

Progetto per il Ministero della Salute (CCM) 2008-2009  
Nuovo progetto

**TITOLO DELLA RICERCA:**

Diagnostica virale rapida in liquami. Sorveglianza sanitaria di virus enterici (enterovirus, adenovirus e norovirus) attraverso campionature codificate di liquami urbani.

Dott. Michele Muscillo, Dipartimento AMPP, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Diagnostica virale rapida in liquami. Sorveglianza sanitaria di virus enterici (enterovirus, adenovirus e norovirus) attraverso campionature codificate di liquami urbani.

### Analisi della struttura del problema

#### Problema e spiegazione plausibile:

In Italia la circolazione di molti virus enterici è alquanto sottostimata a causa di un sistema di notifica legato soprattutto a eventi epidemici che spesso coinvolgono un gran numero di persone. Mentre per alcuni virus, come gli enterovirus, è ben noto quanto sia diffusa la loro circolazione nell'uomo anche in forma asintomatica, non è altrettanto noto quanto questo fenomeno incida sulla circolazione di adenovirus e norovirus. È quindi difficile capire quali ceppi siano prevalenti e ciò può vanificare spesso l'adozione di adeguate misure di prevenzione, come per es. quelle basate sulla vaccinazione. *La presenza capillare sul territorio nazionale di migliaia di impianti di depurazione di acque reflue urbane, tutelate dal D. Lgs.n.152/99 e s.m.i. che recepisce la normativa comunitaria 91/271/CEE ([http://www.apat.gov.it/site/it-IT/Temi/Acqua/Depurazione\\_delle\\_acque\\_reflue/](http://www.apat.gov.it/site/it-IT/Temi/Acqua/Depurazione_delle_acque_reflue/)), può essere utilizzata come un network permanente di sorveglianza per integrare in modo razionale i dati epidemiologici tradizionali.* Attraverso l'utilizzo combinato delle informazioni relative alla portata dell'impianto, degli abitanti equivalenti e dei genomi virali determinati mediante analisi RealTime dei liquami, è possibile definire sia i tipi di virus enterici circolanti in una popolazione che l'entità del serbatoio umano espresso in numero di abitanti ospiti. Questo ultimo approccio può essere utilizzato sia per gli enterovirus, che per adenovirus e norovirus che potrebbero sostituire o integrare gli enterovirus nella valutazione di qualità delle acque a qualunque uso siano esse destinate.

**Gli enterovirus umani non-polio** hanno da molto tempo conquistato una vasta nicchia ecologica. Oltre ad essere responsabili di varie patologie, tra cui le più note sono gastroenteriti, paralisi flaccide transitorie, meningiti asettiche (1), encefaliti, miocarditi e pericarditi, sono caratterizzati da una circolazione prevalentemente asintomatica che determina una sottostima della loro diffusione. Sui ceppi circolanti attualmente in Italia ben poco si conosce in quanto vengono raramente cercati e, quando isolati nell'ambito clinico, sono difficilmente classificabili (5).

Dati sulla loro diffusione ambientale sono stati ottenuti in passato nell'ambito di progetti finanziati dall'allora MURST, condotti al fine di verificare la presenza degli enterovirus nell'acqua di balneazione (7,8). A parte dati sporadici, non si conosce l'entità della diffusione di tali patogeni su scala nazionale.

L'identificazione degli enterovirus umani nell'acqua è fortemente dipendente dalle conoscenze e dallo sviluppo dei dati epidemiologici riguardanti non solo gli enterovirus umani, ma anche quelli animali, soprattutto dei suini che sono molto simili a quelli umani (3).

**Gli adenovirus umani**, scoperti nel 1953, sono responsabili di un ampio spettro di forme cliniche che, sebbene nella maggior parte dei casi si risolvano spontaneamente, possono evolversi in forme assai gravi o letali nei bambini e nei pazienti immunocompromessi. Spesso danno infezioni latenti riattivate a distanza di tempo. La maggior parte di essi causano malattie respiratorie, tranne i sierotipi 40 e 41 che danno gastroenteriti; essi si isolano dalle feci, dalle secrezioni delle mucose nasali, congiuntivali e della faringe. In alcuni casi possono causare infezioni importanti come epatiti, nefriti, miocarditi, meningoencefaliti. - Sierotipi particolarmente virulenti, come per esempio il

14, sono venuti recentemente alla cronaca in quanto responsabili di numerosi decessi negli USA.

Esistono scarse informazioni sulla epidemiologia delle infezioni da adenovirus in Italia e sulla distribuzione dei sierotipi circolanti (4) nell'uomo, nei pazienti immunocompromessi (6) e nell'ambiente (9). L'*Environmental Protection Agency of America* (USEPA) ha introdotto gli adenovirus nella "Contamination Candidate List" inserendoli tra i 4 principali microrganismi da monitorare per le acque potabili. La comunità europea ha di recente finanziato uno studio per una stima della diffusione degli adenovirus nelle acque ricreative, assieme ai norovirus. Il progetto europeo VIROBATHE ha visto coinvolti 9 stati (Italia, Francia, Germania, Spagna, Portogallo, Olanda, Regno Unito, Polonia e Cipro) per un totale di 16 gruppi di ricerca compreso l'ISS (ove il Dott. Muscillo è stato responsabile di una unità operativa) per una proposta di revisione delle normative comunitarie.

I **norovirus** presentano diffusione mondiale nell'uomo e negli animali e nei paesi industrializzati sono i più comuni agenti virali responsabili nell'uomo di gastroenteriti epidemiche e con un ruolo importante nelle gastroenteriti sporadiche. I norovirus vengono classificati in cinque diversi genogruppi, denominati da GI a GV, sulla base di analisi filogenetiche; tali genogruppi sono ulteriormente suddivisi in 29 *cluster* genetici a loro volta comprendenti diversi tipi. La trasmissione dei norovirus può avvenire per consumo di alimenti contaminati, e/o di acqua contaminata, contatto persona-persona o per contatto diretto con superfici contaminate. Sono considerati attualmente patogeni emergenti data la loro grande diffusione in diverse tipologie di ambienti, la capacità di dare luogo ad infezioni clinicamente rilevanti in tutti i gruppi di età e di trasmettersi con diverse modalità, così come l'elevata diversità genetica e la capacità di sviluppare nell'uomo una immunità di tipo breve.

Diversi progetti europei, tra cui VIROBATHE, hanno valutato l'entità della loro diffusione nell'uomo, alimenti ed ambiente e studiato nuove tecniche per la loro identificazione. Uno dei motivi responsabili della scarsità dei dati epidemiologici sulla diffusione dei norovirus è probabilmente legato alla loro incapacità a replicarsi su colture cellulari e quindi soltanto metodi molecolari appropriati sono in grado di identificarli e classificarli (2).

### Soluzione proposta:

Implementazione di un progetto pilota che partendo dalle acque in ingresso ed in uscita degli impianti di depurazione dei liquami di 10 città italiane, sviluppi un adeguato studio epidemiologico sulla circolazione di patogeni virali relativamente ad enterovirus, adenovirus e norovirus.

Il progetto attraverso i dati ufficiali del catasto depuratori dei "Servizi Regionali di Tutela delle Acque", e dell'APAT, affronterà il problema del georeferenzamento degli impianti mediante un database relazionale che chiameremo SIGEMI, acronimo di: **S**istema Georeferenziato **E** Malattie Infettive. Esso contribuirà all'assegnazione di codici univoci permanenti e permetterà una migliore gestione dei dati pregressi e di quelli futuri. Il progetto si baserà su una serie di campionamenti stagionali delle acque reflue dei principali depuratori di Potenza, Napoli, Roma, Firenze, Perugia, Bologna, Brescia, Torino, Trieste e Venezia. Parallelamente, in collaborazione con le Agenzie Regionali per l'Ambiente che aderiranno al progetto, verranno effettuati prelievi *random* di campioni di acque reflue in più regioni utilizzando le codifiche fornite dal sistema SIGEMI.

### Fattibilità:

Il progetto, nella fase pilota, verrà portato avanti con metodiche sperimentate e pubblicate su riviste nazionali ed internazionali, con la collaborazione dell'ACEA di Roma, le ARPA di Potenza, Napoli, Firenze, Perugia, Bologna, Brescia, Torino, Trieste ed il Magistrato Alle Acque di Venezia.

### Criticità:

Sarebbe opportuno integrare i dati epidemiologici ambientali con dati clinici per studi comparativi. E' quindi auspicabile una collaborazione con IRCS e Centri Universitari ed Ospedalieri disposti all'invio di ceppi clinici per il sequenziamento genomico presso l'ISS.

### **Bibliografia**

1. **Faustini A., Fano V., M. Muscillo, Zaniratti S., La Rosa G., L. Tribuzi, and Perucci C.A.** 2006. An outbreak of aseptic meningitis due to Echovirus 30 associated with attending school and swimming in pools . *Int.J.Infect.Dis* 10:291-297.
2. **La Rosa, G., S. Fontana, A. Di Grazia, M. Iaconelli, M. Pourshaban, and M. Muscillo.** 2007. Molecular Identification and Genetic Analysis of Norovirus Genogroups I and II in Water Environments: Comparative Analysis of Different Reverse Transcription-PCR Assays. *Appl.Environ.Microbiol.* 73:4152-4161.
3. **La Rosa, G., M. Muscillo, A. Di Grazia, S. Fontana, M. Iaconelli, and M. Tollis.** 2006. Validation of RT-PCR Assays for Molecular Characterization of Porcine Teschoviruses and Enteroviruses. *J.Vet.Med.Series B* 53:257-265.
4. **La Rosa, G., M. Muscillo, M. Iaconelli, A. Di Grazia, S. Fontana, M. Sali, E. De Carolis, P. Cattani, S. Manzara, and G. Fadda.** 2006. Molecular characterization of human adenoviruses isolated in Italy. *New Microbiol.* 29:177-184.
5. **Manzara, S., M. Muscillo, G. La Rosa, C. Marianelli, P. Cattani, and G. Fadda.** 2002. Molecular identification and typing of enteroviruses isolated from clinical specimens. *J.Clin.Microbiol.* 40:4554-4560.
6. **Minosse, C., M. S. Zaniratti, S. Calcaterra, F. Carletti, M. Muscillo, M. Pisciotta, L. Pillitteri, A. Corpolongo, F. N. Lauria, P. Narciso, G. Anzidei, and M. R. Capobianchi.** 2005. Application of a Molecular Panel To Demonstrate Enterotropic Virus Shedding by Healthy and Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *J Clin Microbiol* 43:1979-1981.
7. **Muscillo, M., G. La Rosa, F. A. Aulicino, P. Orsini, C. Bellucci, and R. Micarelli.** 1995. Comparison of cdna probe hybridizations and rt-pcr detection methods for the identification and differentiation of enteroviruses isolated from sea water samples. *Wat.Res.* 29:1309-1316.
8. **Muscillo, M., G. La Rosa, A. Carducci, L. Cantiani, and C. Marianelli.** 1999. Molecular and biological characterization of poliovirus 3 strains isolated in Adriatic seawater samples. *Wat.Res.* 33:3204-3212.
9. **Muscillo, M., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Fontana, S., Di Grazia, A., Manzara, S., Fadda, G., Santangelo, R, and La Rosa, G.** Detection and Quantification of Human Adenoviruses in Surface Waters by Nested PCR, TaqMan Real-Time PCR and Cell Culture Assays. *Wat Air Soil Pollut* . 2007. In Press

## DEFINIZIONE DELL'OBIETTIVO

### OBIETTIVO GENERALE

L'obiettivo del presente progetto è l'analisi epidemiologica molecolare di virus enterici circolanti in Italia attraverso un protocollo di diagnosi rapida dei virus in reflui urbani di 10 località italiane. Per il raggiungimento dell'obiettivo generale si utilizzeranno metodiche di PCR, RealTime e sequenziamento genico di cui si ha già una consolidata esperienza.

### OBIETTIVO SPECIFICO 1

Allestimento di un archivio informatico di georeferenzamento. Attraverso i dati catastali forniti dall'APAT, regioni, province, verrà implementato un archivio informatico aggiornato ed aggiornabile che permetta la codifica univoca dei punti di prelievo situati sul territorio nazionale. Verrà utilizzato un database Access con un minimo di 10 tabelle relazionali che chiameremo con l'acronimo SIGEMI (Sistema Georeferenziato E Malattie Infettive). Il SIGEMI costituirà uno strumento tecnico di supporto permanente e quindi un valore aggiunto al progetto.

### OBIETTIVO SPECIFICO 2

Identificazione e caratterizzazione molecolare dei ceppi prevalenti di enterovirus adenovirus e norovirus nelle acque reflue degli impianti più rappresentativi di **Potenza, Napoli, Roma, Firenze, Perugia, Bologna, Brescia, Torino, Trieste, Venezia**. Verranno utilizzate metodiche rapide di RT-PCR, PCR e analisi delle sequenze nucleotidiche. I campionamenti avranno una cadenza stagionale. Campioni particolarmente interessanti, perché ceppi ricombinanti o identificati per la prima volta in Italia, verranno isolati su colture cellulari.

### OBIETTIVO SPECIFICO 3

Stima quantitativa dei ceppi prevalenti di enterovirus adenovirus e norovirus nelle acque reflue degli impianti più rappresentativi di **Potenza, Napoli, Roma, Firenze, Perugia, Bologna, Brescia, Torino, Trieste, Venezia**. Mediante RealTime RT-PCR (enterovirus e norovirus) e RealTime PCR (adenovirus) verranno stimate le copie genomiche presenti nei vari siti di prelievo al fine di valutare l'entità e la persistenza di questi virus nell'ambiente. Mediante un sistema integrato di RealTime colture cellulari verrà stabilita la frazione infettante di virus coltivabili (enterovirus e adenovirus) nei campioni analizzati.



PIANO DI VALUTAZIONE PER OGNI OBIETTIVO SPECIFICO

|  |   |                                    |
|--|---|------------------------------------|
| Obiettivo generale                     | Diagnostica virale rapida in liquami                                      |                                    |
| Obiettivo specifico 1                  | Allestimento archivio informatico di georeferenzamento SIGEMI             |                                    |
| Indicatore di risultati 1.1            | Allestimento database nazionale   |                                    |
| Standard di risultati 1.2              | Oltre il 70% delle regioni  |                                    |
| <b>AZIONE</b>                          | <b>INDICATORE DI PROCESSO</b>   | <b>STANDARD DI PROCESSO</b>        |
| Richieste ufficiale agli enti preposti | Reperimento informazioni in formato elettronico del catasto depuratori    | >60% dati reperiti                 |
| Database SIGEMI                        | Implementazione di database ACCESS con almeno 10 tabelle relazionali      | >80% di dati utili                 |
| Georeferenzamento                      | Codifica del numero di punti potenziali di prelievo in ingresso ed uscita | >80% punti prelievo con coordinate |
| Diffusione dei risultati               | Pubblicazione <i>Report</i> informativo                                   | <i>Report</i> annuale              |

CRONOGRAMMA obiettivo specifico 1.

|                                  | 1-2 | 3-8 | 9-12 | 13-16 | 17-21 | 22-24 |
|----------------------------------|-----|-----|------|-------|-------|-------|
| Richieste enti preposti          |     |     |      |       |       |       |
| Realizzazione database           |     |     |      |       |       |       |
| Georeferenzamento impianti       |     |     |      |       |       |       |
| Inserimento risultati virologici |     |     |      |       |       |       |
| Diffusione risultati             |     |     |      |       |       |       |
| Pubblicazioni                    |     |     |      |       |       |       |

rendicontazione

*el* *pa*

(continua)

|                             |  |  |
|-----------------------------|--|--|
| Obiettivo specifico 2       | Identificazione e caratterizzazione molecolare dei ceppi prevalenti di enterovirus adenovirus e norovirus nelle acque reflue degli impianti più rappresentativi di Potenza, Napoli, Roma, Firenze, Perugia, Bologna, Brescia, Torino, Trieste e Venezia. |  |
| Indicatore di risultati 2.1 | Analisi filogenetiche dei ceppi circolanti sul territorio nazionale  |  |
| Standard di risultati 2.1   | Oltre il 50% dei ceppi identificati  |  |
| <b>AZIONE</b>               | <b>INDICATORE DI PROCESSO</b>  | <b>STANDARD DI PROCESSO</b>                            |
| Campionamento               | Raccolta campioni di acque in ingresso/uscita  | almeno un campionamento per ogni stagione              |
| Preparazione campioni       | Purificazione e preparazione dei pellet virali   | >100 campionamenti                                     |
| Identificazione qualitativa | Diagnostica rapida e conferma mediante sequenziamento  | minimo 3 test/campione/virus, >900 PCR e 1600 sequenze |
| Gestione informatizzata     | Utilizzo di interfacce SQL web   | 100% dei dati analitici inseriti nel database          |
| Diffusione dei risultati    | Database pubblico GenBank  | >99% <i>accession number</i>                           |
|                             | Pubblicazione <i>Report</i> informativo  | <i>Report</i> annuale                                  |

**CRONOGRAMMA obiettivo specifico 2.**

|                              |                 |     |      |       |       |       |
|------------------------------|-----------------|-----|------|-------|-------|-------|
|                              | rendicontazione |     |      |       |       |       |
|                              | ↓               | ↓   | ↓    | ↓     | ↓     | ↓     |
|                              | 1-4             | 5-8 | 9-12 | 13-16 | 17-21 | 22-24 |
| Campionamento                |                 |     |      |       |       |       |
| Analisi campioni             |                 |     |      |       |       |       |
| Gestione informatizzata dati |                 |     |      |       |       |       |
| Diffusione risultati         |                 |     |      |       |       |       |
| Pubblicazioni                |                 |     |      |       |       |       |

*el* *pa*

(continua)

|                              |   |   |
|------------------------------|---|---|
| Obiettivo specifico 3        | Stima quantitativa dei ceppi prevalenti di enterovirus adenovirus e norovirus nelle acque in ingresso ed uscita dei depuratori di Potenza, Napoli, Roma, Firenze, Perugia, Bologna, Brescia, Torino, Trieste e Venezia. |   |
| Indicatore di risultati 2.1  | Quantificazione delle copie genomiche virali  |   |
| Standard di risultati 2.1    | Oltre 10 <sup>6</sup> copie per m <sup>3</sup> di acque reflue in ingresso  |   |
| <b>AZIONE</b>                | <b>INDICATORE DI PROCESSO</b>   | <b>STANDARD DI PROCESSO</b>                     |
| Campionamento                | Raccolta campioni di acque in ingresso/uscita.  | =100% campioni idonei                           |
| Preparazione campioni        | Purificazione e preparazione dei pellet virali.   | > 100 campioni                                  |
| Identificazione quantitativa | PCR e RT-PCR RealTime mediante uso di standard sintetici  | > 900 test ed il 90% dei campioni quantizzabili |
| Controllo di qualità         | Utilizzo di RNA sintetico come controllo interno  | <50% segnale in campioni inibiti                |
| Gestione informatizzata      | Utilizzo di interfacce SQL web  | 100% dei dati analitici inseriti nel database   |
| Diffusione dei risultati     | Publicazione Report informativo   | Report annuale                                  |

**CRONOGRAMMA obiettivo specifico 3.**

|                              |                 |     |      |       |       |       |
|------------------------------|-----------------|-----|------|-------|-------|-------|
|                              | rendicontazione |     |      |       |       |       |
|                              | ↓               | ↓   | ↓    | ↓     | ↓     | ↓     |
|                              | 1-4             | 5-8 | 9-12 | 13-16 | 17-21 | 22-24 |
| Preparazione campioni        |                 |     |      |       |       |       |
| Analisi campioni             |                 |     |      |       |       |       |
| Gestione informatizzata dati |                 |     |      |       |       |       |
| Diffusione risultati         |                 |     |      |       |       |       |
| Publicazioni                 |                 |     |      |       |       |       |




## PIANO FINANZIARIO

| Unità Operativa 1                               | referente        | compiti   |
|---|------------------|---|
| Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento AMPP | Michele Muscillo | 1. cordinamento generale<br>2. georeferenzamento impianti<br>3. codifica punti prelievo<br>4. analisi virologiche<br>5. elaborazione dati<br>6. trasferimento dati Min. Salute (CCM)<br>7. diffusione dei risultati |

| Risorse                                       | Compiti e prodotti attesi                                    | 1° anno     | 2° anno     | Totale       |
|---|--|-------------|-------------|--------------|
| 1 ricercatore (contratti da 12 mesi x 2 anni) | Campionamenti, analisi campioni                              | 25.000,00   | 25.000,00   | 50.000,00    |
| Sviluppo software                             | Elaborazione, gestione e acquisto di software per banca dati | 4.000,00    | 3.000,00    | 7.000,00     |
| Materiale di consumo                          | Reagenti e kit per diagnostica rapida                        | 31.000,00   | 27.363,64   | 58.363,64    |
| Spedizioniere                                 |  | 3.000,00    | 2.000,00    | 5.000,00     |
| Missioni *                                    |  | 8.125,00    | 7.875,00    | 16.000,00    |
| Totale  |  | € 71.125,00 | € 65.238,64 | € 136.363,64 |
| Spese generali                                |  | € 7.112,50  | € 6.523,86  | € 13.636,36  |
| Totale richiesto                              |  |             |             | €150.000,00  |

## PIANO FINANZIARIO GENERALE

| Risorse        | 1° anno     | 2° anno     | totale       |
|----------------|-------------|-------------|--------------|
| Personale      | € 25.000,00 | € 25.000,00 | € 50.000,00  |
| Beni e servizi | € 38.000,00 | € 32.363,64 | € 70.363,64  |
| Missioni       | € 8.125,00  | € 7.875,00  | € 16.000,00  |
| Spese generali | € 7.112,50  | € 6.523,86  | € 13.636,36  |
| Totale         | € 78.237,50 | € 71.762,50 | € 150.000,00 |

\*Il progetto prevede diversi sopralluoghi fuori città, sul territorio nazionale, per meglio coordinare con le ARPA i punti di prelievo.