

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Epidemia di epatite virale A
in Campania (gennaio-agosto 2004).
Rapporto conclusivo**

A cura di

Delia Boccia (a), Giuseppe Pontrelli (b), Massimiliano di Renzi (a),
Francesco Giugliano (c), Lucia Pastore Celentano (b), Marco Massari (b),
Maria Rapicetta (d), Luciana Croci (e), Stefania Salmaso (b),
e il Gruppo di lavoro *ad hoc* per l'indagine in Campania

(a) *EPIET, European Programme for Intervention Epidemiology Training*

(b) *Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Servizio di Epidemiologia e Prevenzione, ASL Napoli 5, Napoli*

(d) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(e) *Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

05/31

Istituto Superiore di Sanità

Epidemia di epatite virale A in Campania (gennaio-agosto 2004). Rapporto conclusivo.

A cura di Delia Boccia, Giuseppe Pontrelli, Massimiliano Di Renzi, Francesco Giugliano, Lucia Pastore Celentano, Marco Massari, Maria Rapicetta, Luciana Croci, Stefania Salmaso, e il Gruppo di lavoro *ad hoc* per l'indagine in Campania

2005, iii, 39 p. Rapporti ISTISAN 05/31

Nel 2004 nella regione Campania si è verificata una estesa epidemia di epatite virale A con 882 casi segnalati nel periodo 1° gennaio-1° agosto. L'Osservatorio Epidemiologico Regionale, i Servizi di Epidemiologia e Prevenzione di ASL, e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) hanno collaborato per individuare la possibile fonte di infezione e le modalità di trasmissione, al fine di indicare alle autorità locali le adeguate misure di controllo. Come primo intervento è stato rafforzato e accelerato il sistema di segnalazione delle nuove diagnosi di epatiti da virus A attraverso l'istituzione di un sistema computerizzato (denominato EPOS) di registrazione dei dati, accessibile via Internet e consultabile dai diversi operatori delle ASL di competenza, in grado anche di elaborare in modo automatico le segnalazioni e produrre curve epidemiche. È stato condotto uno studio caso-controllo tra i residenti di Ercolano, comune con il più elevato tasso di attacco. Studi di identificazione e genotipizzazione virale sono stati effettuati sul siero di un campione di convenienza da pazienti ricoverati in due ospedali regionali e su campioni, raccolti in modo sistematico, di frutti di mare commercializzati nella regione. Uno stesso genotipo di virus A è stato identificato nel 90% dei pazienti, suggerendo che l'epidemia abbia avuto origini locali. I risultati dello studio epidemiologico analitico hanno confermato il consumo dei frutti di mare, in particolare quelli conservati illegalmente in acqua, come il fattore di rischio più rilevante per l'acquisizione dell'infezione. L'indagine microbiologica sugli alimenti ha confermato la presenza di stipiti virali da epatite virale A nei prelievi fatti.

Parole chiave: HAV, Genotipizzazione, Epidemia, Studio caso-controllo

Istituto Superiore di Sanità

An outbreak of hepatitis A in Campania, Southern Italy (January-August 2004). Final report.

Edited by Delia Boccia, Giuseppe Pontrelli, Massimiliano Di Renzi, Francesco Giugliano, Lucia Pastore Celentano, Marco Massari, Maria Rapicetta, Luciana Croci, Stefania Salmaso, and the *ad hoc* Working group in Campania region

2005, iii, 39 p. Rapporti ISTISAN 05/31 (in Italian)

During 2004 a large outbreak of hepatitis A virus (HAV) occurred in Campania, in Southern Italy, with 882 cases reported from January 1 until August 1. The regional and local epidemiological units together with the Istituto Superiore di Sanità (the Italian National Institute of Health) carried out activities in order to identify the infection source, the route of transmission, and to point out appropriate control measures. The ordinary surveillance system was enhanced with a web based reporting system (named EPOS), remotely accessed by various competent public health professionals, and able to produce standardised analyses and epidemic curves. A case-control study was conducted among residents of Ercolano, the municipality with the highest attack rate. Viral identification and genotyping were carried out on sera of a sub-set of patients cared in two regional hospitals and on samples of seafood systematically collected by retailers across the region Campania. A same genotype of HAV was identified in 90% of the patients, pointing out the relevance of local contamination. The epidemiological analytical study showed that raw seafood consumption, in particular those illegally kept in water, was strongly associated with the development of HAV illness. The microbiological investigation on seafood identified the presence of HAV strains on the samples taken.

Key words: HAV, Genotyping, Outbreak, Case-control study

Supporto editoriale e grafico: Stefania Giannitelli

Si ringrazia il dott. John Parry dell'Health Protection Agency di Londra per l'analisi immunologica effettuata sui tamponi di saliva collezionati.

Per informazioni su questo documento rivolgersi a: salmaso@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2005

Gruppo di lavoro *ad hoc* per l'indagine di HAV in Campania

Referenti in Campania:

Renato PIZZUTI	<i>Osservatorio Epidemiologico Regione Campania</i>
Francesco FAELLA	<i>Ospedale Cotugno, Napoli</i>
Evangelista SAGNELLI	<i>Ospedale Civile, Caserta</i>
Maria Antonietta FERRARA	<i>ASL AV2</i>
Paolo D'ARGENIO	<i>ASL BN1</i>
Crescenzo BOVE	<i>ASL CE1</i>
Angelo D'ARGENZIO	<i>ASL CE2</i>
Andrea SIMONETTI	<i>ASL NA1</i>
Antonino PARLATO	<i>ASL NA2</i>
Filomena PELUSO	<i>ASL NA3</i>
Raffaele PALOMBINO	<i>ASL NA4</i>
Anna Luisa CAIAZZO	<i>ASL SA1</i>
Maria Grazia PANICO	<i>ASL SA2</i>
Giuseppe DI FLURI	<i>ASL SA3</i>

Referenti per le indagini microbiologiche:

Istituto Superiore di Sanità

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate

Domenico GENOVESE

Stefania TAFFON

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari

Simona DI PASQUALE

Francesco SCALISE

Supporto informatico:

CINECA, Centro Interuniversitario per il Calcolo Avanzato, Bologna

Luca DEMATTÈ

Inoltre hanno collaborato all'indagine:

ASL CE1

Domenico PROTANO

ASL CE2

Concetta IANNIELLO

Servizio di Epidemiologia e Prevenzione, ASL NA5

Rosario COLUCCIO

Vincenzo GRECO

Silvio FORMISANO

Roberto RUSSO

Unità Operativa Collettiva, Distretto di Ercolano

Giuseppe CASCONE

Aldo GINI

Antonio PAPA

Direzione Sanitaria Distretto di Ercolano

Felice MAIORANO

INDICE

Introduzione	1
Descrizione dell'epidemia	4
Obiettivi	4
Metodi.....	4
Epidemiologia descrittiva.....	4
Identificazione e genotipizzazione dell'HAV da campioni di siero	5
Identificazione e genotipizzazione dell'HAV da campioni alimentari.....	6
Determinazione dell'RNA virale.....	6
Prova di conferma su colture cellulari	7
Risultati.....	7
Epidemiologia descrittiva.....	7
Indagini virologiche sui casi	11
Indagini virologiche sugli alimenti	12
Epidemiologia analitica	14
Obiettivi	14
Obiettivo principale.....	14
Obiettivi secondari	14
Metodi.....	14
Disegno dello studio.....	14
Definizione di caso.....	14
Definizione e selezione dei controlli.....	15
Dimensione del campione e potenza dello studio	15
Raccolta dei dati	15
Analisi dei dati	16
Raccolta dei campioni di saliva.....	16
Logistica.....	17
Risultati.....	17
Descrizione dei casi.....	17
Descrizione dei controlli	18
Analisi univariata	20
Analisi multivariata.....	21
Indagini immunologiche sulla saliva.....	22
Discussione e conclusioni	23
Raccomandazioni	26
Bibliografia	28
Allegato	
Questionari utilizzati per l'indagine sui fattori di rischio	31

INTRODUZIONE

L'Italia viene considerata un paese a bassa endemia per l'epatite virale A (HAV, *Hepatitis A Virus*); presenta infatti tassi di incidenza annui intorno a 3 casi per 100.000 (1). L'analisi delle notifiche dell'ultimo decennio mostra tuttavia che il pattern epidemiologico di questa malattia non è uniforme su tutto il territorio nazionale ma le regioni meridionali del paese possono essere considerate una zona ad endemia intermedia, con tassi di incidenza annui che raggiungono i 30 casi per 100.000 (2).

In quasi tutti gli anni è evidente un aumento del numero dei casi segnalati nel primo trimestre seguito da un successivo incremento nel periodo estivo. Tale tendenza è più o meno marcata nei vari anni. La stagionalità più evidente è comunque legata ai mesi estivi nei quali si concentra la maggior parte dei casi. Questa osservazione suggerisce la presenza di una estesa trasmissione di tipo oro-fecale.

Tipicamente le zone ad endemia intermedia sono caratterizzate da epidemie ricorrenti: questi episodi si manifestano in maniera ciclica (ad intervalli di circa 5-10 anni), hanno di solito lunga durata e causano un incremento nell'incidenza annuale che può raggiungere anche i 50-200 casi/100.000. La maggiore incidenza è in genere concentrata nelle classi di età più giovani della popolazione (bambini, adolescenti e giovani adulti) (3).

Anche in Italia meridionale si sono verificate negli ultimi anni estese epidemie di epatite A che hanno presentato un simile pattern. L'episodio più rilevante si è verificato in Puglia nel 1996: l'epidemia si è protratta per circa due anni causando circa 11.000 casi, pari rispettivamente ad un tasso di incidenza annuale di 138 casi per 100.000 nel 1996 e 132 casi per 100.000 nel 1997. (4). Il tasso di attacco più alto si è osservato nella fascia di età 5-14 anni e 15-24 anni (rispettivamente pari a 35,5/100.000 e 68,9/100.000). Due studi analitici hanno dimostrato che il consumo di frutti di mare crudi e inappropriatamente mantenuti abbia costituito la maggiore sorgente di infezione (5). Questa epidemia ha coinvolto anche la Campania dove, negli anni 1996 e 1997, si sono verificati tassi di incidenza pari a 22 e 27 casi per 100.000 (Figura 1).

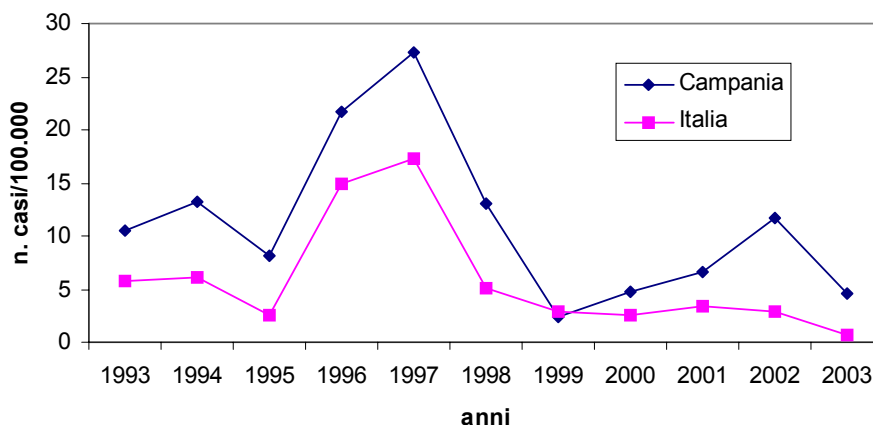


Figura 1. Incidenza annuale (n. casi/100.000/anno) dell'epatite A in Italia e nella regione Campania nel decennio 1993-2003

Il ruolo del consumo di frutti di mare nella trasmissione dell'epatite A in Italia è confermato dalle informazioni raccolte dal SEIEVA (Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale

Acuta) secondo il quale più del 60% dei casi di epatite A in Italia nel periodo 1985-1994 possono essere attribuiti al consumo di frutti di mare. Una quota minore viene invece attribuita ai contatti con casi di epatite (l'8% nel periodo 2000-2001), ai contatti con bambini asintomatici di età prescolare, e a viaggi in zone endemiche (6).

Il 2004 è stato un altro anno epidemico per l'Italia meridionale, e questa volta la regione coinvolta è stata la Campania. Alla fine di marzo 2004 l'Osservatorio Epidemiologico di questa Regione ha segnalato al Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) un insolito numero di casi di epatite A provenienti da varie ASL della regione, e in misura maggiore dalla ASL NA5. Il confronto con i dati di sorveglianza disponibili per lo stesso periodo di anni precedenti (dalla base di dati computerizzata SIMI) ha confermato che i casi osservati erano superiori rispetto all'atteso e che la situazione epidemiologica si configurava come una epidemia di HAV. Nei primi tre mesi del 2004 si è verificato un aumento delle notifiche per HAV in Campania, come evidenziato dalla Tabella 1 in cui si mostrano le notifiche per HAV degli stessi mesi negli anni dal 1996 al 2004.

Tabella 1. Campania. Numero di casi di epatite A riportati nel primo trimestre degli anni 1996-2004

Mese	Anno								
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
gennaio	7	31	40	8	4	15	19	11	26
febbraio	14	45	75	17	32	15	35	14	71
marzo	14	23	56	21	40	41	39	11	126

Agli inizi di aprile è stata richiesta la collaborazione del Reparto di Epidemiologia delle Malattie Infettive del CNESPS per effettuare indagini epidemiologiche descrittive e analitiche al fine di identificare la fonte dell'epidemia, le modalità di trasmissione e mettere in atto adeguate misure di controllo. Le interviste ad alcuni dei primi casi hanno indicato nel consumo di frutti di mare come verosimile fonte di infezione. Tale sospetto, in linea con i risultati pluriennali del sistema di sorveglianza SEIEVA per la Campania, è stato anche rafforzato dal fatto che alcuni dei primi casi si erano verificati tra i partecipanti ad uno stesso banchetto, e che costoro avevano riferito di aver consumato insieme frutti di mare unicamente in quella occasione. Il banchetto si era tenuto il 1 febbraio 2004 presso un ristorante nei dintorni di Caserta che si era rifornito di frutti di mare presso un fornitore presente sul territorio della ASL NA5, zona maggiore frequenza di casi. Il CNESPS ha collaborato alle indagini epidemiologiche condotte nella ASL CE2 fornendo supporto per uno studio di coorte tra i 30 partecipanti a tale banchetto.

Personale del Reparto Malattie Infettive del CNESPS ha effettuato varie missioni in Campania per un totale di 25 giorni persona per fornire supporto all'attività di coordinamento regionale dell'OER, partecipare a riunioni con i SEP e con i Veterinari e condurre le indagini sul campo.

Nell'ambito dell'indagine epidemiologica sono state effettuate le seguenti attività:

1. Implementazione e accelerazione del sistema di segnalazione dei casi: istituzione di un unico database regionale aggiornato settimanalmente da tutte le diverse ASL inizialmente mediante posta elettronica e successivamente mediante accesso protetto ad una pagina web appositamente costruita dal CNESPS in collaborazione con il CINECA-Consortio Interuniversitario per il Calcolo Avanzato, Bologna (EPOS, *EPidemic Observatory System*, <http://epos.cineca.it>).

2. Produzione di rapporti settimanali per il monitoraggio dell'epidemia distribuiti a tutte le ASL Campane
3. Realizzazione di uno studio caso-controllo in collaborazione con la ASL NA5 presso il comune di Ercolano per l'identificazione dei fattori di rischio e le modalità di trasmissione dell'HAV. Lo studio è stato inoltre accompagnato da una survey immunologica su campioni di saliva, condotta in collaborazione con l'*Health Protection Agency* di Londra
4. Identificazione e genotipizzazione di HAV da campioni clinici, forniti dall'ospedale di Caserta e dall'Ospedale Cotugno del virus dell'epatite in collaborazione con il Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie e Immunomediate.
5. Identificazione e genotipizzazione di HAV da campioni di frutti di mare commercializzati in Campania nel 2004, in collaborazione con il Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, ISS.

Il presente rapporto contiene un resoconto delle attività svolte (in termini di metodi e obiettivi) e dei principali risultati conseguiti.

DESCRIZIONE DELL'EPIDEMIA

Obiettivi

- Caratterizzare l'epidemia descrivendo i casi in termini di tempo di insorgenza sintomi, area di residenza e caratteristiche anagrafiche (età e sesso).
- Caratterizzare l'etiologia dell'epidemia identificando da un sottogruppo di pazienti ospedalizzati il virus HAV ed effettuando la genotipizzazione dei virus identificati.
- Migliorare la tempestività delle segnalazioni di nuovi casi di HAV per monitorare l'epidemia.
- Verificare la fattibilità della messa a punto di uno strumento on-line per la raccolta rapida e la gestione condivisa dei dati di focolai epidemici.
- Identificazione e genotipizzazione di HAV da campioni di frutti di mare commercializzati in Campania nel 2004.

Metodi

Epidemiologia descrittiva

Le informazioni sui singoli casi sono state raccolte mediante varie schede in uso nella Regione Campania: gli elenchi di pazienti ammessi in ospedale per sospetta malattia da HAV, il modello 15 di notifica di malattie infettive sui casi confermati, le schede SEIEVA compilate durante il ricovero ospedaliero, le schede di indagine epidemiologica compilate nella ASL di residenza dei casi se non coincidente con quella di diagnosi.

In una prima fase il CNESPS ha proposto e messo in atto un sistema di scambio di informazioni per via elettronica tra i SEP preparando basi di dati separate per ogni ASL con l'indicazione delle informazioni da raccogliere e riempire. Tali dati erano facilmente desumibili dalle diverse schede di segnalazione utilizzate. Le basi di dati sono state distribuite a tutte le ASL nella settimana 18 dell'anno, e attraverso l'invio per posta elettronica, hanno contribuito all'aggiornamento settimanale di un unico database regionale.

Sul sito web di Epicentro, portale di Sanità Pubblica Epidemiologica dell'ISS (www.epicentro.iss.it) è stata segnalata l'epidemia di HAV in Campania, e tutte le ASL italiane invitate alla segnalazione di eventuali casi di HAV, se diagnosticati successivamente ad un periodo di soggiorno in Campania nei primi mesi del 2004.

Nel frattempo, al fine di ottimizzare la segnalazione è stato messo a punto uno strumento basato sulla registrazione dei dati in tempo reale direttamente su uno stesso archivio elettronico, mediante accesso, da parte delle ASL, ad una pagina web protetta da passwords. Il sistema chiamato EPOS (*Epidemic Observatory System*) è stato realizzato insieme al CINECA (Consorzio Interuniversitario Calcolo, Bologna, Italia), ed è accessibile in rete all'indirizzo <http://epos.cineca.it>. Tale strumento permette di trascrivere le informazioni dei singoli casi in una banca dati visibile on-line da altri operatori sanitari. In questo modo si riducono i tempi di trasmissione di informazioni, raccolte da operatori e strutture diverse, ma che è opportuno condividere al fine di una tempestiva descrizione e del controllo dell'epidemia. Il sistema consente le seguenti operazioni: 1) registrare i dati di singoli pazienti diagnosticati e inviarli per via elettronica ad altri utenti competenti; 2) estrarre l'elenco dei pazienti segnalati e residenti

nella propria ASL; 3) verificare i dati mancanti sui pazienti, aggiungere nuove informazioni per ogni paziente raccolte successivamente alla diagnosi (ad esempio su esposizione a fattori di rischio) 4) rendere visibili le informazioni raccolte ad altri operatori competenti; 5) effettuare un'analisi descrittiva semplice dei casi (distribuzione per età e sesso); 6) redigere la curva epidemica dell'intero territorio regionale o specifica per singola ASL.

Ai fini della sorveglianza è stata utilizzata la seguente definizione di caso: ogni residente della regione Campania con diagnosi clinica di epatite A confermata sierologicamente attraverso il riscontro di IgM sieriche specifiche per HAV. I casi non confermati sierologicamente sono stati classificati come casi "probabili". Per ogni caso notificato (confermato o probabile), sono stati raccolti dati demografici e clinici di base (es. conferma sierologica, ricovero ospedaliero e giorni di ricovero, vaccinazione) e informazioni su alcuni fattori di rischio di interesse (es. consumo di frutti di mare, numerosità della famiglia, presenza di conviventi sotto i 5 anni di età).

Identificazione e genotipizzazione dell'HAV da campioni di siero

Da un sottogruppo di pazienti ricoverati presso l'Ospedale di Caserta (ospedale in cui sono stati registrati i primi casi) e l'Ospedale Cotugno di Napoli (in cui si è registrato il maggior numero di ricoveri per HAV) sono stati ottenuti campioni di siero raccolti in fase acuta.

I campioni sono stati analizzati presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate dell'ISS.

L'RNA di HAV è stato estratto da 200 µl di siero utilizzando il kit di estrazione QIAamp MiniElute Virus Spin (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. L'RNA è stato recuperato in 40 µl di tampone di eluizione. L'acido nucleico virale è stato amplificato tramite trascrizione inversa (RT) seguita da reazione a catena della polimerasi (PCR), in una regione del genoma virale corrispondente alla giunzione tra proteine VP1 e 2A, normalmente utilizzata per la genotipizzazione. L'RT è stata eseguita in un volume finale di 20 µl in una miscela contenente 10 µl di RNA, 1 µl di random primers 0,03 OD260/µl, 1 µl di dNTP 10 mM, 4 µl di tampone 5x, 2 µl di 0,1 M di DTT, 20 U di inibitore della RNasi e 200 U di trascrittasi inversa MMLV. I campioni sono stati incubati a 42 °C per 1 ora, e subito dopo incubati a 70 °C per 15 minuti. La PCR, è stata eseguita utilizzando metodi già descritti in letteratura (7), con solo poche modifiche. In pratica dopo denaturazione iniziale a 94 °C per 3 minuti, il cDNA ottenuto dalla reazione di RT (5 µl) è stato amplificato per 35 cicli secondo il seguente profilo termico: 94 °C per 30 secondi, 40 °C per 30 secondi, 72 °C per 1 minuto; alla fine è stato effettuato un ciclo di polimerizzazione finale per 7 minuti a 72 °C; il volume finale di reazione è stato di 50 µl. La seconda PCR è stata effettuata con 2 µl della prima PCR per 35 cicli nelle stesse condizioni. Di questa reazione, 2 µl sono stati analizzati per evidenziare la presenza del prodotto specifico mediante elettroforesi su gel di agarosio (1,8%), utilizzando il Sybr Green come colorante (lunghezza attesa delle bande: ~ 250 bp). Tutti i campioni positivi per l'RNA di HAV sono stati purificati con colonnine Centricon da 100,000 KDa (Millipore, Billerica, Mass.) per eliminare gli oligonucleotidi in eccesso; in seguito i campioni sono stati sequenziati utilizzando il kit "Big Dye 1.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguendo le istruzioni fornite dalla ditta e utilizzando gli stessi primers senso e antisense usati in seconda PCR. Per sequenziare tutti i campioni è stato utilizzato il sequenziatore automatico ABI 310.

In seguito le sequenze ottenute sono state allineate con le sequenze di riferimento tramite il programma Bioedit e analizzate una per una. La genotipizzazione è stata fatta tramite analisi filogenetica usando il metodo Neighbor-Joining e il programma MEGA 2.

Identificazione e genotipizzazione dell'HAV da campioni alimentari

Al fine di descrivere il livello di contaminazione dei frutti di mare in vendita nella regione Campania (sia come causa di trasmissione dell'infezione che come effetto di contaminazione ambientale successivo all'epidemia) è stato avviato, in collaborazione con le ASL di zona, un piano di campionamento di frutti di mare commercializzati nella Regione, che si è protratto per 15 settimane dal mese di marzo. I campioni di frutti di mare raccolti sono stati saggiati per la presenza di HAV presso il Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari dell'ISS. Sui campioni pervenuti è stata effettuata la determinazione del virus dell'epatite A mediante RT-Nested-PCR, utilizzando primers scelti nelle regioni più conservate dei diversi ceppi umani circolanti, la conferma della presenza del virus infettante nei campioni positivi veniva effettuata mediante metodo integrato colture cellulari-RT-PCR (8). Di seguito vengono riportate le fasi principali del metodo.

Determinazione dell'RNA virale

Eluizione e concentrazione del virus: un'aliquota di omogenato di mollusco (75 g) è stata diluita in tampone glicina (0,05 M, pH 9,2) in rapporto 1:1. Dopo agitazione per 30 minuti è stata centrifugata a 10.000 g per 15 minuti a 4 °C. Il supernatante è stato recuperato e il pH aggiustato a 7,2. Dopo due fasi di precipitazione con polyethylene glycol (PEG 8,000, Sigma, MO, USA) 50% e 7,5% NaCl P/V (PEG-NaCl) (9), il supernatante è stato posto sotto agitazione overnight a 4 °C e poi centrifugato a 10.000 g per 45 minuti a 4 °C. Il pellet è stato risospeso in 3 µL di PBS e centrifugato a 10.000 g per 10 minuti a 4°C. Il supernatante è stato poi estratto per due volte con il cloroformio (30% V/V). Estrazione dell'RNA virale: 300 µL della sospensione così preparata, (equivalente a 7,5 g di omogenato di mollusco), sono stati estratti con soluzione D e cloruro di cesio. Il pellet ottenuto veniva lavato con etanolo al 70% e asciugato, secondo il metodo precedentemente descritto (8,10). RT-Nested-PCR: il pellet è stato risospeso in 90 µL di una miscela di reazione contenente: Buffer II 1X PCR (Perkin-Elmer, New Jersey, USA), 2 mM di MgCl₂ (Perkin-Elmer), 0,2 mM di ciascun deossinucleotide trifosfato (dNTP) (Takara-Shuzo, Japan), 20 U di RNAsin (Promega, Madison, WI, USA), 1,25 U di AMV reverse transcriptase (Promega) e 100 pmoli di primer antisenso (5'-CATATGTATGGTATCTCAACAA-3'; localizzazione 1092-113 riferita al ceppo HM175); la miscela così preparata è stata incubata a 42 °C per 60 minuti. La reazione di retrotrascrizione è stata terminata ad una temperatura di 99 °C per 5 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 100 pmoli di primer senso (5'-CAGGGGCATTTAGGTTT-3'; localizzazione 698-714 riferita al ceppo HM175), 2,5 U di Taq DNA polimerasi (Perkin Elmer) e acqua tridistillata DNase-RNase-free (Sigma, USA) fino a raggiungere un volume finale di 100 µL. Si è proceduto alla reazione di amplificazione nelle seguenti condizioni (termociclatore, Gene Amp PCR System 9700 - Applied Biosystem): 30 cicli di PCR a 95 °C per 25 secondi, 49 °C per 10 secondi e 70 °C per 1 minuto. La reazione di PCR è stata completata con un tempo di estensione finale di 72 °C per 5 minuti. Cinque µL del prodotto ottenuto dalla prima PCR sono stati di nuovo amplificati in 95 µL di una miscela di reazione contenente: Buffer II 1X PCR (Perkin-Elmer, New Jersey, USA), 2mM di MgCl₂ (Perkin-Elmer), 0,2 mM di ciascun deossinucleotide trifosfato (dNTP) (Takara-Shuzo, Japan), 100 pmoli di primer senso (5'-TGATAGGACTGCAGTGACT-3'; localizzazione 1029-1047 riferita al ceppo HM175), 100 pmoli di primer antisenso (5'-CCAATTTTGCAACTTCATG-3'; localizzazione 836-854 riferita al ceppo HM175) e 2,5 U di Taq DNA polimerasi (Perkin Elmer). Si è proceduto alla reazione di amplificazione come descritto per la prima PCR Elettroforesi. 10 µL del prodotto amplificato

sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% (Kodak, New Haven, CT, USA) a 110V per 30 minuti. Il gel è stato colorato con bromuro d'etidio e fotografato con Bio-Rad Chemi Doc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). La lunghezza degli ampliconi era rispettivamente di 415 e 211 bp. L'analisi delle sequenze è stata effettuata utilizzando la metodica descritta per i campioni clinici.

Prova di conferma su colture cellulari

I campioni risultati positivi per presenza di RNA virale sono stati sottoposti a conferma per la presenza di virus infettante, mediante l'applicazione di un sistema integrato colture cellulari-RT-PCR (8, 11). Colture cellulari RT-PCR: un millilitro di estratto di mollusco è stato seminato su un monostrato cellulare di Frp/3 per un'ora a 37 °C ad una atmosfera controllata con aggiunta del 5% di CO₂. Dopo incubazione, è stato aggiunto il terreno EMEM al 2%. Il monostrato infettato è stato incubato per circa 15 gg per consentire al virus di replicarsi. Successivamente è stato sottoposto a trattamenti di congelamento e scongelamento (*freezing-tawin*) e il lisato cellulare così ottenuto è stato sottoposto a RT-PCR nelle condizioni sopra riportate.

Risultati

Epidemiologia descrittiva

Complessivamente nel periodo 01/10/04-1/08/04 sono stati registrati su EPOS 882 casi di epatite A. Per 694 casi (pari al 78,7% del totale) è stata registrata la conferma sierologica (positività per IgM HAV specifiche). Il profilo della curva epidemica (Figura 2) mostra 3 picchi fino alla settimana 18 distanziati da circa un mese l'uno dall'altro, seguiti da un apparente declino, e da un picco successivo tra la settimana 24 e 28. In accordo con il periodo medio di incubazione per l'epatite A (30 giorni), il primo picco di casi è compatibile con una sorgente di infezione puntuale che ha agito nel periodo di Natale. Alle successive generazioni di casi hanno probabilmente contribuito sia la persistenza della sorgente di infezione che, in misura minore, la trasmissione persona-persona.

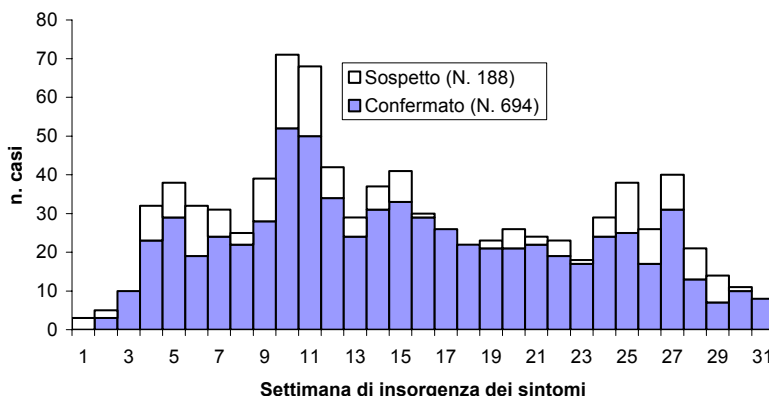


Figura 2. Distribuzione dei casi confermati e sospetti di epatite da HAV per settimana di insorgenza dei sintomi. Regione Campania, gennaio-agosto 2004

Durante questo periodo, il tasso di attacco per l'intera regione è stato pari a 15,9/100.000 abitanti, con ampie variazioni tra le ASL di residenza dei casi. Alcune ASL (BN1, AV1, CE1, SA2, SA3) hanno registrato pochissimi casi e un tasso d'attacco, nei sette mesi considerati,

inferiore ai 5 casi per 100.000. Le altre ASL sono state maggiormente coinvolte dall'epidemia, soprattutto la ASL NA5 in cui il tasso d'attacco è stato pari a 54,3/100.000, più che triplo rispetto alla media regionale (Figura 3). Per il calcolo dei tassi di attacco sono stati utilizzati i dati di popolazione forniti dal Ministero della Salute e aggiornati all'anno 2002 (www.ministerosalute.it/servizio/datixlsusl/xls2001/Strutture_ASL_2002.xls; ultimo accesso: novembre 2004). Quando i tassi di attacco per ASL di residenza vengono riportati sulla cartina della regione Campania, si osserva come le aree costiere sono state quelle più colpite dall'epidemia (Figura 4).

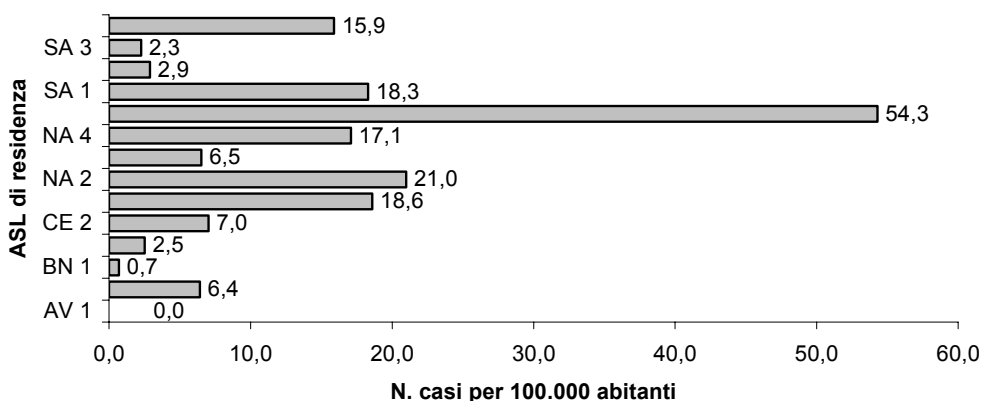


Figura 3. Tasso di attacco (n. casi/100.000 abitanti) complessivo e per ASL di residenza. Regione Campania (1° gennaio-1° luglio 2004)

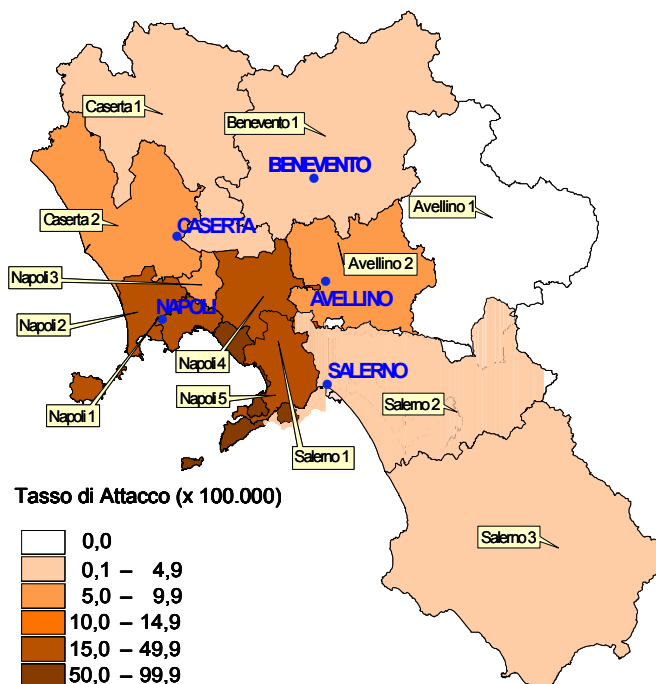


Figura 4. Tasso di attacco per ASL di notifica. Regione Campania (1° gennaio-31 luglio 2004)

L'analisi dei dati storici relativi alle notifiche per ASL nel periodo 1996-2004 mostrano che l'incremento più consistente di casi di epatite A si è verificato per le ASL CE2, NA2, NA4 e soprattutto NA5. Nel periodo di interesse sono stati notificati 341 casi nella sola area coperta dalla ASL NA5, il 56% di essi (n. 188) sono stati notificati nel periodo 16 febbraio-30 aprile 2004 e circa la metà di essi era residente nella sola città di Ercolano.

I tassi di attacco specifici per fascia di età mostrano che le fasce di età più colpite sono state quella tra 11-20 e 21-30 anni (rispettivamente con tasso d'attacco di 33,0 casi per 100.000 e 37,8 per 100.000) (Tabella 2). I casi riportati dalla ASL NA5 sono risultati complessivamente più giovani dei rimanenti casi osservati nella regione: in questa ASL le classi di età più colpite sono risultate quelle tra 6-10 e 11-20 (con tassi d'attacco approssimativamente pari a 145 per 100.000 in entrambi i gruppi). Questo si riflette anche nell'età mediana dei casi residenti in questa ASL che è risultata pari a 17 anni (range 1-62) a fronte di una mediana di 21 anni (range 1-76) osservata complessivamente per i rimanenti casi. La Tabella 3 riporta anche il dato relativo all'età mediana per singola ASL.

Tabella 2. Distribuzione per classe di età rispettivamente per tutti i casi, per i casi notificati dalla ASL NA5 e per i casi notificati da tutte le altre ASL. Regione Campania (gennaio-agosto 2004)

Classe di età	Totale			ASL NA5			Tutte le altre ASL		
	n. casi	popolazione	ta*	n. casi	popolazione	ta*	n. casi	popolazione	ta*
0-5	76	390.051	19,5	37	44.303	83,5	39	345.748	11,3
6-10	87	351.152	24,8	55	38.313	143,6	32	312.839	10,2
11-20	256	775.707	33,0	124	84.373	147,0	132	691.334	19,1
21-30	327	864.965	37,8	97	96.689	100,3	230	768.276	29,9
31-40	108	901.445	11,9	22	94.565	23,3	86	806.880	10,7
41+	28	2.442.048	1,1	6	268.748	2,2	22	2.173.300	1,0
Totale	882	5.725.368	15,4	341	626.991	54,4	541	5.098.377	10,6

*ta = tasso di attacco

Tabella 3. Età mediana dei casi riportati per singola ASL

ASL di residenza	Casi	Età mediana
Avellino 1	0	NC
Avellino 2	17	26
Benevento 1	2	NC
Caserta 1	10	27
Caserta 2	32	26
Napoli 1	187	23
Napoli 2	106	24
Napoli 3	25	21
Napoli 4	92	22
Napoli 5	341	17
Salerno 1	48	22
Salerno 2	16	27
Salerno 3	6	NC
Totale	882	21

NC= Non Calcolabile per ASL con un numero di casi inferiore a 10

La Tabella 4 presenta una sintesi delle principali informazioni raccolte per i casi. Per maggiore semplicità, le diverse ASL sono state raggruppate in 4 gruppi (indicati come macro-

aree) secondo il tasso di attacco crescente. La nota della Tabella 4 illustra le ASL incluse nei raggruppamenti e la cartina precedente la rappresentazione geografica; il gruppo 4 include solo la ASL NA5 che ha il tasso di attacco maggiore.

Tabella 4. Sintesi delle principali informazioni raccolte sui casi per macro area di notifica

Caratteristica	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3	Gruppo 4	Totale
<i>Range dei tassi di attacco riportati (per 100,000)</i>	0-4,9	5,0-9,9	15,0-49,9	50,9-99,9	
<i>Range di casi notificati nelle diverse ASL</i>					
minimo	0 (AV 1)	17 (AV 2)	48 (SA 1)	341 (NA5)	
massimo	16 (SA 2)	32 (CS 2)	187 (NA 1)		
Sesso					
n. maschi (%)	25(73,5)	44 (59,5)	262 (60,5)	196 (57,4)	527 (59,8)
n. femmine (%)	9(26,5)	30 (40,5)	171 (39,5)	145 (42,6)	355 (40,2)
<i>Età mediana (range)</i>	27 (1-76)	24 (2-56)	23 (2-67)	17 (1-54)	21 (1-76)
<i>N. casi ricoverati in ospedale (%)</i>					
non registrato (% totale)	1 (2,9)	3 (4,1)	24 (5,5)	75 (22,0)	103 (11,7)
sì	32 (96,7)	61 (85,9)	367 (89,7)	248 (93,2)	708 (90,9)
no	1 (3,3)	10 (14,1)	42 (11,3)	18 (6,8)	71(9,1)
<i>Mediana del numero di conviventi (range)</i>	3 (1-5)	3 (0-5)	3 (0-12)	4 (1-8)	3 (0-12)
non registrato (% totale)	16 (47,5)	39 (52,7)	163 (37,6)	277 (81,2)	495 (56,2)
<i>Consumo di frutti di mare</i>					
non registrato (% totale)	13 (38,2)	39 (52,7)	127 (29,3)	267 (78,3)	446 (50,1)
sì (%)	19 (90,5)	28 (80,0)	248 (81,0)	60 (81,1)	355 (81,4)
no (%)	2 (9,5)	7 (20)	58 (19,0)	14 (18,9)	81(18,6)
<i>Frutti di mare crudi *</i>	18 (94,7)	19 (67,9)	185 (74,6)	31 (51,7)	253 (71,3)
<i>Contatto con caso di epatite nei 2 mesi precedenti</i>					
non registrato (% totale)	16 (47,1)	42 (56,8)	205 (47,3)	277 (81,2)	540(61,2)
sì	2(11,1)	3 (9,4)	31 (13,6)	7 (10,9)	43 (12,6)
no	16 (88,9)	29 (90,6)	197 (86,4)	57 (89,1)	299 (87,4)
Totale dei casi notificati **	34 (3,8)	74 (8,5)	433 (48,3)	341 (39,3)	882 (100,0)

Gruppo 1: Tasso di attacco compreso tra 0.0- 4.9 per 100.000 abitanti (include Caserta 1, Benevento 1, Avellino 1, Salerno 2, Salerno 3); **Gruppo 2:** Tasso di attacco compreso tra 5.0-9.9 per 100.000 abitanti (include Caserta 2, Napoli 3, Avellino 2); **Gruppo 3:** Tasso di attacco compreso tra 15.9-49.9 per 100.000 abitanti (include Napoli 2, Napoli 1, Napoli 4, Salerno 1); **Gruppo 4:** Tasso di attacco superiore uguale a 50.0 per 100.000 (include solo Napoli 5).

* Percentuale calcolata sul totale di coloro che hanno dichiarato il consumo di frutti di mare

** Percentuale calcolata sul totale complessivo della regione

In tutte le macro-aree la maggior parte dei casi è risultata di sesso maschile. L'età mediana dei casi oscilla tra i 17 anni osservata nella ASL NA5 e i 27 anni osservato nel gruppo 1. L'età mediana dei casi della ASL Napoli 5 (17 anni, 1-62) è risultata significativamente più bassa dell'età mediana dei casi riportati dalle restanti ASL (21 anni, 1-76, P=0,001, Test di Mann-Whitney).

La maggior parte dei casi notificati è stata sottoposta a ricovero ospedaliero in tutte le aree considerate, con percentuali di ospedalizzazione uguali (gruppo 4) o superiori al 70% (tutti gli altri gruppi).

La registrazione dei dati riguardanti lo stato vaccinale e ad alcuni fattori di rischio è risultata particolarmente lacunosa e le inferenze circa le esposizioni e l'utilizzo delle vaccinazioni sono state effettuate in base allo studio analitico successivamente descritto. Tuttavia per i casi dei quali è stato possibile raccogliere informazioni su eventuali esposizioni, il sistema EPOS ha rilevato che più dell' 80% ha riferito il consumo di frutti di mare almeno una volta nei due mesi precedenti l'insorgenza dei sintomi, e il 70% di frutti di mare crudi. I casi hanno riferito un numero mediano di conviventi superiore o uguale a 3 in tutte le aree considerate, con massimi anche di 12 conviventi. Il sistema di sorveglianza ha inoltre raccolto la segnalazione di cinque casi "esportati" di HAV, in residenti in Emilia-Romagna e Veneto che nei due mesi precedenti all'esordio della malattia hanno trascorso un periodo di soggiorno in Campania.

Indagini virologiche sui casi

Sono stati analizzati campioni di siero ottenuti da 33 pazienti con diagnosi di HAV raccolti in fase acuta. In Tabella 5 sono presentate le principali informazioni ottenute. Dodici pazienti erano stati ricoverati presso l'Ospedale di Caserta e 21 presso l'Ospedale Cotugno di Napoli.

Tabella 5. Analisi molecolare per HAV-RNA in sieri di pazienti ricoverati con una diagnosi clinica di epatite per data di esordio

Paziente	Ospedale	ASLdi residenza	Sesso	Età	Esordio	Determinazione HAV
1	Caserta	NA3	F	23	31/01/04	1B
2	Caserta	NA3	M	5	04/02/04	1B
3	Caserta	CE2	F	26	04/02/04	Negativo
4	Caserta	CE2	M	30	05/03/04	1B
5	Cotugno	NA2	F	22	17/03/04	1B
6	Caserta	NA3	M	29	05/04/04	Negativo
7	Cotugno	NA4	F	5	10/04/04	1B
8	Caserta	CE2	M	23	12/04/04	1A
9	Caserta	CE2	M	29	12/04/04	1B
10	Cotugno	NA1	F	28	21/04/04	1B
11	Cotugno	NA2	F	45	24/04/04	1B
12	Cotugno	CE2	F	26	28/04/04	1B
13	Cotugno	NA2	F	18	28/04/04	1B
14	Cotugno	NA2	F	26	29/04/04	1B
15	Cotugno	NA4	F	9	29/04/04	1B
16	Caserta	CE2	M	25	30/04/04	1B
17	Cotugno	NA5	F	12	30/04/04	1B
18	Cotugno	NA1	M	15	30/04/04	1B
19	Caserta	CE2	F	45	01/05/04	1B
20	Cotugno	NA2	M	16	01/05/04	1B
21	Cotugno	NA2	F	20	02/05/04	1A
22	Cotugno	NA2	M	18	02/05/04	1B
23	Cotugno	NA4	F	29	02/05/04	1B
24	Caserta	CE2	M	7	03/05/04	1B
25	Cotugno	NA2	M	14	03/05/04	1B
26	Cotugno	NA4	M	27	03/05/04	1B
27	Cotugno	NA5	M	2	04/05/04	1B
28	Cotugno	NA2	M	18	05/05/04	1B
29	Cotugno	NA1	M	8	07/05/04	1B
30	Cotugno	NA1	M	20	08/05/04	1B
31	Cotugno	NA4	M	5	08/05/04	1B
32	Caserta	NA2	M	18	14/06/04	1B
33	Caserta	SA1	F	29	15/06/04	1B

I pazienti, 18 maschi e 15 femmine, avevano un'età mediana di 20 anni (range 2-45) e risiedevano in aree diverse coperte da 7 ASL campane (7 in CE2, 4 in NA1, 10 NA2, 3 in NA3, 5 in NA4, 2 in NA5, 1 in SA1).

I campioni sono stati raccolti in un arco temporale compreso tra il 31 gennaio e il 15 giugno e mediamente 9 giorni dopo l'esordio clinico. 31 sieri raccolti sono risultati positivi per la presenza di genoma del virus dell'epatite A; in 29 di essi (pari al 93,6%) il genoma virale apparteneva al genotipo 1B; negli altri 2 al genotipo 1A.

Indagini virologiche sugli alimenti

Nel periodo marzo-luglio 2004 sono stati effettuati dal personale delle ASL 72 campionamenti di frutti di mare presso pescherie, mercati ittici, grossisti, ipermercati e allevamenti della Campania. I primi campionamenti sono stati effettuati alla fine di marzo. Sono stati raccolti solo campioni di vongole e mitili (Tabella 6).

11 campioni (15,3%) di frutti di mare di diverse tipologie e diversa origine sono risultati positivi per la presenza di genoma virale dell'epatite A. La conferma condotta su colture cellulari ha evidenziato in tutti i casi presenza di virus infettante. L'analisi delle sequenze dei genomi virali isolati ha messo in evidenza in 3 campioni la presenza di HAV appartenente al genotipo 1B, riconducibile al ceppo HM175 (>98% di omologia per il tratto esaminato) e negli altri 8 la presenza di HAV appartenente al genotipo 1A (omologia 100% con il ceppo di riferimento GBM). Il 55% dei campioni positivi sono stati raccolti in aree appartenenti alla ASL NA5. Cinque campioni positivi erano costituiti da frutti di mare allevati nella regione Campania, 5 da altre regioni italiane e uno dalla Turchia. Per cinque campioni è stata accertata la pratica illegale del "rinfresco" ovvero la conservazione dei prodotti ittici in acqua di provenienza non controllata.

Tabella 6. Determinazione dell'HAV da campioni alimentari per ASL di provenienza

n.	ASL di provenienza	Data prelievo	Luogo del prelievo	Tipo di campione	Provenienza del campione	Determinazione dell'HAV
1	CE 1	22/06/04	pescheria	mitili	-	assente
2	CE 1	19/05/04	ipermercato	vongole	Campania	assente
3	CE 2	24/05/04	ingrosso	mitili	Grecia	assente
4	CE 2	22/06/04	pescheria	mitili	Campania	assente
5	CE 2	29/05/04	centro ittico	mitili	Grecia	assente
6	CE2	01/06/04	pescheria	mitili	Campania	assente
7	NA 1	08/06/04	pescheria	mitili	Altra regione	assente
8	NA 1	15/06/04	pescheria	mitili	Altra regione	assente
9	NA 1	22/06/04	pescheria	mitili	Altra regione	assente
10	NA 1	08/07/04	pescheria	mitili	Campania	assente
11	NA 1	20/07/04	allevamento	mitili	Campania	assente
12	NA 1	20/07/04	allevamento	mitili	Campania	assente
13	NA 1	-	pescheria	mitili	Campania	presente
14	NA 1	01/04/04	ristorante	mitili	Campania	assente
15	NA 1	03/05/04	allevamento	mitili	-	presente
16	NA 1	03/05/04	allevamento	mitili	-	assente
17	NA 1	03/06/04	allevamento	mitili	-	assente
18	NA 1	15/04/04	mercato ittico	mitili	Campania	assente
19	NA 1	20/04/04	mercato ittico	mitili	Campania	assente
20	NA 1	04/05/04	mercato ittico	vongole	Altra regione	assente
21	NA 1	11/05/04	mercato ittico	vongole	Altra regione	assente

segue

continua

n.	ASL di provenienza	Data prelievo	Luogo del prelievo	Tipo di campione	Provenienza del campione	Determinazione dell'HAV
22	NA 1	27/04/04	mercato ittico	vongole	Tunisia	assente
23	NA 1	06/05/04	pescheria	-	Campania	assente
24	NA 1	07/05/04	pescheria	mitili	Altra regione	assente
25	NA 1	07/06/04	cooperativa	mitili	Altra regione	presente
26	NA 2	27/05/04	pescheria	mitili	Ignota	assente
27	NA 2	22/06/04	pescheria	mitili	Campania	assente
28	NA 2	22/06/04	pescheria	mitili	Campania	assente
29	NA 2	23/06/04	pescheria	mitili	Altra regione	presente
30	NA 2	25/06/04	mercato ittico	telline	Grecia	assente
31	NA 2	25/06/04	mercato ittico	vongole	Altra regione	assente
32	NA 2	25/06/04	mercato ittico	mitili	Campania	assente
33	NA 2	07/07/04	pescheria	mitili	Campania	assente
34	NA 2	01/07/04	allevamento	mitili	Campania	assente
35	NA 2	01/07/04	allevamento	mitili	Campania	assente
36	NA 2	13/05/04	allevamento	mitili	Campania	assente
37	NA 2	13/05/04	allevamento	mitili	Campania	assente
38	NA 2	14/05/04	ristorante	mitili	Campania	assente
39	NA 2	21/05/04	mercato ittico	mitili	Campania	assente
40	NA 3	18/06/04	pescheria	mitili	Altra regione	assente
41	NA 3	21/05/04	pescheria	mitili	Campania	assente
42	NA 4	09/06/04	hotel	vongole	Campania	assente
43	NA 4	13/10/04	pescheria	mitili	Ignota	assente
44	NA 4	07/07/04	pescheria	mitili	Ignota	assente
45	NA 4	08/07/04	ristorante	mitili	Campania	presente
46	NA 4	25/05/04	negozio surgelati	mitili	Altra regione	assente
47	NA5	14/06/04	campo mitilicoltura	mitili	Campania	assente
48	NA5	12/07/04	campo mitilicoltura	mitili	Campania	assente
49	NA5	23/06/04	pescheria	mitili	Campania	presente
50	NA5	07/07/04	pescheria	mitili	Campania	assente
51	NA5	13/07/04	pescheria	vongole	Altra regione	assente
52	NA5	07/07/04	allevamento	mitili	Campania	assente
53	NA5	04/06/04	banco naturale	mitili	Campania	assente
54	NA5	21/03/04	pescheria	vongole	Campania	presente
55	NA5	06/05/04	ingrosso	mitili	Altra regione	presente
56	NA5	06/05/04	ingrosso	mitili	Campania	assente
57	NA5	06/05/04	ingrosso	fasolari	Campania	assente
58	NA5	07/05/04	pescheria	vongole	Altra regione	assente
59	NA5	07/05/04	pescheria	vongole	Altra regione	assente
60	NA5	12/05/04	ingrosso	vongole	Altra regione	presente
61	NA5	12/05/04	ingrosso	vongole	Altra regione	assente
62	NA5	15/05/04	ingrosso	vongole	Turchia	presente
63	NA5	15/05/04	ingrosso	vongole	Altra regione	assente
64	NA5	15/05/04	ingrosso	mitili	Grecia	assente
65	NA5	18/05/04	allevamento	mitili	Campania	assente
66	NA5	21/03/04	pescheria	vongole	Campania	presente
67	SA 1	08/06/04	pescheria	vongole	Altra regione	assente
68	SA 1	07/06/04	ingrosso	vongole	Altra regione	assente
69	SA 2	09/06/04	mercato ittico	mitili	Altra regione	assente
70	SA 2	29/06/04	mercato ittico	mitili	Altra regione	assente
71	SA 3	20/05/04	pescheria	mitili	Altra regione	assente
72	SA 3	12/05/04	pescheria	vongole	Altra regione	assente

L'analisi delle sequenze, effettuata sugli RNA virali riscontrati nei campioni positivi, ha evidenziato presenza in 8 campioni la presenza di HAV appartenente al genotipo 1A, e in 3 campioni la presenza di HAV appartenente al genotipo 1B.
- non noto

EPIDEMIOLOGIA ANALITICA

Obiettivi

Obiettivo principale

- Stimare l'associazione tra consumo di frutti di mare e acquisizione dell'infezione da HAV nel comune con il più elevato tasso di attacco.
- Stimare l'associazione tra malattia e esposizione a casi di HAV e a bambini conviventi di età <5 anni.

Obiettivi secondari

- Valutare la frequenza di vaccinazione tra i familiari dei casi.
- Identificare lo stato immunitario dei controlli nei confronti dell'HAV.
- Valutare l'utilità e accettabilità dell'indagine immunitaria utilizzando prelievi di saliva per la ricerca di IgM e IgG specifiche.
- Stimare la prevalenza di IgM e IgG della popolazione generale.
- Accertare e quantificare la frequenza di recenti infezioni acute da HAV in bambini asintomatici di età inferiore ai 5 anni mediante determinazione di IgM e IgG per HAV presenti nella saliva.

Metodi

Disegno dello studio

È stato realizzato uno studio caso-controllo con i casi residenti nel comune di Ercolano registrati nel secondo picco dell'epidemia, e confrontati con un gruppo di residenti di controllo appaiati ai casi per gruppo di età (*frequency matching*). La scelta del *frequency matching* è dovuta alla diversa distribuzione dell'età dei casi rispetto alla popolazione generale di Ercolano.

Per decidere in quali sottogruppi di età suddividere casi (e quindi i relativi controlli), è stata considerata la distribuzione per età dei casi considerati. Sono state quindi individuate quattro fasce di età, così distinte: 0-5 anni; 6-10 anni; 11-20 anni; 21-30 anni.

Principali fattori di rischio indagati sono stati: il consumo di frutti di mare e l'aver conviventi di età uguale o minore a 5 anni.

Definizione di caso

Sono stati selezionati tutti i casi di epatite A confermata sierologicamente (IgM specifiche) con data di inizio della sintomatologia compresa nel periodo 16 febbraio-30 aprile 2004, avvenuti tra i residenti della città di Ercolano e notificati dalla regione Campania. Operativamente sono stati inclusi i casi rintracciabili da un recapito telefonico.

Definizione e selezione dei controlli

Per la selezione dei controlli è stato considerato eleggibile chiunque fosse residente nella città di Ercolano nello stesso periodo e avesse un'età compresa in una delle quattro classi predefinite.

Unici due criteri di inclusione per la selezione dei controlli sono stati il far parte della lista degli assistiti degli stessi medici di medicina generale/pediatri di libera scelta dei casi, e l'accettazione dell'intervista.

Criteri operativi di inclusione sono stati: l'età, la disponibilità di un recapito telefonico e l'adesione allo studio.

I criteri di esclusione all'indagine sono stati:

1. pregressa epatite A
2. storia recente di ittero
3. vaccinazione per HAV
4. rifiuto a partecipare all'indagine
5. non reperibilità dopo almeno tre tentativi di contatto

I controlli sono stati reclutati con due differenti metodologie, a seconda che si trattasse di assistiti dei pediatri di base o dei medici di medicina generale:

– *Fasce di età 0-5 anni e 6-10 anni*

Si è fatto ricorso a visita diretta presso lo studio di pediatri di base rappresentativi di quelli operanti ad Ercolano. La rappresentatività è stata garantita dalla scelta di studi di pediatri che hanno avuto tra i loro assistiti casi di epatite A e situati nelle due diverse aree della città: la zona centrale (nei pressi del mercato di Pugliano); la zona periferica, (alle pendici del Vesuvio). Tra i controlli pediatrici sono stati reclutati 2 bambini presso il centro Vaccinale della ASL di Ercolano.

– *Fasce di età 11-32 anni e 21-30 anni*

Data l'estrema difficoltà di riuscire a contattare controlli di queste età presso lo studio dei medici, è stato chiesto a questi ultimi, previa autorizzazione e contatto con la Sezione di Epidemiologia (SEP) della ASL NA5, di fornire una lista di loro assistiti da utilizzare come controlli. In aggiunta, quando possibile, si è cercato di ottenere ulteriori controlli attraverso gli archivi della anagrafe degli assistiti di Ercolano, sempre chiedendo gli assistiti dei medici di medicina generale selezionati.

Dimensione del campione e potenza dello studio

Sono stati reclutati 57 casi e 54 controlli. La dimensione del campione raggiunta garantisce una potenza dello studio dell'80%, per mettere in evidenza un incremento del rischio di malattia da HAV di almeno 3,5 volte tra i consumatori di frutti di mare, rispetto ai non consumatori. Nel calcolo della dimensione del campione si è tenuto conto di una frequenza di esposizione ai frutti di mare nell'arco di un mese pari al 25%.

Raccolta dei dati

La raccolta dei dati è avvenuta mediante intervista diretta sia ai casi che ai controlli e effettuata da personale addestrato. L'intervista è stata effettuata con duplice modalità: faccia a faccia qualora il controllo fosse reclutato direttamente allo studio medico, oppure intervista telefonica per i casi e per gli altri controlli.

L'intervista ai casi e ai controlli minorenni è stata effettuata successivamente all'acquisizione di consenso informato verbale da parte di uno dei genitori.

I dati sono stati raccolti mediante un questionario *ad hoc* e hanno incluso dati demografici, clinici e relative ai principali fattori di rischio indagati (in Allegato vengono riportati i questionari utilizzati).

L'esposizione al consumo di frutti di mare è stata indagata sia nella dose, sia nella tipologia dei singoli frutti di mare. In aggiunta, sono stati raccolti dati sul luogo di acquisto, sulla conservazione al momento dell'acquisto, sul tipo e modalità di consumo.

Per i casi sono state raccolte informazioni relative ai due mesi precedenti l'esordio dei sintomi (periodo massimo di incubazione). Per i controlli le informazioni sono state riferite ai due mesi precedenti l'intervista.

Sono state raccolte anche informazioni relative al consumo di alimenti freschi, quali verdure e formaggi, così come sull'origine dell'acqua da bere eventualmente consumata fuori dal domicilio.

Per quanto riguarda un'eventuale trasmissione secondaria, sono state raccolte informazioni sull'esposizione ad un caso di epatite A. Sono stati poi raccolti dati sul numero di conviventi di età uguale o minore a 5 anni.

Analisi dei dati

Tutti i dati raccolti sono stati inseriti in una base di dati costruita con il software Epi-Info 3.

I dati sono stati analizzati mediante Epi-Info 3. Dato il disegno dello studio, per l'analisi univariata sono stati calcolati Odds Ratio (OR) aggiustati per la variabile gruppo di età (*Mantel Haenszel Odds Ratio*) con un intervallo di confidenza del 95%. È stata effettuata un'analisi multivariata per evidenziare eventuali fattori di interazione e confondimento.

Raccolta dei campioni di saliva

La letteratura riporta come l'infezione nei bambini decorra frequentemente in maniera asintomatica e quindi come i bambini possano costituire l'origine del contagio per i suscettibili presenti all'interno di nuclei familiari. Per verificare se i conviventi di età uguale o minore a 5 anni dei casi o dei controlli avessero contratto recentemente infezione da HAV è stata richiesta la raccolta di un campione di saliva per la ricerca di anticorpi specifici (IgM e IgG anti-HAV) (12).

L'indagine è stata proposta, previo consenso scritto informato, a tutti i controlli e relativi conviventi di età uguale o minore a 5 anni, e tutti i conviventi di età uguale o minore a 5 anni di tutti i casi. Sono stati inoltre raccolti dei campioni di saliva anche da alcuni casi (da utilizzare come controllo positivo del test).

La raccolta di saliva è stata effettuata a seconda delle preferenze dei partecipanti all'indagine, per assicurare una migliore partecipazione:

- visita a domicilio
- incontro presso lo studio del medico di medicina generale/pediatra di base
- incontro presso il centro vaccinale della ASL di Ercolano

La raccolta è stata effettuata mediante dei tamponi sterili commerciali. Come da istruzioni d'uso, il tampone doveva essere fatto passare per circa un minuto sulla faccia anteriore dell'arcata dentale, nel vestibolo della cavità orale. Tutti i tamponi sono stati conservati a temperatura di 4 °C fino alla spedizione al laboratorio presso l'*Health Protection Agency* di Londra, dove sono stati analizzati.

Logistica

L'indagine sul campo si è svolta nel periodo 31 maggio-15 giugno 2004.

Lo studio caso-controllo è stato organizzato dal RMI/CNESPS/ISS con la collaborazione della Regione Campania e del SEP della ASL NA5.

La selezione dei controlli è stata effettuata a partire dagli elenchi di residenti assistiti dai medici di famiglia dei casi dal personale SEP della ASL NA5.

La raccolta dei dati per lo studio caso-controllo e dei campioni biologici è stata svolta direttamente ad Ercolano dalla dott.ssa Delia Boccia e dal dott. Massimiliano Di Renzi, partecipanti al progetto *European Programme for Intervention Epidemiology Training (EPIET)* e dal dott. Giuseppe Pontrelli in formazione epidemiologica presso il Reparto di Malattie Infettive del Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute dell'ISS.

Risultati

Descrizione dei casi

Dalla banca dati dell'ISS risultavano 88 notifiche di casi di epatite A diagnosticata tra il 16 febbraio e il 30 aprile 2004. Due casi non sono stati confermati sierologicamente e sono stati scartati per lo studio. Tutti i restanti 86 casi sono stati considerati eleggibili per lo studio caso-controllo.

Tra questi 86, 16 casi (pari al 18,6%) non sono stati rintracciati: non si è riuscito ad ottenerne un recapito telefonico né attraverso l'anagrafe degli assistiti, né attraverso le pagine bianche di Ercolano. Altri 15 casi (17,4%), per i quali comunque è stato reperito un recapito telefonico, non hanno accettato di partecipare all'indagine.

In aggiunta, sono stati reclutati 2 ulteriori casi di epatite A confermata sierologicamente e avvenuta nel periodo in esame, ma non ancora notificati.

Sono quindi stati reclutati 55 casi sugli 86 previsti (64%) più 2 nuovi casi accertati, per un totale di 57 casi. L'età mediana dei casi reclutati è stata di 13 anni (range: 2-38 anni).

La Tabella 7 mostra la distribuzione dei casi arruolati per fascia di età. Il 50,9% era di sesso femminile.

Tabella 7. Distribuzione dei casi per età

Fascia di età	n. casi	% casi
0-5	11	19,3
6-10	9	15,8
11-20	28	49,1
21+	9	15,8
Totale	57	100,0

Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa fra i casi arruolati e i casi che non hanno partecipato, né in termini di singole età (Mann-Whitney test, p value=0,33) né di fascia di età (c2 test, p-value=0,67) né di sesso (c2 test, p-value=0,26). Tutti i 57 casi hanno riferito almeno un sintomo.

La Tabella 8 riporta la distribuzione dei maggiori sintomi.

Tabella 8. Frequenza dei sintomi nei casi selezionati

Sintomo	n. casi	% casi
Astenia	50	87,7
Urine ipercromiche	49	86,0
Icttero sclere	44	77,2
Feci ipocromiche	41	71,9
Icttero cutaneo	30	52,6

Trentasette casi (pari al 65% del totale) sono stati ricoverati in ospedale. I casi intervistati hanno riportato un tempo medio di ospedalizzazione di circa 2 settimane (mediana 12 giorni; range 2-32 giorni).

L'età dei casi non è associata alla durata della degenza in ospedale.

Solamente 3 casi (pari al 5% del totale) hanno risposto di aver ricevuto la vaccinazione anti-HAV. È stato inoltre chiesto se i familiari, per i quali la vaccinazione era gratuita, avessero ricevuto il vaccino. Soltanto 10 casi (pari al 18%) hanno risposto che loro familiari sono stati vaccinati successivamente ad aver ricevuto la diagnosi di epatite A.

Sono stati raccolti campioni di saliva da 6 casi e 3 conviventi di essi sotto i 5 anni di età.

Descrizione dei controlli

Dalle liste degli assistiti di 5 pediatri di libera scelta e 16 medici di medicina generale sono stati identificati 180 potenziali controlli, con distribuzione per fascia d'età medesima alla popolazione dei casi. Attraverso la collaborazione dei medici e l'impiego di liste anagrafiche e elenchi telefonici del comune di Ercolano è stato possibile reperire il numero di telefono del 71% del totale, e di questi circa la metà sono stati effettivamente rintracciati.

Quasi tutti i controlli contattati hanno aderito all'indagine (60/63; 95,2%).

Infine, dei 60 controlli per cui è stato compilato il questionario, 54 (90%) sono risultati eleggibili (ovvero con anamnesi negativa per epatite A, ittero o vaccinazione anti HAV).

Sono stati raccolti campioni di saliva da 29 controlli e 15 loro conviventi sotto i 5 anni di età.

Non ci sono state differenze significative fra casi e controlli né in termini di età (Mann-Whitney test, p-value=0,35) né di fascia di età (Tabella 9) (χ^2 test, p-value=0,77). Anche per quanto riguarda la variabile sesso (Tabella 10) non è stata riscontrata alcuna differenza significativa (χ^2 , p-value=0,31), anche dopo stratificazione per fascia di età.

Tabella 9. Distribuzione per età

Fascia di età	n. casi	%	n. controlli	%
0-5	11	19,3	12	22,2
6-10	9	15,8	12	22,2
11-20	28	49,1	23	42,6
21+	9	15,8	7	13,0
Totale	57	100,0	54	100,0

Tabella 10. Distribuzione per sesso

Sesso	n. casi	%	n. controlli	%
Femmine	30	52,6	31	57,4
Maschi	27	47,4	23	42,6
Totale	57	100,0	54	100,0

È stata confrontata la presenza di bambini conviventi al di sotto dei 5 anni di età per casi e controlli. È stata inoltre creata una variabile “dimensione della famiglia” così definita: *famiglie medio-piccole*: fino a 5 conviventi; *famiglie grandi*: più di 5 conviventi (Tabelle 11-13).

Tabella 11. Composizione delle famiglie

Conviventi in famiglia	n. casi	%	n. controlli	%
3	5	8,8	6	11,1
4	14	24,6	22	40,7
5	19	33,3	18	33,3
6	17	29,8	5	9,3
7+	2	3,6	3	5,6
Totale	57	100,0	54	100,0

Tabella 12. Presenza di bambini

Conviventi < 5 anni di età	n. casi	%	n. controlli	%
0	38	66,6	34	63,0
1	19	33,3	16	29,6
2	0	0	4	7,4
Totale	57	100,0	54	100,0

Tabella 13. Dimensione della famiglia

Dimensione della famiglia	n. casi	%	n. controlli	%
Medio-piccola (0-5 conviventi)	38	66,7	46	85,2
Grande (6+ conviventi)	19	33,3	8	14,8
Totale	57	100,0	54	100,0

Sulla base delle informazioni disponibili, si è cercato di ricostruire i nuclei familiari tra i casi: in tutto sono state rintracciate 5 famiglie all'interno delle quali si è verificato più di un caso.

Ad eccezione di un nucleo familiare (per il quale non erano disponibili le date di insorgenza dei sintomi) abbiamo verificato che in ciascuna delle famiglie interessate si sono verificati un massimo di due casi a distanza di pochissimi giorni l'uno dall'altro e quindi da considerarsi co-primari.

Analisi univariata

Nella Tabella 14 sono riportati la frequenza di esposizione ai principali fattori di rischio esaminati, e i rispettivi OR Crudi e aggiustati per la variabile “gruppo di età” di appartenenza (in grassetto sono evidenziato i fattori di esposizione significativi).

Tabella 14. Fattori di rischio analizzati

Fattore di rischio	n. casi esposti (%)	n. controlli esposti (%)	OR ^(a) (CI 95%)	OR _{MH} ^(b) (CI 95%)
Dimensione della famiglia (>6)	19/57 (33,3)	8/54 (14,8)	2,8 (1,0-8,2)	2,8 (1,1-7,2)
Numero conviventi sotto i 5 aa	19/57 (33,3)	20/54 (37,0)	0,8 (0,4-2,0)	0,9 (0,4-2,2)
Contatto con un caso di HAV	22/57 (43,1)	19/54 (36,5)	1,3 (0,5-3,2)	1,4 (0,6-3,2)
Consumo di verdure	35/57 (61,4)	38/54 (29,6)	0,7 (0,3-1,6)	0,6 (0,3-1,4)
Insalata	33/57 (57,9)	33/54 (61,1)	0,8 (0,4-2,0)	0,8 (0,4-1,8)
Sedano	7/57 (12,3)	4/54 (7,4)	1,7 (0,4-7,8)	1,6 (0,4-6,4)
Carote	23/57 (40,4)	26/54 (48,1)	0,7 (0,3-1,7)	0,7 (0,3-1,5)
Ravanelli	6/57 (10,5)	6/54 (11,1)	0,9 (0,2-3,6)	0,9 (0,3-2,9)
Finocchi	30/57 (52,6)	26/54 (48,1)	1,2 (0,5-2,7)	1,2 (0,5-2,4)
Consumo di formaggi	48/56 (85,7)	50/54 (92,6)	0,5 (0,1-1,9)	0,4 (0,1-1,5)
Consumo di acqua da fontane pubbliche	21/54 (38,9)	16/52 (30,8)	1,4 (0,6-3,5)	1,5 (0,7-3,4)
Consumo di frutti di mare	37/57 (64,9)	20/54 (37,0)	3,1 (1,3-7,4)	3,2 (1,4-7,3)
Frutti di mare crudi	13/57 (23,0)	0/54 (0,0)	Non calcolabile	Non calcolabile
Cozze	15/56 (26,8)	6/54 (11,1)	2,9 (0,9-9,5)	2,8 (1,0-8,0)
Vongole	30/56 (53,6)	19/54 (35,2)	2,1 (0,9-5,0)	2,0 (0,9-4,4)
Fasolari	13/56 (23,2)	2/54 (3,7)	7,9 (1,5-54,3)	7,8 (1,6-38,0)
Tartufi	7/55 (12,7)	2/51 (3,8)	3,8 (0,6-27,8)	3,7(0,7-19,9)
Datteri	5/55 (9,1)	1/53 (1,9)	5,3 (0,6-123,3)	4,9 (0,5-48,4)
Cannolicchi	10/55 (18,2)	2/53 (3,8)	5,7 (1,0-40,2)	5,6 (1,1-27,7)

a. Odds ratio crudi

b. Mantel-Haenszel Odds ratio (aggiustati per gruppi di età)

Sono stati ulteriormente indagati i frutti di mare per valutare la relazione dose-risposta tra consumo e rischio di contrarre l'epatite A: il test per il trend relativo alla distribuzione della frequenza del consumo di frutti di mare tra casi e controlli nell'ultimo mese fornisce un p-value=di 0,003. La Tabella 15 riporta la relativa distribuzione.

Tabella 15. Quantità di frutti di mare consumata e malattia da HAV

Consumo di frutti di mare negli ultimi 2 mesi	n. casi esposti (%)	n. controlli (%)	OR	CI 95%
Mai	18 (31,6)	34 (63,0)		
Solo una volta	10 (17,5)	1 (1,9)	18,9	2,1-426,4
2-5 volte	18 (31,6)	17 (31,5)	2,0	0,8-5,3
1 volta a settimana	11 (19,3)	2 (3,7)	10,4	1,8-76,6
Totale	57 (100,0)	54 (100,0)		

La associazione tra consumo di frutti di mare e malattia è stata indagata in maggiore dettaglio distinguendo tra coloro che non hanno mai consumato frutti di mare, quelli che hanno

consumato frutti di mare confezionati in retine e quelli che hanno consumato frutti di mare conservati in acqua al momento dell'acquisto. La Tabella 16 riporta i risultati ottenuti.

Tabella 16. Conservazione dei frutti di mare e malattia da HAV

	n. casi esposti (%)	n. controlli esposti (%)	OR ^(a) (CI 95%)	OR _{MH} ^(b) (CI 95%)
Gruppo di riferimento ^(c)	18/57 (31,6)	34/54 (63,0)	1,0	1,0
Frutti di mare non in acqua	10/57 (17,5)	7/54 (13,0)	2,7 (0,9-8,3)	2,6 (0,8-8,1)
Frutti di mare in acqua	29/57 (50,9)	13/54 (24,0)	4,2 (1,8-10,0)	4,5 (1,8-11,0)
Totale	57/57 (100,0)	54/54 (100,0)		

(a) Odds ratio crudi

(b) Mantel-Haenszel Odds ratio (aggiustati per gruppi di età)

(c) Coloro che non hanno mai consumato frutti di mare

Analisi multivariata

Successivamente è stata condotta un'analisi multivariata. Nel modello di regressione logistica sono stati inseriti la variabile fascia di età, la presenza di conviventi con età inferiore ai 5 anni e solo quei fattori di rischio con un OR $\geq 1,5$ o con un valore di $P \leq 0,10$. La Tabella 17 riporta i fattori di rischio rimasti significativi dopo l'analisi multivariata.

Tabella 17. Analisi multivariata

Fattore di rischio	n. casi esposti (%)	n. controlli esposti (%)	OR _{MH} ^(a) (CI 95%)	OR _{Adj} ^(b) (CI 95%)
Frutti di mare non in acqua	10/57 (17,5)	7/54 (13,0)	2,6 (0,8-8,1)	3,2 (1,0-10,5)
Frutti di mare in acqua	29/57 (50,9)	13/54 (24,0)	4,5 (1,8-11,0)	4,6 (1,8-11,8)
Frutti di mare crudi	13/39 (33,3)	0/20 (0,0)	Non calcolabile	Non calcolabile
Dimensione della famiglia	19/57 (33,3)	8/54 (14,8)	2,8 (1,1-7,2)	3,1 (1,2-10)

(a) Mantel-Haenszel Odds ratio (aggiustati per gruppi di età)

(b) Odds ratio ricavati dall'analisi multivariata

Nel modello sono stati inclusi per default le variabili "gruppi di età" e "numero di conviventi con età inferiore ai 5 anni"

Per quanto riguarda il ruolo della trasmissione secondaria, i dati disponibili mostrano che tra coloro che hanno riferito un contatto con un caso di epatite il 54% dei casi ha riferito un contatto intrafamiliare contro il 26,3% dei controlli ($P=0,006$). Non appare invece statisticamente rilevante la differenza di frequenza di contatti con compagni di scuola riferita dai casi e dai controlli (rispettivamente del 45,5% e del 63,2%, $P=0,2$). La Tabella 18 riporta la descrizione della tipologia di contatti riferita sia da casi che da controlli.

Tabella 18. Tipologia del contatto con un caso di epatite

Tipologia di contatto	n. casi	%	n. controlli	%
Familiare	12	54,5	5	26,3
Collega	0	0,0	1	5,3
Compagno di scuola	10	45,5	12	63,2
Non noto	0	0,0	1	5,3
Totale	22	100,0	19	100,0

È stata infine condotta una analisi includendo solo quei soggetti che hanno dichiarato di non aver mai consumato frutti di mare (52 tra casi e controlli) in modo da mettere in evidenza specifici fattori di rischio in questo sotto gruppo. I risultati sono presentati nella Tabella 19.

Tabella 19. Fattori di rischio per coloro che non hanno consumato frutti di mare

Fattore di rischio	n. casi esposti (%)	n. controlli esposti (%)	OR ^(a) (CI 95%)	OR _{MH} ^(b) (CI 95%)
Dimensione della famiglia (>6)	6/18 (33,3)	6/34 (17,6)	2,3 (0,5-10,7)	2,2 (0,6-8,2)
Numero conviventi < 5 anni	7/18 (38,9)	11/34 (32,4)	1,3 (0,3-5,2)	2,4 (0,6-10,2)
Contatto con un caso di HAV	8/16 (50,0)	12/33 (36,5)	1,3 (0,5-3,2)	1,4 (0,6-3,2)
Consumo di verdure	8/18 (44,4)	21/34 (61,8)	0,5 (0,1-1,8)	0,5 (0,1-1,7)
Acqua fuori casa	6/18 (33,3)	11/34 (32,4)	1,0 (0,3-4,2)	1,2 (0,3-4,0)
Formaggi	16/18 (88,9)	32/34 (94,1)	0,5 (0,04-5,7)	0,5 (0,07-4,4)

(a) Odds ratio crudi

(b) Mantel-Haenszel Odds ratio (aggiustati per gruppi di età)

Indagini immunologiche sulla saliva

I risultati della sorveglianza su campioni di saliva sono riportati nella Tabella 20.

Tabella 20. Studio su campioni di saliva

	campioni raccolti	IgM positivi	IgG positivi
Casi	6	0	6
Conviventi dei casi	3	0	2
Controlli	29	0	3
Conviventi dei controlli	15	0	1

I risultati mostrano che la stragrande maggioranza dei controlli (26/29) era ancora suscettibile al momento dell'arruolamento allo studio e pertanto eleggibile. Solo 1 sui 15 campioni di saliva raccolti dai conviventi dei controlli è risultato portatore di IgG, mentre 2 su tre conviventi dei casi sono risultati positivi per IgG. Nessuno dei pazienti arruolati è risultato positivo per IgM-HAV.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questa epidemia ha rappresentato un evento eccezionale per le dimensioni che la hanno caratterizzata, ma non del tutto inatteso in zone endemiche come la Campania. In alcune regioni italiane si verificano periodicamente epidemie di HAV, con dimensioni la cui vastità è dovuta al progressivo accumularsi di suscettibili. Questi eventi colpiscono generalmente adolescenti e giovani adulti che a causa delle migliorate condizioni socio-sanitarie, meno frequentemente sono precedentemente entrati in contatto con il virus.

L'istituzione di uno strumento per la sorveglianza basato sulla creazione di un database accessibile mediante internet (EPOS) si è rivelato utile e efficace. Tale sistema ha infatti permesso di accorciare notevolmente i tempi di trasmissione delle informazioni raccolte nel territorio regionale, e di condividere tutti i dati utili a una tempestiva descrizione dell'epidemia. L'accesso ad EPOS ha consentito la registrazione in tempo reale dei dati anagrafici dei singoli pazienti con diagnosi di HAV, sia sospetta che accertata sierologicamente. È stato inoltre possibile effettuare analisi dei dati raccolti secondo criteri modificabili sia per spazio (ad esempio specifici per comune, ASL, o intera regione) che per tempo di insorgenza. Inoltre il sistema ha permesso di raccogliere in un unico database tutte le informazioni rilevanti disponibili, non soltanto relative ai dati anagrafici ma comprensive dell'informazione su eventuali esposizioni a fattori di rischio, altrimenti disperse nei diversi moduli cartacei di sorveglianza (Modello 15, schede SEIEVA, schede locali di indagini epidemiologica). L'utilità del sistema è stata aumentata dalla capacità di generare in modo automatico curve epidemiche regionali e specifiche per ASL consentendo una descrizione affidabile dell'andamento dell'epidemia. La confidenzialità dei dati trattati è stata salvaguardata dall'accesso riservato ai responsabili delle diverse ASL abilitati mediante *username* e *password* personali. Il sistema EPOS creato in questa occasione presenta caratteristiche di flessibilità in grado di renderlo strumento utile per la condivisione e l'analisi di dati in occasione di tutti i focolai epidemici estesi.

La segnalazione dell'epidemia su internet, all'interno del portale web di Epicentro, strumento di informazione ben conosciuto e utilizzato dagli operatori di Sanità Pubblica, ha consentito di identificare diversi "casi esportati" in persone non residenti in Campania che avevano contratto l'HAV successivamente al soggiorno in questa regione.

Il sistema di sorveglianza ha consentito di evidenziare e caratterizzare l'epidemia regionale. In tutta la Campania sono stati segnalati 882 casi nel periodo 1° gennaio-1° agosto 2004 con circa l'80% di conferme sierologiche documentate. Ma l'epidemia ha interessato in maniera diversa il territorio: le ASL costiere della zona di Napoli sono state le più coinvolte, col primato dell'ASL NA5 che ha presentato un tasso d'attacco pari a 54,3 per 100.000 abitanti, più di tre volte quello dell'intera Campania.

Anche questa epidemia ha colpito in misura maggiore le fasce d'età giovanili (11-20 e 21-30 anni), con tassi d'attacco età specifici in queste fasce più che doppi rispetto al tasso d'attacco grezzo. Inoltre nella ASL più colpita (NA5), l'età mediana dei casi è risultata 17 anni, significativamente inferiore ai 21 anni, età mediana per l'intera Campania. In questa ASL il tasso di attacco specifico anche per la fascia d'età inferiore (6-10 anni), è risultato estremamente aumentato rispetto al tasso d'attacco regionale per la medesima fascia d'età (143,6 contro 24,8).

Il 91% dei casi notificati è stato ospedalizzato. Lo studio analitico, ha consentito di stimare un tempo medio di degenza di circa 12 giorni. Sebbene il dato relativo al ricovero sia probabilmente distorto dal fatto che la nostra casistica è stata per lo più notificata dai centri

ospedalieri, la durata della degenza conferma che la sintomatologia presentata sia stata abbastanza severa.

La quasi totalità dei casi per i quali è stata effettuata l'identificazione del virus HAV è risultata essere stata infettata da un medesimo genotipo, 1B, recentemente descritto in un cluster di casi in Puglia (13). In letteratura non vi sono segnalazioni di epidemie così estese come quella studiata in Campania sostenute da un unico genotipo, tuttavia mancano dati esaustivi circa la variabilità dei genotipi circolanti in Italia.

L'81,4% dei casi registrati su EPOS hanno riferito il consumo di frutti di mare, e il 12,6% il contatto nei 2 mesi precedenti con un caso di epatite. È interessante osservare che nel 2001 la frequenza di fattori di rischio associati ai casi segnalati al sistema di sorveglianza nazionale SEIEVA è stata del 73% per quanto riguarda il consumo di frutti di mare, e del 9% per quanto riguarda il contatto con itterico nelle sei settimane precedenti alla malattia.

Lo studio di epidemiologia analitica è stato concentrato nella ASL NA5 per l'elevato tasso di attacco qui presente (circa il 40% dei casi dell'intera regione sono stati notificati dalla ASL NA5) e la semplicità logistica di lavorare in una sola ASL.

Lo studio analitico ha presentato alcuni limiti di carattere metodologico, derivanti dalla limitata dimensione del campione, dall'arruolamento di controlli provenienti da fonti diverse e dalla scelta di intervistare alcuni controlli tramite telefono e altri di persona. Tuttavia la difficoltà di reclutare i controlli ha reso necessario operare scelte pragmatiche per salvaguardare la fattibilità dello studio e impiegare al meglio il tempo a disposizione sul campo.

Lo studio caso controllo ha messo in evidenza come anche in questa epidemia, il principale fattore di rischio sia stato il consumo di frutti di mare (ORMH=3,2; 1,0-10,5), e in particolare di frutti di mare conservati in acqua (ORMH=4,6; 1,8-11,8). Questo risultato dimostra ancora una volta: 1) la notevole diffusione di questa errata e illegale pratica di conservazione; 2) il rischio associato al consumo di frutti di mare conservati con questa modalità.

Anche il dato relativo al consumo di frutti di mare crudi pur non essendo calcolabile è estremamente significativo: nessuno dei controlli ha dichiarato di consumare frutti di mare crudi.

Tra i frutti di mare non è stato possibile identificare un particolare tipo a maggior rischio.

Nonostante queste osservazioni, rimane una quota abbastanza consistente di casi (circa il 32%) che hanno dichiarato di non aver mai consumato frutti di mare. Un'analisi più approfondita di questo sottogruppo di casi non ha messo in evidenza fattori di rischio particolari. È verosimile che nell'epidemia si sia anche verificata una quota di casi dovuta a trasmissione inter-personale; a causa della elevata frequenza di trasmissione dell'HAV durante la fase asintomatica, il ricordo anamnestico di un precedente contatto con un altro caso può essere stato ostacolato, insieme alla capacità dell'indagine di identificare il reale ruolo di questa modalità di infezione.

Nello studio analitico è risultato che solo il 17,5% dei contatti familiari dei casi ha effettuato la vaccinazione per l'HAV dopo la diagnosi del caso indice in famiglia.

Inaspettatamente avere avuto contatti con casi di epatite A o avere bambini in casa al di sotto dei 5 anni di età non è risultato associato all'insorgenza dei sintomi. Avere una famiglia con più di 5 componenti è risultato associato alla malattia (OR=2,8, CI95% 1,1-7,2). Probabilmente la dimensione della famiglia è un proxy socio-economico che influenza anche le abitudini alimentari, ma soprattutto lo stato di pregressa suscettibilità.

A causa dello scarso numero di campioni di saliva raccolti non è stato possibile raggiungere tutti gli obiettivi prefissati dall'indagine immunologica. Tuttavia i risultati ottenuti forniscono alcune informazioni interessanti: 1) la maggioranza dei controlli è risultata negativa per HAV-IgG dimostrando non solo la correttezza dei criteri di elezione utilizzati per lo studio, ma anche che nella popolazione generale è ancora consistente la quota di soggetti suscettibili all'infezione; 2) non sono state riscontrate IgM né nei casi né nei controlli. Questo potrebbe

essere dovuto sia alla tardiva raccolta dei campioni, sia alle caratteristiche di sensibilità del test; 3) l'esiguo numero di adesioni allo studio ha dimostrato la scarsa fattibilità di una indagine simile in questo contesto, in assenza di iniziative di promozione *ad hoc*.

L'isolamento del virus HAV su numerosi campioni di alimenti commercializzati in Campania sostiene i risultati ottenuti dallo studio caso controllo nell'individuare nel consumo di frutti di mare il principale fattore di rischio associato all'infezione. Le indagini sul genoma dei virus isolati da campioni di siero hanno rivelato la prevalenza del genotipo 1B, variante isolata recentemente nel Sud Italia (13-14) e in Albania (15) e riscontrato anche in alcuni campioni alimentari.

I virus di genotipo 1B, comunque, isolati dai campioni di frutti di mare pur appartenendo al medesimo genotipo di quelli isolati dai sieri, risultano riconducibili ad un ceppo diverso rispetto a questi ultimi. Nonostante questo dato non consenta di affermare in maniera conclusiva un'associazione causale tra consumo di frutti di mare e insorgenza della malattia, tuttavia diverse ipotesi possono spiegarlo senza diminuire la forza dell'associazione ottenuta dallo studio analitico. Vari studi hanno mostrato la difficoltà di rivelare un'esatta correlazione tra il genotipo dei virus isolati dai campioni ambientali e quello dei virus isolati da campioni clinici (16). La genotipizzazione nei campioni di frutti di mare è infatti estremamente complessa e basata su metodiche non ancora perfettamente standardizzate. Inoltre il ritrovamento nei frutti di mare di un ceppo diverso può far presupporre la presenza in essi di più ceppi dello stesso virus, data la straordinaria capacità di questi animali di filtrare e concentrare efficacemente tutti i contaminanti presenti nelle acque costiere, l'elevata stabilità nonché la prolungata persistenza del virus dell'HAV nell'ambiente (17,18). Le indagini basate sulla PCR possono aver risentito di questa compresenza e non aver rivelato tutti i ceppi di virus presenti.

I campioni alimentari positivi all'indagine virologica HAV specifica sono risultati eterogenei sia per tipologia di frutto di mare che per provenienza (da allevamenti di diverse regioni italiane ma anche da nazioni estere), ma sono risultati per la maggior parte commercializzati (55%) nel territorio della ASL che ha presentato il maggior tasso d'attacco (NA5). Questi dati suggeriscono un ruolo importante della contaminazione locale, avvenuta probabilmente attraverso la pratica illegale ancorché diffusa del "rinfresco".

Episodi come questi hanno sicuramente un costo economico, oltre che clinico: un recente studio italiano ha quantificato il costo dei circa 6.000 casi in Puglia in 12 milioni di euro corrispondente a circa lo 0,5% della spesa sanitaria regionale. Sebbene difficili da quantificare, nell'epidemia campana potrebbero aggiungersi anche i costi derivanti dalla perdita di turisti durante la stagione estiva. Si ricorda infatti che recentemente almeno due siti web internazionali (inglese e olandese) di medicina dei viaggiatori ha elencato la zona come ad alto rischio per epatite A suggerendo la vaccinazione ai potenziali visitatori.

RACCOMANDAZIONI

L'esperienza di questa vasta epidemia di epatite A ha evidenziato e confermato l'importanza di fattori e di misure di intervento utili a migliorare la sorveglianza e prevenire il ripetersi di eventi di tale entità.

Migliorare la capacità di identificazione delle epidemie. Anche in questa occasione la segnalazione di un inatteso aumento di casi di HAV è avvenuta alla fine di marzo, contemporaneamente alla presenza del maggiore picco epidemico, su comunicazione del principale ospedale di malattie infettive della regione all'Osservatorio Epidemiologico. Nelle regioni a più alta incidenza di HAV, dove le epidemie possono ricorrere dopo intervalli di qualche anno, è necessario mantenere alta la sensibilizzazione di tutte le figure sanitarie, con il coinvolgimento non solo dei presidi ospedalieri, dei Servizi di Epidemiologia e Prevenzione locali, ma anche dei medici di medicina generale e pediatri. La loro diffusione sul territorio fa di questi professionisti utili sentinelle per la segnalazione di aumenti nella frequenza di malattie come l'HAV, prima ancora che la segnalazione giunga da centri specializzati.

Migliorare la sorveglianza in occasione di focolai epidemici diffusi prevedendo l'integrazione dei sistemi routinari con sistemi tempestivi per la raccolta e la condivisione dei dati. L'esperienza del sistema EPOS, basato sulla creazione di una banca dati regionale accessibile e interrogabile via internet, ha dimostrato l'efficacia di uno strumento flessibile e a basso costo in grado di evitare la dispersione delle informazioni raccolte e di generare in tempo reale analisi e curve epidemiche di straordinaria utilità sia per la sorveglianza che per la pianificazione dei successivi interventi.

Migliorare la capacità di risposta con indagini di campo che possano disporre di ampie collaborazione e un adeguato supporto di uomini e mezzi. Questa epidemia ha ampiamente superato le competenze e la responsabilità di un'unica struttura locale: ha infatti coinvolto diffusamente un'intera regione. Inoltre è stata documentata la presenza, anche se limitata, di casi esportati in altre regioni.

Migliorare l'offerta attiva e gratuita del vaccino anti-HAV ai conviventi dei casi. Anche se l'indagine analitica ha rilevato il ruolo preponderante del consumo di frutti di mare come fattore di rischio, è presumibile che una certa quota di casi sia stata secondaria a trasmissione diretta. Un impiego sistematico della vaccinazione ai conviventi è sicuramente da raccomandare, quale intervento efficace nell'evitare casi secondari e, di concerto con altri interventi, rallentare la trasmissione dell'infezione (19).

Migliorare le condizioni igieniche delle acque costiere. Questo intervento non solo previene epidemie da altri e più gravi patogeni, ma contribuisce al miglioramento della qualità della vita della popolazione locale e al rispetto dei beni ambientali.

Monitorare la qualità e le modalità di conservazione dei frutti di mare alla vendita e attuare un costante controllo sul territorio per scoraggiare e impedire la vendita di frutti di mare di dubbia provenienza e impropriamente conservati.

Attuare campagne di comunicazione atte a far diminuire i comportamenti a rischio. L'acquisto di frutti di mare impropriamente conservati in acqua e il consumo degli stessi senza adeguata cottura si sono rivelati comportamenti ancora diffusi nella popolazione e il loro ruolo dimostrato dal nostro studio analitico.

Ancora da valutare è l'istituzione della vaccinazione routinaria nei bambini, come risulta consigliato in paesi con livelli di endemia paragonabili a quelli del sud Italia. La fattibilità di un simile intervento dovrebbe tenere conto dell'accettazione della popolazione, e non incoraggiare comportamenti a rischio (come il consumo di frutti di mare crudi o conservati in acqua) e

accompagnarsi agli interventi che assicurino la sicurezza dei prodotti alimentari e delle acque costiere.

In conclusione, l'epidemia di HAV del 2004 in Campania, ha costituito per la sua dimensione un evento di particolare rilevanza per un paese dell'Unione Europea. Il coordinamento delle attività e delle diverse competenze e professionalità a diversi livelli istituzionali ha consentito una caratterizzazione epidemiologica nelle sue componenti descrittive, analitiche e molecolari.

Ciascuno degli interventi di controllo consigliati ha il potenziale di prevenire o almeno contenere epidemie future, tuttavia in mancanza di risorse adeguate, occorrerà individuare gli interventi prioritari attraverso una opportuna analisi costo-beneficio.

BIBLIOGRAFIA

1. Mele A, Tosti ME, Spada E, Condili L, Marzolini F. *SEIEVA Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta. Rapporto 2000-2001*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2003. (Rapporti ISTISAN 03/23).
2. Germinario C, Lopalco PL, Chirona M, Da Villa G. From hepatitis B to hepatitis A and B prevention: the Puglia (Italy) experience. *Vaccine* 2000;18(28):3326.
3. Franco E, Vitiello G. Vaccination strategies against hepatitis A in southern Europe. *Vaccine* 2003;21(7-8):696-7.
4. Lopalco PL, Malfait P, Menniti-Ippolito F, Prato R, Germinario C, Chironna M, Quarto M, Salmaso S. Determinants of acquiring hepatitis A virus disease in a large Italian region in endemic and epidemic periods *J Viral Hepat* 2005;(3):315-21.
5. Malfait P, Lopalco PL, Salmaso S, Germinario C, Quarto M, Barbuti S, Cipriani R, Mundo A, Pesole G. An outbreak of hepatitis A in Puglia, Italy, 1996. *Euro Surveil*. 1996;1(5):33-5.
6. Mele A, Stroffolini T, Palumbo F, Gallo G, Ragni P, Balocchini E, Tosti ME, Corona R, Marzolini A, Moiraghi A. Incidence of and risk factors for hepatitis A in Italy: public health indications from a 10-year surveillance. SEIEVA Collaborating Group. *J Hepatol* 1997;4:743-7.
7. De Paula VS, Baptista ML, Lampe E, Niel C, Gaspar AMC. Characterization of Hepatitis A Virus Isolates from Subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 2002;66:22-7.
8. Croci L, Ciccozzi M, De Medici D, Di Pasquale S, Fiore A, Mele A, Toti L. Inactivation of Hepatitis A virus in Heat-treated mussels. *Journal of Applied Microbiology* 1999;87:884-8.
9. De Medici D, Croci L, Di Pasquale S, Fiore A, Toti L. Detecting the presence of infectious hepatitis A virus in molluscs positive to RT-nested-PCR. Letters in *Applied Microbiology* 2001;33:362-6.
10. Croci L, De Medici D. *Giornata di studio "Epatite A trasmessa con gli alimenti". Istituto Superiore di Sanità Roma, 18 maggio 1999*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000 (Rapporti ISTISAN 00/2).
11. De Medici D, Croci L, Di Pasquale S, Fiore A, Toti L. The presence of viral RNA in food is a real risk for the consumer? *J Clin Virol* 2001;22(2):170.
12. Jacobson S, Buttery R, Parry JV, Perry KR, Wreghitt TG. Investigation of a hepatitis A outbreak in a primary school by sequential saliva sampling. *Clin Diagn Virol* 1995;3:173-80.
13. Chironna M, Lopalco P, Prato R, Germinario C, Barbuti S, Quarto M. Outbreak of infection with hepatitis A virus (HAV) associated with a foodhandler and confirmed by sequence analysis reveals a new HAV genotype IB variant. *J Clin Micr* 2004;42(6):2825-8.
14. Chironna M, Grottole A, Lanave C, Villa E, Barbuti S, Quarto M. Genetic analysis of HAV strains recovered from patients with acute hepatitis from Southern Italy. *J Med Virol* 2003;70(3):343-9.
15. Divizia M, Gabrieli R, Macaluso A, Bagnato B, Palombi L, Buonuono E, Cenko F, Leno L, Bino S, Basha A, Panà A. Nucleotide correlation between HAV isolates from human patients and environmental samples. *J Med Virol* 2005;75:8-12.
16. Pina S, Buti M, Jordi R, Clemente-Casares P, Jofre J, Girones R. Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 12):2955-63.
17. Sobsey MD, Shields PA, Hauchman FS, Davis AL, Rullman VA, Bosch A. Survival and persistence of hepatitis A virus in environmental samples. In: Zuckerman A. (Ed.). *Viral hepatitis and liver disease*. New York: AR Liss inc.; 1988. pp121-124.

18. Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Schvoerer C, Besse B, Aleman MH, Billaudel S, Cristina J, Ferre V. Genetic analysis of hepatitis A virus outbreak in France confirms the co-circulation of subgenotypes Ia, Ib and reveals a new genetic lineage. *J Med Virol* 2001;65(2):233-40.
19. D'Argenio P, Adamo B, Cirrincione R, Gallo G. The role of vaccine in controlling hepatitis A epidemics. *Vaccine* 2003;21:2246-9.

ALLEGATO

Questionari utilizzati per l'indagine sui fattori di rischio

Istituto Superiore di Sanità
Questionario per lo studio caso controllo - Scheda per i Casi

Parte da compilare prima dell'intervista

Intervistatore ----- Data -----

Dati anagrafici del caso

ID Caso -----
 Sesso M F Data di nascita -----
 Età -----
 Domicilio -----
 Comune ----- Telefono -----

Domande per l'intervistato

Se <18 anni chiedere autorizzazione ad un genitore
 Se <12 anni somministrare il questionario ad un parente
 Se <12 anni

Intervistato Parente Altro

Composizione del nucleo familiare

Numero dei conviventi nella abitazione -----
 Numero bambini di età inferiore uguale a 5 anni di età nella abitazione -----
 Per ogni bambino di età inferiore uguale a 5 anni di età indicare:

ID	Nome	Età
1.	-----	-----
2.	-----	-----
3.	-----	-----
4.	-----	-----
5.	-----	-----

Se età < 18 anni

Scuola SI NO
 Se SI
 Nome scuola -----
 Indirizzo scuola -----
 Materna Elementare Medie Superiori Università
 Classe frequentata -----
 C'è la refezione a scuola? SI NO
 Suo figlio/a pranza alla mensa della scuola? SI NO

Dati clinici

Ha presentato sintomi? SI NO
 Se SI,
 Quando ha cominciato a stare male? -----
 Quali tra i seguenti sintomi ha presentato? **SI** **NO**
 Colorito giallo sclere
 Colorito giallo cute
 Urine rosso
 Feci Chiare
 Astenia/inappetenza
 È stato ricoverato in ospedale? SI NO
 Se SI, quanti giorni è stato ricoverato? -----

È stato vaccinato per l'HAV? <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO Se SI, quando _____			
Chi altro in famiglia è stato vaccinato? <input type="checkbox"/> Nessuno			
Data della vaccinazione*			

*se non ricorda la data, indicare almeno se prima o dopo l'insorgenza dei sintomi del caso.			
Dati sull'esposizione (relativo al possibile periodo di esposizione)			
Calcolare il possibile periodo di esposizione sulla base della data di inizio sintomi	Da (60 gg prima) Al (15 gg prima)		

Nel periodo considerato, ha avuto contatti con persone con una diagnosi di HAV?			
<input type="checkbox"/> SI* <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Non so			
Se SI, il contatto era?	Età Comune Data dei sintomi		
<input type="checkbox"/> Familiare	-----		
<input type="checkbox"/> Collega	-----		
<input type="checkbox"/> Compagno di scuola	-----		
Nel periodo di esposizione, ha consumato i seguenti alimenti?			
Verdure crude	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Non ricordo		
Se SI, ha consumato alcuni tra i seguenti prodotti?			
SI	NO	Non ricordo	
Finocchi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Insalata	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ravanelli	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Carote	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sedani	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nel periodo considerato, ha consumato frutti di mare?			
<input type="checkbox"/> Mai			
<input type="checkbox"/> Solo 1 volta	In che occasione? -----		
<input type="checkbox"/> Saltuariamente (2-5 volte)			
<input type="checkbox"/> Circa 1 volta a settimana o più			
<input type="checkbox"/> Non ricordo			
Se SI, quali dei seguenti frutti di mare?			
Ostriche	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Non ricordo		
	<input type="checkbox"/> Crude <input type="checkbox"/> Cotte		
Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/> A Casa <input type="checkbox"/> Al Ristorante		
Se a CASA, dove sono state acquistate?	<input type="checkbox"/> Negozio <input type="checkbox"/> Ambulante		
Se presso un NEGOZIO, ricorda quale? -----			
Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante?			

L'alimento era conservato in acqua?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?			

Cozze	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	Non ricordo
	<input type="checkbox"/>	Crude	<input type="checkbox"/>	Cotte		
Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/>	A Casa	<input type="checkbox"/>	Al Ristorante		
Se a CASA, dove sono state acquistate?			<input type="checkbox"/>	Negozio	<input type="checkbox"/>	Ambulante
				Se presso un NEGOZIO, ricorda quale?		-----
				Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante?		-----
L'alimento era conservato in acqua?	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO		
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?						
Vongole	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	Non ricordo
	<input type="checkbox"/>	Crude	<input type="checkbox"/>	Cotte		
Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/>	A Casa	<input type="checkbox"/>	Al Ristorante		
Se a CASA, dove sono state acquistate?			<input type="checkbox"/>	Negozio	<input type="checkbox"/>	Ambulante
				Se presso un NEGOZIO, ricorda quale?		-----
				Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante?		-----
L'alimento era conservato in acqua?	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO		
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?						
Fasolari	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	Non ricordo
	<input type="checkbox"/>	Crude	<input type="checkbox"/>	Cotte		
Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/>	A Casa	<input type="checkbox"/>	Al Ristorante		
Se a CASA, dove sono state acquistate?			<input type="checkbox"/>	Negozio	<input type="checkbox"/>	Ambulante
				Se presso un NEGOZIO, ricorda quale?		-----
				Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante?		-----
L'alimento era conservato in acqua?	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO		
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?						
Cannolicchi	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	Non ricordo
	<input type="checkbox"/>	Crude	<input type="checkbox"/>	Cotte		
Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/>	A Casa	<input type="checkbox"/>	Al Ristorante		
Se a CASA, dove sono state acquistate?			<input type="checkbox"/>	Negozio	<input type="checkbox"/>	Ambulante
				Se presso un NEGOZIO, ricorda quale?		-----
				Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante?		-----
L'alimento era conservato in acqua?	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO		
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?						
Datteri	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	Non ricordo
	<input type="checkbox"/>	Crude	<input type="checkbox"/>	Cotte		
Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/>	A Casa	<input type="checkbox"/>	Al Ristorante		
Se a CASA, dove sono state acquistate?			<input type="checkbox"/>	Negozio	<input type="checkbox"/>	Ambulante
				Se presso un NEGOZIO, ricorda quale?		-----
				Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante?		-----
L'alimento era conservato in acqua?	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO		
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?						

Tartufi	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	Non ricordo
	<input type="checkbox"/>	Crude	<input type="checkbox"/>	Cotte		
Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/>	A Casa	<input type="checkbox"/>	Al Ristorante		
Se a CASA, dove sono state acquistate?			<input type="checkbox"/>	Negozio	<input type="checkbox"/>	Ambulante
		Se presso un NEGOZIO, ricorda quale? -----				
		Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante?				
	-----			-----		
		L'alimento era conservato in acqua?	<input type="checkbox"/>	S	<input type="checkbox"/>	NO
			I			
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?						
Nel periodo considerato, ha consumato latticini sfusi (non confezionati), come mozzarelle, ricotte, formaggi freschi						
	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	Non ricordo
Se SI dove sono stati acquistati?						-----

Nel periodo considerato, ha consumato acqua proveniente da pozzi, fontane?						
	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	Non ricordo
Se SI, in quale località si trova?						-----

Istituto Superiore di Sanità
Questionario per lo studio caso controllo - Scheda per i Controlli

Parte da compilare prima dell'intervista

Intervistatore _____ Data _____
 ID controllo _____
 Sesso M F Età _____ Telefono _____

Domande per l'intervistato

Se <18 anni chiedere autorizzazione ad un genitore
 Se <12 anni somministrare il questionario ad un parente
 Se età < 12 anni

Intervistato Parente (indicare nome e legame di parentela) Altro

Dati relativi al controllo per stabilirne l'eleggibilità allo studio

Ha mai avuto l'epatite? SI Quando _____
 NO
 Non so
 Nei mesi scorsi ha mai avuto uno dei seguenti sintomi? Ittero cutaneo
 Ittero sclerale
 Feci chiare
 Urine scure
 È mai stato vaccinato per l'HAV? SI Quando _____
 NO
 Non so

Se non ha risposto mai SI, il controllo è arruolato e si può procedere all'intervista.

Composizione del nucleo familiare

Numero dei conviventi nella abitazione _____
 Numero di bambini di età inferiore uguale a 5 anni di età nella abitazione _____
 Per ogni bambino dio età inferiore uguale a 5 anni di età indicare

ID	Età
6. _____	_____
7. _____	_____
8. _____	_____
9. _____	_____
10. _____	_____

Dati sull'esposizione (relativo al possibile periodo di esposizione)

Nel periodo considerato, ha avuto contatti con persone con una diagnosi di HAV?

SI NO Non so

Se SI, il contatto era?

- Familiare
 Collega
 Compagno

	Età	Comune	Data sintomi
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

Se età < 18 anni

Scuola SI NO
 Se SI
 Nome scuola _____
 Indirizzo _____
 Materna Elementare Medie Superiori Università
 Classe _____

Refezione	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Pranza a mensa	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO

Nel periodo di esposizione, ha consumato i seguenti alimenti?

Verdure crude	SI	NO	Non ricordo
Se SI, ha consumato alcuni tra i seguenti prodotti?			
	SI	NO	Non ricordo
Finocchi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Insalata	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ravanelli	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Carote	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sedani	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Nel periodo considerato, ha consumato frutti di mare?

Mai

Solo 1 volta In che occasione? -----

Saltuariamente (2-5 volte)

Circa 1 volta a settimana o più

Non ricordo

Se SI, quali dei seguenti frutti di mare?

Ostriche	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> Non ricordo
	<input type="checkbox"/> Crude	<input type="checkbox"/> Cotte	
Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/> A Casa	<input type="checkbox"/> Al Ristorante	
Se a CASA, dove sono state acquistate? <input type="checkbox"/> Negozio <input type="checkbox"/> Ambulante			
Se presso un NEGOZIO, ricorda quale? -----			
Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante? -----			

L'alimento era conservato in acqua? <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO			
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?			
Cozze	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> Non ricordo
	<input type="checkbox"/> Crude	<input type="checkbox"/> Cotte	
Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/> A Casa	<input type="checkbox"/> Al Ristorante	
Se a CASA, dove sono state acquistate? <input type="checkbox"/> Negozio <input type="checkbox"/> Ambulante			
Se presso un NEGOZIO, ricorda quale? -----			
Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante? -----			

L'alimento era conservato in acqua? <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO			
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?			
Vongole	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> Non ricordo
	<input type="checkbox"/> Crude	<input type="checkbox"/> Cotte	
Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/> A Casa	<input type="checkbox"/> Al Ristorante	
Se a CASA, dove sono state acquistate? <input type="checkbox"/> Negozio <input type="checkbox"/> Ambulante			
Se presso un NEGOZIO, ricorda quale? -----			
Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante? -----			

L'alimento era conservato in acqua? <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO			
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?			
Fasolari	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> Non ricordo
	<input type="checkbox"/> Crude	<input type="checkbox"/> Cotte	

Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/>	A Casa	<input type="checkbox"/>	Al Ristorante
Se a CASA, dove sono state acquistate?			<input type="checkbox"/>	Negozio <input type="checkbox"/> Ambulante
Se presso un NEGOZIO, ricorda quale?	-----			
Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante?	-----			
L'alimento era conservato in acqua?	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?	-----			
Cannolicchi	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/> Non ricordo
	<input type="checkbox"/>	Crude	<input type="checkbox"/>	Cotte
Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/>	A Casa	<input type="checkbox"/>	Al Ristorante
Se a CASA, dove sono state acquistate?			<input type="checkbox"/>	Negozio <input type="checkbox"/> Ambulante
Se presso un NEGOZIO, ricorda quale?	-----			
Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante?	-----			
L'alimento era conservato in acqua?	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?	-----			
Datteri	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/> Non ricordo
	<input type="checkbox"/>	Crude	<input type="checkbox"/>	Cotte
Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/>	A Casa	<input type="checkbox"/>	Al Ristorante
Se a CASA, dove sono state acquistate?			<input type="checkbox"/>	Negozio <input type="checkbox"/> Ambulante
Se presso un NEGOZIO, ricorda quale?	-----			
Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante?	-----			
L'alimento era conservato in acqua?	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?	-----			
Tartufi	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/> Non ricordo
	<input type="checkbox"/>	Crude	<input type="checkbox"/>	Cotte
Dove le ha consumate?	<input type="checkbox"/>	A Casa	<input type="checkbox"/>	Al Ristorante
Se a CASA, dove sono state acquistate?			<input type="checkbox"/>	Negozio <input type="checkbox"/> Ambulante
Se presso un NEGOZIO, ricorda quale?	-----			
Se presso un AMBULANTE, ricorda il nome e la zona dell'ambulante?	-----			
L'alimento era conservato in acqua?	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO
Se al RISTORANTE ricorda il nome e la località?	-----			
Nel periodo considerato, ha consumato latticini sfusi (non confezionati), come mozzarelle, ricotte, formaggi freschi	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/> Non ricordo
Se SI dove sono stati acquistati?	-----			
Nel periodo considerato, ha consumato acqua proveniente da pozzi, fontane?	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/> Non ricordo
Se SI, in quale località si trova?	-----			

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, dicembre 2005 (n. 4) 4° Suppl.