



**Alma Mater Studiorum- Università di Bologna**

**Dottorato di ricerca in “Epidemiologia e Controllo  
delle Zoonosi” (SSD VET/05)**

**Ciclo XIX**

**EPATITE E: RUOLO DEL SUINO NELLA  
TRASMISSIONE DELL' INFEZIONE ALL'  
UOMO, STUDIO DI  
PREVALENZA IN AREE RURALI DELLA  
BOLIVIA**

**Candidato :**

Dr.ssa Angela Pieri

**Relatore:**

Prof. Francesco Tolari

**Coordinatore:**

Prof. Luigi Morganti

Esame finale anno 2008

*ad Oscar*

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	pag 4
<b>CAPITOLO I: L'EPATITE E</b> .....	pag 6
1.1. CENNI STORICI .....	pag 6
1.2. EZIOLOGIA .....	pag 9
✓ Tassonomia .....	pag 9
✓ Caratteristiche morfologiche e strutturali .....	pag 11
✓ Genoma e replicazione .....	pag 11
✓ Spettro d'ospite .....	pag 14
1.3. LA MALATTIA NELL' UOMO .....	pag 17
1.3.1 EPIDEMIOLOGIA .....	pag 17
✓ Modalità di trasmissione .....	pag 17
✓ Prevalenza nelle aree endemiche .....	pag 22
✓ Prevalenza nelle aree non endemiche .....	pag 23
1.3.2 PATOGENESI .....	pag 25
1.3.3 ASPETTI ANATOMOPATOLOGICI E CLINICI .....	pag 28
1.3.4 DIAGNOSI .....	pag 33
✓ Diagnosi clinica .....	pag 33
✓ Diagnosi di laboratorio .....	pag 33
1.3.5 PREVENZIONE E CONTROLLO .....	pag 37
<b>CAPITOLO II: RICERCHE PERSONALI</b> .....	pag 41
2.1 EPATITE E IN AMERICA LATINA .....	pag 43
<b>CAPITOLO III: MATERIALI E METODI</b> .....	pag 45
3.1 ASPETTI DEMOGRAFICI E SOCIOSANITARI DELL' AREA DI STUDIO .....	pag 45
3.2 POPOLAZIONE STUDIATA .....	pag 49
3.3 RACCOLTA DEI CAMPIONI .....	pag 51
✓ Equipe di lavoro .....	pag 51
✓ Step 1: incontro con le comunità locali .....	pag 51
✓ Step 2: questionario .....	pag 52
✓ Step 3: prelievo ematico e raccolta campioni fecali .....	pag 52
✓ Step 4: esami di laboratorio .....	pag 53
• Esami virologici su campioni di feci .....	pag 53
• Esami virologici su campioni di siero .....	pag 55
• Esami sierologici .....	pag 55
<b>CAPITOLO IV: RISULTATI</b> .....	pag 57
4.1 POPOLAZIONE UMANA .....	pag 57
4.2 POPOLAZIONE SUINA .....	pag 60
<b>CAPITOLO V: DISCUSSIONE</b> .....	pag 61
<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	pag 65
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	pag 66

## INTRODUZIONE

L'epatite virale è una malattia universalmente diffusa, sostenuta da agenti patogeni epatotropi in grado di causare un processo infiammatorio del fegato istologicamente caratterizzato da necrosi parenchimale e da infiltrati flogistici.

L'epatite E, in particolare, è una forma a trasmissione fecale-orale e con caratteristiche cliniche di epatite acuta non soggetta a cronicizzazione. Gli aspetti clinici ed anatomo-patologici della malattia sono sovrapponibili a quelli delle altre epatiti virali, ma la sua epidemiologia si differenzia nettamente.

HEV è la causa più frequente di epatiti virali sporadiche nelle zone a clima tropicale o subtropicale con condizioni igieniche scadenti, ed è responsabile di epidemie dovute alla contaminazione di acque potabili (1,2).

Soltanto recentemente, grazie ad una maggiore disponibilità di test diagnostici, si è constatato che nei paesi sviluppati la prevalenza di anticorpi anti-HEV è superiore a quella attesa e varia tra lo 0,7% e il 5%,. La presenza di anticorpi anti-HEV in assenza, almeno apparentemente, di casi clinici, ha fatto sorgere il sospetto che possano esistere riserve naturali del virus diverse dall'uomo. HEV è stato recentemente isolato anche in diversi animali e l'analisi nucleotidica degli isolati virali di origine animale ha mostrato un elevato grado di omologia con i ceppi di HEV umani avvalorando l'ipotesi che alcuni animali possano fungere da fonte di contagio per l'uomo (3,4).

Un' ulteriore conferma di tale ipotesi viene dalla dimostrazione della possibilità di trasmissione interspecifica di ceppi umani al suino e di ceppi suini a primati non umani.

In questa tesi, dopo un aggiornamento sugli aspetti più rilevanti dell'infezione da HEV nell'uomo, verranno presentati i risultati di uno studio di sieroprevalenza per HEV condotto in Bolivia in alcune comunità rurali dove vengono allevati suini. L'indagine è stata svolta congiuntamente dai gruppi di ricerca di virologia veterinaria del Dipartimento di Patologia Animale dell'Università di Pisa e della Clinica di Malattie Infettive dell'Università di Firenze, la quale svolge da anni attività di ricerca in Bolivia. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti in un precedente studio di sieroprevalenza condotto nel medesimo Paese nel 1998 (5) ed è stato valutato il ruolo del suino come possibile serbatoio animale del virus dell'epatite E.

# Capitolo I

## *L'Epatite E*

### *1.1 Cenni Storici*

Le epatiti virali sono patologie conosciute dall'antichità e fino a tempi relativamente recenti sono state considerate patologie benigne. L'agente eziologico cercato era rimasto sempre sconosciuto ma negli anni '40 McCallum identificò due distinte modalità di trasmissione, enterica e parenterale, e propose di indicare le rispettive forme di infezione con i termini di epatite A e epatite B (6). Negli anni '70, Blumberg scopre il virus dell'epatite B e da allora si susseguono una serie di scoperte che portano all'identificazione di nuovi virus epatotropici. Oggi i virus epatitici ben definiti sono: il virus dell'epatite A (HAV), dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV), dell'epatite D (delta), dell'epatite E (HEV) e dell'epatite G (HGV).

I virus epatitici A ed E si trasmettono per via fecale-orale e causano una forma di epatite ad andamento acuto-subacuto; i virus epatitici B, C, D e G si trasmettono per via parenterale e parenterale inapparente e possono essere responsabili di una malattia cronica che può evolvere verso la cirrosi epatica e l'adenocarcinoma epatico. Circa il 10-20% delle epatiti acquisite per via enterica o parenterale, l'agente eziologico rimane ignoto. Diversi virus sono stati chiamati in causa per spiegare la quota di epatiti non legate ai classici virus, anche se al momento mancano delle conferme sperimentali. Di questi i più studiati sono stati il TT virus, il SEN virus e il virus dell'epatite F, anche se l'esistenza di quest'ultimo non sembra confermata (7,8).

Il virus dell'epatite E (HEV) è l' agente eziologico della principale forma di epatite acuta sporadica nei Paesi in via di sviluppo, dove può essere responsabile anche di epidemie che insorgono attraverso la contaminazione delle sorgenti idriche (9).

L'epatite E è stata riconosciuta come patologia distinta solo nel 1980 in India, quando test sierologici per la diagnosi dell'epatite A e B furono applicati a campioni umani conservati durante precedenti epidemie di epatite conseguente a contaminazione idrica. La maggiore di queste occorrenze a Nuova Delhi dal 1955 al 1956 in seguito alla contaminazione fecale del più grande impianto di trattamento delle acque. Tali epidemie erano molto simili a quelle causate dall'infezione da HAV dal punto di vista clinico, ma fu coinvolta principalmente la popolazione dei giovani adulti (10), e questo rappresentava un dato straordinario tenendo conto che in India, come in altri Paesi a basso livello socio-economico, la prevalenza di anticorpi nei confronti del virus dell'epatite A può raggiungere anche il 100% fra i bambini. I test diagnostici applicati escludono che si trattasse di una epidemia da epatite A, e quindi si ipotizzò la presenza di un nuovo virus. Questa nuova malattia fu denominata epatite trasmessa per via enterica non A, non-B.

Il virus dell'epatite E fu identificato per la prima volta da Bala-yan nel 1983 (11). Un volontario che in passato aveva già contratto l'epatite A ingerì una sospensione di materiale fecale proveniente da un paziente infetto e dopo circa due settimane sviluppò un'epatite acuta. Le particelle virali furono evidenziate tramite microscopia elettronica nelle feci del volontario e la trasmissione fu riprodotta successivamente dall'uomo a scimmie del genere *cynomolgus*, stabilendo il ruolo eziologico di HEV nell'epatite non A non B non C epidemica. A causa delle difficoltà della coltivazione *in vitro* di HEV, le conoscenze sulle sue caratteristiche biologiche sono rimaste per lungo tempo scarse. Recentemente il virus dell'Epatite E è stato clonato e sequenziato completamente e la conoscenza delle caratteriz-

zazione del suo genoma ha reso possibile l' allestimento di test diagnostici da utilizzare nella routine diagnostica e quindi lo studio delle caratteristiche epidemiologiche e clinico-evolutive di tale forma di epatite virale (12, 13).

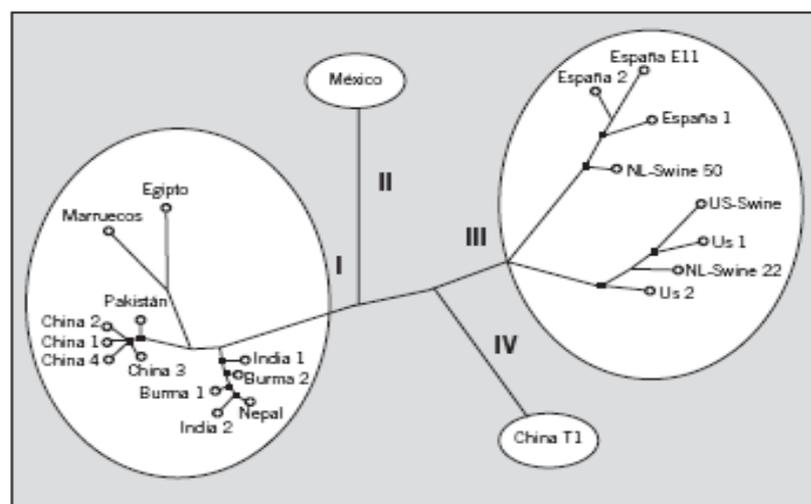
Oggi si stima che nei Paesi Industrializzati il 6-7% delle epatiti acute non diagnosticate sia attribuibile a HEV, mentre nei Paesi in Via di Sviluppo tale percentuale sale al 50%.

## 1.2. Etiologia

### ▲ *Tassonomia:*

Al momento della sua scoperta HEV fu inserito nella famiglia *Caliciviridae*, genere *Calicivirus*. In seguito al sequenziamento del suo genoma virale si osservò che non era correlato a nessuno altro virus conosciuto, pur presentando qualche somiglianza con il virus della rosolia e con un fuvovirus delle piante (13, 14). Attualmente HEV viene classificato nella nuova famiglia *Hepeviridae* (13,15), genere *Hepevirus*, e si distinguono 4 genotipi di HEV, due dei quali includono sia isolati umani che suini. Poiché isolati virali distinti sono distribuiti quasi ovunque nel mondo, si ritiene che HEV sia un virus abbastanza antico che si è diffuso in un passato più o meno remoto. A confermare ciò sta il fatto che isolati umani ed animali dalla stessa regione sono molto più simili tra loro rispetto ad isolati sia animali che umani provenienti da regioni diverse.

Dalla fine degli anni '80 sono stati isolati numerosi stipiti virali. L'analisi delle sequenze nucleotidiche delle regioni strutturali e non strutturali, ha permesso il riconoscimento di almeno 9 gruppi differenti, raccolti in 4 genotipi maggiori (Fig. 1).



**Fig 1. Albero filogenetico di HEV**

Il genotipo I corrisponde al gruppo 1, il genotipo II al gruppo 2, il genotipo III include i gruppi 3,4,5,6,7 e il genotipo IV i gruppi 8 e 9. Fra i differenti genotipi, il genotipo I è quello con la minore variabilità.

Il gruppo 1 è rappresentato dal prototipo isolato in Birmania nel 1990 durante un epidemia (12) e da stipiti asiatici e africani.

Il gruppo 2 include il prototipo messicano (13) e vari isolati nigeriani, il gruppo 3 gli isolati nordamericani umani e suini. Nel gruppo 4 ci sono gli isolati italiani, strettamente correlati agli isolati suini della Nuova Zelanda.

Il gruppo 5 è formato da stipiti isolati in Grecia e in Spagna, mentre il 6 da ulteriori stipiti greci. Il gruppo 7 è costituito dagli stipiti virali isolati in Argentina nel corso di casi sopradici autoctoni. I gruppi 8 e 9 sono rappresentati dagli isolati cinesi (14,16).

Genotipo	Grupo	Aislamientos de referencia
I	1	Burma
		China/Taiwan 1, 2, 3, 4
II	2	Pakistán
		India 1, 2
III	3	Nepal
		Egipto
	4	Marruecos
		México
	5	Nigeria
		Estados Unidos 1
	6	Estados Unidos 2
		Estados Unidos porcina 1
	7	Nueva Zelanda porcina 1
		Italia 1
IV	8	España porcina
		España 1
9	9	España 2
		Grecia 1
		Grecia 2
		Austria 1
		Argentina 1
		Argentina 2
		China/Taiwan Ct-1
		China/Taiwan Cs-15

**Fig. 2: Genotipi di HEV**

Il continuo reperto di isolati umani e animali in nuove regioni avvenuto negli ultimi anni fa sì che classificazione su base genotipica sia in continua evoluzione (61).

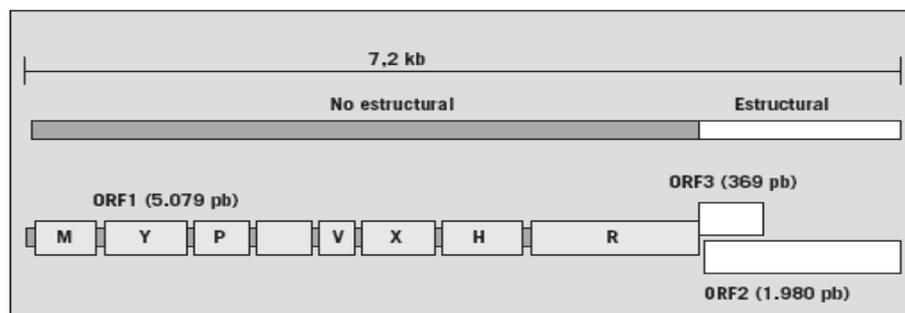
### ▲ ***Caratteristiche morfologiche e strutturali***

Le particelle virali di HEV sono sferiche, presentano simmetria icosaedrica, hanno un diametro di circa 30-34 nm e sono sprovviste di envelope. La struttura superficiale è meno pronunciata rispetto a quella del virus di Norwalk (*calicivirus*), ma assolutamente distinguibile da quella di HAV (*picornavirus*). Sulla base delle caratteristiche morfologiche HEV non può essere distinto facilmente da altri virus enterici (17).

### ▲ ***Genoma e replicazione***

La caratterizzazione del genoma virale ha reso possibile l'allestimento di test diagnostici ad antigeni ricombinanti ormai di uso routinario nella diagnostica sierologica e quindi lo studio delle caratteristiche epidemiologiche e clinico-evolutive di tale forma di epatite virale.

Il genoma virale è costituito da una molecola di RNA positivo a singolo filamento di circa 7,6 kilobasi. Nel 1990 Reyes isolò un frammento di cDNA del virus dell'epatite E (HEV) (12) e successivamente fu sequenziato l'intero genoma (13).



**Fig. 3. Caratteristiche del genoma di HEV.**

Il genoma virale contiene tre cornici di lettura (ORF) (Fig. 3). **ORF 1**, di 5Kb, è localizzata nella regione 5' e codifica per le proteine non strutturali (nsP) che includono una metiltransferasi, una proteasi, una RNA elicasi e una RNA polimerasi RNA dipendente, insieme ad ulteriori domini a funzione sconosciuta.

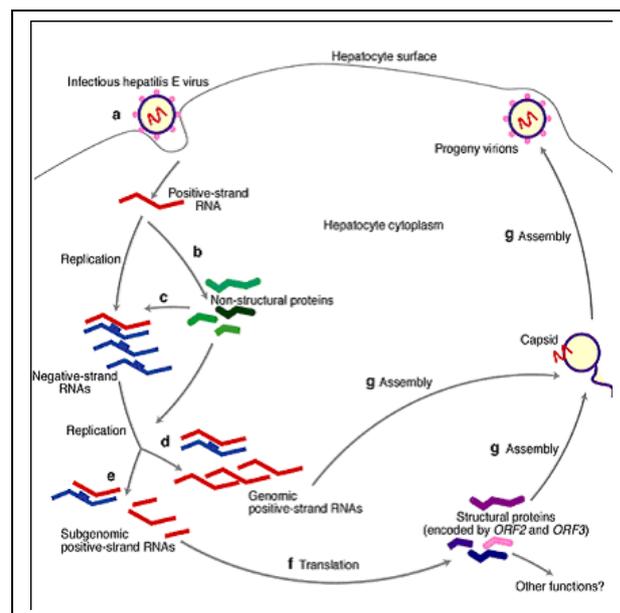
**ORF 2**, di 2kb, è localizzato nella regione 3' e codifica per la maggiore proteina capsidica (72 kd). ORF 3, la cornice più piccola, ad ORF 1 e ORF 2 e molto probabilmente codifica per una fosfoproteina associata al citoscheletro.

Il genoma virale contiene inoltre piccole regioni non traducibili (**UTR**) agli estremi 5' e 3', rispettivamente di 26 e 68 nucleotidi.

La replicazione del virus HEV in colture cellulari è abbastanza limitata (18) e questo fenomeno ha fortemente limitato lo studio del suo ciclo replicativo. Negli ultimi anni studi di transfezione con plasmidi contenenti l'intero genoma di HEV su diverse linee cellulari hanno reso possibile

l'espressione dei vari trascritti, lo studio delle loro funzioni e la produzione di particelle virali infettanti (19). E' stato proposto un modello sperimentale per la replicazione di HEV, sulla base di omologie con altri virus a RNA a polarità positiva. Quando il virus entra nella cellula permissiva, l'RNA virale viene tradotto all'interno del citoplasma producendo le proteine non strutturali (nsP) codificate dalla regione ORF 1. Fra queste, la replicasi virale sarebbe implicata nella sintesi di intermediari replicativi a polarità negativa a partire dalla catena genomica positiva. Così come avviene per gli *Alphavirus*, gli intermediari si comportano da "stampo" per la sintesi di copie addizionali di RNA genomico e subgenomico che possono venire tradotte in proteine strutturali nelle fasi successive. Le proteine strutturali si assembleranno a costituire il capside e ingloberanno il genoma dando origine a una nuova particella virale che sarà poi rilasciata per lisi cellulare (20).

Il titolo infettante di HEV nelle feci non eccede le  $10^7$  particelle virali infettanti per grammo, due ordini di grandezza inferiore a quello di HAV.



**Figura 4: Modello proposto per la replicazione di HEV, da *A proposed model of hepatitis E virus replication*, Shahid Jameel.**

▲ *Spettro d'ospite:*

Sperimentalmente, è stato dimostrato che HEV è capace di infettare numerose specie di animali, dato confermato dal fatto che anticorpi anti-HEV sono stati riscontrati in molte specie di animali domestici e selvatici, in particolare nei suini, cinghiali, bovini, pecore, capre, polli, bufali, cervi, ratti, topi, gatti e scimmie, facendo sorgere il sospetto che alcuni costituiscano la riserva dell'infezione nelle aree non endemiche. (21, 22, 23, 24, 25, 26). Anche se inizialmente tali positività potevano essere correlate ad una cross-reattività con un virus simile ad HEV il successivo isolamento del virus in alcune specie animali ha dimostrato che si tratta dello stesso virus che infetta l'uomo. Alcuni anni fa è stata dimostrata sperimentalmente la trasmissione interspecie. In particolare, sono stati infettati primati con HEV di origine suina e suini, ovini e roditori con uno stipite di HEV umano. I suini infettati con l'isolato umano sierconvertirono rapidamente, dimostrando che questa variante virale si adatta perfettamente al suino (27, 53). Inoltre, lo stipite di HEV suino fu in grado di infettare i primati.

L'isolamento del primo virus HEV animale in allevamenti suini del Nord America e la sua stretta correlazione genetica con altri stipiti virali isolati successivamente in casi umani autoctoni (27, 28, 29, 30), ha rafforzato l'ipotesi dell'esistenza di uno o più serbatoi animali di HEV. Indagini sieroepidemiologiche condotte in numerosi Paesi, soprattutto in via di sviluppo, hanno messo in evidenza che il virus è molto diffuso nella popolazione suina dove infetta prevalentemente soggetti sopra i tre mesi di età causando scarsa sintomatologia clinica e lievi alterazioni a livello epatico. La trasmissione fra i suini avviene essenzialmente per via feco-orale (31), il periodo di incubazione è in media 4 settimane e l'escrezione del virus con le feci avviene tra il periodo di incubazione e l'inizio della

fase acuta. La viremia è poco prolungata, gli anticorpi di classe IgM compaiono alla fine del periodo di incubazione mentre quelli di classe IgG all'inizio della fase acuta. L' infezione in suine gravide provoca epatite subclinica senza alcun effetto sul feto (32).

Negli anni successivi, ulteriori stipiti di HEV suino sono stati isolati in numerosi Paesi, e sono risultati antigenicamente e geneticamente omologhi a quelli umani isolati nella stessa area geografica (28, 29, 30, 33, 34). In Spagna, Pina e collaboratori hanno identificato isolati virali di HEV nel siero dei pazienti e in campioni di acque reflue di mattatoi, dove si sacrificavano prevalentemente suini. I due isolati umani presentavano fra loro una omologia nucleotidica del 93,4% per la regione ORF2 e del 92,7% per la regione ORF 1. Gli isolati virali ottenuti dai campioni di acqua presentavano rispettivamente una omologia del 92,1% e del 94% con i due isolati umani. L' HEV suino isolato in Spagna presenta un' omologia nella regione ORF 2 del 85,5% con gli stipiti nordamericani. Inoltre, in quello stesso studio, furono riscontrati anticorpi anti-HEV nella popolazione suina studiata nella percentuale del 25% (34).

Ulteriori studi hanno permesso di isolare il virus HEV in altre specie animali come roditori, pollame (35), cinghiali, cervi Sika, manguste (22, 36, 23, 37, 38) e cavalli (39). Al contrario del suino, è stato visto che nel ratto la viremia persiste per molto tempo e questo potrebbe spiegare la diffusione del virus nell'ambiente. Inoltre, l'analisi delle sequenze nucleotidiche ha evidenziato che gli isolati virali murini del Nepal erano strettamente correlati agli stipiti virali isolati dai pazienti provenienti dalla stessa regione. (22).

Più recentemente, in Egitto, è stato dimostrato che i cavalli sono suscettibili all' infezione da HEV ed è stata verificata la possibilità della trasmissione interspecie (39). In particolare, si sono osservate omologie nucleotidiche del 97-100% tra isolati virali equini ed isolati virali ottenuti

da persone che vivevano a stretto contatto con i cavalli. Tuttavia, il ruolo degli equini nella trasmissione di HEV all'uomo necessita di ulteriori conferme.

## ***1.3 La malattia nell'uomo***

### ***1.3.1 Epidemiologia:***

#### ***▲ Modalità di trasmissione:***

Negli ultimi anni, grazie anche ad una maggiore disponibilità dei test diagnostici, sono andate chiarendosi le caratteristiche epidemiologiche dell'epatite E.

Nei Paesi endemici, ovvero nelle regioni a clima tropicale o subtropicale o laddove esistano situazioni igienico-sanitarie carenti, l'epatite E si presenta prevalentemente in forma epidemica. In tali Paesi, possono ricorrere casi sporadici o piccoli focolai epidemici, indipendentemente dalle condizioni climatiche.

Nei Paesi industrializzati, invece, vengono segnalati esclusivamente casi sporadici, per lo più in soggetti che hanno soggiornato in zone dove l'infezione da HEV è endemica.

Durante le epidemie il virus si trasmette prevalentemente attraverso la via fecale-orale. La maggior parte delle epidemie sono state messe in relazione con il consumo di acque contaminate da materiale fecale, pertanto l'epatite E rappresenta un problema di sanità pubblica soprattutto nei Paesi a basso livello socioeconomico (42,43,44).

Di solito le epidemie sono precedute da forti piogge che contaminano le fonti di acqua potabile e sono ovviamente correlate al clima, al sovraffollamento e alle condizioni igieniche esistenti. Tali epidemie sono generalmente di lunga durata, anche se sono stati osservati

focolai che hanno colpito centinaia o migliaia di individui in un breve lasso di tempo.

Durante le epidemie di epatite E, sono piuttosto rari i casi secondari a trasmissione interumana, anche fra i soggetti conviventi (43, 44). La percentuale dei casi di infezione da persona a persona è stimata intorno a 1-2%. Questo dato si contrappone a quello relativo alla frequenza di casi secondari di epatite A, che può raggiungere anche il 75% (45). Una possibile spiegazione di questo fenomeno, può essere la bassa concentrazione fecale del virus HEV e la sua minore resistenza nell'ambiente.

I giovani-adulti sembrano essere gli individui maggiormente colpiti in corso di epidemie di HEV (3-30%), piuttosto che i bambini (0,25-10%) (46). Sono state segnalate solo poche epidemie in cui l'incidenza di infezione era simile in tutte le classi di età considerate (47) o addirittura superiore nei bambini (48). Contrariamente a quello che succede nell'epatite E, la prevalenza di anticorpi nei confronti del virus dell'epatite A nei bambini delle aree endemiche raggiunge anche il 90% (41, 49). Questi dati possono indicare che i bambini presentano con più frequenza forme subcliniche e anitteriche. Questo fenomeno è tuttora in fase di studio, ma una delle ipotesi più accreditate è quella che il virus HEV abbia un tropismo selettivo per il fegato dei soggetti adulti. Inoltre, non è ancora chiaro se l'infezione pregressa conferisca uno stato di immunità permanente.

Un riassunto delle caratteristiche epidemiologiche dell'infezione da HEV, viene riportato in una recente pubblicazione che descrive un focolaio di epatite E avvenuto fra il luglio ed il dicembre 2004 in un campo profughi del Darfur, nel Sudan occidentale (2). Lo studio di coorte ha dimostrato che il rischio di contrarre l'infezione acuta sintomatica, confermata con la determinazione di IgM specifiche per HEV, era più alto nel gruppo di età compreso fra i 15 e i 45 anni e fra coloro che avevano

bevuto acque fluviali di superficie anche se sottoposte a clorazione. Il rischio di infezione asintomatica era alto nel gruppo di età compreso tra 15-45 anni e in quello compreso fra 0-14 anni, così come osservato in precedenti studi (50, 51). Sono stati osservati alcuni casi secondari di infezione, soprattutto all'interno delle stesse famiglie, ma nel lavoro non viene riportato il *tasso di attacco secondario*. L'acqua del fiume rappresentava la sorgente di infezione più importante in quanto uomini ed animali vi si bagnavano e vi scaricavano le loro deiezioni, come confermato dalla presenza di coliformi nei campioni analizzati. Verosimilmente, la clorazione delle acque non era stata sufficiente ad inattivare HEV. Riguardo a ciò, l'OMS raccomanda che i livelli residui di cloro liberi siano almeno 0,5 mg/L per 30 minuti con pH <8 e torbidezza media inferiore a 1U (52).

Nei Paesi industrializzati, considerati non endemici, casi sporadici di epatite E sono stati correlati all'ingestione di frutti di mare crudi o poco cotti contaminati (53), e in Cina sono anche stati segnalati casi dovuti alla contaminazione crociata tra prodotti carnei crudi ed altri alimenti pronti per il consumo.

Recentemente, è stato dimostrato che l'infezione può essere acquisita per via alimentare attraverso il consumo di prodotti carnei contaminati crudi o poco cotti. In Giappone sono stati segnalati casi di epatite E in cui l'unico fattore di rischio era il consumo, 6-7 settimane prima dell'inizio dei sintomi, di carni crude di cinghiale e cervo *Sika*. Nel siero dei soggetti che avevano sviluppato un'epatite acuta, furono dimostrati anticorpi anti-HEV di classe IgM e tecniche molecolari permisero di svelare il virus HEV nel siero dei pazienti e nella carne di cervo congelata. Successivamente, fu possibile dimostrare una omologia nucleotidica del 100% fra gli isolati umani e quelli animali (54), confermando il ruolo del consumo di carne infetta nella trasmissione del

virus.

Anche altri animali come suini, bovini, ovini e roditori sono ritenuti possibili serbatoi di HEV ed è quindi ipotizzata la trasmissione all'uomo attraverso il consumo delle carni infette, come il caso di contagio attraverso l'ingestione di fegato di maiale in Giappone. Tuttavia, in molti altri casi l'origine dell'infezione da HEV non è ancora stata identificata.

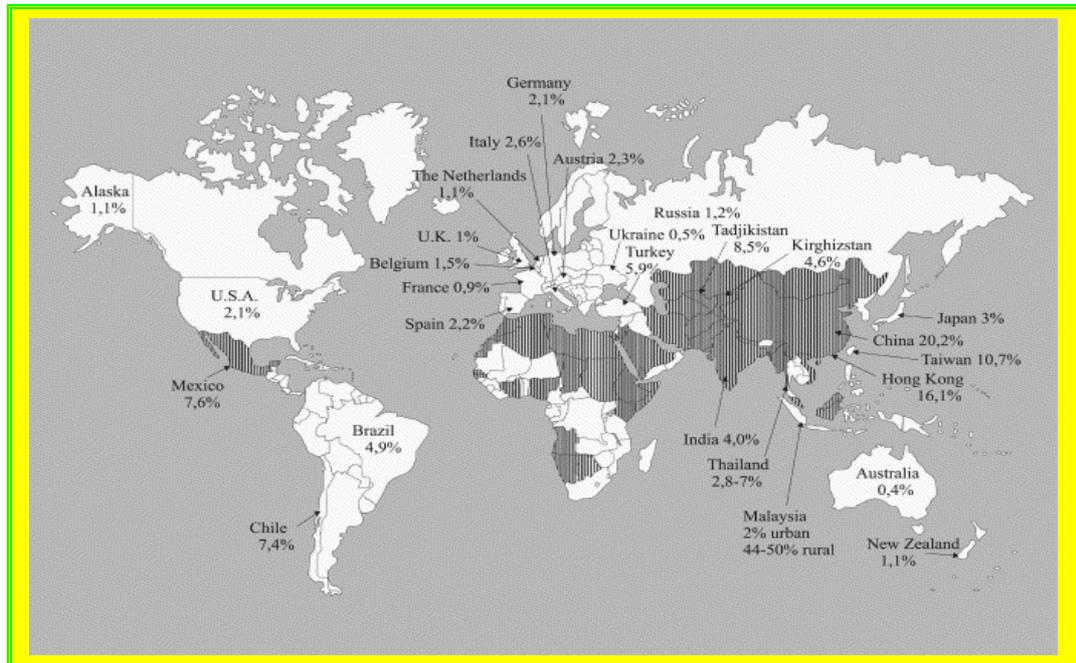
In questi ultimi anni le maggiori conoscenze delle caratteristiche epidemiologiche e virologiche di HEV hanno dimostrato come l'epatite E possa essere considerata una zoonosi emergente. Il principale serbatoio animale è rappresentato proprio dal suino e le persone che lavorano a stretto contatto con tali animali sono considerate a rischio di infezione. Allevatori, personale addetto agli animali e veterinari possono venire in contatto con il virus nel periodo viremico e di massima escrezione fecale. Studi recenti hanno evidenziato un'alta prevalenza di anticorpi anti-HEV nei soggetti che lavorano a stretto contatto con i suini rispetto alla popolazione generale e ad altre categorie professionali (27, 40). Inoltre, non deve essere sottostimato il possibile rischio di diffusione del virus nell'ambiente con i reflui di allevamenti suinicoli, con conseguente contaminazione dei vegetali e delle acque, sia ad uso potabile, che di balneazione.

Se viene confermata la possibilità che il virus HEV si può trasmettere dal suino all'uomo, l'utilizzo di tessuti e organi animali nella pratica degli xenotrapianti può rappresentare un serio problema e dovrebbe essere considerato il virus HEV come un potenziale agente xenogenico (55).

Per quanto riguarda le altre modalità di trasmissione, essendo breve la durata della viremia (nonostante siano stati riportati casi di viremia protratta fino a 4-6 mesi), la trasmissione attraverso scambi di sangue è piuttosto rara, ma teoricamente possibile. I pochi casi di infezione avvenuti

con questa modalità sono stati segnalati in personale sanitario ospedaliero e nei feti di madri infettatesi durante il terzo trimestre di gravidanza. Tuttavia i rari casi viremia prolungata potrebbero costituire un pericolo per quanto riguarda la trasmissione dell'infezione attraverso il sangue infetto: la determinazione degli anticorpi anti-HEV non viene eseguita di routine in corso di donazione di sangue, pertanto alcuni casi potrebbero sfuggire ai normali controlli clinico-sierologici aumentando il rischio di trasmissione dell'infezione per via parenterale (56, 57, 59). Sembra inoltre che il virus HEV sia presente nel colostro con una concentrazione notevolmente più bassa rispetto al sangue materno ed è stato concluso che l' allattamento al seno sembra essere sicuro (7). La presenza del virus nelle feci, e quindi l' infettività, appare limitata alla settimana precedente l' esordio della malattia e alle due immediatamente successive. Questo periodo è considerato quello di maggior contagiosità. Il titolo infettante di HEV nelle feci è pari a  $10^7$  particelle virali per grammo, 2 volte inferiore al titolo fecale in corso di infezione da HAV (8). Non essendo stati segnalati casi di cronicizzazione della malattia né portatori sani del virus, le fonti di contagio sono costituite dai soli soggetti con infezione acuta.

### ▲ *Prevalenza nelle aree endemiche*



**Fig. 5. Distribuzione dell'epatite E nelle aree endemiche e relativi tassi di sieroprevalenza: le aree in nero rappresentano le regioni con epidemie documentate di HEV o dove più del 25% delle epatiti non A-C è attribuibile ad HEV. Centers for Disease Control and Prevention**

L' infezione da HEV è endemica nel centro e nel Sudest Asiatico, ma diverse epidemie sono occorse in Medio Oriente, Africa settentrionale, orientale e occidentale, in molti Paesi dell' ex-URSS e in America del Sud e Messico (Fig. 5), con il coinvolgimento di anche di decine di migliaia di soggetti. Attualmente sono in atto terribili epidemie in Sudan e in Iraq, causate dalle carenti condizioni igienico-sanitarie favorite dai conflitti bellici (2).

Al di sopra dei 40 anni di età, la prevalenza di anticorpi anti-HEV nelle aree endemiche varia dal 10 al 40%, apparentemente senza differenza tra i sessi.

Negli ultimi anni sono state descritte una trentina di epidemie di HEV in vari Paesi, fra cui Nepal, Birmania, India, Cina, Africa, Messico, varie aree dell'ex-Unione Sovietica ed è stato verificato che molte epidemie del passato erroneamente attribuite al virus dell'epatite A erano in realtà provocate da HEV. La Cina rappresenta il Paese con il maggior numero di epidemie di epatite E. dalla scoperta del virus fino al 2004 sono stati segnalati ben 11 episodi. L'epidemia più devastante si è manifestata nel 1986 a *Xinjiang Uighur Autonomus Region*, nel nord est della Cina. Protrattasi per ben due anni, ha coinvolto circa 120.000 persone causandone il decesso di oltre 700 (43).

Nelle aree endemiche è possibile anche il verificarsi di piccoli focolai epidemici, in genere autolimitanti, o casi sporadici: e' stato calcolato che oltre il 25% delle epatiti in forma sporadica non A, non B, non C sia attribuibile al virus dell'epatite E (58). La dimostrata presenza di anticorpi anti-HEV negli animali domestici e selvatici soprattutto nelle regioni dove HEV è endemico pone alcuni interrogativi su eventuali riserve di virus alternative all'uomo, che potrebbero giocare un ruolo fondamentale nel verificarsi di ondate epidemiche negli anni. (22, 3).

### ✓ *Prevalenza nelle aree non endemiche*

Nel resto del mondo, l'infezione da HEV è poco frequente ed il maggior numero di casi riguarda persone che hanno viaggiato in zone endemiche (55). Un certo andamento stagionale è pur sempre riconoscibile anche nei Paesi ad alto tenore di vita. In particolare, è possibile evidenziare un picco epidemico nella tarda estate-primi autunno che corrisponde al periodo in cui i viaggiatori ritornano dalle zone endemiche.

Negli ultimi anni, grazie anche allo sviluppo di test sierologici sensibili, è stato possibile descrivere in Europa e in America del Nord casi

isolati apparentemente autoctoni di epatite E. Sorprendentemente la sieroprevalenza per IgG anti-HEV nelle regioni dove il virus è endemico è risultata più bassa di quanto atteso (dal 3% al 26%) mentre nelle regioni non endemiche è risultata molto più alta (da 1% al 20%) (58).

Gli studi epidemiologici condotti negli ultimi anni anche in Europa, hanno evidenziato che il tasso di prevalenza di anticorpi anti-HEV nella popolazione umana varia dallo 0,7% al 5%. Per quanto riguarda l'Italia, l'infezione da HEV sembra essere responsabile di circa il 10% dei casi di epatiti virali non-A, non-B, non-C (60, 61, 62, 63, 64). La prevalenza sarebbe ancora più elevata in soggetti appartenenti a particolari categorie a rischio: emodializzati, tossicodipendenti ed omosessuali maschi. Inoltre, è stata segnalata un'associazione significativa tra positività per anticorpi anti HEV ed infezione da HIV.

Nel 1999 è stato identificato nelle feci di un paziente che non aveva viaggiato in zone endemiche e non era venuto a contatto con individui di ritorno da tali zone, uno stipo geneticamente diverso dai virus isolati in altri Paesi, il quale mostrava analogie nucleotidiche non troppo strette solo con alcuni stipi americani. Questo stipo pertanto è stato considerato originario del territorio italiano (61, 64).

Allo stato attuale delle conoscenze, si può affermare che sono diversi i fattori che sostengono l'endemicità dell'epatite E nei Paesi ad alto tenore di vita fra questi possiamo citare i serbatoi animali, l'ambiente, il ruolo occupazionale e gli alimenti.

### **1.3.2. Patogenesi:**

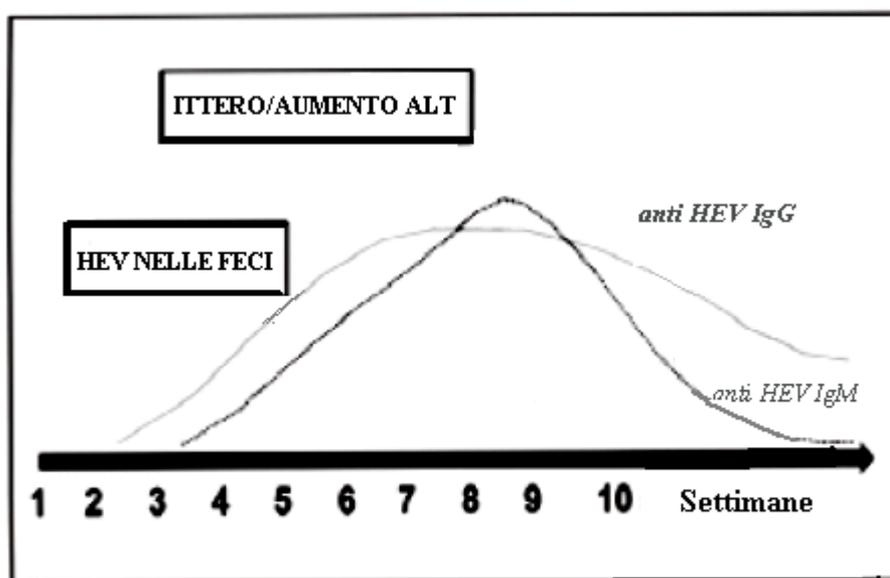
La trasmissione dell'infezione da HEV avviene generalmente per via fecale-orale attraverso l'ingestione di acqua o cibi contaminati.

Come nel caso dell'epatite A, il meccanismo patogenetico non è ancora completamente noto. In particolare, non è certo se il sito di replicazione iniziale sia il tratto intestinale perché studi condotti su animali hanno dimostrato la trasmissibilità del virus attraverso la inoculazione endovenosa di materiale infetto.

E' certo che dopo la localizzazione epatica, il virus replica nel citoplasma degli epatociti e viene escreto nella bile e nel sangue. HEV è stato trovato in grandi quantità anche nella bile di primati infettati sperimentalmente per cui si presume che la maggior parte del virus presente nel tratto gastrointestinale origini dal fegato (12). In modelli sperimentali suini, HEV RNA è stato riscontrato, oltre che nel fegato, nel piccolo intestino, nei linfonodi mesenterici, nel colon e nella bile, suggerendo che esistano siti di replicazione extra-epatici (65, 66).

Come per gli altri virus epatitici maggiori, non è stato dimostrato inequivocabilmente un effetto citopatico diretto. Nel citoplasma di epatociti di macachi infettati sperimentalmente è stato identificato l'antigene virale HEVAg nelle prime fasi dell'infezione. E' stato osservato che la comparsa di tale antigene nel fegato precede o coincide con l'elevazione degli indici di necrosi epatica. Inoltre, HEV Ag induce la formazione di anticorpi anti-HEV negli stessi primati infetti e la guarigione dall'infezione si accompagna allo sviluppo di anticorpi specifici. Si può concludere che il danno epatocellulare causato dall'infezione da HEV sia indotto dall'attivazione della risposta immunitaria di tipo cellulo-mediata verso gli antigeni virali non rilevabili nel sangue ma solo a livello epatico, pertanto, più tardivo rispetto all'ingresso del virus nel parenchima epatico. Anche

nell'uomo è caratteristica la dissociazione fra l'andamento della viremia e degli indici di necrosi: le transaminasi sieriche raggiungono valori elevati all'inizio della malattia, per poi diminuire progressivamente mentre la viremia è bassa nelle fasi iniziali e poi aumenta gradualmente. Al contrario, nelle altre forme di epatite virale, la comparsa degli anticorpi coincide con la scomparsa della viremia.



**Fig. 6. Andamento delle transaminasi sieriche.**

Secondo alcuni Autori la viremia si riduce rapidamente durante la successiva fase itterica ed il genoma non è più rilevabile nel momento in cui le transaminasi raggiungono il picco massimo di concentrazione sierica (7). Esistono tuttavia, casi di viremia protratta in cui la positività permane fino a 16 settimane dopo l'inizio dei sintomi (67). Da un recente studio condotto in Cina non è emersa alcuna correlazione tra i livelli sierici di ALT ed HEV-RNA: su 44 pazienti affetti da epatite acuta da HEV, 36

(81,8%) presentavano elevati livelli di viremia anche dopo il picco di transaminasi, e la viremia persisteva elevata per lunghi periodi (in media 53 giorni) nonostante la riduzione degli indici di citolisi epatica (68). Questo dato suggerisce la possibilità dell'esistenza di un meccanismo differente dalla lisi cellulare per spiegare la liberazione del virus dall'epatocita e avvalorare l'ipotesi dell'esistenza di siti extraepatici di replicazione virale, come precedentemente menzionato (65).

In alcuni soggetti, il prolungato periodo viremico, può convalidare l'ipotesi di trasmissione parenterale dell'infezione, soprattutto quando la malattia decorre in forma asintomatica o subclinica.

### ***1.3.3. Aspetti anatomopatologici e clinici:***

Dal punto di vista istopatologico l'epatite E presenta alcuni aspetti differenti dalle altre forme di epatite acuta. La maggior parte dei pazienti presenta una forma colestatica di epatite, caratterizzata da ricchi infiltrati parenchimali e periportali con proliferazione dei colangioli ed intensa colestasi citoplasmatica ed evidenti trombi biliari. In altri pazienti è possibile riscontrare la presenza di *cellule balloniformi* (epatociti degenerati) e necrosi epatocitaria focale o confluyente. In tal caso, le lesioni focali sono molto simili a quelle osservate in corso di epatiti associate a farmaci. Talvolta si osserva un infiltrato infiammatorio lobulare costituito prevalentemente da macrofagi e linfociti; nella forma ad impronta colestatica, l'infiltrato è costituito invece da leucociti polimorfonucleati. Un'altra caratteristica peculiare è rappresentata dalla ipertrofia e iperplasia delle cellule di Kupffer e di quelle perisinusoidali, mentre gli spazi portali sono sede di infiltrato infiammatorio misto (69).

Qualsiasi sia la forma predominante, l'insorgenza dell'ittero è tardiva ma la bilirubinemia risulta significativamente più elevata rispetto alle forme di epatite A e i prodromi sono più prolungati, rappresentando anch'esso un elemento peculiare della malattia.

I dati disponibili circa il profilo biochimico, virologico ed immunologico dell'infezione sono stati ricavati da studi di infezioni sperimentali su volontari.

La viremia è stata rilevata tramite RT-PCR 22 giorni dopo l'esposizione, quindi verso la fine del periodo di incubazione, tenendo presente che la malattia che si manifesta dopo circa 30 giorni post esposizione (70, 11). Tuttavia, sono stati segnalati pazienti (71, 67) in cui la viremia si è protratta per più di 100 giorni.

La maggiore escrezione del virus nelle feci e nella bile si ha dal

34° giorno post infezione e rimane presente per 1-2 settimane.

Le transaminasi raggiungono il picco di concentrazione ematica intorno al 45° giorno, periodo che coincide con la elevazione del titolo anticorpale. Come è stato osservato anche nell'epatite A, IgM ed IgG specifiche sono presenti al momento in cui si manifesta la malattia. Nel 90% dei casi le IgM compaiono dopo 10 giorni, mentre nel 60% dei casi all' esordio e il loro andamento è sovrapponibile a quello della viremia. Le IgM, che vengono prodotte solo dal 90% dei pazienti, scompaiono dopo alcuni mesi. Le IgG sono svelabili per molto tempo dopo l' infezione (oltre i tre mesi) e persistono per anni (72).

E' da segnalare inoltre il ritrovamento di elevati livelli di IgA nel siero di alcuni pazienti (73) durante la fase acuta della malattia (38).

Nonostante che la modalità di trasmissione dell' infezione da HEV e quella da HAV sia la stessa, sono riconoscibili delle differenze cliniche. In particolare, si è visto che il tasso di mortalità dell'epatite E è maggiore di dieci volte rispetto a quello dell' epatite A raggiungendo anche l' 1-2% (49). Inoltre, l' infezione da HEV può risultare particolarmente fatale nelle donne gravide, in cui il tasso di mortalità può raggiungere il 20-25% nel III trimestre (74, 75). Nel 1980 si verificò in Madea, una città algerina, un focolaio di epatite E conseguente alla contaminazione accidentale da scarichi fognari del fiume che riforniva la maggior parte della regione colpita, in seguito a un difettoso funzionamento dell' impianto di clorazione dell'acqua potabile. Le persone colpite furono per lo più giovani adulti e fu osservata una drammatica mortalità fra le donne gravide: tutte le 9 pazienti gravide ricoverate in ospedali morirono (76).

Questo dato si contrappone all'andamento delle altre forme virali in cui lo stato di gravidanza non rappresenta di per sé un fattore di rischio di evoluzione in epatite fulminante. La ragione di questa elevata mortalità non è infatti del tutto chiara, ma secondo alcuni Autori lo stato di gravidanza predisporrebbe ad una maggiore suscettibilità verso le

prostaglandine ed i leucotrieni, mediatori chimici presumibilmente coinvolti nella patogenesi delle epatiti fulminanti. Ricerche su animali hanno infatti confermato un ruolo diretto del virus HEV nel precipitare lo stato di pre-eclampsia come conseguenza del danno dell'epitelio dei tubuli renali causato dalla localizzazione e dalla replicazione virale in questa sede, probabilmente favorita dalle citochine rilasciate dalle cellule di Kupffer attivate (77, 100). Nonostante il tropismo selettivo del virus per il tessuto renale, sembra che non si verifichino particolari danni d'organo al feto nelle donne gravide che sopravvivono. E' certo che l'infezione in gravidanza è associata ad una maggiore percentuale di parti prematuri e comunque a un maggior numero di complicanze *peri o post partum* (78).

L'Epatite E non può essere differenziata dalle altre epatiti acute virali solo sulla base degli aspetti clinici (79,80). Le indagini sieroepidemiologiche mettono in evidenza che sono frequenti le infezioni subcliniche (81). Tuttavia, nelle forme acute sintomatiche, come avviene in corso di epidemie, le manifestazioni cliniche sono simili a quelle di altre epatiti virali e l'andamento della malattia può essere suddiviso in quattro fasi. Il periodo di incubazione (asintomatico) può durare dai 14 ai 64 giorni (in media 42). Già prima della comparsa dei sintomi può essere messo in evidenza un aumento delle transaminasi sieriche. Il secondo periodo è definito preitterico ed è caratterizzato da una sintomatologia aspecifica, con disturbi dispeptici (nel 50%), dolore all'ipocondrio destro (70%), malessere, astenia, febbre (nel 15%). Il terzo periodo rappresenta la fase conclamata che vede la comparsa di urine ipercromiche, feci ipocoliche e ittero. I valori di transaminasi, bilirubina e fosfatasi alcalina sieriche ritornano solitamente normali entro 1-6 settimane. In un piccolo numero di casi si accompagna anche la comparsa di diarrea, artralgie, rash cutaneo transitorio. Con la comparsa dell'ittero, la febbre e gli altri sintomi prodromici tendono rapidamente ad attenuarsi fino a scomparire. Alla

palpazione dell'addome è frequente apprezzare un fegato ingrandito, di consistenza parenchimatosa e lieve splenomegalia (7, 82, 83).

Il quarto periodo è quello della convalescenza in cui può persistere malessere generale e astenia ed anomalie degli indici di funzionalità epatica.

Sintomi/Segni	Frequenza (%)
Ittero	~100
Malessere generale	~100
Anoressia	66-100
Dolori addominali	37-82
Epatomegalia	10-85
Nausea e vomito	29-100
Febbre	23-97
Prurito	14-59

*Fig. 7. Aspetti Clinici dell' Epatite E*

Per quanto riguarda l' evoluzione dell'epatite E, così come per l'epatite A, non sono ancora stati segnalati casi di cronicizzazione della malattia, né lo stato di portatori cronico di HEV. Tuttavia, numerose sono le segnalazioni di forme protratte, addirittura oltre i venti mesi, mentre forme ricorrenti sono state descritte sperimentalmente solo nei primati (84).

La prognosi a lungo termine dell'epatite E è buona ma i tassi di mortalità rimangono tuttora elevati in determinate categorie a rischio, in primo luogo fra le gestanti specie se contraggono l' infezione durante il III trimestre di gravidanza. Anche la denutrizione sembra essere un fattore favorente l' evoluzione verso forme fulminanti, ma negli ultimi anni si è stabilito che la superinfezione con HEV determina un aggravamento di una eventuale malattia epatica cronica. Nei pazienti affetti da epatite cronica HBV o HCV correlata il virus dell'epatite E aumenta la mortalità: molti pazienti sviluppano una sindrome epato-renale, un' encefalopatia epatica o necrosi massiva del parenchima epatico. (85, 86). Per tale motivo, i pazienti con epatopatie croniche o cirrosi dovrebbero prendere ogni precauzione soprattutto in vista di viaggi verso zone endemiche per HEV.

### **1.3.4. Diagnosi:**

#### **▲ *Diagnosi clinica:***

La diagnosi “di sospetto” dell’epatite E, al pari di altre patologie infettive, si basa su criteri anamnestici ed obiettivi e sui dati di laboratorio. In particolare, un’accurata indagine anamnestica dovrà essere effettuata circa una possibile trasmissione per via fecale-orale:

- ✓ viaggi in zone endemiche
- ✓ ingestione di alimenti a rischio quali frutti di mare e acqua non potabile o comunque proveniente da fonti sospette, come falde acquifere o pozzi posti in prossimità di scarichi fognari
- ✓ contatti stretti con animali considerati serbatoi di infezione
- ✓ presenza degli stessi sintomi/segni clinici fra i conviventi

Dovranno inoltre essere ricercati i dati obiettivi più significativi e caratteristici come l’ ittero e l’epatomegalia, e l’ aumento delle transaminasi sieriche con inversione del normale rapporto AST/ALT e degli indici di colestasi, dati inconfutabili di danno epatico.

#### **▲ *Diagnosi di laboratorio:***

Le prove di laboratorio utilizzate per la diagnosi di epatite E comprendono tecniche molecolari e di immunomicroscopia elettronica che riconoscono il virus in feci e siero, e prove sierologiche per la identificazione di anticorpi anti-HEV di classe IgM e IgG.

La diagnosi eziologica di epatite E nell’uomo si basa comunemente sulla ricerca degli anticorpi specifici anti-HEV di classe

IgM. Le metodiche usate di routine sono di tipo immunoenzimatico, test ELISA commerciali specifici per IgM e IgG che utilizzano come antigeni proteine ricombinanti o peptidi sintetici di HEV che corrispondono a epitopi immunodominanti delle proteine strutturali (ORF2 e ORF3) generalmente degli isolati di gruppo I e II (87). Durante l' infezione acuta, gli anticorpi di classe IgM precedono di pochi giorni quelli di classe IgG, raggiungendo il picco intorno alla quarta settimana e scomparendo gradualmente nel giro di 4-5 mesi (88, 81). Da uno studio condotto da Favorov nel 1996 è emerso che la positività degli IgM anti-HEV può raggiungere valori del 100% quando il campione di siero viene prelevato da 1 a 40 giorni dopo la comparsa dei sintomi. Tale positività si riduce, nello stesso campione di soggetti, se il prelievo viene eseguito 3-4 mesi e 6-12 mesi dopo l'inizio dei sintomi, raggiungendo valori di positività delle IgM rispettivamente del 50% e del 40% (70). Il titolo delle IgG aumenta già nella fase acuta fino a quella di convalescenza, raggiungendo un picco in media 2- 4 settimane dopo e può persistere elevato anche per i 4-5 anni successivi. Gli anticorpi di classe IgG indicano la sieroconversione, tuttavia, non è completamente noto se gli anticorpi anti-HEV che compaiono in seguito all' infezione acuta siano neutralizzanti e per quanto tempo realmente persistano. La durata degli anticorpi anti-HEV di classe IgG è estremamente variabile ed il titolo anticorpale sembra decrescere nel tempo, fino alla completa negativizzazione (88, 81, 72). Da uno studio condotto nel Kashmir, India, 14 anni dopo un episodio di epidemia è emersa una sieroprevalenza degli anti-HEV IgG del 47%, tra i soggetti precedentemente infettati (72). Dati simili sono emersi da uno studio di sieroprevalenza condotto in alcuni villaggi del Messico e in comunità dell'Asia centrale. Gli anti-HEV IgG sono stati riscontrati nel 65% e nel 75% della popolazione studiata, rispettivamente, a distanza di 10 anni da un'epidemia di epatite E che aveva coinvolto tutti i soggetti in esame (89). In entrambi gli studi viene dimostrata una riduzione del titolo anticorpale

col trascorrere del tempo. Inoltre, è stato dimostrato (90) che la sensibilità dei test diagnostici diminuisce quando vengono applicati in pazienti convalescenti, creando problemi soprattutto in corso di studi di sieroprevalenza dove la sensibilità diagnostica può variare da un 17 ed un 100% e la sieroprevalenza può venire sottostimata. Uno studio cinese del 1994 ha dimostrato che gli anticorpi anti-ORF3 vengono determinati in molti pazienti entro 17 giorni dal contagio, ma il titolo anticorpale decresce rapidamente fino a divenire indeterminabile entro tre mesi. Ulteriori studi hanno dimostrato che molti antigeni ricombinanti basati su ORF3 e sul mosaico antigenico di ORF2 espresso su *E. coli*, presentano una reattività bassa o variabile con i sieri dei pazienti convalescenti. Per esempio, è stato visto che l' antigene ORF2 3-2 (M) era reattivo con le IgG nel 91% dei pazienti egiziani in fase acuta, ma nel 50% a 12 mesi e nel 27% a 6 mesi (91). Al contrario, lo stesso antigene 3-2 (M) risultava areattivo con i sieri dei convalescenti del Pakistan mentre l' antigene 3-2(B) rimaneva reattivo negli stessi pazienti 4 anni dopo l' inizio della malattia. Più tardi è stato dimostrato che la regione carbossi-terminale di ORF2 contiene epitopi che vengono riconosciuti da anticorpi della fase di convalescenza. I test immunoenzimatici che usano l' antigene ORF2.1 espresso in *E.coli* sono in grado di determinare le IgG anti-HEV nel siero di pazienti in fase acuta e in fase di convalescenza ed è stato inoltre dimostrato che l' epitopo presentato da ORF2.1 è altamente conservato fra stipti diversi di HEV (92).

Oggi, la specificità e la sensibilità dei test diagnostici sierologici sono molto alte, non solo se vengono applicati in pazienti in fase acuta di malattia. Inoltre, negli ultimi anni, è stato ridotto anche il rischio di cross reattività con il virus HAV, mentre rimane la possibilità di falsi positivi esaminando sieri di pazienti infetti da HIV e CMV.

La determinazione delle particelle virali nelle feci con la immunomicroscopia elettronica è complicata, per cui non viene utilizzata

nel diagnostico di routine. Le tecniche di immunomicroscopia e di immunofluorescenza permettono la stima semiquantitativa di anticorpi anti-HEV nel siero di pazienti in fase acuta della malattia o durante la convalescenza ma il costo e la complessità di utilizzo ne limitano l'uso ai soli laboratori specializzati. L'antigene virale, HEV-Ag, svelabile nelle fasi precoci dell'infezione mediante biopsia nel tessuto epatico, è stato ricercato solo nell'infezione sperimentale dei primati (93, 94).

Il genoma virale viene svelato nelle feci con la tecnica *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) durante la fase acuta dell'infezione, in particolare durante il periodo che va dalla settimana precedente l'inizio dei sintomi fino alle 2-4 settimane successive. Nel sangue, il virus può essere svelato con la medesima tecnica ancor prima della comparsa dell'ittero e dell'aumento delle transaminasi, secondo i tempi già precedentemente indicati.

Negli ultimi anni sono stati messi a punto primers in grado di amplificare numerosi isolati virali (3, 29), permettendo la identificazione delle molteplici varianti genetiche di HEV.

I progressi delle tecniche molecolari hanno permesso lo studio filogenetico degli isolati virali e il confronto in base alla provenienza geografica e all'ospite.

### ***1.3.5. Prevenzione e Controllo:***

I procedimenti di vigilanza e controllo dell'epatite E sono simili a quelli adottati per le altre patologie a trasmissione feco-orale e vedono nel miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie e nella fornitura di acqua potabile i più importanti mezzi di prevenzione. La bollitura dell'acqua prima del consumo sembra ridurre il rischio di trasmissione della patologia nelle aree endemiche. Tuttavia, sebbene tali procedure possano sembrare di facile esecuzione non sempre sono realizzabili, soprattutto nelle aree a basso tenore igienico-sanitario e socio-economico. L'isolamento delle persone infette non è necessario poiché, anche in corso di epidemie, sono piuttosto rari i casi secondari a trasmissione inter umana (82). Il virus è stato isolato da numerose specie di animali domestici e selvatici, pertanto lo stretto contatto con alcuni animali da allevamento può rappresentare una via di trasmissione del virus e quindi diventa importante adottare misure di prevenzione idonee soprattutto per determinate categorie di lavoratori come allevatori, personale addetto alla manutenzione delle stalle e veterinari.

Tuttavia, devono essere presi in considerazione ulteriori aspetti :

- l'incidenza della malattia
- gli studi epidemiologici per una maggiore conoscenza delle modalità di trasmissione
- l'individuazione dei focolai epidemici
- il contenimento della propagazione.

Per quanto riguarda le strategie di immunizzazione passiva, è stata proposta la somministrazione di immunoglobuline pre e post-esposizione, soprattutto nelle donne gravide, negli epatopatici cronici o nei conviventi di soggetti affetti da epatite E, ma la loro efficacia deve ancora

essere dimostrata. Il loro utilizzo, durante epidemie di epatite E in India, non sembra aver diminuito in maniera notevole il tasso di infezione.

Non è ancora disponibile in commercio alcun tipo di vaccino, anche se sono in corso studi in proposito (95, 96, 97). Gli anticorpi anti-HEV si sviluppano rapidamente in risposta alle infezioni naturalmente acquisita o sperimentalmente indotta, come ad esempio nelle scimmie del genere *Cynomolgus*, e l'epidemiologia dell'epatite E suggerisce che le persone precedentemente infettate sono "protette" durante le successive epidemie, sebbene il titolo anticorpale tenda a ridursi nel tempo. Sono stati ottenuti risultati incoraggianti proprio nell'immunizzazione di primati (98). In particolare, si è visto che la proteina codificata dal gene ORF<sub>2</sub> rappresenta il substrato ottimale per la realizzazione di un vaccino in quanto è la principale proteina strutturale del virus e possiede una buona antigenicità. Finora il gene ORF<sub>2</sub> è stato espresso in cellule procariote, cellule d'insetto, di lievito, di animali e di piante (99). La somministrazione parenterale di due dosi di un vaccino ricombinante, costituito dalla proteina strutturale capsidica di HEV, codificata nella regione ORF<sub>2</sub>, sembra indurre una buona immunizzazione nei primati, anche se nei confronti della malattia, ma non dall'infezione (95). Un promettente vaccino orale è stato ottenuto sfruttando la capacità della proteina capsidica di HEV di autoassemblarsi in vitro, quando espressa in cellule di insetto, formando delle pseudo particelle virali (VLPs) prive di acidi nucleici. Tali particelle sono risultate protettive per i topi inducendo una risposta immunitaria sistemica e locale senza il bisogno di utilizzare adiuvanti (101). Questo vaccino, somministrato in fase I di studio ad 88 volontari americani, è risultato sicuro ed immunogeno. Un'ulteriore valutazione è stata effettuata in Nepal, paese in cui l'epatite E è endemica. Tre dosi di vaccino da 5 a 20 µg sono state iniettate in 44 volontari al tempo zero, a un mese e a sei mesi. Non è stato osservato alcun evento avverso durante e dopo la sua somministrazione. Entro il secondo mese, 43 dei 44 volontari hanno

sieroconvertito, con comparsa degli anti-HEV. Entro il settimo mese tutti volontari risultavano positivi agli anticorpi anti-HEV. Questo studio indica che il vaccino in esame è sicuro ed immunogeno. Recentemente è stato utilizzato, nelle prove cliniche di fase II, un vaccino costituito da un polipeptide purificato, ottenuto da cellule di insetto (*Spodoptera frugiperda*) infettate con un virus geneticamente modificato (*baculovirus ricombinante*), in modo da esprimere gli antigeni capsidici di HEV. Sono stati arruolati 1794 volontari, soldati dell'esercito di Kathmandu, Nepal, maggiormente esposti al rischio di infezione da HEV. I soggetti sono stati divisi in 2 gruppi: uno riceveva il vaccino (898 soggetti) e uno il placebo (896 soggetti). Il vaccino è stato somministrato in 3 dosi da 20 µg ognuna al tempo 0, dopo 1 mese e dopo 6 mesi. Il vaccino è risultato efficace nel 95,5% dei soggetti dopo un *follow-up* di circa 20 mesi. Solo lo 0,3% dei volontari vaccinati ha contratto l'epatite E a fronte del 7,4% (66 volontari) del gruppo che ha ricevuto il placebo (102, 103).

Ultimamente, si sono ottenuti buoni risultati usando i polli come modelli sperimentali per studiare l'immunità e la patogenesi di HEV. Il virus dell'epatite E aviaria è un virus emergente associato ad una sindrome caratterizzata da epato e splenomegalia, riconosciuto nei polli nel Nord America. Il virus aviario sembra essere correlato a quello umano e l'immunizzazione dei polli con un vaccino che utilizza la proteina ricombinante ORF 2 è risultata protettiva nei confronti dell'infezione da HEV aviario (104).

Malgrado gli innumerevoli studi sull'allestimento e sull'uso di un vaccino efficace per l'epatite E, ancora oggi sono numerosi gli interrogativi circa la sua efficacia e il suo reale utilizzo. Non è noto se tale vaccino rende immuni verso tutti i ceppi di HEV, compresi quelli di origine animale, visto il ruolo svolto, sebbene ancora poco chiaro, del *reservoir* animale nella trasmissione dell'infezione all'uomo. Inoltre, come per l'immunità

acquisita, anche nell'immunità indotta non è ancora nota la durata nel tempo degli anticorpi anti-HEV né il loro ruolo protettivo (99). Ulteriori studi saranno necessari al fine di dirimere questi dubbi e comprendere quanto ancora poco chiaro o ignoto circa le caratteristiche epidemiologiche e patogenetiche dell'infezione da HEV.

## Capitolo II

### RICERCHE PERSONALI

Lo studio è stato realizzato nell'ambito di una ricerca che ha coinvolto il Dipartimento di Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Pisa e la Clinica di Malattie Infettive della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Firenze che dal 1986 svolge attività di ricerca in Bolivia (5, 105-129). Hanno inoltre collaborato le seguenti istituzioni sanitarie locali: il SEDES (*Servicio Departamental de Salud*) di Santa Cruz, le *Gerencias de Red de Salud* di Vallegrande e Monteagudo, l'*Instituto Diagnostico Veterinario* "LIDIVET" della città di Santa Cruz de la Sierra e il *Convenio-Ministerio de Salud Vicariato Apostolico de Cuevo* di Camiri.

La nostra indagine sulla presenza dell'infezione da HEV nell'uomo e nel suino in zone rurali della Bolivia si è inserita in una ricerca più ampia che ha riguardato anche altri aspetti dell'infettivologia umana, in particolare l'associazione tra le parassitosi endemiche in tali aree e malattie neurologiche. In questo contesto specifico, la Clinica Neurologica dell'Università di Catania collabora da anni con l'Università di Firenze per valutare la correlazione fra varie forme cliniche di epilessia e la cisticercosi e la toxocariosi (130-134)

Gli obiettivi della nostra indagine erano i seguenti:

1. confrontare i risultati ottenuti con quelli di un precedente studio di sieroprevalenza condotto dalla Clinica di Malattie Infettive dell'Università di Firenze in un' altra zona della Bolivia nel 1999.
2. verificare mediante *Nested RT-PCR* la presenza di HEV nella popolazione umana e suina.

## ***2.1 Epatite E in America Latina:***

Sono stati effettuati pochi studi sulla prevalenza di HEV in America Latina e fino alla metà degli anni '90 non esistevano dati ufficiali sulla presenza dell'infezione in Bolivia.

Nel 1997 Ibarra condusse uno studio di sieroprevalenza tra i donatori di sangue di alcune comunità cilene, ottenendo una sieroprevalenza dell'8%, senza differenze di sesso o di età (135). In Venezuela la sieroprevalenza è risultata del 3.9% nella popolazione rurale generale e del 5.4% tra la popolazione rurale indigena (136). Uno studio di sieroprevalenza su donatori di sangue afferenti al *Regional Blood Bank* di Paraná, Brasile, da maggio a dicembre 1999, ha evidenziato una sieroprevalenza del 2.3% (23 soggetti sieropositivi su 996 inclusi nello studio) (137).

Fino al 1998 non esistevano dati ufficiali sulla presenza di HEV in Bolivia. In tale anno la Clinica di Malattie Infettive dell'Università di Firenze, ha condotto uno studio epidemiologico in due comunità rurali della regione sud orientale della Bolivia (5) segnalando un tasso di sieroprevalenza nella popolazione generale del 7,3 % e confermando che l'infezione era presente con maggior frequenza fra i giovani adulti (25%) e che non c' erano significative differenze in relazione al sesso, così come evidenziato in altri studi (46,49,87). Inoltre, si è evidenziato che esistevano differenze di prevalenza nelle due aree di studio in relazione al loro sistema di approvvigionamento idrico. In particolare la popolazione che utilizzava come sorgente di acqua potabile pozzi in vicinanza delle rive del fiume, mostrava sieroprevalenza maggiore.

Konomi e collaboratori hanno condotto uno studio retrospettivo al fine di valutare la sieroprevalenza delle principali forme di epatite virale tra i donatori di sangue afferenti all'ospedale di Santa Cruz, Bolivia, tra il 1992

e il 1998. Su 574 soggetti analizzati, 93 (16,7%) presentava anticorpi anti-HEV, e 10 soggetti (1,7%) risultavano positivi per IgM, pur non manifestando sintomi di epatite acuta in atto (138).

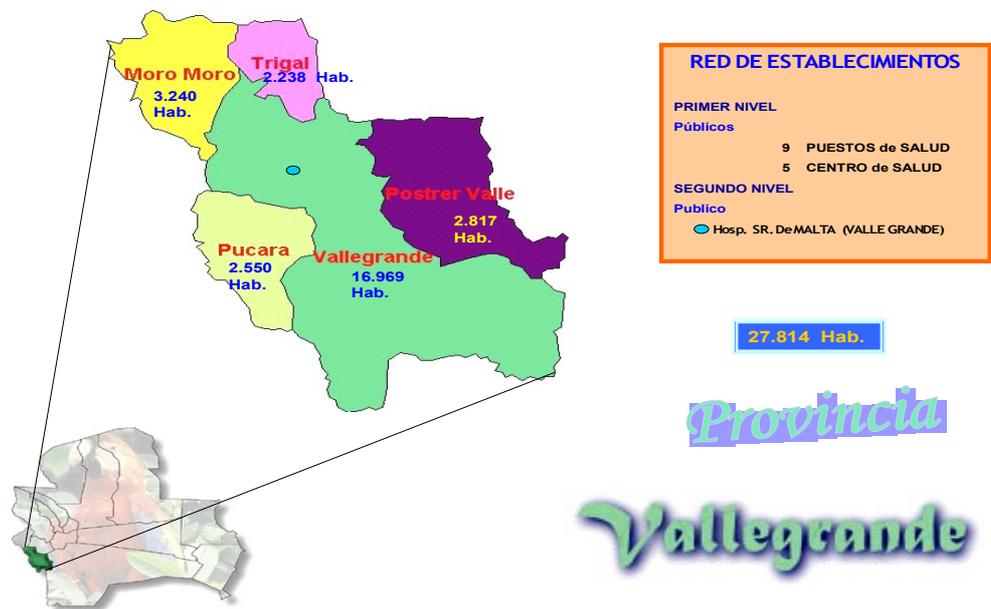
La prima identificazione del HEV di origine suina in America Latina è recente ed è avvenuta in un allevamento della provincia di Pergamino a nord di Buenos Aires in Argentina. Gli stipiti sono riconducibili al genotipo III e sono strettamente correlati a due altri isolati virali di origine umana argentini. Una successiva indagine ha evidenziato che la sieroprevalenza variava dal 4% al 58% a seconda della provincia. Gli isolati virali argentini di origine suina ed umana sono correlati ad altri stipiti umani Austriaci appartenenti al genotipo III, e questo fa ipotizzare una origine europea dell'infezione da HEV in Argentina (139).

## Capitolo III

### MATERIALI E METODI

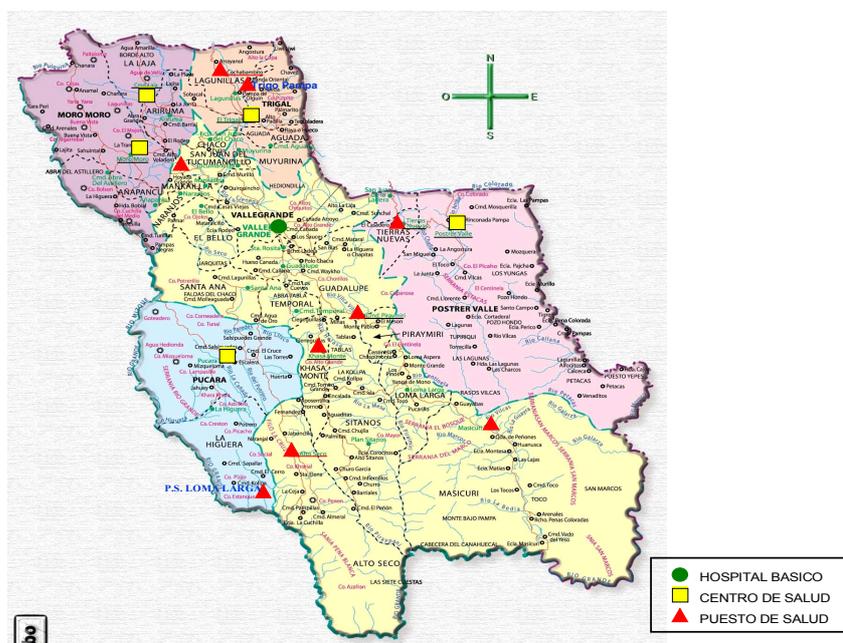
#### *3.1. Aspetti Demografici e Socio-Sanitari dell'Area di Studio:*

Lo studio è stato realizzato nella comunità rurale di Bartolo, nel Dipartimento di Chuquisaca e in quella di Casas Viejas, nel Dipartimento di Santa Cruz in Bolivia.



La Bolivia, con un'estensione totale di 1.098.521 Km<sup>2</sup> di cui un 65% costituito dalle pianure basse, un 15% dall'altopiano e un 20% dalla cordigliera e dalle valli interandine, confina con Perù, Brasile, Cile, Argentina e Paraguay e non ha sbocchi sull'oceano. La Bolivia è divisa in 9

dipartimenti: Beni, Chuquisaca, Cochabamba, La Paz, Oruro, Pando, Potosí, Santa Cruz, Tarija (Fig.8). Ogni dipartimento si divide in province per un totale di 112 su tutto il territorio nazionale. A sua volta ogni provincia si divide in municipi, in distretti, in cantoni ed in comuni.



La temperatura media-annua è di 22-24°C, con valori massimi che raggiungono i 43°C e con minime vicine a 0°C, e con un periodo di piogge più intense tra dicembre e marzo.

Secondo i dati statistici forniti dalla CIA (*Central Intelligence Agency*) nel 2008 la popolazione totale è stimata di 9.119.152 persone, con 8 abitanti per kmq (140). La Bolivia è il Paese meno densamente popolato dell'America Latina, e la popolazione è concentrata principalmente sull'altipiano e nella regione delle cordigliere e delle valli interandine, mentre nella pianura (tra cui il Chaco che è la regione più estesa) vive solamente un quarto della popolazione. Gli abitanti d'età compresa tra 0-14 anni rappresentano il 34,3% della popolazione, quelli tra 15-65 anni il 61,1%, mentre quelli di età > 65 anni il 4,6%. Il 33% della popolazione è rappresentato da meticci e il 10% da soggetti di razza bianca. Il restante è

rappresentato dalle popolazioni native fra cui sono prevalenti quelle di lingua *quechua*, *aymarà*, *guaranì* e dai *Mataco Noctenes*. La lingua ufficiale rimane però il *castigliano*.

I gruppi prevalenti nelle aree di studio sono quelli dei gruppi etnici *Quecha* e *Guaranì* ma numerosi sono i meticci, discendenti dall'incontro tra autoctoni e spagnoli e, dalla metà del 800, anche con tedeschi, italiani, arabi ed, in misura minore, altre popolazioni.

La maggior parte della popolazione vive in una situazione di miseria, soprattutto nelle aree rurali, associata a mancanza di educazione sanitaria e di risanamento ambientale, analfabetismo e basso livello di scolarità e alle precarie condizioni delle abitazioni. L'indice di povertà varia tra il 71% e il 93% nelle diverse province, con notevoli differenze tra aree urbane e rurali. L'economia si basa sull'agricoltura (principalmente la coltivazione del mais) e sull'allevamento di animali (bovini, suini, ovini e pollame). Nonostante la precarietà delle infrastrutture in Bolivia, quali una scadente rete stradale e ferroviaria, in questi ultimi anni, in relazione al basso costo della manodopera e alle irrilevanti garanzie sociali per i lavoratori, sono aumentate le attività industriali manifatturiere quali industrie tessili, alimentari e di materiali per la costruzione. Tuttavia, nonostante i piccoli progressi osservati negli ultimi anni, l'agricoltura insieme all'allevamento di bovini e suini, rimane la principale attività di sussistenza, soprattutto nelle aree rurali (141,142).

La situazione di notevole povertà presente nell'intero Paese, anche se principalmente nelle aree rurali, è legata soprattutto alle scarse e poco redditizie attività economiche, all'analfabetismo e al basso livello di scolarità, alle precarie condizioni delle abitazioni e delle strutture pubbliche, alla mancanza di risanamento ambientale e di educazione sanitaria. I tassi di mortalità infantile sono fra i più alti del mondo. Stime recenti indicano una mortalità nel 1° anno di vita del 93%, ed entro il 5° anno del 145%. Se si considera che questi sono dati ufficiali che non

prendono in considerazione l'alto numero di bambini morti che non vengono registrate ufficialmente, si può immaginare che il problema è notevolmente più serio ed è probabile che il 70% dei bambini boliviani muoia prima di raggiungere i 5 anni. A causa della scarsa distribuzione di personale medico a cui segue la mancanza di qualsiasi tipo di assistenza nazionale, diretta o indiretta, solo una minoranza della popolazione può sostenere i costi di un intervento medico di natura diagnostica o terapeutica (143, 144, 145).

La Bolivia mostra una tipologia di morbilità e mortalità legate ancora prevalentemente alle patologie infettive, in maggioranza prevenibili e/o curabili, a differenza dei paesi economicamente avanzati in cui è la patologia multifattoriale a carattere cronico-degenerativo a causare il maggior numero di malattie e decessi.

### 3.2 Popolazione studiata:

Lo studio è stato condotto nelle comunità rurali di Bartolo, Provincia Hernando Siles nel Dipartimento di Chuquisaca, e di Casas Viejas, Provincia Vallegrande nel Dipartimento di Santa Cruz.

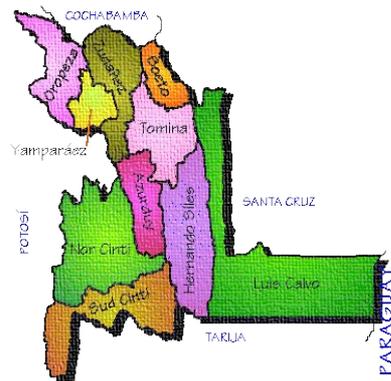
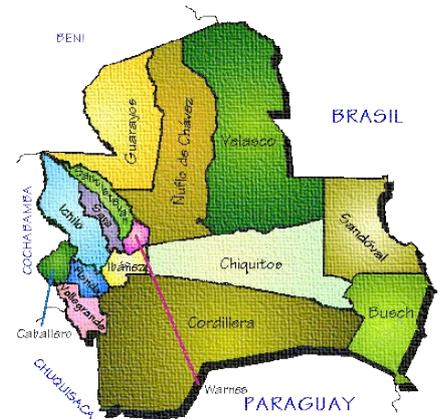


Fig. 8: Dipartimento di Chuquisaca

Fig. 9: Dipartimento di Santa Cruz



La comunità di Bartolo si trova a circa 42 Km da Monteagudo, ad un'altitudine di 992 metri sul livello del mare ed è la capitale della Provincia Hernando Siles.

La popolazione è composta da circa 200 abitanti, principalmente costituita dai gruppi etnici *Quecha e Guarani*, ma numerosi sono i meticci, discendenti dall'incontro tra autoctoni e spagnoli ed europei in generale. La

lingua parlata, oltre al *castillano*, è il *quechua*. La comunità di Casas Viejas si trova a circa 17 Km da Vallegrande, che è ad un'altitudine di 1998 metri sul livello del mare ed è la capitale della Provincia Vallegrande. La popolazione è composta da circa 200 abitanti, prevalentemente meticci, di lingua spagnola.

Le principali attività di sussistenza sono l'agricoltura e l'allevamento. Le condizioni socio-economiche nelle aree rurali sono molto povere, sebbene si possa osservare una differenza tra le due comunità in esame, con presenza di condizioni igienico-sanitarie ed un livello socio-economico migliori in Casas Viejas. In tale comunità la popolazione ha anche un più facile accesso alla struttura sanitaria, quale l' Ospedale cubano “*Señor de Malta*” localizzato nella vicina Vallegrande. La popolazione di entrambe le comunità vive a stretto contatto con gli animali da allevamento, principalmente maiali, in assenza di latrine e di acqua corrente.

Le due comunità studiate sono state scelte perché presentavano le seguenti caratteristiche in comune: consistenza della popolazione, presenza di allevamenti di maiali a gestione familiare, assenza di strutture idonee per la macellazione degli animali, mancanza di latrine e mancanza di acqua corrente.

Nello studio è stato preso in esame un campione di 238 persone, 65 a Casas Viejas e 173 a Bartolo.

Gli esami sierologici sono stati eseguiti su 236 persone, solamente a due bambini non si è potuto eseguire il prelievo di sangue.

### ***3.3 Raccolta dei campioni:***

#### **▲ *Equipe di lavoro***

L'equipe era composta dal seguente personale Italiano: due medici neurologi della Clinica Neurologica I dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Catania, due infettivologi della Clinica di Malattie Infettive dell'Università di Firenze e una biologa del Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti dell'Università di Pisa; e dal seguente personale Boliviano: un medico di medicina generale, un veterinario e 7 paramedici. Gli operatori sanitari locali sono stati selezionati con la collaborazione del *Distrito de Salud Cordillera* di Camiri e della Scuola di Salute Pubblica, *Tekove Katu*, diretta da Padre Tarcisio Ciabatti.

#### **▲ *Step 1: incontro con le comunità***

Per il raggiungimento degli obiettivi previsti dallo studio è stato necessario ottenere la piena collaborazione della popolazione delle due comunità. Le persone sono state informate dal medico locale e da rappresentanti del *Distrito de Salud Cordillera* di Camiri alcune settimane prima dell'inizio dell'attività sul campo. In questa occasione la popolazione delle due comunità è stata informata sulle finalità e le modalità di esecuzione della ricerca. è stato spiegato loro lo scopo del lavoro, le procedure e i benefici per la popolazione.

L'equipe ha raggiunto le comunità in esame il giorno precedente l'inizio dell'attività, per incontrare la popolazione, rispondere ad eventuali domande

relative allo studio e poterne valutare l'adesione.

Inizialmente, l'equipe ha tracciato una mappa di ciascuna comunità, per determinare il numero e la posizione di ogni abitazione. Le persone sono state esaminate negli edifici adibiti a scuola, ma talvolta la visita è stata eseguita anche a domicilio.

Il lavoro è stato svolto durante le ore diurne, fin quando la luce solare lo consentiva, essendo tali comunità sprovviste di energia elettrica.

### ▲ ***Step 2: questionario***

Per ogni soggetto veniva raccolto il consenso informato e veniva compilato un questionario, con le seguenti informazioni:

1) informazioni di carattere generale: residenza, data di nascita, sesso, tipo di parentela con il capofamiglia, livello d'istruzione, occupazione, condizioni igieniche dell'abitazione, disponibilità di latrine, presenza di maiali allevati a conduzione familiare;

2) dati sullo stato individuale di salute del soggetto mediante visita medica. Per quanto riguarda l'Epatite E veniva posta particolare attenzione al rilievo di eventuali segni di infezione, quali ittero e febbre.

Gli adulti sono stati intervistati direttamente; per i bambini di età inferiore agli 8 anni si raccoglievano le informazioni attraverso le madri od altri familiari.

### ***Step 3: prelievo ematico e raccolta dei campioni fecali***

Durante la visita medica veniva eseguito il prelievo ematico e veniva consegnato un contenitore, contrassegnato con un codice identificativo, per

la raccolta di campioni fecali. I contenitori venivano riconsegnati nei giorni successivi all'equipe di lavoro. Sono stati riconsegnati 122 campioni fecali (90 a Bartolo e 32 a Casas Viejas) che successivamente sono stati raggruppati in 22 pool.

Sono stati inoltre raccolti un totale di 121 campioni di feci di suini presenti nelle due comunità, 67 a Bartolo e 54 a Casas Viejas. Questi campioni sono poi stati raggruppati in 22 pool. Le feci sono state raccolte da suini di età compresa tra i 2 mesi e 1 anno, in accordo con quanto riportato in letteratura sulla maggior frequenza di infezione nei suini di età superiore a 3 mesi.

#### ▲ *Step 4: Esami di laboratorio*

##### **Esami virologici su campioni di feci:**

Le feci, umane e suine, venivano inviate giornalmente al LIDIVET (*Laboratorio de Investigación y Diagnostico Veterinario*) a Santa Cruz de la Sierra, dove venivano creati pool di feci riunendo insieme campioni individuali in base all'età del soggetto e alla comunità di appartenenza.

I 22 pool di feci umane (16 di Bartolo e 6 di Casa Viejas) erano costituiti da campioni provenienti da 4-10 individui ciascuno. I 22 pool di feci suine (13 di Bartolo e 9 di Casas Viejas) erano formati da campioni provenienti da 4-7 soggetti ciascuno.

I pool ed i campioni individuali di feci umane e suine sono stati conservati a -20°C e successivamente sottoposti ad estrazione del RNA virale secondo la metodica sotto descritta. I campioni individuali di feci umane e suine sono invece rimasti stoccati in congelatore fino al momento di essere

trasportati in Italia.

La ricerca del genoma virale nelle feci umane e suine è stata eseguita secondo la seguente metodica:

- 1) diluizione delle feci al 10% p/v con PBS in provette falcon da 50ml;
- 2) aggiunta di sferette di vetro sterili;
- 3) agitazione con vortex per 2 minuti;
- 4) centrifugazione per 1 ora a 3000 rpm a 4°C;
- 5) recupero del surnatante;
- 6) ulteriore centrifugazione per 10 minuti a 14000 rpm a temperatura ambiente;
- 7) raccolta del surnatante;
- 8) estrazione dell'RNA virale con il kit mediante il kit QIAamp viral RNA Mini Kit (Quiagen);
- 9) *Nested* RT-PCR secondo la metodica di Meng X-J et al. (3).

.....

L'amplificazione riguarda un frammento di 348 bp di una regione altamente conservata del gene ORF 2, codificante la proteina capsidica di HEV.

Gli amplificati con banda della dimensione attesa, sono stati inviati per il sequenziamento alla ditta *BMR-Genomics Srl* di Padova.

Per l'analisi delle sequenze sono stati utilizzati i software *Bioedit* e *Blast*, disponibili online.

Per quanto riguarda i campioni fecali di origine umana, in prima istanza sono stati esaminati soltanto i 22 pool ed in seconda istanza 30 campioni individuali selezionati in base ai seguenti criteri:

- ✓ 5 (di cui 1 anche IgM ELISA dubbio) campioni che avevano formato il pool risultato positivo alla *Nested* RT-PCR ed al sequenziamento ;
- ✓ 25 (uno IgM ELISA positivo) campioni dei 26 che avevano formato

4 pool che avevano dato bande molto lievi della dimensione attesa, risultate poi aspecifiche al sequenziamento (un campione fecale utilizzato per costituire i pool era poi risultato insufficiente per l'esame individuale);

Per i campioni fecali di origine suina ci siamo limitati all'esame dei pool.

### **Esami virologici su campioni di siero:**

Sette campioni individuali di siero sono stati sottoposti a *Nested* RT-PCR. I campioni esaminati avevano fornito i seguenti risultati agli esami sierologici: 4 positivi e 3 dubbi al test sierologico IgM ELISA. In due soggetti la *Nested* RT-PCR è stata eseguita anche sul campione fecale.

L'estrazione dell'RNA virale è stato fatta direttamente sul campione di siero, con lo stesso kit di estrazione usato per le feci

### **Esami sierologici:**

Il sangue prelevato veniva sierato in giornata presso il Laboratorio dell'Ospedale *San Antonio de los Sauces* di Monteagudo per la comunità di Bartolo e presso il laboratorio dell'Ospedale *Señor de Malta* di Vallegrande per la comunità di Casas Viejas. I sieri sono poi stati conservati in *criovials* a -20°C nell'ospedale municipale di Camiri, che dista alcune ore di viaggio e successivamente sono stati trasportati in Italia per essere sottoposti ai test immunoenzimatici.

Per gli esami sierologici sono stati utilizzati 2 kit ELISA ad antigeni sintetici, corrispondenti ad epitopi conservati ed immunodominanti di HEV, per la determinazione degli anticorpi anti HEV di classe IgG e IgM, (IgG ELISA e IgM ELISA) commercializzati dalla DIA.PRO Srl, Milano. Per l'esecuzione dei test e l'interpretazione dei risultati sono stati seguiti i protocolli dei kit.

Il test IgG ELISA è stato eseguito su 240 sieri umani provenienti da 172 individui della comunità di Bartolo, 64 individui della comunità Casas Viejas e da 4 operatori sanitari locali.

Il test IgM ELISA è stato eseguito su un campione di sieri appartenenti a 45 individui della comunità di Bartolo e 6 della comunità di Casas Viejas, ed un operatore sanitario locale, per un totale di 52 sieri esaminati.

Sono stati inclusi nel campione:

3.14 sieri IgG ELISA positivi;

4.4 IgG ELISA dubbi;

5.3 IgG ELISA negativi, ma con un risultato prossimo al cut off;

6.i sieri dei 5 soggetti i campioni fecali dei quali avevano formato il pool risultato positivo alla *Nested* RT-PCR;

7.25 sieri dei 26 soggetti, i campioni fecali dei quali avevano formato i 4 pool risultati dubbi alla *Nested* RT-PCR. Il siero di uno di questi soggetti non era stato raccolto perchè si trattava di un bambino molto piccolo;

8.il siero di un operatore sanitario con valore prossimo al cut off nel test IgG ELISA.

Gli esami virologici e sierologici sono stati eseguiti, con l'aiuto della Dr.ssa Maria Chiara Dell'Amico, in parte presso il laboratorio della Clinica di Malattie Infettive dell'Università di Firenze ed in parte presso il Dipartimento di Patologia Animale dell'Università di Pisa.

## Capitolo IV

### RISULTATI

#### *4.1 Popolazione Umana*

Il genoma virale è stato identificato in uno dei 22 pool di feci umane, della comunità di Bartolo costituito con le feci di 5 individui di età compresa tra i 10 e i 14 anni. Altri 4 pool della stessa comunità, hanno dato risultato dubbio; questi pool erano stati formati da 26 campioni fecali individuali.

L'esame virologico dei campioni di feci individuali ha fornito i risultati sintetizzati nella tabella 1, nella quale sono anche riportati i risultati degli esami sierologici eseguiti sugli stessi individui.

L'analisi delle sequenze genomiche dei 5 amplificati da feci (1 da pool e 4 da campioni individuali) ha permesso di includere tutti gli isolati virali corrispondenti nel genotipo III.

L'esame virologico dei 7 campioni individuali di siero ha fornito un solo risultato positivo. L'isolato virale corrispondente all'unico amplificato positivo apparteneva anch'esso al genotipo III.

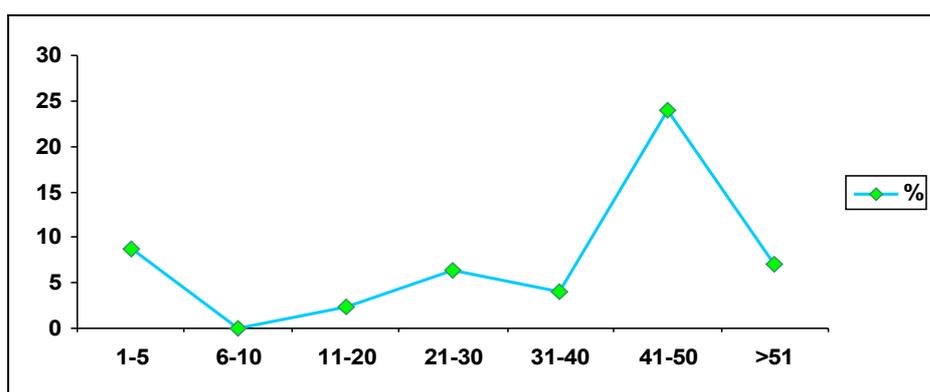
La diagnosi sierologica mediante IgG ELISA eseguita sui 240 campioni di siero umano ha fornito i seguenti risultati:

1. quindici campioni (12 di Bartolo e 3 di Casas Viejas) sono risultati positivi (6.2%), con una prevalenza del 7.4% (8/108) tra le femmine e del 5.4% (7/128) tra i maschi ( $p=0.5$ );

2. la prevalenza nella comunità di Bartolo è risultata del 7%, ed in quella di Casas Viejas del 4.7% (p=0.5);
3. quattro soggetti, tutti della comunità di Bartolo, hanno fornito risultati dubbi;
4. i campioni dei 4 operatori sanitari locali sono risultati tutti negativi;
5. l'età media dei 15 soggetti sieropositivi è stata di 41.5 anni (range 3-87) con una prevalenza maggiore nei soggetti di età > 41 anni rispetto a quelli di età < 41 anni, (3.8% vs 2.5%);
6. la prevalenza maggiore (24%) si è osservata nei soggetti di età compresa tra 41 e 50 anni

I 52 sieri esaminati con test IgM ELISA, hanno fornito 4 risultati positivi e 3 dubbi. I soggetti positivi appartenevano tutti alla comunità di Bartolo ed avevano un'età variabile da 12 a 29 anni.

Nessun soggetto presentava al momento della visita e del prelievo ematico segni e/o sintomi di epatite acuta nè riferiva precedenti episodi itterici.



**Fig. 10: distribuzione delle sieropositività (IgG ELISA) in base all'età dei soggetti testati**

**Tabella 1: confronto fra risultati sierologici e virologici in 35 soggetti.**

<b>SOGGETTO</b>	<b>IgG ELISA</b>	<b>IgM ELISA</b>	<b>RT-PCR feci o (siero)</b>
BA108	P	D	(N)
BA086	N	N	N
BA096	N	N	P
BA056	N	N	N
BA013	N	N	P
BA053	N	N	P
BA084	N	N	N
BA101	N	N	N
BA069	N	N	N
BA055	N	N	N
BA039	N	N	P
BA038	N	D	N (P)
BA037	N	N	N
BA068	N	N	N
BA095	N	N	N
BA058	N	N	N
BA059	-	-	N
BA028	N	N	N
BA020	N	N	N
BA010	N	N	N
BA048	N	N	N
BA008	N	N	N
BA033	N	N	N
BA003	N	N	N
BA050	N	N	N
BA133	N	N	N
BA071	N	N	N
BA118	N	P	N (N)
BA120	N	N	N
BA066	N	N	N
BA077	N	N	N
BA162	P	P	(N)
BA009	D	P	(N)
BA078	D	P	(N)
CV016	N	D	(N)

**Legenda:**

P= positivo; N= negativo; D= dubbio; - = test non eseguito.

BA = comunità di Bartolo CV = comunità di Casas Viejas

## ***4.2 Popolazione suina:***

La *Nested* RT-PCR eseguita sui 22 pool di feci suine ha dato esito positivo in 7 pool (6 di Bartolo e 1 di Casas Viejas).

L'analisi delle sequenze genomiche degli amplificati, ha permesso di includere tutti i 7 isolati virali suini nel genotipo III.

Tale analisi ha inoltre consentito di osservare una omologia aminoacidica del 92% tra gli isolati virali umani e gli isolati virali suini.

## Capitolo V

### DISCUSSIONE

L'epatite E è una patologia ampiamente diffusa nelle zone a clima tropicale e subtropicale con condizioni igienico-sanitarie scadenti, dove la contaminazione fecale delle acque è un'evenienza piuttosto frequente. Le informazioni epidemiologiche sull'epatite E sono ancora limitate e in particolare non è stato completamente chiarito il ruolo di eventuali serbatoi animali nella diffusione dell'infezione. Finora pochi studi sono stati condotti sulla prevalenza dell'epatite E nelle popolazioni del Sud America, e uno solo in comunità rurali boliviane. Nel presente studio è stato possibile accertare la presenza dell'infezione da HEV in due comunità rurali boliviane, Bartolo e Casas Viejas, nelle quali le condizioni igienico-sanitarie sono scadenti e la popolazione vive a stretto contatto con i suini di allevamenti familiari. La sieroprevalenza per anticorpi IgG anti-HEV è risultata pari al 6,2%, molto simile a quella evidenziata in uno studio condotto precedentemente in Bolivia (5). Nel nostro caso la presenza dell'infezione è stata anche confermata in alcuni soggetti mediante PCR. Quattro soggetti, tutti appartenenti alla comunità di Bartolo, sono risultati sieropositivi al test IgM ELISA. Questo dato fa pensare che i soggetti avessero contratto l'infezione di recente, anche se l'anamnesi e l'esame obiettivo non indicavano una infezione in fase acuta. Una delle due donne, al momento della visita, riferiva prurito pur in assenza di un franco ittero. Un altro dato emerso da questo studio è la bassa prevalenza nei soggetti giovani o in età avanzata e la elevata prevalenza nella fascia di età da 41 a 50 anni (24%). Questi dati sono in accordo con quanto riportato in

letteratura dove nelle aree endemiche, HEV infetta prevalentemente i soggetti giovani-adulti, con frequenza variabile dal 3% al 30%, rispetto ai bambini (0,25-10%). Al contrario, l'epatite A, patologia che riconosce la stessa modalità di trasmissione di HEV, si manifesta con maggior prevalenza nei bambini. In particolare, nelle comunità boliviane è stata documentata un'elevata prevalenza di anticorpi anti-HAV già nei primi anni di vita (65% e 92% rispettivamente nelle fasce di età 1-5 e 6-10 anni) (5, 138). In numerose altre casistiche la prevalenza dell'epatite A raggiunge valori di circa il 90% nei soggetti di età inferiore ai 10 anni (14, 82, 41, 49).

Il genoma virale di HEV è stato identificato in un pool di feci umane, in 4 campioni fecali individuali ed in un campione di siero umano. Anche in questo caso i soggetti PCR positivi non avevano presentato al momento della visita segni o sintomi di infezione in fase acuta.

Un solo soggetto (quello risultato PCR positivo sul siero) ha fornito un risultato dubbio (vicino al *cut off*) al test IgM ELISA; mentre gli altri 4 soggetti PCR positivi sui campioni fecali, hanno fornito risultato negativo al test IgM ELISA (vedi tab. 1). Questo dato ci sembra piuttosto anomalo, in quanto gli anticorpi de classe IgM compaiono abbastanza precocemente dopo l'infezione.

Per spiegare questo fenomeno possiamo avanzare diverse ipotesi:

- dal momento che tutti i campioni fecali PCR positivi appartenevano a soggetti della comunità di Bartolo, poteva essere in atto una infezione molto recente in diversi soggetti contemporaneamente della stessa comunità. Infatti nei primi giorni dopo l'infezione non sono ancora evidenti segni clinici caratteristici come l'ittero e gli anticorpi di classe IgM possono essere ancora non svelabili;
- la sensibilità del test IgM ELISA utilizzato potrebbe essere stata non elevata e quindi non in grado di svelare minime quantità di anticorpi. Infatti l'antigene del kit ELISA è stato preparato a partire da stipiti virali birmani

e messicani rispettivamente appartenenti ai genotipi I e II di HEV, mentre il genotipo da noi identificato in tutti i campioni PCR positivi era il genotipo III;

- i sieri hanno subito in Bolivia, durante la stagione estiva, un doppio trasporto dal luogo del prelievo a quello di preparazione e successivamente a quello di stoccaggio e poi sono stati trasportati in Italia. La conservazione in condizioni non ottimali e i diversi congelamenti e scongelamenti, possono avere influito negativamente sulla reattività dei sieri al test.

Per quanto riguarda la ricerca del virus nei suini, la presenza di HEV in pool di campioni di feci suine non è un dato inaspettato, dal momento che il virus è stato identificato in tali animali con una elevata frequenza in differenti aree geografiche (28,29,30). Recentemente ne è stata documentata la presenza anche in allevamenti suini del Sud America, ma fino ad ora il virus non era stato segnalato in quelli di comunità rurali boliviane.

Dal momento che i sette isolati virali identificati appartenevano tutti al genotipo III, è presumibile che anche nelle popolazioni suine boliviane questo sierotipo sia prevalente come già osservato in Argentina (139) ed in altre parti del mondo.

L'analisi delle sequenze genomiche di tutti gli amplificati, ha consentito di stabilire che anche gli isolati umani appartenevano allo stesso genotipo III di quelli suini e presentavano con questi una elevata omologia aminoacidica (92%). E' possibile quindi che in alcuni casi il suino sia stato la sorgente dell'infezione per l'uomo.

I risultati ottenuti rappresentano un contributo alle conoscenze epidemiologiche sulla presenza di infezioni da HEV in Bolivia.

Attualmente, non essendo disponibili in commercio vaccini per l'epatite E, la prevenzione si basa prevalentemente nel miglioramento delle condizioni igieniche delle comunità locali. Un eventuale vaccino, all'allestimento del quale stanno lavorando diversi gruppi di ricerca (95, 98, 102, 103), potrebbe servire in campagne di vaccinazione nelle aree endemiche, soprattutto per proteggere le donne in gravidanza. Nelle aree a bassa endemicità o non endemiche, la vaccinazione potrebbe essere riservata soltanto ai soggetti a rischio (viaggiatori che si recano in aree endemiche, personale militare, addetti agli impianti fognari e al trattamento delle acque reflue, veterinari, allevatori, personale sanitario e di laboratorio, pazienti affetti da epatite cronica).

## RINGRAZIAMENTI

*Desidero ringraziare il Prof. Francesco Tolari che ha guidato la presente ricerca e che mi ha dato la possibilità di svolgere una bellissima e costruttiva esperienza quale il Dottorato di Ricerca in Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi.*

*Un particolare e sentito ringraziamento va a tutto il personale del Dipartimento di Patologia Animale dell'Università di Pisa per i consigli utili alla mia crescita personale e professionale, alla Dr.ssa Maria Chiara Dell'Amico per l'esecuzione dei test virologici e sierologici, e al Dr. Maurizio Mazzei e alla Prof.ssa Patrizia Bandecchi per l'incoraggiamento fornito in questi anni.*

*Desidero inoltre esprimere la mia gratitudine ai cari colleghi della Clinica di Malattie Infettive dell'Università di Firenze, ad Alessandro, Antonella, Annalisa e Sara, che hanno creduto e lavorato come sempre in maniera valida e competente a questa ricerca.*

*Per il lavoro sul campo, ringrazio il personale del LIDIVET di Santa Cruz de la Sierra, degli Ospedali San Antonio de los Sauces di Monteagudo e Señor de Malta di Vallegrande. Ringrazio inoltre il Distrito de Salud Cordillera di Camiri, la Scuola di salute Pubblica Tekove Katu di Gutierrez e tutti coloro che hanno reso possibile l'esecuzione dello studio e la permanenza in Bolivia.*

*Un ringraziamento speciale ricco di affetto va ovviamente al Padre Tarcisio Ciabatti e a tutti gli amici boliviani, come sempre disponibili ed instancabili, con i quali è stato possibile lavorare ancora una volta insieme.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Meng XJ, Purcell RH, Halburb PG et al *A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus* Proc Nat Acad Sci USA 1997; 94(18): 9860-5
2. Reyes GR, Yarbough PO, Tam AW et al *Hepatitis E virus (HEV): the novel agent responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis* Gastroenterol Jpn. 1991 Jul; 26 Suppl 3:142-7
3. Inoue J, Takahashi M *Analysis of human and swine hepatitis E virus (HEV) isolates of genotype 3 in Japan that are only 81-83 % similar to reported HEV isolates of the same genotype over the entire genome* J Gen Virol 2006 Aug;87(Pt 8):2363-9
4. Guthmann JP, Klovstad H *A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of Water treatment methods* CID 2006; 42: 1685-91
5. Bartoloni A, Bartalesi F, et al *Prevalence of antibodies against*

- hepatitis A and E viruses among rural populations of the Chaco region, south-eastern Bolivia Trop Med Intern Health 1999; 4, 9: 596–601*
6. Dewar TN *Non-A, non-B hepatitis* West J Med 1990;153:173-179
  7. Piazza M da *Epatiti virali acute e croniche*, Ghedini editore, VIII ediz.
  8. Purcell RH *Hepatitis viruses: Changing patterns of human disease* Proc Natl Acad Sci 1994 91:2401-06
  9. Khuroo MS *Study of an epidemic of non A, non B hepatitis: Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-trasfusion non-A, non-B type* Am J Med 1980; 68:818-23
  10. Vishwanathan R *Infectious hepatitis in Delhi (1955-56): a critical study: Epidemiology* Indian J Med Res 1957; 45: 1-29
  11. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS et al *Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route* Intervirology 1983;20:23-31

12. Reyes GR, Purdy MA, Kim JP et al *Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis*  
Science 1990; 247: 1335-9
13. Tam AW, Smith MM, Guerra ME et al *Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome*  
Virology 1991; 185:120-31
14. Pérez-Gracia MT, Iglesias MR *Aspectos actuales del virus de la hepatitis E* Med Clin (Barc) 2003;121:787-92
15. Okamoto H *Genetic variability and evolution of hepatitis E virus*  
Virus Research 2007; 127:216–228
16. Lu L, Li C, Hagedorn CH *Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis* Rev Med Virol 2006;16:5-36
17. Ticehurst J, Popkin TJ, Bryan JP, *Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis in Pakistan: serologic responses and pattern of virus excretion.* J Med Virol Feb 1992; 36(2) :84-92
18. Tam AW, White R, Yarbough PO *In vitro infection and replication of*

*hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes*  
Virology 1997, 10;238:94-102

19.Panda SK, Ansari IH, Durgapal H et al *The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious* J Virol 2000;74:2430-7

20.Reyes GR, Huang CC et al *Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV)* Arch Virol Suppl 1993;7:15-25

21.Favorov MO, Kooy MY, Tsarev SA et al *Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States* J Infect Dis 2000; 181: 449-455

22.He J, Innis BL, Shrestha MP et al *Evidence that rodents are a reservoir of hepatitis E virus for humans in Nepal.* J Clin Microbiol 2002 Dec; 40:4493-8

23.Sonoda H Abe M Sugimoto T et al. *Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan.* J Clin Microbiol 2004 Nov; 42:5371-4

24. Corwin AL, Tien NT, *The unique riverine ecology of hepatitis E virus transmission in South-East Asia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 93(3): 255-60
25. Wang YC Zhang HY Xia NS et al. *Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China*. *J Med Virol* 2002 Aug; 67:516-21
26. Easterbrook JD Kaplan JB Vanasco NB et al. *A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA*. *Epidemiol Infect* 2007 ; 135:1192-9
27. Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS et al *Genetic and experimental evidence for cross-species infection by the swine hepatitis E virus* *Journal of Virology* 1998; 72: 9714-9721
28. Banks M, Heath GS, Grierson D et al *Evidence for the presence of hepatitis E virus in the United Kingdom* *Veterinary Record* 2004; 154: 223-227
29. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK et al *Detection by Reverse Transcription-PCR and Genetic Characterization of Field Isolates of Swine Hepatitis E Virus from Pigs in Different Geographic Regions*

*of the United States* J Clin Microb 2002; 40: 1326-1332

30. Van der Poel WHM, Verschoor F, van der Heide R et al *Hepatitis E Virus Sequences in Swine Related to Sequences in Humans, the Netherlands* Emerging Infectious Diseases 2001; 7:970-976
31. Kasorndorkbua C, Guenette DK, Huang FF et al. *Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs.* J Clin Microbiol 2004 Nov; 42:5047-52
32. Halbur PG, Kasorndorkbua C, Gilbert C, Guenette D, Potters MB, Purcell RH, Emerson SU, Toth TE, Meng XJ. *Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human.* J Clin Microbiol 2001; 39(3) :918-23
33. Wibawa ID, Muljono, DH Mulyanto et al. *Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among apparently healthy humans and pigs in Bali, Indonesia: identification of a pig infected with a genotype 4 hepatitis E virus.* J Med Virol 2004 May; 73:38-44
34. Pina S, Buti M, Cotrina M et al *HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain* J Hepatol 2000; 33: 826–833

35. Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR et al. *Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States.* J Gen Virol 2001 Oct; 82:2449-62
36. Nakamura M, Takahashi K, Taira K, Taira M, Ohno A, Sakugawa H. *Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence.* Hepatol Res Mar 2006; 34(3) :137-40
37. Tei S, Kitajima N, Takahashi K et al. *Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings.* Lancet 2003 Aug 2; 362:371-3
38. Takahashi M, Nishizawa T, Tanaka T et al *Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan* Journal of General Virology 2005, 86:1807–1813
39. Saad MD, Hussein HA, Bashandy MM, Kamel HH, Earhart KC, Fryauff DJ, Younan M, Mohamed AH. *Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt.* Infect Genet Evol Jun 2007; 7(3) :368-73

40. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F et al *Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries* J Clin Microbiol 2002; 40: 117–122
41. Favorov MO, Margolis HS *Hepatitis E virus infection: an enterically transmitted cause of hepatitis* da Emerging Infections 1999, chapter 1
42. Krawczynski K, Aggarwal R, Kamili S *Hepatitis E* Infect Dis Clin North Am 2000;14:669-87
43. Zhuang H, Cao XY, Liu CB et al *Epidemiology of hepatitis E in China* Gastroenterol Jpn 1991;26 Suppl 3:135-8
44. Aggarwal R, Naik SR *Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread* J Hepatol 1994;21:718-23
45. Somani SK, Aggarwal R, Naik SR et al *A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection* J Viral Hepat 2003;10:446-9

46. Arankalle VA Tsarev SA Chadha MS et al. *Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992.* J Infect Dis 1995 ; 171:447-50
47. Mushahwar IK Dawson GJ Bile KM et al. *Serological studies of an enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Somalia.* J Med Virol 1993 Jul; 40:218-21
48. El-Zimaity DM Hyams KC Imam IZ et al. *Acute sporadic hepatitis E in an Egyptian pediatric population.* Am J Trop Med Hyg 1993 Mar; 48:372-6
49. Chau TN, Lai ST, Tse C et al *Epidemiology and clinical features of sporadic hepatitis E as compared with hepatitis A* Am J Gastroenterol 2006;101:292-6
50. Skidmore SJ, *Factors in spread of hepatitis E* Lancet 1999; 354 (9184): 1049-50
51. San-Shwe, *Epidemiological criteria as indication of non-A, non-B hepatitis in a community* Lancet 1985; 2 (8459):828
52. WHO; *Guidelines for drinking-water quality*, 2005 World Health

## Organization

53. Caredda F, Antinori S, Re T *Clinical features of sporadic non-A non-B hepatitis possibly associated with faecal-oral spread* Lancet 1985; 2(8452): 444-5
54. Tei S, Kitajima N, Takahashi K et al *Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings* Lancet 2003; 362: 371–373
55. Fletcher J, *A traveller returning from Nepal with Hepatitis E* Med J Aust 1993; 159 (8):563
56. Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C et al *Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion* J Med Virol 2004; 74:563-572
57. Colson P, Coze C, Gallian P et al *Transfusion-associated hepatitis E in France* Emerg Infect Dis 2007;13:648-9
58. Purcell RH, Meng XJ, Dea S, Engle RE *Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is*

- common or is rare in the human population* J Med Virol Nov 1999;  
59 (3):297-302
- 59.Barzilai A, Schulman S, Karetny YV *Hepatitis E virus infection in hemophiliacs* J Med Virol 1995; 46: 153-6
- 60.Cacopardo B, Russo R, Preiser W et al *Acute hepatitis E in Catania (eastern Sicily) 1980-1994. The role of hepatitis E virus* Infection 1997;25:313-6
- 61.Schlauder GG, Desai SM, Zanetti AR et al *Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV* J Med Virol 1999;57:243-51
- 62.Stroffolini T, Menchinelli M, Dambroso V et al *Prevalence of hepatitis E in a central Italian town at high endemicity for hepatitis C virus* Ital J Gastroenterol 1996;28:523-5
- 63.Zanetti AR, Dawson GJ *Hepatitis type E in Italy: a seroepidemiological survey. Study Group of Hepatitis E* J Med Virol 1994;42:318-20
- 64.Zanetti AR, Schlauder GG, Romano L et al *Identification of a novel*

*variant of hepatitis E virus in Italy* J Med Virol 1999; 57: 350-360

65. Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG et al *Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model* J Clin Microbiol 2001;39:3040-6
66. De Deus N, Seminati C, Pina S et al *Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions* Vet Microbiol 2007; 119: 105-14
67. Nanda SK, Ansari IH, Acharya SK et al *Protracted viremia during acute sporadic hepatitis E virus infection* Gastroent 1995; 108: 225-30
68. Zhao ZY, Ruan B, Shao H et al *Detection of hepatitis E virus RNA in sera of patients with hepatitis E by polymerase chain reaction* Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2007, vol 6, n 1
69. Gupta DN, Smetana HF *The histopathology of viral hepatitis as seen in the Delhi epidemic (1955-56)* Indian J Med Res 1957;45(Suppl.):101-13

70. Chauhan A, Jameel S et al, *Hepatitis E virus transmission to a volunteer* Lancet 1993 Jan 16;341(8838):149-50
71. Clayson ET, Myint KS, Snitbhan R et al *Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E* J Infect Dis 1995; 172: 927-933
72. Khuroo MS, Kamili S, Dar MY et al *Hepatitis E and long-term antibody status* Lancet 1993;341:135
73. Chau KH, Dawson GJ, Bile KM et al *Detection of IgA class antibody to hepatitis E virus in serum samples from patients with hepatitis E virus infection.* J Med Virol 1993; 40(4):334-8
74. Acharya SK, Dasarathy S, Kumer TL et al *Fulminant hepatitis in a tropical population: clinical course, cause, and early predictors of outcome.* Hepatology 1996;23(6):1448-55
75. Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma JB, Murthy NS *Hepatitis E in pregnancy* Int J Gynaecol Obstet. 2004 ;85(3):240-4
76. Belabbes EH, Bouguermouh A, Benatallah A, Illoul G *Epidemic non-A, non-B viral hepatitis in Algeria: strong evidence for its*

*spreading by water.* J Med Virol. 1985;16(3):257-63

77. Pal R, Aggarwal R, Naik SR et al. *Immunological alterations in pregnant women with acute hepatitis E.* J Gastroenterol Hepatol 2005; 20 (7):1094-101.
78. Bista BK, Rana A *Acute hepatitis e in pregnancy - study of 16 cases.* JNMA J Nepal Med Assoc. 2006;45(161):182-5
79. Ramalingaswami V, Purcell RH *Waterborne non-A, non-B hepatitis.* Lancet 1988; 1 (8585): 571-3
80. Ghabrah TM, Stickland GT, Tsarev S et al. *Acute viral hepatitis in Saudi Arabia: seroepidemiological analysis, risk factors, clinical manifestations, and evidence for a sixth hepatitis agent.* Clin Infect Dis. 1995;21(3):621-7.
81. Bryan JP et al. *Epidemic hepatitis E in Pakistan: patterns of serologic response and evidence that antibody to hepatitis E virus protects against disease.* J Infect Dis. 1994 ;170(3):517-21
82. Aggarwal R, Krawczynski K *Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research.* Review J Gastrol

83. Zuag H, Cao XY, Liu CB et al *Enterically transmitted non A, non B hepatitis in China*. In Shitaka T, Purcell RH, Uccida T et al *Viral Hepatitis C, D, and E*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1991; 277-85
84. Purcell RH, Emerson SU. *Animal models of hepatitis A and E*. ILAR J. 2001;42(2):161-77. Review.
85. Zhang GS, Feng FM, Li YL et al *A study of chronic hepatitis B infection superinfected with hepatitis E infection* Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi 2006;14(12):906-8
86. KC S, Mishra AK, Shrestha R *Hepatitis E virus infection in chronic liver disease causes rapid decompensation*. JNMA J Nepal Med Assoc. 2006;45(161):212-5
87. Favorov MO, Fields HA, Purdy MA, Yashina TL et al *Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings*. J Med Virol. 1992 ;36(4):246-50
88. Arankalle VA, Goverdhan MK, Banerjee K *Antibodies against hepatitis E virus in Old World monkeys* J Viral Hepat 1994;1:125-9

89. Favorov MO, Khudyakov YE, Mast EE et al *IgM and IgG antibodies to hepatitis E virus (HEV) detected by an enzyme immunoassay based on an HEV-specific artificial recombinant mosaic protein* J Med Virol 1996; 50(1):50-8
90. Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH *Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group* Hepatology, 1998; 27 (3):857-61.
91. Goldsmith R, Yarbough PO, Reyes GR, Fry KE, Gabor KA, Kamel M, Zakaria S, Amer S, Gaffar Y *Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in Egyptian children.* Lancet, 1992; 339 (8789):328-31
92. Li F, Zhuang H, Kolivas S, Locarnini SA, Anderson DA. *Persistent and transient antibody responses to hepatitis E virus detected by western immunoblot using open reading frame 2 and 3 and glutathione S-transferase fusion proteins.* J Clin Microbiol. 1994 Sep;32(9):2060-6
93. Longer CF, Denny SL, Caudill JD et al *Experimental hepatitis E:*

*pathogenesis in cynomolgus macaques (Macaca fascicularis)* J Infect Dis 1993;168:602-9

94. Bradley DW, Krawczynski K et al *Enterically transmitted non A, non B hepatitis: Etiology of disease and laboratory studies in nonhuman primates* In Zuckermann AJ *Viral Hepatitis and Liver disease* New York: Alan R Liss, 1988; 138-47

95. Tsarev SA, Tsarev a TS, Emerson SU et al *Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge* Vaccine 1997;15(17-18):1834-8

96. Zhou YH, Purcell RH, Emerson SU *A truncated ORF2 protein contains the most immunogenic site on ORF2: antibody responses to non-vaccine sequences following challenge of vaccinated and non-vaccinated macaques with hepatitis E virus.* Vaccine, 2005; 23 (24): 3157-65

97. Li SW, Zhang J, Li YM et al. *A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates.* Vaccine, 2005; 23(22): 2893-901

98. Zhang M, Emerson SU, Nguyen H et al *Recombinant vaccine against*

*hepatitis E: duration of protective immunity in rhesus macaques*  
Vaccine 2002 10;20(27-28):3285-91

99. Wang L e Zhuang H *Hepatitis E: An overview and recent advances in vaccine research* World J Gastroenterol 2004;10(15):2157-2162

100. Mas A, Rodes J *Fulminant hepatic failure*. Lancet 1997; 349: 1081-1085.

101. Li TC, Suzaki Y, Ami Y et al *Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles* Vaccine 2004; 22(3-4):370-7

102. Shrestha MP, McNair Scott R, Joshi DM *Safety and Efficacy of a Recombinant Hepatitis E Vaccine* N Engl J Med 2007; 356:895-903

103. Purcell RH, Nguyen H, Shapiro M *Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine* Vaccine 2003 Jun 2;21(19-20):2607-15

104. Guo H, Zhou EM, Sun ZF, Meng XJ *Protection of chickens against avian hepatitis E virus (avian HEV) infection by immunization with recombinant avian HEV capsid protein* Vaccine. 2007; 25 (15): 2892-

9.

105. Paradisi F., Bartoloni A., *Scientific research and health cooperation in Bolivia. Primo contributo dell' Università di Firenze allo studio delle realtà ambientali dell' America Latina. Atti*, 1991.
106. Cancrini G., Bartoloni A., Nunez L.E., Paradisi F. *Esperienze di parassitologia medica in Bolivia. Rivista di Parassitologia* 1988; 5, (Suppl.): 23-25.
107. Bartoloni A., Aquilini D., Roselli M., Parri F., De Majo E., Nunez L.E., Corti G., Paradisi F. *Serological survey of antibodies to cytomegalovirus in the Santa Cruz region of Bolivia. Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1989; 92, 391-2.
108. Bartoloni A., Paradisi F., Aquilini D., Roselli M., Rivero R., Nunez L., De Majo E., Parri F. *Absence of HIV infection in low- and high-risk groups in the Santa Cruz region, Bolivia. AIDS* 1989; 3, 184-5.
109. Paradisi F., Bartoloni A., Aquilini D., Roselli M., Nunez L., Manzone G., De Majo E., Parri F. *Serological survey of toxoplasmosis in the Santa Cruz region of Bolivia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1989; 83, 213-

4.

110. Bartoloni A., Aquilini D., Roselli M., Parri F., De Majo E., Nunez L., Nicoletti P., Corti G., Paradisi F. *Prevalence of antibody to hepatitis A virus in the Santa Cruz region of Bolivia*. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1989; 92, 279-81.

111. Bartoloni A., Aquilini D., Roselli M., Darras C., Colao M.G., De Majo E., Parri F. *Seroepidemiological study of HIV antibody prevalence in the Santa Cruz region, Bolivia*. Bollettino dell'Istituto Sieroterapico Milanese 1989; 68, 97.

112. Bartoloni A., Cancrini G., Guglielmetti P., Roselli M., Pereira L. *Prevalenza della malaria in tre aree del Dipartimento di Santa Cruz, Bolivia*. Parassitologia 1990; 32, Suppl.1, 13-14.

113. Bartoloni A., Colao M.G., Roselli M., Orsi A., Aquilini D., Corti G., Gamboa H., Paradisi F. *Antimicrobial agent susceptibility patterns of staphylococci isolated in urban and rural areas of Bolivia*. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1990; 93, 360-364.

114. Bartoloni A., Guglielmetti P., Cancrini G., Gamboa H., Roselli M., Nicoletti A., Paradisi F. *Comparative efficacy of a single 400 mg*

*dose of albendazole or mebendazole in the treatment of nematode infections in children.* Tropical and Geographical Medicine 1993; 45, 114-6.

115. Bartoloni A., Guglielmetti P., Salazar E., Nicoletti A., Difonzo A.R., Roselli M., Anichini P., Cancrini G. *Anchilostomiasi e bilancio ematico del ferro in bambini residenti in due comunità rurali della Bolivia.* Parassitologia 1994; 36, Suppl.1, 12.

116. Bartoloni A., Guglielmetti P., Salazar E., Nicoletti A., Difonzo A.R., Roselli M., Anichini P., Cancrini G. *The relationship between haematological measurements and hookworm intensity in children of two rural Bolivian communities.* Giornale Italiano di Malattie Infettive 1995; 1, 45-50.

117. Cutts F.T., Bartoloni A. et al. *Prevalence of measles antibody among children under 15 years of age in Santa Cruz, Bolivia: implications for vaccination strategies.* Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1995; 89, 119-122.

118. Ciceroni L., Bartoloni A., Ciarrocchi S., Pinto A., Guglielmetti P., Valdez C., Gamboa H., Roselli M., Paradisi F *Serological survey for antibodies to Borrelia burgdorferi in sheep, goats and dogs in*

*Cordillera Province, Bolivia. Journal of Veterinary Medicine* 1997; 44, 133-137.

119. Bartoloni A., Cutts F.T., Guglielmetti P., Brown D., Bianchi Bandinelli M.L., Hurtado H., Roselli M. *Response to measles revaccination among Bolivian school-aged children. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1997; 91, 716-718.

120. Ciceroni L., Bartoloni A., Pinto A., Guglielmetti P., Valdez Vasquez C., Gamboa Barahona H., Roselli M., Giannico F., Paradisi F. *Serological survey of leptospiral infections in sheep, goats and dogs in Cordillera province, Bolivia. Microbiologia* 1997; 20, 77-81.

121. Cancrini G., Bartoloni A., Zaffaroni E., Guglielmetti P., Gamboa H., Nicoletti A., Genchi C. (1998). *Seroprevalence of Toxocara canis-IgG antibodies in two rural Bolivian communities. Parassitologia* 1998; 40, 473-5.

122. Bartoloni A., Cutts F.T., Leoni S., Austin C.C., Mantella A., Guglielmetti P., Roselli M., Salazar E., Paradisi F. *Patterns of antimicrobial use and antimicrobial resistance among healthy children in Bolivia. Tropical Medicine and International Health* 1998;

3, 116-123.

123. Bartoloni A. *Antimicrobial use and antimicrobial resistance among healthy children in Bolivia*. APUA Newsletter 1998; 3, 1-2.
124. Bartoloni A., Cancrini G., Bartalesi F., Nicoletti A., Mendez Prado G., Rosado J., Roselli M., Paradisi F. *Anticuerpos contra Trichinella spiralis en la población rural de la provincia Cordillera, Bolivia*. Revista Panamericana de Salud Publica 1999; 5, 97-99.
125. Bartoloni A. et al. *Mansonella ozzardi infection in Bolivia: prevalence and clinical associations in the Chaco region*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1999; 61, 830-3.
126. Bartoloni A et al. *Increasing Resistance in Commensal Escherichia coli, Bolivia and Peru*. Emerg Infect Dis. 2008 Feb;14(2):338-340.
127. Pallecchi L, Lucchetti C, Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Gamboa H, Carattoli A, Paradisi F, Rossolini GM. *Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure*. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Apr;51(4):1179-84.

128. Bartoloni A et al. *Multidrug-resistant commensal Escherichia coli in children, Peru and Bolivia*. Emerg Infect Dis. 2006 Jun;12(6):907-13.
129. Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Dell'Amico E, Roselli M, Strohmeyer M, Barahona HG, Barrón VP, Paradisi F, Rossolini GM. *High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption*. J Infect Dis. 2004 Apr 1;189(7):1291-4
130. Nicoletti A., Reggio A., Bartoloni A., Failla G., Bartalesi F., Roselli M., Gamboa H., Salazar E., Paradisi F., Tempera G., Hall A. *A neuroepidemiological survey in rural Bolivia: backgrounds and methods*. Neuroepidemiology 1998; 17, 273-280.
131. Nicoletti A., Reggio A., Bartoloni A., Failla G., Sofia V., Bartalesi F., Roselli M., Gamboa H., Salazar E., Osinaga R., Paradisi F., Tempera G., Dumas M., Hall A.J. *Prevalence of epilepsy in rural Bolivia*. Neurology 1999; 53, 2064-9.
132. Nicoletti A., Sofia V., Giuffrida S., Bartoloni A., Bartalesi F., Lo Bartolo M.L., Lo Fermo S., Cocuzza V., Gamboa H. Salazar E., Reggio A. *Prevalence of stroke: a door-to-door survey in rural Bolivia*. Stroke 2000; 31, 882-5.

133. Nicoletti A., Sofia V., Bartoloni A., Bartalesi F., Marletta C., Lo Bartolo M.L., Rosado J., Le Pira F., Reggio A. *Lifetime prevalence of Bell's palsy in rural Bolivia: a door-to-door survey.* Neuroepidemiology 2002; 21, 100-104.
134. Nicoletti A., Bartoloni A., et al. *Epilepsy, cysticercosis and toxocariasis. A population-based case-control study in rural Bolivia.* Neurology 2002; 58, 1256-1261.
135. Ibarra H, Riedemann S, Reinhardt G *Prevalence of hepatitis E virus antibodies in blood donors and other population groups in southern Chile* Rev Med Chil 1997 Mar;125(3):275-8
136. Pujol FH, Favorov MO, Marcano T et al *Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela* J Med Virol 1994 Mar;42(3):234-6
137. Bartolomiero AL, Bonametti AM, Morimoto HK et al *Seroprevalence for Hepatitis E virus (HEV) infection among volunteer blood donors of the regional blood bank of Londrina, state*

*of Paraná, Brazil* Rev Inst Med Trop S.Paulo 2006 48:87-92

138.Konomi N, Miyoshi C, La Fuente Zerain C et al *Epidemiology of Hepatitis B, C, E, and G Virus Infections and Molecular Analysis of Hepatitis G Virus Isolates in Bolivia* J Clin Microbiol 1999; 31(10): 3291–3295

139.Munnã MS, Vladimírsky S, Otegui L et al *Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina* J Med Virol 2006;78(12):1579-83

140. CIA, *The World Factbook-Bolivia 2008*  
[www.cia.gov/library/publications](http://www.cia.gov/library/publications)

141.Unidad de Anàlisis de Políticas Econòmicas: Bolivia, “*Diagnostico de pobreza 2000*”, giugno 2000

142.*Evaluación Comùn de Paìs, Sistema de las Naciones Unidas en Bolivia*, La Paz, 2000.

143.Instituto Nacional de Estadística de Bolivia, INE, “*Censo Nacional de Población y Vivienda*”, 2002. La Paz, Bolivia.

144. *Encuesta Nacional de Demografía y Salud*, ENDSA, La Paz, Bolivia, 1994.

145. UNAIDS/WHO, “*Epidemiological Fact Sheets on HIV/AIDS and Sexually Transmitted Infections*”, Update, 2002