologica che porterà ad una riduzione della quota di falsi negativi.

FINANZIAMENTI

Lo studio è finanziato dal CCM (Ministero della Salute), all'interno del Programma CCM 2011.

UNITÀ OPERATIVE COINVOLTE NELLA RICERCA

Centro di Coordinamento (Unità Operativa 1):

Dr.ssa Maria Elena Tosti, Dr.ssa Valeria Alfonsi: Centro Nazionale di Epidemiologia Sorveglianza e Promozione della Salute - Istituto Superiore di Sanità.

Unità Operativa 2:

Prof. Zanetti Alessandro, Dr.ssa Romanò Luisa, Dr.ssa Paladini Sara, Tagliacarne Catia: Dipartimento di Sanità Pubblica – Microbiologia – Virologia, Università degli Studi di Milano

Unità Operativa 3:

Dr.ssa Annarita Ciccaglione, Dr. Roberto Bruni: Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate (MIPI) - Istituto Superiore di Sanità.

Unità Operativa 4:

Dr. Michele Muscillo, Dr.ssa Giuseppina La Rosa, Dr.ssa Simonetta Della Libera, Marcello Iaconelli, Dr.ssa Marta Fratini, Dr.ssa Graziana D'Oro, Dr.ssa Valentina Spuri-Vennarucci, Stefania Trinca: Reparto di Microbiologia e Virologia Ambientale e Wellness – Istituto Superiore di Sanità.

Bibliografia

1. Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis.* 2008 Nov;8(11):698-709. Review.
2. Acharya SK, Panda SK. Hepatitis E: water, water everywhere - now a global disease. *J Hepatol.* 2011 Jan;54(1):9-11.
3. Takahashi M, Tamura K, Hoshino Y, Nagashima S, Yazaki Y, Mizuo H, Iwamoto S, Okayama M, Nakamura Y, Kajii E, Okamoto H. A nationwide survey of hepatitis E virus infection in the general population of Japan. *J Med Virol.* 2010 Feb;82(2):271-81.
4. Romanò L, Paladini S, Tagliacarne C, Canuti M, Bianchi S, Zanetti AR. Hepatitis E in Italy: a long-term prospective study. *J Hepatol.* 2011 Jan;54(1):34-40.
5. Zanetti AR, Dawson GJ. Hepatitis type E in Italy: a seroepidemiological survey. Study Group of Hepatitis E. *J Med Virol.* 1994 Mar;42(3):318-20.
6. Gessoni G, Manoni F. Hepatitis E virus infection in north-east Italy: serological study in the open population and groups at risk. *J Viral Hepat.* 1996 Jul;3(4):197-202.
7. Cacopardo B, Russo R, Preiser W, Benanti F, Brancati G, Nunnari A. Acute hepatitis E in Catania (eastern Sicily) 1980-1994. The role of hepatitis E virus. *Infection.* 1997 Sep-Oct;25(5):313-6.
8. Ripabelli G, Sammarco ML, Campo T, Montanaro C, D'Ascenzo E, Grasso GM. Prevalence of antibodies against enterically transmitted viral hepatitis (HAV and HEV) among adolescents in an inland territory of central Italy. *Eur J Epidemiol.* 1997 Jan;13(1):45-7.
9. Rapicetta M, Kondili LA, Pretolani S, Stroffolini T, Chionne P, Villano U, Madonna E, Casali F, Gasbarrini G. Seroprevalence and anti-HEV persistence in the general population of the Republic of San Marino. *J Med Virol.* 1999 May;58(1):49-53
10. Bihl F, Negro F. Hepatitis E virus: a zoonosis adapting to humans. *J Antimicrob Chemother.* 2010 May;65(5):817-21.
11. Masia G, Orrù G, Liciardi M, Desogus G, Coppola RC, Murru V, Argiolas M, Orrù G. Evidence of hepatitis E virus (HEV) infection in human and pigs in Sardinia, Italy. *J Prev Med Hyg.* 2009 Dec;50(4):227-31.
12. Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 2007 Aug;127(2):216-28.
13. Martelli F, Toma S, Di Bartolo I, Caprioli A, Ruggeri FM, Lelli D, Bonci M, Ostanello F. Detection of Hepatitis E Virus (HEV) in Italian pigs displaying different pathological lesions. *Res Vet Sci.* 2010 Jun;88(3):492-6.
14. Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol.* 2008 Mar;48(3):494-503.
15. Pavio N, Meng XJ, Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res.* 2010 Nov-Dec;41(6):46. Epub 2010 Apr 2. Review
16. La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Vennarucci VS, Muscillo M. Molecular detection of hepatitis E virus in sewage samples. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Sep;76(17):5870-3.
17. La Rosa G, Muscillo M, Spuri Vennarucci V, Garbuglia AR, La Scala P, Capobianchi MR. Hepatitis E Virus In Italy: Molecular Analysis Of Travel-Related And Autochthonous Cases. *J Gen Virol.* 2011 Apr 6.