

# *Alma Mater Studiorum – Università di Bologna*

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

## **Epidemiologia e controllo delle zoonosi**

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: **07/H3**

Settore Scientifico disciplinare: **VET 05**

### ***EPIDEMIOLOGIA E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI VIRUS EMERGENTI RESPONSABILI DI ZONOSI: CALICIVIRUS E VIRUS DELL'EPATITE E.***

Presentata da: **Dott.ssa Eleonora Ponterio**

Coordinatore Dottorato

**Prof. Giovanni Poglayen**

Relatore

**prof. Fabio Ostanello**

Correlatore

**Dott. Franco Maria Ruggeri**

**Esame finale anno 2012**

# *Indice*

<b>Introduzione</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPITOLO 1: HEV</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 CENNI STORICI</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 MORFOLOGIA, ORGANIZZAZIONE GENOMICA E REPLICAZIONE</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 MORFOLOGIA E PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE .....	5
1.2.2 ORGANIZZAZIONE GENOMICA .....	6
1.2.3 CICLO REPLICATIVO .....	8
1.2.4 GENOTIPI VIRALI .....	10
<b>1.3 EPIDEMIOLOGIA</b> .....	<b>12</b>
1.3.1 EPIDEMIOLOGIA NELL'UOMO .....	12
1.3.2 L'INFEZIONE NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO .....	14
1.3.3 L'INFEZIONE NEI PAESI INDUSTRIALIZZATI .....	16
<b>1.4 EPIDEMIOLOGIA NELLE SPECIE ANIMALI</b> .....	<b>16</b>
<b>1.5 PATOGENESI E SINTOMATOLOGIA</b> .....	<b>19</b>
1.5.1 LA MALATTIA NELL'UOMO .....	19
1.5.2 LA MALATTIA NEL SUINO.....	20
<b>1.6 ASPETTI ZOOTICI</b> .....	<b>21</b>
1.6.1 INFEZIONE INTERSPECIFICA: CROSS-SPECIE.....	<b>23</b>
<b>1.7 SICUREZZA ALIMENTARE E AMBIENTALE</b> .....	<b>24</b>
<b>CAPITOLO 2: CALICIVIRUS</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1 CENNI STORICI</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2 CLASSIFICAZIONE</b> .....	<b>29</b>
<b>2.3 ORGANIZZAZIONE DEL GENOMA</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4 EPIDEMIOLOGIA DEI CALICIVIRUS</b> .....	<b>34</b>
<b>2.5 RELAZIONI FILOGENETICHE NEL GENERE NOROVIRUS</b> .....	<b>37</b>
2.5.1 RELAZIONI ANTIGENICHE .....	38
2.5.2 REPLICAZIONE DI NOROVIRUS ED ESPRESSIONE DEL GENOMA.....	39
2.5.3 PROTEINE STRUTTURALI .....	41
2.5.4 NOROVIRUS, MALATTIA E PATOLOGIA.....	44
2.5.5 EPIDEMIOLOGIA NELL'UOMO.....	46
2.5.6 TRASMISSIONE DI NOROVIRUS.....	48

2.5.7 EPIDEMIOLOGIA NEGLI ANIMALI .....	56
2.5.8 MALATTIA NEGLI ANIMALI.....	57
<b>2.6 PROFILASSI VACCINALE E DISINFEZIONE .....</b>	<b>58</b>
<b>2.7 EZIOLOGIA: Sapovirus .....</b>	<b>59</b>
2.7.1 INTRODUZIONE.....	59
2.7.2 ORGANIZZAZIONE GENOMICA.....	60
2.7.3 STUDI EPIDEMIOLOGICI E AMBIENTALI.....	61
2.7.4 SAPOVIRUS NEGLI ANIMALI.....	63
2.7.5 MALATTIA NEGLI ANIMALI.....	64
2.8 NOROVIRUS E SAPOVIRUS: AGENTI DI ZONOSI? .....	64
<b>2.8.1 RICOMBINANTI TRA CALICIVIRUS ANIMALI E UMANI.....</b>	<b>64</b>
SEZIONE SPERIMENTALE: <i>VIRUS DELL'EPATITE E</i> .....	67
CAPITOLO 3: Caratterizzazione antigenica e molecolare di HEV.....	68
<b>3.1 ESPRESSIONE DI ANTIGENI VIRALI MEDIANTE IL SISTEMA BACULOVIRUS E PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI.....</b>	<b>69</b>
3.1.1 INTRODUZIONE .....	69
3.1.2 MATERIALI E METODI .....	70
3.1.3 RISULTATI.....	76
3.1.4 DISCUSSIONE.....	83
<b>3.2 SISTEMA D'ESPRESSIONE: SEMLIKI FOREST VIRUS REPLICON .....</b>	<b>85</b>
3.2.1 INTRODUZIONE .....	85
3.2.2 MATERIALI E METODI .....	86
3.2.3 RISULTATI.....	88
3.2.4 DISCUSSIONE.....	89
<b>3.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI RIPORTATI NEL CAPITOLO .....</b>	<b>90</b>
CAPITOLO 4: Epidemiologia di HEV.....	92
<b>4.1 PRESENZA DI HEV IN SUINI AL MACELLO IN ITALIA.....</b>	<b>92</b>
4.1.1 INTRODUZIONE.....	92
4.1.2 MATERIALI E METODI .....	93
4.1.3 RISULTATI.....	97
4.1.4 DISCUSSIONE .....	101
<b>4.2 VALUTAZIONE DI METODI PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI INFEZIONE DA HEV IN SUINI DOMESTICI E SELVATICI .....</b>	<b>104</b>
4.2.1 INTRODUZIONE.....	104
4.2.2 MATERIALI E METODI .....	105

4.2.3 RISULTATI.....	108
4.2.4 DISCUSSIONE .....	113
<b>4.3 RICERCA DI ANTICORPI ANTI HEV IN SIERI UMANI UTILIZZANDO LA PROTEINA CAPSIDICA RICOMBINANTE DEL CEPPLO ITALIANO SUINO g3 .....</b>	<b>115</b>
4.3.1 INTRODUZIONE.....	115
4.3.2 MATERIALI E METODI .....	116
4.3.3 RISULTATI.....	117
4.3.4 DISCUSSIONE .....	117
<b>4.4 DISCUSSIONE DEI RISULTATI RIPORTATI NEL CAPITOLO.....</b>	<b>119</b>
<b>SEZIONE SPERIMENTALE: CALICIVIRUS .....</b>	<b>122</b>
<b>CAPITOLO 5: NOROVIRUS E SAPOVIRUS: EPIDEMIOLOGIA .....</b>	<b>123</b>
<b>5.1 IDENTIFICAZIONE DI CEPPI DI SAPOVIRUS E NOROVIRUS IN SUINI ASINTOMATICI IN ALLEVAMENTI DELL’EMILIA ROMAGNA. ....</b>	<b>124</b>
5.1.2 INTRODUZIONE.....	124
5.1.2 MATERIALI E METODI .....	125
5.1.3 RISULTATI.....	125
5.1.4 DISCUSSIONE .....	127
<b>CAPITOLO 6: Norovirus bovino (BEC): possibile agente di zoonosi?.....</b>	<b>129</b>
<b>6.1 RICERCA DI NOROVIRUS IN BOVINI ALLEVATI NEL NORD ITALIA .....</b>	<b>130</b>
6.1.1 INTRODUZIONE.....	130
6.1.2 MATERIALI E METODI .....	130
6.1.3 RISULTATI.....	131
6.1.4 DISCUSSIONE .....	132
<b>6.2 RICERCA DI ANTICORPI DIRETTI CONTRO NOROVIRUS BOVINO E UMANO IN SIERI DI VETERINARI ITALIANI.....</b>	<b>133</b>
6.2.1 INTRODUZIONE.....	133
6.2.1 MATERIALI E METODI .....	133
6.2.3 RISULTATI.....	134
6.2.4 DISCUSSIONE .....	135
<b>6.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI RIPORTATI NEL CAPITOLO.....</b>	<b>136</b>
<b>Capitolo 7. Produzione di un anticorpo monoclonale per esperimenti di immuno cattura .....</b>	<b>138</b>
7.1 INTRODUZIONE.....	138
7.2 MATERIALI E METODI .....	139
7.2 RISULTATI.....	141
7.3 DISCUSSIONE .....	144

<b>Capitolo 8: Attivazione <i>ex-vivo</i> del sistema immunitario con VLP (virus like particle) di Norovirus umano</b>	
<b>Gli.4.</b> .....	<b>146</b>
8.1 INTRODUZIONE.....	146
8.2 MATERIALI E METODI .....	147
8.3 RISULTATI.....	149
8.4 DISCUSSIONE .....	153
<b>Capitolo 9. Conclusioni .....</b>	<b>155</b>
<b>Ringraziamenti.....</b>	<b>161</b>
<b>PUBBLICAZIONI.....</b>	<b>162</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>163</b>

## *Introduzione*

La diversità biologica riscontrabile nei virus è di gran lunga superiore rispetto a quella complessivamente mostrata dagli altri organismi batterici, vegetali e animali. Questa situazione è determinata dalla capacità dimostrata dai virus di parassitare tutti i gruppi di organismi viventi conosciuti, e la conoscenza di tale diversità è la chiave per comprendere l'interazione dei virus con i loro ospiti.

Oggi si conoscono numerose malattie ad eziologia virale, e sono di origine virale alcune delle malattie emergenti negli ultimi anni (SARS, influenza da ceppi ad alta patogenicità) o che potrebbero avere, nei prossimi anni, un ampliamento del loro bacino di diffusione (West Nile Disease e altre patologie trasmesse da vettori). Molte di esse, considerate emergenti o riemergenti, sono delle zoonosi, il cui studio è reso complicato dalla presenza serbatoi animali, spesso asintomatici, per cui l'infezione è identificabile solo con un attento piano di monitoraggio e sorveglianza.

Inoltre, i dati epidemiologici e clinici dimostrano che i virus stanno assumendo una crescente importanza come causa di malattie trasmesse con gli alimenti. Il primato dei batteri quali causa di gastroenteriti legate al consumo di alimenti viene di anno in anno ridimensionato rispetto al ruolo emergente dei virus, primi tra tutti i norovirus, il cui ruolo è ancora largamente sottostimato, e il virus dell'epatite E.

Già nel 2004, nel rapporto sulle zoonosi in Europa elaborato dal RIVM (National Institute for Public Health and the Environment, Olanda) sono stati indicati alcuni criteri che devono essere utilizzati per la prioritizzazione nel caso di malattie emergenti, in particolare:

- presenza attuale o futura di uno o più fattori di rischio;
- velocità di trasmissione;
- trasmissione persona-persona;
- incidenza-prevalenza-presenza;
- disponibilità di trattamenti preventivi o vaccinazione;
- costo;
- percezione del rischio.

Appare chiaro che molte zoonosi virali soddisfano la maggior parte di tali criteri.

Già nel documento programmatico della Commissione Europea (DG SANCO) del 2006 in tema di zoonosi e nella Direttiva Comunitaria relativa alla sorveglianza delle zoonosi (Dir. 2003/99/EC), è stata riconosciuta l'importanza dell'attuazione di piani di monitoraggio delle zoonosi, includendo per la prima volta anche i calicivirus. Similmente, nella redazione dei nuovi criteri di inclusione tra le malattie denunciabili stabilite dall'OIE (Office International des Epizooties Annual Reports; OIE, 2006) il virus dell'Epatite E è stato incluso nelle liste del Terrestrial Animal Health Code.

Alla luce di ciò, il lavoro sperimentale condotto durante il Dottorato di Ricerca in Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi è stato focalizzato sull'approfondimento di aspetti epidemiologici e molecolari dell'infezione da virus dell'epatite E (HEV) e dei calicivirus, responsabili entrambi di casi di malattia clinica nell'uomo e segnalati con crescente frequenza nel mondo. E' stata in particolare investigata la correlazione filogenetica di ceppi circolanti negli animali e nell'uomo nell'ambito dello stesso territorio geografico, allo scopo di valutare il potenziale zoonotico di questi virus.

L'ultima parte della tesi è stata focalizzata su norovirus umano, con particolare riguardo alla risposta immunitaria indotta *ex vivo* in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells) e alla risposta anticorpale indotta *in vivo*, nei topi. L'assenza di colture cellulare per questo virus ha fino ad oggi limitato l'acquisizione di nuove conoscenze sulla risposta immunitaria nel corso dell'infezione naturale. Gli studi presentati hanno ovviato a questo limite utilizzando antigeni ricombinanti.

Le informazioni acquisite dal progetto del dottorato hanno contribuito a chiarire i meccanismi della risposta immunitaria attivata dal virus, e la diffusione dell'infezione dei virus studiati soprattutto in ambito nazionale, anche al fine di fornire indicazioni elementi conoscitivi utili a definire il rischio sanitario connesso alla presenza di queste infezioni negli allevamenti, nei macelli e in campioni ambientali (acque reflue).

Parte generale:  
VIRUS DELL'EPATITE E

# CAPITOLO 1: HEV

## 1.1 CENNI STORICI

L'infezione da virus dell'epatite E è attualmente considerata un problema emergente di sanità pubblica. Si stima che 2.3 milioni di persone siano state infettate nel mondo (World Health Organization: Viral hepatitis, 2010). L'epatite E, prima riconosciuta tra le epatiti virali acute non-A, non-B, non-C, è una malattia infettiva con caratteristiche cliniche di epatite acuta non soggetta a cronicizzazione. La prima segnalazione si è avuta nel 1955 a New Delhi (Viswanathan *et al.*, 1957); il focolaio epidemico coinvolse 30.000 persone e fu causato dal consumo di acqua contaminata. L'agente eziologico, identificato nell'uomo all'inizio degli anni '80, fu denominato virus dell'epatite E (Hepatitis E Virus - HEV) (HEV, E = "enterico, epidemico e endemico"), in conformità con gli standard di nomenclatura delle epatiti virali.

La prima identificazione del virus dell'epatite E nell'uomo, avvenuta tramite l'utilizzo del microscopio elettronico, risale alla metà degli anni '70 (Feinstone *et al.*, 1975); tale virus fu temporaneamente classificato nella famiglia *Picornaviridae* (Panda *et al.*, 2007). La conferma che l'agente eziologico fosse un virus a RNA venne anni dopo, nel 1990, quando l'RNA del virus dell'epatite E fu clonato per la prima volta (Reyes *et al.*, 1990). Il genoma di HEV, di 7,6 Kb, differiva da tutti quelli fino a quel momento identificati, e il virus fu inizialmente riclassificato come un nuovo genere della famiglia *Caliciviridae* (Tam *et al.*, 1991), poi modificato. Oggi, il virus HEV è l'unico membro appartenente al genere *Hepevirus* della famiglia *Hepeviridae* (Emerson *et al.*, 2004). L'agente eziologico dell'epatite E è un piccolo virus a RNA privo di envelope, trasmesso principalmente per via oro-fecale (Purcell & Emerson, 2001; Meng *et al.*, 2010). Negli ultimi decenni sono stati fatti grandi progressi sulla conoscenza dell'epidemiologia, sui serbatoi animali, sulla patogenesi, sulla struttura e biologia molecolare di HEV. La messa in evidenza del genoma di HEV nei suini (Meng, *et al.* 1997), polli (Haqshenas *et al.*, 2001), conigli (Zhao *et al.*, 2009), cervi (Takahashi *et al.*, 2004) e manguste (Nakamura *et al.*, 2006), e il rilevamento della presenza di anticorpi specifici anti-HEV in altre specie animali: in topi, polli, cani, vacche, pecore, capre, scimmie, manguste, cavie, suini, cinghiali, cervi, gatti, cavalli, uccelli, bufali (Meng *et al.*, 2010)

portano a ritenere che lo spettro degli ospiti e della diversità di HEV sia anche più ampia di quanto fino ad oggi scoperto.

Il primo ceppo di HEV di origine suina fu identificato nel 1997 negli Stati Uniti. Il virus si rivelò simile ma non identico ai ceppi circolanti nell'uomo nello stesso territorio: il gene ORF2 mostrava il 79-80% d'identità a livello nucleotidico e il 90-92% a livello amminoacidico con la stessa regione dei ceppi umani (Meng *et al.*, 1997). Dal momento della sua scoperta, swine-HEV è stato identificato in suini provenienti da tutto il mondo (Schlauder *et al.*, 1999; van der Poel *et al.*, 2001; Nishizawa *et al.*, 2003; Banks *et al.*, 2004a; Preiss *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2006; Caprioli *et al.*, 2007; Dalton *et al.*, 2007a; Jung *et al.*, 2007; Di Bartolo *et al.*, 2008; Seminati *et al.*, 2008; Ning *et al.*, 2008; Di Bartolo *et al.*, 2011), e si è sempre rivelato molto simile ai ceppi circolanti nell'uomo nelle stesse aree, tranne che in India, dove i ceppi circolanti nelle due specie sembrano essere distinti (Arankalle *et al.*, 2002; Shukla *et al.*, 2007). Alcuni studi hanno riportato un'elevata prevalenza anticorpale anti-HEV anche in soggetti professionalmente esposti al contatto con suini (Drobeniuc *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2002; Withers *et al.*, 2002). L'evidenza diretta della possibilità di trasmissione zoonosica di HEV è infine arrivata nel 2003 dal Giappone, dove alcuni casi di epatite E sono stati associati all'ingestione di carne o organi crudi di suino, cinghiale e cervo poche settimane prima dell'inizio dei sintomi (Matsuda *et al.*, 2003; Tamada *et al.*, 2004; Yazaki *et al.*, 2003). L'epatite E è ora riconosciuta come una zoonosi, come di recente sottolineato in un Report redatto dal panel di esperti sui pericoli biologici dell'EFSA (EFSA Panel on Biological Hazards, 2011). I suini domestici e selvatici (cinghiale) e il cervo sono considerati serbatoi per il virus (Meng *et al.*, 2003, Meng *et al.*, 2010). Inoltre, la costruzione di cloni infettivi di HEV e lo sviluppo di modelli animali quali suini e polli offrono oggi anche l'opportunità di investigare le basi molecolari della replicazione di HEV e la sua patogenesi (Halbur *et al.*, 2001; Billam *et al.*, 2005).

## **1.2 MORFOLOGIA, ORGANIZZAZIONE GENOMICA E REPLICAZIONE**

### **1.2.1 MORFOLOGIA E PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE**

HEV è un virus sferico con un diametro di circa 32-34 nm, presenta simmetria icosaedrica ed è privo di envelope. Il genoma è costituito da una molecola di RNA a singolo filamento con polarità positiva, che presenta un *cap* all'estremità 5' ed una coda poly-(A) all'estremità 3'. I virioni sono

costituiti dalla proteina maggiore del capsido, di dimensioni di 72 kDa, e da una piccola proteina (1,5 kDa), la cui funzione è tuttora sconosciuta (Fauquet *et al.*, 2005).

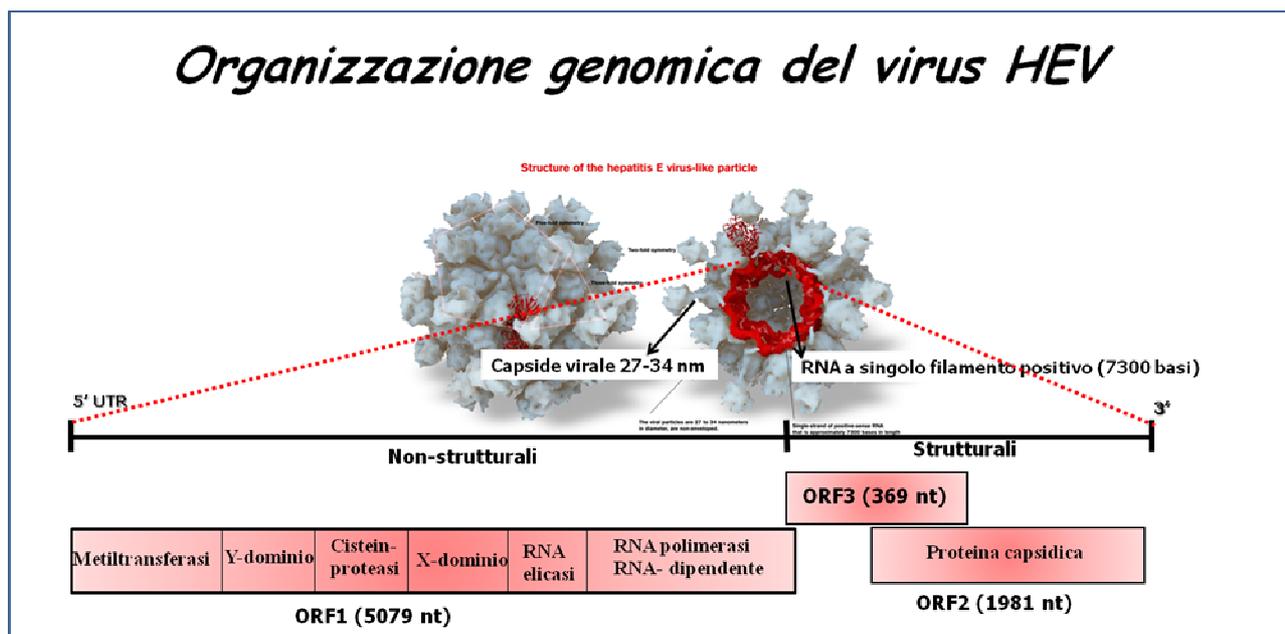
Le particelle di HEV sono sensibili a basse temperature di conservazione e a disinfettanti iodati (Purcell e Emerson, 2001).

Si ritiene che HEV sia in grado di tollerare cambiamenti di pH da condizioni moderatamente alcaline ad acide, assicurando la sopravvivenza nel tratto gastrointestinale durante la trasmissione oro-fecale, ma non sembra tollerare elevate concentrazioni di sali (Panda *et al.*, 2007; Purcell e Emerson, 2001).

Per quanto riguarda la resistenza del virus al calore, esistono diversi studi a riguardo. In uno di questi, è stata comparata la stabilità termica di diversi ceppi di HEV tramite incubazione di sospensioni fecali del virus a differenti temperature, e successiva infezione in colture cellulari permissive. Sono stati esaminati diversi ceppi, che hanno mostrato un'inattivazione totale a temperature superiori ai 60°C (Feagins *et al.*, 2008), anche se la crescita *in vitro* scarsamente efficiente del virus ha reso difficili prove conclusive. E' stato comunque dimostrato che solo campioni di fegato incubati a 56°C contenevano virus ancora infettante. Questo ha dimostrato che l'infettività di HEV presente in fegati suini commercializzati è completamente inattivata mediante adeguata cottura. Sebbene HEV si sia dimostrato meno stabile al calore rispetto al virus dell'epatite A, alcuni ceppi di HEV potrebbero sopravvivere alle temperature interne della carne non adeguatamente cotta (Emerson *et al.*, 2005).

### 1.2.2 ORGANIZZAZIONE GENOMICA

Il genoma virale è costituito da una molecola di RNA a singolo filamento con orientamento positivo, di circa 7,2 kb (Meng, 2009; Tam *et al.*, 1991). La regione codificante è preceduta da una corta regione non codificante (UTR, *untranslated region*) di circa 25 nucleotidi, ed è seguita da una seconda UTR più lunga (65-74 nucleotidi) e da una estremità poly-(A) (Okamoto, 2007). La regione codificante è costituita da tre *Open Reading Frames* (ORFs), denominate ORF1, ORF2 e ORF3, parzialmente sovrapposte (Tam *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2002) (Figura 1.1).



**Figura 1.1:** Rappresentazione schematica del genoma di HEV (da: Panda *et al.*, 2007, modificata).

Il gene della ORF1, che misura approssimativamente 5 kb, è localizzato all'estremità 5' del genoma virale e codifica per una poliproteina di circa 1693 amminoacidi, comprendente proteine non strutturali, coinvolte nella replicazione del genoma e nella maturazione delle proteine virali. In particolare, la sequenza di tale poliproteina contiene domini caratteristici per una metiltransferasi virale, una cisteina proteasi papaina-simile, una elicasi e una RNA polimerasi RNA-dipendente (Aggarwal e Krawczynski, 2000; Koonin *et al.*, 1992). In aggiunta, la ORF1 possiede due regioni chiamate domini X e Y, di funzione sconosciuta.

La ORF2 misura approssimativamente 2 kb, è localizzata all'estremità 3' del genoma virale e codifica per la proteina strutturale del capsido, di 660 amminoacidi. Si tratta di una glicoproteina con un peso molecolare di 72 kDa, caratterizzata dalla presenza di aminoglicani e da una regione ricca di arginina e lisina all'estremità N-terminale, la quale costituisce il sito di aggancio al reticolo endoplasmatico. Inizialmente sintetizzata come precursore, la proteina capsidica viene in seguito processata tramite clivaggio in una proteina matura e glicosilata in tre siti (fenomeno frequente nelle proteine dell'envelope, ma raro per una proteina capsidica). La proteina capsidica codificata dalla regione ORF2 (pORF2) contiene epitopi immunogenici, è responsabile della risposta anticorpale, e rappresenta il bersaglio per lo sviluppo di vaccini (Meng 2009; Aggarwal e Krawczynski, 2000).

La ORF3 è una regione di circa 366-369 nucleotidi che si sovrappone alla ORF2. Codifica per una piccola fosfoproteina immunogenica di 123 amminoacidi (pORF3), di funzione ancora non ben

definita ma che sembra interagire con la pORF2 (Okamoto, 2007). E' stato ipotizzato che pORF3 sia in grado di associarsi al citoscheletro delle cellule epatiche fungendo da sito di ancoraggio nel quale la pORF2 e l'RNA possono avviare il processo di assemblaggio del nucleocapside virale (Wang e Zhuang, 2004).

Solo negli ultimi anni, sono stati descritti in letteratura sistemi di crescita del virus *in vitro*, i quali risultano tuttavia poco efficienti (Okamoto *et al.*, 2011). Conseguentemente, ad oggi la diagnosi e la caratterizzazione dei ceppi sono basate sull'analisi dell'RNA virale mediante tecniche biomolecolari (Panda *et al.*, 2007).

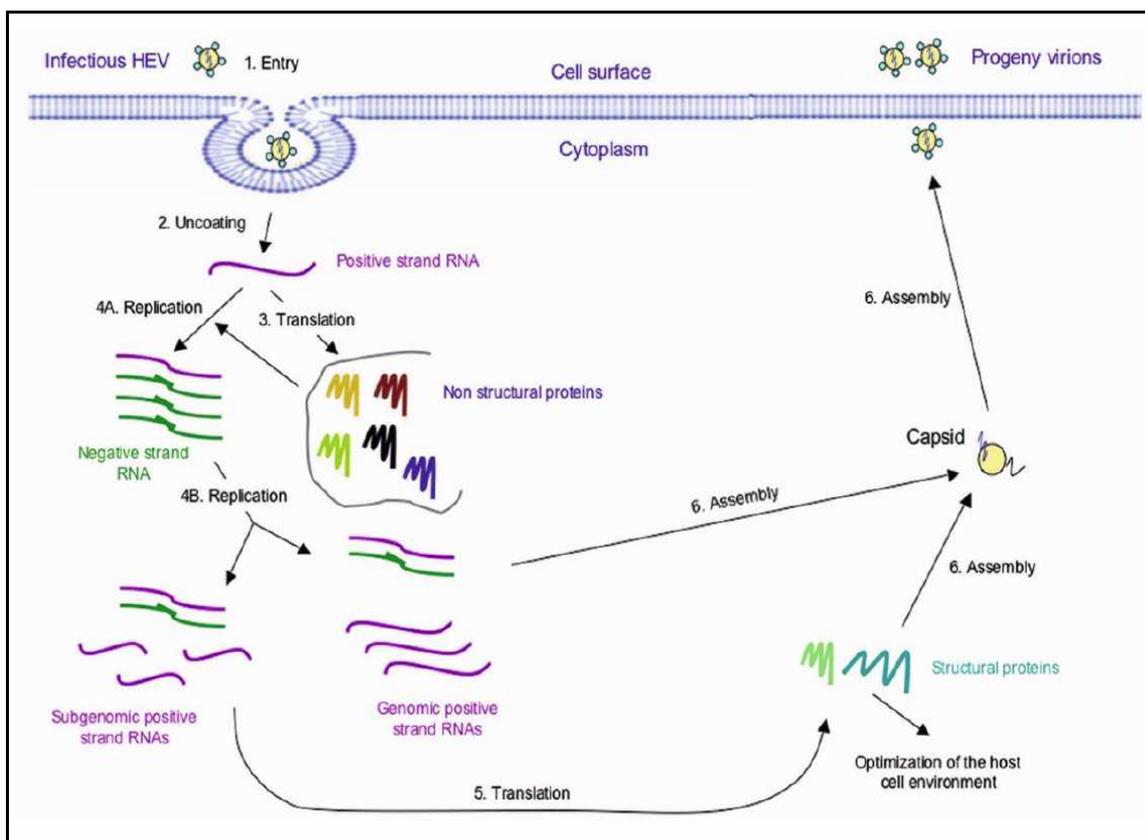
### 1.2.3 CICLO REPLICATIVO

Recentemente, una rassegna dei diversi sistemi di colture cellulari utilizzati per isolare ceppi di HEV è stata presentata da Okamoto e colleghi (Okamoto *et al.*, 2011). Già nel 2006 Tanaka e colleghi (Tanaka *et al.*, 2006) avevano condotto uno studio comparativo dei metodi di coltivazione di HEV su 21 linee cellulari epatiche di derivazione umana, di scimmia o suina. Nel 2007, gli stessi autori (Tanaka *et al.*, 2007) hanno dimostrato che è possibile sviluppare un sistema colturale adeguato per HEV, anche se questo rimane un virus difficile da coltivare con rese accettabili.

La strategia replicativa del virus HEV resta infatti in larga misura ancora sconosciuta, proprio a causa della mancanza di un sistema di coltura cellulare idoneo. Poco è noto sui recettori virali per HEV e sul meccanismo di ingresso del virus all'interno delle cellule. Il modello proposto si basa sulle somiglianze e l'omologia di sequenza con altri virus a RNA a filamento positivo meglio caratterizzati, come gli alphavirus (Reyes *et al.*, 1993; Chandra *et al.*, 2008). Le cellule in cui avviene la replicazione virale *in vivo* sono prevalentemente gli epatociti, ma sono stati identificati anche altri siti di replicazione extraepatica, tra cui il piccolo intestino, la milza, i linfonodi, il colon e i monociti del sangue periferico (de Deus *et al.*, 2007; Leblanc *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2001). Una volta penetrato in una cellula permissiva, l'RNA genomico virale è decapsidato e tradotto in una poliproteina non strutturale codificata dall'ORF1 (nsP, Figura 1.2), nel citosol della cellula infettata. Ad opera di proteasi cellulari, la poliproteina è quindi processata nelle unità funzionali individuali, che sono le proteine non strutturali metiltransferasi, proteasi, elicasi e RNA polimerasi RNA dipendente (RdRP). Grazie all'enzima virale RdRP, il filamento genomico positivo è trascritto in un filamento a orientamento negativo. Quest'ultimo rappresenta un intermedio replicativo e, per analogia con gli alphavirus, è stato postulato che esso possa servire come stampo per la sintesi di copie aggiuntive di filamenti di RNA positivo. Come avviene per gli alphavirus, infatti, questo

RNA intermedio presenta una sequenza che agisce come promotore subgenomico. L'RNA subgenomico a filamento positivo è quindi tradotto nelle proteine strutturali, che a loro volta vanno a circondare il genoma virale per formare la progenie dei nuovi virioni infettanti. Nonostante queste conoscenze, il meccanismo e la sintesi delle proteine strutturali a partire dall'RNA subgenomico necessita di ulteriori chiarimenti. Inoltre, la modalità di uscita del virus dalla cellula infettata, come anche la sua presenza nel sangue e nella bile, devono essere maggiormente indagate (Panda *et al.*, 2007).

I filamenti genomici a polarità positiva sono stati ritrovati con maggiore abbondanza rispetto ai filamenti negativi. Entrambi i filamenti si ritrovano nel fegato, organo principale della replicazione di HEV, mentre nel siero e nella bile si ritrovano solamente i filamenti positivi di RNA (Nanda *et al.*, 1994).



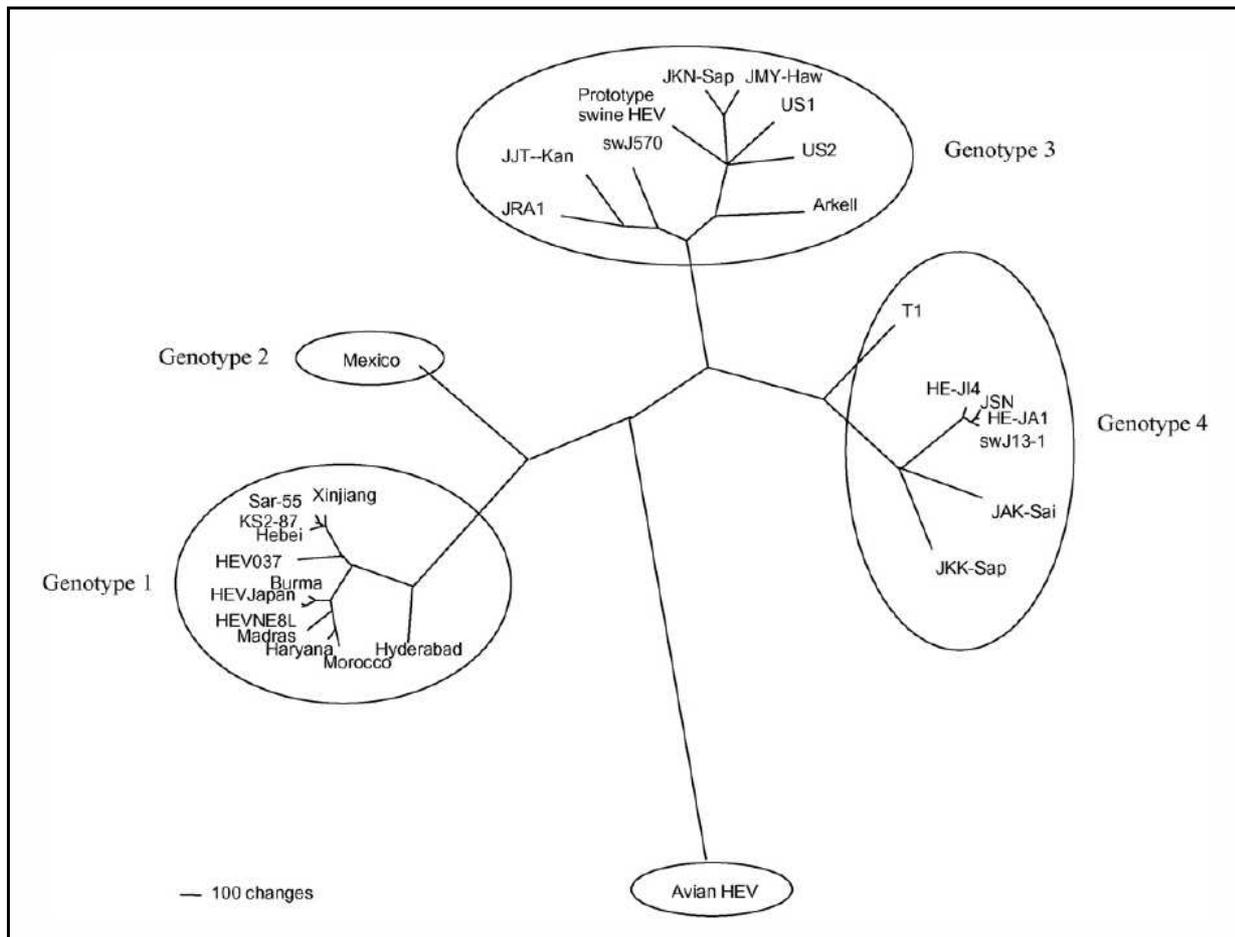
**Figura 1.2:** Modello proposto per il ciclo di replicazione di HEV (da Chandra *et al.*, 2008).

### 1.2.4 GENOTIPI VIRALI

I diversi ceppi di HEV sono classificati sulla base delle omologie nella sequenza nucleotidica, in particolare nella regione dell'ORF2. Fino ad oggi sono stati identificati 4 maggiori genotipi virali (Lu *et al.*, 2006) ed è riconosciuto un solo sierotipo (Wang *et al.*, 2004). Sebbene siano stati proposti vari schemi per la classificazione del virus (Erker *et al.*, 1999; Schlauder *et al.*, 1999; Schlauder e Mushahwar, 2001), finora lo schema più accettato prevede la classificazione dei diversi isolati di HEV sulle omologie nucleotidiche tra i residui 5185-7178 nell'ORF2, distinguendo i diversi genotipi in base a differenze di almeno il 20% nella sequenza nucleotidica (Lu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004). Mentre i ceppi dei genotipi 1 e 2 sono stati isolati solo dall'uomo (tranne il caso del ceppo suino cambogiano identificato da Caron e colleghi nel 2006, e appartenente al genotipo 1), quelli appartenenti ai genotipi 3 e 4 sono stati identificati sia nell'uomo sia in diverse specie animali, tra cui il suino domestico, il cinghiale, il coniglio, il ratto e il cervo (Meng *et al.*, 1997; Goens e Perdue, 2004; Okamoto, 2007; Panda *et al.*, 2007; Zhao C *et al.*, 2009; Johne *et al.*, 2010 ) (Figura 1.3).

E' anche largamente adottata l'ulteriore suddivisione in sottotipi all'interno dei 4 genotipi, basata sulle sequenze dei 300-450 nucleotidi terminali della regione genomica dell'ORF2. Secondo questo studio, il genotipo 1 comprende ad oggi 5 sottotipi, mentre i genotipi 2, 3 e 4, contengono 2, 10, e 7 sottotipi, rispettivamente (Lu *et al.*, 2006).

La maggior parte delle infezioni in Asia e in Africa sono causate da ceppi di HEV di genotipo 1, mentre in Messico e in Nigeria prevale il genotipo 2, che regioni appare meno diffuso geograficamente rispetto al genotipo 1 (Lu *et al.*, 2006). Nei paesi industrializzati, dove fino a poco tempo fa l'infezione era considerata sporadica, sono stati individuati i genotipi 3 e 4 (Aggarwall *et al.*, 2000; Emerson *et al.*, 2002; Emerson *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2006). Virus di genotipo 3 prevalgono in USA e in Europa, mentre il genotipo 4 è tipicamente riscontrato in Cina e Taiwan (Wang *et al.*, 2004) (figura 1.4).

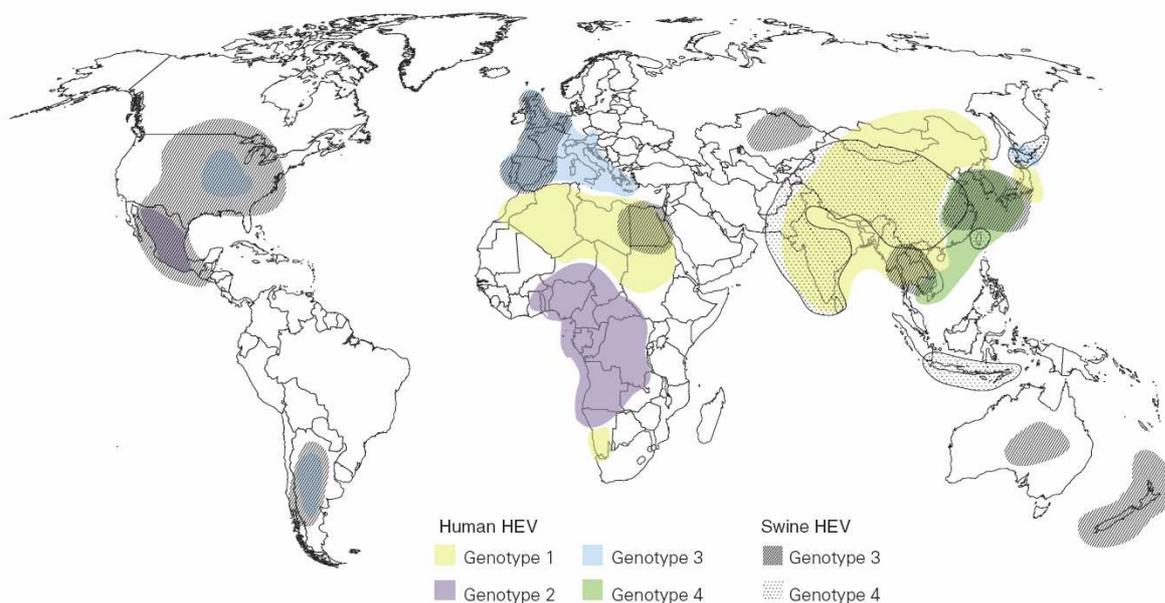


**Figura 1.3:** Albero filogenetico indicante la distanza dei 4 genotipi, basato sulla sequenza genomica completa di 30 ceppi umani, suini, e aviari di HEV. La barra in scala indica le distanze genetiche relative (Meng *et al.*, 2009).

Il primo ceppo animale di HEV è stato identificato nel suino nelle regioni centro-occidentali degli USA nel 1997. Il virus, denominato Swine Hepatitis E virus, apparteneva al genotipo 3 e presentava un'omologia dell'ORF2 con ceppi umani. In particolare, l'ORF2 del ceppo suino presentava il 92% di identità nucleotidica e il 98-99% di identità amminoacidica con 2 ceppi americani di HEV di origine umana (ceppi US1 E US2); tale analogia dimostrò l'appartenenza dei ceppi suini e umani alla medesima famiglia (Meng *et al.*, 1997).

Ceppi di HEV sono stati isolati anche nei polli (Haqshenas *et al.*, 2001; He *et al.*, 2002). L'HEV aviare è, però, filogeneticamente distinto dagli altri ceppi di HEV animali e umani. L'omologia

nucleotidica dell'HEV aviare con ceppi umani e suini è soltanto del 48-60% (Haqshenas *et al.*, 2001). Inoltre, la malattia causata nei polli non è una epatite, ma una epato-spleno megalia.



**Figura 1.4:** Distribuzione geografica dei genotipi di HEV di origine umana e suina (da Aggarwal e Naik, 2009).

## 1.3 EPIDEMIOLOGIA

### 1.3.1 EPIDEMIOLOGIA NELL'UOMO

Le caratteristiche epidemiologiche dei focolai epidemici di HEV sono, come già rilevato nel corso della prima epidemia in New Delhi, l'alta percentuale di rischio d'infezione nei giovani e la letalità molto elevata nelle donne in gravidanza, che arriva fino al 20% (Khuroo *et al.*, 1994; Navaneethan *et al.*, 2008). Pochi studi hanno quantificato l'incidenza dell'epatite E nella popolazione. Labrique e colleghi (Labrique *et al.*, 2010) hanno descritto un'epidemia comprendente 1134 soggetti nel sud del Bangladesh, dove la prevalenza di anticorpi anti HEV era del 22,5%. Durante i primi 12 mesi del follow up, fu rilevata un'incidenza sierologica del 60,3/1000. Sono stati condotti numerosi studi sulla prevalenza di HEV in differenti gruppi di popolazione; in Francia, Boutrouille e colleghi

(2007) hanno descritto che una prevalenza di anticorpi anti-HEV in campioni di sangue di donatori pari al 3,20%, valore simile a quello riscontrato in altri paesi industrializzati (Boutrouille et al, 2007). Tuttavia, le informazioni ad oggi disponibili relativamente alla reale diffusione dell'infezione nelle popolazioni umane sono ancora scarse. Il motivo è da imputare alla mancanza di test standard con sensibilità e specificità adeguati; inoltre, i test sierologici sviluppati per i genotipi 1 e 2 potrebbero non essere in grado di rilevare con uguale efficienza gli anticorpi prodotti nei confronti degli altri genotipi, nonostante sia sinora accertata l'esistenza di un solo sierotipo. Nonostante ciò, la sieroprevalenza è elevata nella popolazione anche in quei contesti in cui le forme cliniche di epatite E sono rare o non segnalate (Meng *et al.*, 2010).

Si possono riconoscere due distinti pattern epidemiologici di infezione da HEV nell'uomo (Figura 1.5):

- endemico con focolai epidemici, che si manifesta prevalentemente nelle aree tropicali e subtropicali;
- sporadico, proprio invece dei paesi industrializzati (Clemente-Casares *et al.*, 2003; Teo *et al.*, 2006; Panda *et al.*, 2007).

La malattia è considerata endemica nei paesi in via di sviluppo, dove si manifesta anche con episodi epidemici generalmente associati al consumo di acqua contaminata da feci (Panda *et al.*, 2007; Teo, 2006). L'infezione da HEV è diffusa in prevalenza nei paesi tropicali e sub-tropicali in via di sviluppo: gran parte dell'Asia, Nord Africa, Medio Oriente e America centro-meridionale. In queste aree, i casi coinvolgono ampie fasce d'età, ma i più colpiti sono gli adulti. Infatti, la sieroprevalenza è di circa il 5% nei bambini al di sotto di 10 anni e tende ad aumentare fino al 10-40% negli adulti (Aggarwal *et al.*, 2000; Emerson e Purcell, 2003; Li *et al.*, 2011; Taniguchi et al. 2009). La trasmissione interumana diretta è ritenuta rara, con bassi tassi di infezione secondaria, attorno al 5% all'interno dei nuclei familiari di soggetti malati (Aggarwal *et al.*, 2000; Clemente-Casares *et al.*, 2003; Emerson e Purcell, 2003; Ijaz *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006a). Questo quadro sembra compatibile con una trasmissione indiretta di tipo ambientale, anche in relazione alle caratteristiche di resistenza del virus escreto con le feci nell'ambiente (Aggarwall *et al.*, 2000; Emerson *et al.*, 2002).

L'infezione da HEV è oggi ritenuta un problema emergente nei paesi industrializzati, compresa l'Italia (Orrù *et al.*, 2004; Cacciola *et al.*, 2011; La Rosa *et al.*, 2011; Romanò *et al.*, 2011), nei quali di recente sono stati descritti diversi casi sporadici e piccole epidemie (Aggarwall R., 2000; Meng, 2010; Rose *et al.*, 2010; Motte *et al.*, 2011; Nelson *et al.*, 2011; Bouquet *et al.*, 2011; Pfefferle *et al.*, 2011; Dalton *et al.*, 2011). Fino a pochi anni fa, la maggior parte dei casi di malattia

erano registrati in viaggiatori provenienti da aree del mondo endemiche per HEV. Tuttavia, già nel 1999 (Zanetti *et al.*, 1999) venne identificata una nuova variante virale considerata autoctona nelle feci di un paziente che non aveva viaggiato né era venuto a contatto con individui di ritorno da zone a rischio. Questo virus presentava analogie nucleotidiche con ceppi americani del genotipo 3, ma non sufficienti a sostenerne l'importazione dagli USA. Per i casi autoctoni nei Paesi industrializzati, la via di trasmissione più probabile è quella zoonotica da specie animali serbatoio (Acharya e Panda, 2006; Aggarwal *et al.*, 2000; Buti *et al.*, 2004; Clemente-Casares *et al.*, 2003; Emerson e Purcell, 2003; Lewis *et al.*, 2006; Panda *et al.*, 2007; Teo, 2006).

### **1.3.2 L'INFEZIONE NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO**

Nelle principali epidemie descritte, HEV risulta trasmesso principalmente attraverso il consumo di acqua contaminata da feci. Nel sud-est dell'Asia, le epidemie sono per lo più concentrate durante le stagioni di piogge, quando piogge torrenziali e alluvioni possono, in condizioni igienico-sanitarie generalmente scarse, creare gravi problemi alle reti fognarie e conseguente contaminazione delle acque chiare (Khuroo *et al.*, 1994; Corwin *et al.*, 1996; Balayan, 1997; Emerson e Purcell, 2003; Ippagunta *et al.*, 2007; Panda *et al.*, 2007; Boccia *et al.*, 2006; Teo, 2006; Panda *et al.*, 2007).

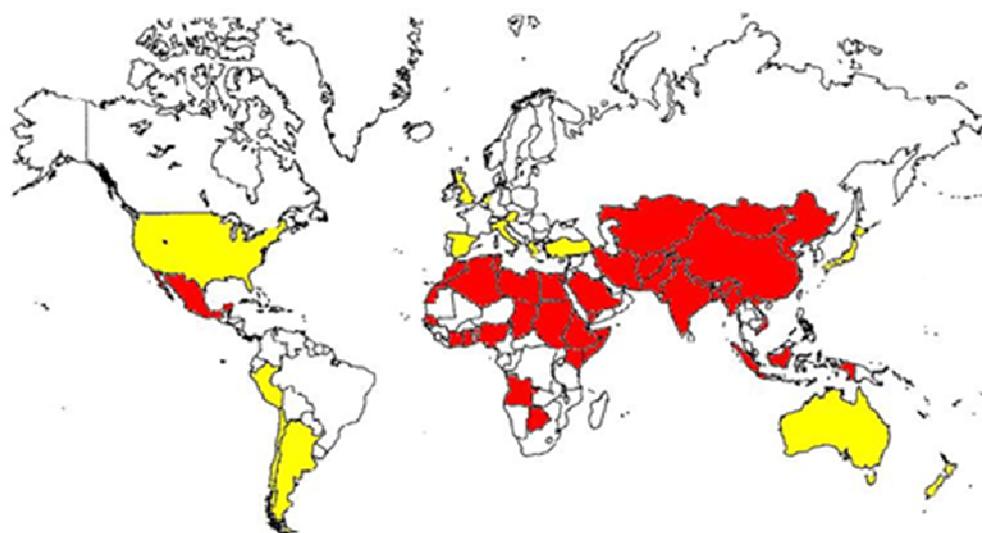
Recenti evidenze in queste epidemie suggeriscono anche una trasmissione persona-persona (Teshale *et al.*, 2010).

Come altra possibilità di trasmissione di HEV è stata anche considerata la via parenterale tramite trasfusioni, ma le probabilità che questa trasmissione giochi un ruolo importante appaiono molto basse sia nei paesi in via di sviluppo che in quelli industrializzati (Panda *et al.*, 2007; Kaufmann *et al.*, 2011; Rostamzadeh Khameneh *et al.*, 2011; Bajpai *et al.*, 2011). Tuttavia, sono stati riportati casi di trasmissione diretta da donatore di sangue infetto da HEV (Matsubayashi *et al.*, 2008), e non vanno sottovalutate le sieroprevalenze elevate (52,5% di soggetti positivi per IgG anti HEV) riscontrate tra i donatori di sangue nel sud-est della Francia (Mansuy *et al.*, 2001).

A tale proposito, le informazioni disponibili sono tuttavia discordanti. In Svizzera, un lavoro condotto da Kaufmann e colleghi ha riscontrato una bassa sieroprevalenza per HEV nella popolazione normale (5,4% negli uomini e 4,1% nelle donne). Questa differenza con quanto descritto in Francia potrebbe sia essere spiegata con una bassa sensibilità dei test commerciali utilizzati nello studio Svizzero, ma gli autori propongono che possa anche dipendere dalla regolamentazione rigorosa degli animali e delle importazioni di carne (Kaufmann *et al.*, 2011). La

trasmissione verticale dalle donne in gravidanza ai feti è stata ben documentata da Khuroo e colleghi, i quali hanno indagato la presenza d'infezione di HEV in donne gravide, sia sintomatiche che asintomatiche, concludendo che la causa della morte del feto era ascrivibile a un danno epatico causato dalla replicazione di HEV (Khuroo *et al.*, 2009). Ad oggi, non è stata dimostrata la trasmissione dell'infezione per via venerea.

In alcune regioni dell'Africa (Sudan, Chad, Kenya e Somalia), un numero maggiore di casi di epatite E sono stati descritti in soggetti che vivono in campi profughi o in accampamenti (Teshale *et al.*, 2010), in scarse condizioni igienico-sanitarie. Altri fattori di rischio per le popolazioni dei paesi in via di sviluppo potrebbero essere rappresentati dalle condizioni di mal nutrizione, con conseguente compromissione del sistema immunitario. Questo potrebbe spiegare in parte anche l'alta letalità registrata durante le epidemie di HEV in Africa (Boccia *et al.*, 2006). Focolai epidemici di HEV sono stati segnalati anche in gruppi di lavoratori che si spostavano dalle città e andavano a vivere in baraccopoli affollate (Shidrawi *et al.*, 1994).



- Aree con >25% di epatiti causate da HEV
- Aree considerate non endemiche per HEV

**Figura 1.5:** Aree endemiche e non endemiche per la presenza dell'epatite E.

### 1.3.3 L'INFEZIONE NEI PAESI INDUSTRIALIZZATI

La sieroprevalenza di anticorpi anti-HEV varia tra il 60% in comunità rurali del sud della Cina (Li *et al.*, 2006), dove HEV rappresenta la maggiore causa di epatite, al 4-10% in Europa (Bendall *et al.*, 2010; Mansuy *et al.*, 2008; Haagsman *et al.*, 2007) e USA (Kuniholm *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2002). In queste ultime aree, i casi di epatite E sono sporadici (La Rosa *et al.*, 2011; Brost *et al.*, 2010; Romanò *et al.*, 2011), sebbene siano state descritte alcune piccole epidemie (Colson *et al.*, 2010).

Molti dei casi umani di epatite E descritti in Europa sono causati da virus del genotipo 1 (g1), e vengono messi in relazione a individui con anamnesi di viaggi in aree endemiche. Recentemente, un incremento del numero di casi sporadici di infezione è stato riportato in Europa e in altri Paesi industrializzati (Buti *et al.*, 2004; Borgen *et al.*, 2008; Dalton *et al.*, 2008; Mansuy *et al.*, 2009; Vasikova *et al.*, 2011; La Rosa *et al.*, 2011), nei quali il virus implicato apparteneva al g3. Dei 4 genotipi di HEV messi in evidenza anche nell'uomo, il genotipo 3 (g3) è quello che circola anche nelle popolazioni di suini (Rose *et al.*, 2010). Sono stati riportati casi sporadici di epatite E causati da ceppi di HEV appartenenti al genotipo g3 in tutto il mondo (Meng *et al.*, 1997; Zanetti *et al.*, 1999; Clemente-Casares *et al.*, 2003; Tahan *et al.*, 2003; Banks *et al.*, 2004a; Buti *et al.*, 2004; Ijaz *et al.*, 2005; Dalton *et al.*, 2007b; Teo, 2006; Herremans *et al.*, 2007; Panda *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2008; Norder *et al.*, 2009; Fogeda *et al.*, 2009; Reuter *et al.*, 2009; Dell'Amico *et al.*, 2011; Krüttgen *et al.*, 2011) in soggetti senza anamnesi di viaggi all'estero, suggerendo che questi casi di malattia siano ascrivibili a virus endemici sul territorio (Hsieh *et al.*, 1999; Zanetti *et al.*, 1999; Emerson e Purcell, 2003; Nishizawa *et al.*, 2003; Acharya e Panda, 2006; Banks *et al.*, 2007).

## 1.4 EPIDEMIOLOGIA NELLE SPECIE ANIMALI

Molte specie animali si sono rivelate recettive all'infezione, per dimostrazione diretta della presenza del virus o per la messa in evidenza di anticorpi anti-HEV nel siero (Goens e Perdue, 2004). La presenza di anticorpi anti-HEV è stata riscontrata in topi, polli, cani, vacche, pecore, capre, scimmie, manguste, cavie, suini, cinghiali, cervi, gatti, cavalli, uccelli, bufali (Meng *et al.*, 1997; Favorov *et al.*, 2000; Arankalle *et al.*, 2001; Haqshenas *et al.*, 2001; Kuno *et al.*, 2003; Goens e Perdue, 2004; Vitral *et al.*, 2005; He *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2006; de Deus *et al.*, 2007;

Michitaka *et al.*, 2007; Saad *et al.*, 2007; Shukla *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Vi sono anche evidenze sulla presenza di anticorpi anti-HEV in diverse specie di ratti, e un recente lavoro ha confermato la presenza di RNA genomico di HEV nel ratto (*Rattus norvegicus*) in Germania (Johne *et al.*, 2010). Una osservazione simile è stata riportata recentemente anche in California, e la sequenza nucleotidica del ceppo di HEV di ratto americano era sostanzialmente identica a quella del ceppo isolato in Germania (Purcell *et al.*, 2011).

La prevalenza di HEV in suini e in cinghiali in Europa, misurata in base alla presenza dell'RNA genomico mediante PCR, varia dal 5,9% al 76%, e dal 3,8% al 25%, rispettivamente (Lewis *et al.*, 2010). Le sequenze di HEV da queste specie animali sono strettamente correlate con quelle di ceppi umani. Inoltre, la presenza di anticorpi e/o del genoma virale è stata anche riscontrata in popolazioni di cervi, con valori che oscillano dal 5% al 13% (Boadella *et al.*, 2010; Rutjes *et al.*, 2010). Recentemente, è stata riportata l'identificazione di un ceppo di HEV in un allevamento di conigli in Cina. Gli autori del lavoro hanno esaminato 335 campioni di siero di coniglio, prelevati da due diversi allevamenti, per la presenza di anticorpi anti-HEV e di RNA genomico di HEV. La ricerca anticorpale ha rilevato una siero-prevalenza nei due allevamenti del 7,5 e il 57%, rispettivamente; la caratterizzazione del genoma virale dei campioni positivi mediante RT-PCR suggerisce che il ceppo di HEV isolato dal coniglio appartenga ad un nuovo genotipo (Zhao *et al.*, 2009).

In Giappone, diversi casi di epatite E sono stati messi in relazione al consumo di fegati crudi di suino e di carne di cinghiale: la stessa sequenza nucleotidica è stata infatti identificata nei soggetti affetti dalla malattia e nei residui di alimento che questi avevano consumato (Matsuda *et al.*, 2003; Yazaki *et al.*, 2003). Il cervo potrebbe avere un ruolo importante nella trasmissione del virus nella fauna selvatica; infatti, non solo è stata riportata una circolazione del virus in questa specie (Boadella *et al.*, 2010; Rutjes *et al.*, 2010), ma sembra che vi possa essere anche una trasmissione del virus dal cinghiale al cervo, come suggerito dall'elevata omologia delle sequenze dei virus messi in evidenza in cinghiali e cervi all'interno dello stesso parco (Tei *et al.*, 2003).

La maggior parte di dati su HEV e animali selvatici è tuttavia riferita ai cinghiali, che sembrano essere un altro serbatoio asintomatico del virus, in aggiunta al maiale domestico (Meng *et al.*, 2009). In Italia, è stata indagata la presenza di HEV in una popolazione di cinghiali del parco dei Gessi Bolognesi. L'RNA virale è stato identificato in 22 campioni (35%) da 88 animali esaminati. L'analisi filogenetica delle sequenze ottenute ha indicato che solo un ceppo di HEV stava circolando nella popolazioni di cinghiale considerata, anche se le sequenze confrontate erano molto brevi. Le sequenze avevano un'identità nucleotidica più vicina a quelle di ceppi di HEV suini e

umani che circolano in Europa piuttosto che a sequenze ottenute da cinghiali esaminati in Giappone (Martelli *et al.*, 2008). Anche in Germania sono stati isolati diversi ceppi di HEV nei cinghiali, con prevalenze variabili dal 5% al 68% (Kaci *et al.*, 2008; Adlhoch *et al.*, 2009; Schielke *et al.*, 2009), mentre la prevalenza di HEV nei cinghiali in Spagna è del 19.6% relativamente alla presenza di genoma virale, e del 42.7% in termini di sieroprevalenza anticorpale (de Deus *et al.*, 2008).

Inoltre, è stata segnalata la presenza di HEV anche in manguste (Nakamura *et al.*, 2006) e cavalli (Saad *et al.*, 2007).

Incluso nello stesso genere famiglia, ma appartenente a un differente genotipo, l'HEV aviario è responsabile della sindrome di epatomegalia/splenomegalia nel pollo (sindrome HS, o HSS). L'HEV aviario infetta anche i tacchini (Sun *et al.*, 2004), e mostra solo il 50% di identità nucleotidica con i ceppi identificati nei mammiferi, pur condividendone la stessa organizzazione genomica (Huang *et al.*, 2002). Come per i ceppi di HEV nei suini, l'infezione di HEV aviario è diffusa nei polli, con circa il 30% di polli positivi per anticorpi anti-HEV di tipo IgG in USA (Sun *et al.*, 2004). In Europa, epidemie di HSS sono state riportate già in passato, ma solo recentemente le sequenze di ceppi virali sono state descritte in polli asintomatici, in Spagna. Comunque, la possibile trasmissione di questi virus ad altre specie aviarie e un loro potenziale passaggio di specie non possono essere minimizzate. Come dimostrato nei casi di altri virus ad RNA (influenzale, Norovirus, Rotavirus, ecc.), anche ceppi emergenti di HEV potrebbero evolvere rapidamente, facilitando un loro possibile adattamento alla replicazione in specie diverse, da animali selvatici a domestici e all'uomo.

Gli studi epidemiologici e le informazioni sulla prevalenza di HEV nelle diverse specie di animali domestici e selvatici (cinghiali, cervi, conigli, ecc.) sono importanti per poter studiare le eventuali interazioni tra i diversi ceppi di virus e i differenti ospiti, e per valutare il rischio di trasmissione zoonosica. La mancanza di un'efficiente sistema di coltura cellulare per HEV e di modelli sperimentali di piccoli animali, non ha aiutato la ricerca di base e i meccanismi patogenetici sono ancora oggi poco conosciuti. Recentemente, è osservabile un incremento dei dati sui ceppi animali di HEV, ma tutto resta da chiarire il ruolo eventuale degli animali selvatici come serbatoi di HEV in natura. Nella popolazione di animali che vivono nella stessa area geografica, l'abilità del virus di evolvere accumulando rapidamente mutazioni, come dimostrato per altri virus a RNA, potrebbe portare a nuove varianti virali più virulente che potrebbero essere responsabili di gravi problemi di sanità pubblica per l'uomo.

## 1.5 PATOGENESI E SINTOMATOLOGIA

### 1.5.1 LA MALATTIA NELL'UOMO

Nella maggior parte degli individui l'infezione con HEV esita in una malattia di lieve entità, eccetto che per le donne in gravidanza, per le quali la letalità può raggiungere il 20%, almeno in paesi non sviluppati. La possibilità di aborti, nascite premature e mortalità neonatale possono inoltre essere elevati. Il motivo per il quale questa malattia è particolarmente grave nelle donne in gravidanza non è chiaro (Aggarwall *et al.*, 2000). Sembrerebbe che HEV danneggi le cellule epatiche riducendo la loro resistenza alle endotossine prodotte dai batteri nel tratto intestinale. La stessa reazione infiammatoria evocata dal virus provocherebbe la sintesi di prostaglandine e altri mediatori ad azione chemiotattica. L'azione combinata delle endotossine e dei prodotti dell'infiammazione porterebbe all'occlusione delle vie biliari con conseguente colestasi (Jameel *et al.*, 1999). Dalla comparsa dei primi sintomi epatici, nei soggetti più gravi, la morte sopravviene in 4-8 settimane a causa di un'encefalopatia fulminante, diatesi emorragica o collasso renale (Panda *et al.*, 2007).

Nel corso di ulteriori studi è stato constatato che l'infezione si può trasmettere verticalmente dalla madre al feto, mentre non è stata segnalata la trasmissione per via venerea (Emerson *et al.*, 2002).

Non è ancora chiaro se l'immunità acquisita nel corso di infezione da HEV sia permanente, come nel caso dell'epatite A (Panda *et al.*, 2007).

L'epatite E si manifesta con diverse forme cliniche. L'epatite acuta itterica è la forma più comune ed è caratterizzata da una fase prodromica che dura pochi giorni, nella quale si manifestano sintomi simil-influenzali come febbre, tremori, anoressia, nausea, vomito, dolori addominali, diarrea, dolori articolari e astenia. Questi sintomi sono seguiti dopo pochi giorni da ittero, con iscurimento delle urine e feci ipocoliche. Con la comparsa dell'ittero, la febbre e gli altri sintomi prodromici tendono a diminuire o a scomparire del tutto. Le indagini di laboratorio mostrano bilirubinuria, bilirubinemia (principalmente coniugata), elevazione degli enzimi epatici. Con il regredire della malattia, che in genere ha una durata di 1-4 settimane, i valori ematochimici tornano gradualmente alla normalità. In alcuni pazienti la sintomatologia può perdurare con persistenza di ittero e intenso prurito, e in questi casi è presente un innalzamento della fosfatasi alcalina e una persistente bilirubinemia, anche quando i valori delle transaminasi ritornano alla normalità. La prognosi è normalmente di 2-6 mesi

(Aggarwall *et al.*, 2000; Emerson e Purcell, 2003). Nei pazienti che manifestano sintomi simil-influenzali, la malattia è riconoscibile solo con indagini di laboratorio. L'infezione da HEV può essere del tutto asintomatica, ma la frequenza di queste forme non è nota, anche se potrebbe elevata essere molto comune, considerati gli alti valori di sieroprevalenza riscontrati in molti paesi industrializzati contro la sostanziale rarità dei casi di malattia accertata clinicamente. L'infezione stimola una risposta immunitaria di tipo umorale, con la comparsa nel siero di anticorpi IgM, che sono riscontrabili tra una settimana e due mesi dall'inizio della malattia in oltre il 90% dei pazienti. Anticorpi IgG sono invece riscontrabili nel siero solo successivamente, aumentando di titolo tra la fase acuta e la convalescenza (sieroconversione) (Meng *et al.*, 1998a; Meng *et al.*, 1998b; Williams *et al.*, 2001; Halbur *et al.*, 2001). ultimi Anticorpi IgG possono persistere per periodi molto lunghi, fino e oltre 14 anni (Aggarwall *et al.*, 2000; Emerson *et al.*, 2002).

### 1.5.2 LA MALATTIA NEL SUINO

Lo studio della malattia nel suino domestico, naturalmente infetto, come anche nel suino inoculato sperimentalmente, ha dimostrato che HEV provoca di regola infezioni subcliniche con segni di epatite rilevabili solo a livello istologico; questa si caratterizza per la presenza di modesti infiltrati linfoplasmocitari multifocali sinusoidali e periportali, distribuzione irregolare di vacuolizzazione e necrosi epatocellulare (Meng *et al.*, 1998b; Halbur *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2002).

La via principale di trasmissione per i suini è quella fecale-orale (Meng *et al.*, 1998a; Meng *et al.*, 1998b; Aggarwall *et al.*, 2000; Emerson *et al.*, 2002; Kasomdorkbua *et al.*, 2004; Bouwknecht *et al.*, 2009), e non ci sono evidenze di trasmissione verticale (Meng *et al.*, 1998). In uno studio condotto in Olanda da Bouwknecht e colleghi sono state esaminate due diverse vie di trasmissione nel suino, l'inoculo per via endovenosa verso l'esposizione a suini infetti. Il corso dell'infezione differiva tra le due, suggerendo che il contatto con suini infetti e quindi la trasmissione orizzontale rappresenti un'efficiente via di trasmissione. I campioni di urina e la carne sono stati identificati come possibili fonti di HEV nella trasmissione tra suino e suino e tra suino e uomo (Bouwknecht *et al.*, 2009).

Anche nel suino non è ancora chiaro in che modo HEV, una volta penetrato nell'ospite, raggiunga il fegato né quali siano i siti iniziali di replicazione. Evidenze di replicazione del virus, oltre che nel fegato, si ritrovano soprattutto nel tratto intestinale e nei linfonodi (Williams *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2003; de Deus *et al.*, 2008; Leblanc *et al.*, 2010). Si ritiene che l'immunità materna protegga i

suinetti per circa 2 mesi e che questi siano a massimo rischio di infezione naturale tra i 2 e i 3 mesi di vita (Meng *et al.*, 1997).

La viremia nel suino inizia subito dopo l'infezione e ha una durata di circa 2 settimane. L'escrezione del virus attraverso le feci si protrae per circa 3-7 settimane (fino ai 3-5 mesi di età), e successivamente si manifesta sierconversione con conseguente graduale eliminazione del virus ad opera del sistema immunitario (Haqshenas *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 1999; Meng *et al.*, 1998).

Come nell'uomo, l'infezione induce anche negli animali lo sviluppo di anticorpi anti-virus, con l'immediata produzione di IgM, seguita dopo circa una settimana da un innalzamento delle IgG. Le IgM decrescono rapidamente nel giro di 1-2 settimane, mentre le IgG incrementano costantemente per diverse settimane. La sierconversione avviene generalmente intorno ai 3-4 mesi di vita (picco anticorpale a 4 mesi) e gli animali restano normalmente sieropositivi fino ad almeno 5-6 mesi di vita, quando anche le IgG cominciano lentamente a decrescere (Haqshenas *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 1999; Meng *et al.*, 1997).

Va tuttavia puntualizzato che in recenti lavori (Fernandez-Barredo *et al.*, 2007; Di Bartolo *et al.*, 2008) il virus è stato rinvenuto anche in animali prossimi all'età di macellazione (circa 6 mesi), e nei riproduttori (animali con età superiore agli 8 mesi). Il virus è stato rinvenuto nel fegato di animali macellati (Feagins *et al.*, 2007; Di Bartolo *et al.*, 2011), quindi al di sopra dei 3-5 mesi di età indicati nei primi studi di infezione sperimentale. Se si tratti di un'infezione prolungata nel tempo o acquisita tardivamente, o di reinfezione è ancora da chiarire. Non si può inoltre escludere la possibilità di infezioni acquisite in sequenza, causate da ceppi verso cui la immunità precedentemente instaurata verso un primo ceppo virale potrebbe non essere totalmente protettiva (Fernandez-Barredo *et al.*, 2007).

## 1.6 ASPETTI ZOONOTICI

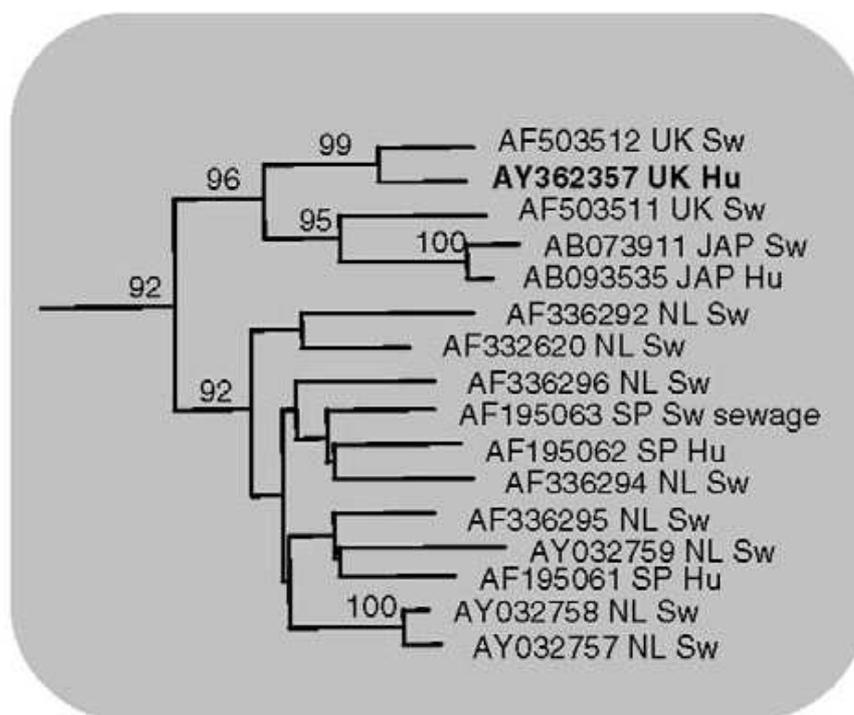
Numerosi lavori indicano che l'epatite E è una malattia a trasmissione zoonotica e numerosi esempi di trasmissione alimentare sono stati descritti, riferiti al consumo di alimenti crudi o poco cotti: fegato, carne o salsiccia di suino, di cinghiale o di cervo (Matsuda *et al.*, 2003; Tei *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Masuda *et al.*, 2005; Matsubayashi *et al.*, 2008; Colson *et al.*, 2010).

Attualmente, il potenziale zoonotico di HEV è stato comprovato attraverso prove di infezione sperimentale, che hanno dimostrato la possibilità di infettare efficientemente il suino con ceppi umani e i primati non umani con ceppi suini. I ceppi suini di HEV in grado di infettare le scimmie appartengono fino ad ora esclusivamente al genotipo 3 (Meng *et al.*, 1998). Tali virus causano infezioni asintomatiche nei primati ma, considerando anche la notevole variabilità genetica, non può essere escluso che alcuni ceppi possano causare una malattia più o meno grave. Il potenziale zoonotico di HEV è anche confermato da studi di filogenesi di ceppi suini e umani isolati in varie regioni del mondo (Meng *et al.*, 1997; Hsieh *et al.*, 1999; Haqshenas *et al.*, 2001 ; Williams *et al.*, 2001; Banks *et al.*, 2004).

Numerosi studi hanno, infatti, dimostrato l'esistenza di elevate identità nucleotidiche e amminoacidiche tra i virus suini e umani isolati nella stessa area geografica (Meng *et al.*, 1997; Hsieh *et al.*, 1999; Haqshenas *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001; Banks *et al.*, 2004a; Lu *et al.*, 2006; Okamoto *et al.*, 2007). Ceppi di HEV identificati nell'uomo tendono a presentare elevate omologie nucleotidiche se circolanti nello stesso territorio formando dei gruppi (clusters) geografici (Okamoto, 2007) (Figura 1.6). I ceppi appartenenti ai genotipi 1 e 2 mostrano tra loro minori differenze nucleotidiche rispetto a quelli appartenenti ai genotipi 3 e 4, e questo sembra essere dovuto alla contemporanea circolazione di questi ultimi due genotipi sia negli animali sia nell'uomo (Lu *et al.*, 2006). Mentre i genotipi 1 e 2 hanno una trasmissione di tipo oro-fecale, prevalentemente sostenuta da contaminazione fecale delle acque potabili e sembrano in grado di infettare quasi esclusivamente l'uomo con un ciclo inter-umano, gli altri due genotipi (3 e 4) hanno un ciclo epidemiologico più complesso, che può coinvolgere specie diverse dall'uomo.

Nel complesso, le informazioni presenti in letteratura contribuiscono a sostenere l'ipotesi che vi sia una trasmissione interspecifica di ceppi di virus dell'epatite E appartenenti ai genotipi 3 e 4 dagli animali, in particolare dal suino all'uomo, e che quindi esistano delle vie di trasmissione di tipo zoonotico.

Singolare è un caso umano di epatite E di origine autoctona descritto in Francia, in cui la fonte di infezione è stata individuata nel suino "minipig", con il quale il paziente aveva stretto contatto mantenendolo come animale da compagnia (Renou *et al.*, 2007; Renou *et al.*, 2008). In Giappone, anche nei gatti domestici è stata dimostrata la presenza di anticorpi anti-HEV: 44 di 135 animali esaminati sono risultati sieropositivi (Okamoto *et al.*, 2004). Queste evidenze, che sembrano indicare la possibile trasmissione di HEV all'uomo anche mediante contatto con animali da compagnia qualora necessitano di adeguata conferma mediante altri studi.



**Figura 1.6:** Vicinanza filogenetica tra ceppi umani e suini circolanti sullo stesso territorio (da Banks *et al.*, 2004a).

### 1.6.1 INFEZIONE INTERSPECIFICA: CROSS-SPECIE

Ceppi appartenenti ai genotipi 3 e 4 di HEV suino possono superare le barriere di specie infettando primati non umani, quali le scimmie e gli scimpanzé (Meng *et al.*, 1998; Arankalle *et al.*, 2006). Evidenze, ottenute da sperimentazioni in animali, dimostrano che ceppi umani di HEV appartenenti ai genotipi 3 e 4 sono in grado di infettare i suini (Halbur *et al.*, 2001; Feagins *et al.*, 2008). Grazie a queste sperimentazioni è stato quindi possibile dimostrare che HEV, e in particolare i ceppi appartenenti a genotipo 3, possono essere trasmessi dall'uomo al suino e viceversa, dando così la prima conferma dell'ipotesi che gli animali, in particolare il suino, giochino un ruolo importante nella trasmissione zoonotica dell'infezione da HEV, soprattutto nei casi autoctoni di infezione (Panda *et al.*, 2007). Al contrario, ceppi umani di HEV appartenenti ai genotipi 1 e 2 hanno uno spettro d'ospite apparentemente limitato all'uomo, e tentativi di infettare sperimentalmente suini con ceppi di questi tipi non sono riusciti (Meng *et al.*, 1998). Infezioni di cross-specie di HEV sono stati riportati in altre specie animali; per esempio agnelli e ratti sono stati infettati con ceppi umani di HEV (Usmanov *et al.*, 1994; Maneerat *et al.*, 1996), anche se i risultati di questi studi restano controversi. Anche nel caso dell'HEV aviario, la specificità d'ospite appare piuttosto elevata. Infatti il virus del pollo può infettare con successo il tacchino (Sun *et al.*, 2004), ma il tentativo di infettare

sperimentalmente due scimmie con un ceppo aviario di HEV non ha avuto successo (Huang *et al.*, 2004), suggerendo che il ceppo aviario di HEV difficilmente potrebbe infettare l'uomo.

L'epatite E è ora riconosciuta come zoonosi e il suino come altre specie animali potrebbero essere considerati dei serbatoi d'infezione (Ropp *et al.*, 2000; Meng, 2009; Meng *et al.*, 2010). Persone che hanno contatti frequenti e stretti con i suini, come gli allevatori e i veterinari, sia nei paesi in via di sviluppo che nei paesi industrializzati, sono categorie professionali che mostrano un rischio d'infezione di HEV più elevato. Questo è stato confermato da diversi studi sieroepidemiologici (Drobeniuc *et al.*, 2001; Withers *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2002; Vulcano *et al.*, 2007 Adjei *et al.*, 2009; Suwannakarn *et al.*, 2010; Vivek *et al.*, 2011) che hanno rilevato prevalenze anticorpali per HEV significativamente più elevate in persone professionalmente esposte al contatto con suini (allevatori, veterinari, macellatori, addetti agli animali, commercianti) rispetto alle popolazioni di controllo. Sono stati anche diagnosticati casi di epatite E messi in relazione con l'esposizione alle carcasse di suini infetti durante la macellazione e la lavorazione delle carni (Jary *et al.*, 2005; Mateos *et al.*, 2005), e più recentemente, è stata testimoniata l'infezione con un ceppo di HEV suino in un gestore di macelleria in Spagna (Fernandez-Barredo *et al.*, 2007).

Si ritiene che la comprensione della biologia e ecologia di HEV sarà la chiave per l'effettiva conoscenza e il controllo delle infezioni di HEV nell'uomo (Meng *et al.*, 2010).

## **1.7 SICUREZZA ALIMENTARE E AMBIENTALE**

La via principale di trasmissione di HEV è quella oro-fecale e l'acqua contaminata è la maggiore fonte d'infezione di HEV. È stato dimostrato che suini e altri animali infetti eliminano nell'ambiente, attraverso le feci, grandi quantità di HEV (Meng *et al.*, 2009), ponendo così un possibile grave problema di sicurezza alimentare e ambientale (Kasorndorkbua *et al.*, 2004). Nell'ambiente, i ceppi di HEV di origine suina e umana sono stati identificati in campioni di residui fognari (Ahmad *et al.*, 2010; La Fauci *et al.*, 2010; La Rosa *et al.*, 2010; Guerrero-Latorre *et al.*, 2011; Kokkinos *et al.*, 2011; Kamel *et al.*, 2011). Come descritto in precedenza, casi sporadici di HEV sembrano per lo più essere legati al consumo di carne cruda o poco cotta di suino e cinghiale (Meng *et al.*, 2009; Yazaki *et al.*, 2003). Le sequenze nucleotidiche di HEV identificate nei fegati al commercio sono simili e in alcuni casi identici a quelle dei ceppi identificati in pazienti (Yazaki *et*

*al.*, 2003). Indagini effettuate in Giappone, poi confermate in altri paesi, hanno rivelato che alla base di un numero considerevole di casi di infezione umana da HEV che si sono verificati, vi è verosimilmente la trasmissione alimentare (Matsuda *et al.*, 2003; Tei *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2006, Colson *et al.*, 2010.). In particolare, episodi di malattia si sono verificati dopo il consumo di carne di cinghiale alla griglia o bollita (Tamada *et al.*, 2004) e, più frequentemente, di fegato crudo di cinghiale (Matsuda *et al.*, 2003). Nonostante la bollitura dovrebbe inattivare il virus, resta possibile la cross-contaminazione dell'alimento cotto in una fase successiva. In Giappone, un uomo di 53 anni ha manifestato una severa epatite E dopo aver consumato carne di cinghiale (Matsuda *et al.*, 2003), mentre un altro paziente, di 70 anni, che aveva consumato la stessa carne di cinghiale è morto di epatite fulminante (Matsuda *et al.*, 2003). Anche in questi casi, le sequenze dei ceppi virali identificati nel siero dei pazienti presentavano elevate percentuali di omologia con quelle presenti nella carne che avevano consumato (Tamada *et al.*, 2004).

Altri pazienti hanno manifestato sintomatologia acuta, in seguito attribuita all'epatite E, dopo aver consumato carne cruda di cervo; successivamente, le indagini molecolari condotte sulla carne hanno rilevato in quest'ultima la presenza di sequenze virali con elevate percentuali di omologia con quelle rinvenute nelle persone che l'avevano consumata (Tei *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2004). In uno di questi episodi di trasmissione alimentare, un ceppo di HEV geneticamente identico a quello identificato nei casi umani è stato ritrovato nella carne di cervo implicata nel focolaio umano, rimasta in parte conservata nel congelatore dei pazienti (Tei *et al.*, 2003). In aggiunta a ciò, uno studio successivo ha reso evidente, sempre in Giappone, che consumatori di selvaggina cruda presentano valori di sieroprevalenza più elevati rispetto a gruppi di controllo (Teo, 2006).

In un recente studio condotto negli USA, è stato dimostrato che fegati di suino in vendita in un supermercato erano positivi per la presenza di HEV. Omogenati di questi fegati sono stati somministrati a suini SPF (Specific Pathogen Free), i quali hanno sviluppato infezione dimostrando l'infettività del virus HEV riscontrato nei tessuti con metodi molecolari (Feagins *et al.*, 2007).

Nel suino si ritiene che HEV si replichi soprattutto nel fegato e nel tratto intestinale (Ha e Chae, 2004), e un'indagine svolta su fegati di maiale in vendita in alcune macellerie di Hokkaido ha rilevato la presenza di elevate cariche virali nel prodotto (Yazaki *et al.*, 2003). Nel 2010, in Corsica è stata descritta un'epidemia di HEV in soggetti che avevano consumato una specialità locale, a base di fegato di maiale, il "figatellu" (Colson *et al.*, 2010). Da una ricerca di anticorpi IgM anti-HEV e di RNA genomico di HEV, 7 individui su 13 che avevano consumato il "figatellu" sono risultati positivi per HEV, mentre nessun positivo è stato riscontrato tra i 5 individui che non ne avevano consumato. Inoltre RNA di HEV di genotipo 3 è stato anche identificato in 7 di 12

“figatellu” campionati nei supermercati della zona, supportando il nesso di causalità con l’ingestione di salsicce di fegato crude (Colson *et al.*, 2010).

Il muscolo invece non sembra essere una sede elettiva della replicazione del virus, anche se è comunque possibile che virus infettante possa pervenire e restare presente in queste sedi in conseguenza della viremia (Teo, 2006). Deve essere inoltre considerata la possibilità di una contaminazione secondarie delle parti edibili della carcassa e dei risultanti prodotti carnei durante le fasi di macellazione.

Un fattore di rischio di trasmissione alimentare di HEV potrebbe anche essere il consumo di molluschi crudi, come dimostrato dalle più elevate sieroprevalenze per HEV riscontrate in persone che hanno questa abitudine alimentare (Cacopardo *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2007; Renou *et al.*, 2008), o tra persone che vivono in zone costiere (Ijaz *et al.*, 2005).

Parte generale:  
CALICIVIRUS

# CAPITOLO 2: CALICIVIRUS

## 2.1 CENNI STORICI

Le prime conoscenze sui calicivirus coincidono con la descrizione di diversi focolai di esantema vescicolare suino (VES) in California negli anni '70. La causa di questi casi venne più tardi ricondotta ad animali marini infetti, i cui resti crudi venivano frequentemente usati come cibo per i suini (Smith *et al.*, 1998). L'agente eziologico venne infatti denominato San Miguel sea lion virus type I (SMSV) prototipo dell'attuale genere *Vesivirus*.

Questo e altri virus animali che mostravano una morfologia simile, con depressioni coppa-simili sulla superficie del capsido virale, vennero indicati come calicivirus, famiglia *Caliciviridae*.

Nell'uomo, i calicivirus sono associati a patologie gastroenteriche, e in particolare i Norovirus rappresentano la principale causa di gastroenterite virale nell'uomo. Vennero scoperti nel 1972 durante le indagini su un focolaio originatosi in una scuola elementare a Norwalk, Ohio. Dopo aver escluso un'eziologia batterica, filtrati fecali di persone affette vennero somministrati a volontari, i quali svilupparono la medesima sintomatologia. Analisi di immuno-microscopia elettronica (IEM) dei filtrati fecali lasciati reagire con sieri convalescenti misero in evidenza la presenza di particelle simil-virali non rivestite (27 nm) dell'“agente di Norwalk” (NV) (Kapikian *et al.*, 1972).

Studi successivi, sia su casi di gastroenterite epidemica che sporadica, mostrarono la presenza di agenti morfologicamente simili tra loro nominati “small round structured virus” (SRSV), che come il ceppo NV, non risultavano in grado di replicarsi in colture cellulari o in modelli animali.

Nel 1976, per la prima volta, furono riconosciuti calicivirus umani nelle feci di bambini affetti da gastroenterite sporadica (Madeley, 1979). Negli anni successivi, la caratterizzazione di diversi ceppi virali umani portò al raggruppamento di tutti questi virus sotto il nome di “calicivirus enterici umani” meglio noti come “Norwalk-like virus” (NLV). Un secondo focolaio epidemico importante, oltre a quello di Norwalk, fu quello di una scuola di Sapporo (Japan) nel 1977 (Chiba *et al.*, 1979); il virus allora identificato, differente da Norovirus, divenne il ceppo prototipo dei “calicivirus classici umani”, successivamente rinominati Sapporo-like virus (SLV).

Agli inizi degli anni '90, il clonaggio e il sequenziamento di alcuni ceppi rivoluzionarono lo studio dei calicivirus umani (Estes et al. 2000; Lambden *et al.*, 1993).

Le nozioni sull'organizzazione del genoma di questo gruppo virale portarono all'immediato sviluppo di metodiche di diagnostica molecolare (RT-PCR, sonde d'ibridazione), che permisero una più dettagliata comprensione dell'epidemiologia del virus (De Leon *et al.*, 1992), e consentirono di giudicare in una prospettiva globale quei focolai che in passato erano stati considerati limitati e geograficamente isolati.

Inoltre, la possibilità d'individuare questi virus nelle matrici alimentari, tramite metodiche diagnostiche molecolari, ha offerto la possibilità di definire in modo specifico l'origine di molti focolai, promuovendo norme più accurate per il controllo di alimenti e acqua al fine d'evidenziarne l'eventuale contaminazione e prevenire la diffusione del virus e l'originarsi di epidemie (Kukkula *et al.*, 1999).

## 2.2 CLASSIFICAZIONE

La famiglia delle *Caliciviridae* comprende quattro generi: *Lagovirus*, *Vesivirus*, *Norovirus* e *Sapovirus* (Pringle, 1998; Green *et al.*, 2000; Mayo *et al.*, 2002). I generi di calicivirus che infettano in modo predominante l'uomo sono i *Norovirus* e i *Sapovirus*, mentre i *Lagovirus* e i *Vesivirus* infettano esclusivamente gli animali. Recentemente è stato proposto un quinto genere che include virus che infettano i bovini, per ora denominato *Nebovirus* o *Becovirus* (Oliver *et al.*, 2006) che include Newbury Agent 1 e Nebraska, due ceppi che mostrano significative differenze con gli altri quattro generi appartenenti alla famiglia *Caliciviridae*.

La classificazione è basata sulla comparazione dell'organizzazione genomica e delle sequenze tra i singoli genomi. Tutti i genomi dei calicivirus consistono di un RNA a singolo filamento (ss) a polarità positiva di 7-8 kilobasi (kb) (Black *et al.*, 1978).

Al loro interno, i norovirus sono ulteriormente divisi in 5 genogruppi, in base all'analisi delle regioni del genoma codificanti il capsido e la polimerasi RNA-dipendente (Katayama *et al.*, 2002). Genogruppi diversi presentano differenze nella sequenza nucleotidica di almeno il 30%.

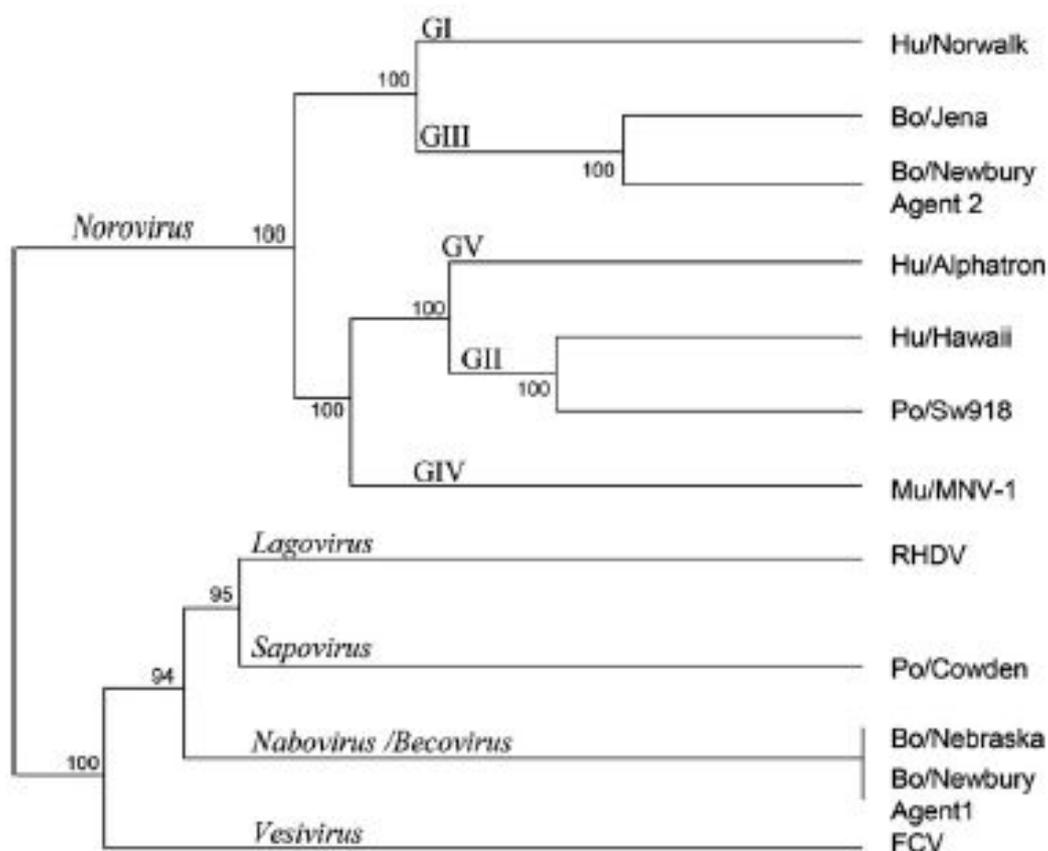
I calicivirus bovini ed il norovirus murino, di recente scoperta (MNV-1), rispettivamente assegnati al genogruppo III e V (Oliver *et al.*, 2006) (Fig. 2.1), mostrano con i norovirus umani (genogruppi I, II, IV) una differenza maggiore del 55% nella sequenza amminoacidica del capsido.

Come i norovirus, anche i virus del genere *Sapovirus* causano gastroenterite acuta nell'uomo. Esistono diversi genogruppi di sapovirus in grado di infettare l'uomo e, ceppi appartenenti a genogruppi distinti sono stati identificati anche negli animali.

Tra i *Vesivirus*, il Calicivirus felino (FCV) è noto come causa importante di malattie respiratorie e vescicazione/ulcerazione dell'epitelio della cavità orale nei gatti (Studdert, 1978). Entro lo stesso genere, il virus dell'esantema vescicolare suino (VESV) e il virus del leone marino di San Miguel (SMSV) causano rispettivamente febbre e formazione di vesciche orali nei maiali e nei leoni marini. VESV e SMSV sono anche associati ad aborti pre-termine (Smith *et al.*, 1973).

Il virus emorragico del coniglio (RHDV), *Lagovirus*, è la causa di una malattia altamente contagiosa che causa necrosi del fegato, emorragia e alta letalità (Gregg *et al.*, 1991).

Complessivamente, nonostante le somiglianze morfologiche e genetiche, i membri della famiglia *Caliciviridae* si caratterizzano per la grande diversità di organi e tessuti bersaglio nelle diverse specie ospite, dei meccanismi patogenetici e malattie indotte.



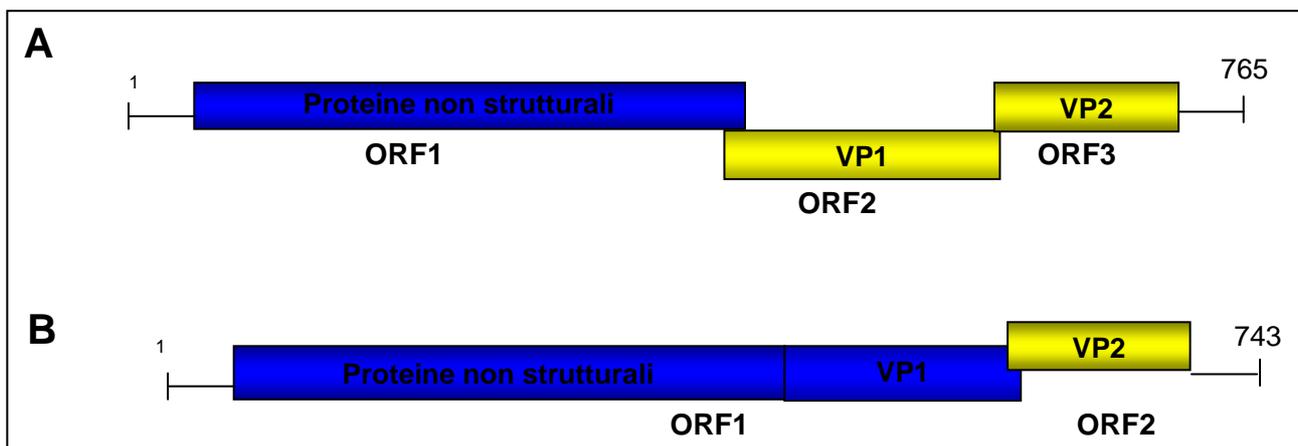
**Figura 2.1:** Classificazione filogenetica della famiglia *Caliciviridae* basate sull'identità nucleotidica dell'*ORF2*. Le diversità tra i generi si basano sulla comparazione tra le sequenze geniche del capsido (Scipione *et al.*, 2007). Le sequenze nucleotidiche derivano da NoV umano Alphatron (AF195847), NoV murino 1 (AY228235), NoV suino SW918 (AB074893), NoV umano Hawaii (U07611), NoV bovino Jena (AJ011099), NoV bovino Newbury Agent 2 (AF097917), ceppo NoV bovino Newbury Agent 1 (DQ013304), NoV bovino Nebraska (NC\_004064), NoV umano Norwalk (M87661), ceppo virus della malattia emorragica del coniglio (RHDV; M67473), Calicivirus felino (FCV; L40021), Sapovirus suino Cowden (AF182760).

## 2.3 ORGANIZZAZIONE DEL GENOMA

Nonostante la somiglianza di base, l'organizzazione del genoma differisce nei diversi generi di Calicivirus (Fig. 2.2).

I virus dei generi *Vesivirus* e *Norovirus* contengono tre regioni codificanti (ORF); le proteine non strutturali (proteine virali che non partecipano alla struttura della particella infettiva) sono codificate dalla ORF1, mentre le proteine strutturali VP1 e VP2 sono codificate rispettivamente dalla ORF2 e dalla ORF3.

I generi *Sapovirus* e *Lagovirus* hanno invece un genoma organizzato in due ORF, dove la prima codifica le proteine non strutturali e la VP1, mentre la seconda codifica la VP2 (Clarke e Lambden, 2000).



**Figura 2.2:** Organizzazione del genoma delle *Caliciviridae*. A: organizzazione del genoma dei *Norovirus* e *Vesivirus*. B: organizzazione del genoma dei *Sapovirus* e *Lagovirus*.

NV (Norwalk) è il ceppo prototipo di *Norovirus*, e il suo genoma è composto di 7,7 kb di RNA a singolo filamento (ss) positivo. L'ORF1 codifica proteine non strutturali, e queste sono tradotte come una singola poliproteina poi tagliata dalla proteasi virale durante la traduzione.

I siti di clivaggio post-traduzionale delle proteine non strutturali della ORF1 sono state descritte per molti calicivirus (Belliot *et al.*, 2003), e le singole proteine rilasciate, nelle loro forme mature e attive, svolgono 11 diverse funzioni nella replicazione del genoma e nell'assemblaggio virale.

VP1 e VP2 sono codificate da un RNA subgenomico che è co-terminale con la porzione in 3' dell'RNA genomico (Jiang *et al.*, 1993).

Le ORF 1 e 3 hanno lo stesso schema di lettura, l'ORF1 si estende nell'ORF2 mentre l'ORF3 inizia all'interno della porzione codificante dell'ORF2 (Clarke e Lambden, 2000).

Entrambi gli RNA, genomico e subgenomico, hanno una coda di poly-(A) di 110 nucleotidi (Jiang *et al.*, 1993).

L'organizzazione del genoma dei calicivirus li rende differenti dagli altri virus a ssRNA positivo, come ad esempio i poliovirus, poiché le proteine non strutturali sono codificate dalla regione terminale al 5' del genoma, piuttosto che al 3' (Clarke e Lambden, 2000).

Molti genomi di calicivirus sono stati sequenziati (Katpally *et al.*, 2011) e, a parte le somiglianze nella sequenza, le caratteristiche strutturali dell'RNA virale sono comuni.

Tutti i genomi sono poliadenilati alla terminazione in 3'. La regione al 5' non tradotta (UTR) dell'RNA genomico e subgenomico è piuttosto differente da quella dei tipici messaggeri eucariotici. La prima AUG nel giusto contesto di Kozak (Kozak, 1986), sull'RNA genomico e subgenomico di NoV - FCV e RHDV, è rispettivamente al nucleotide 11, 20 e 10 (Carter *et al.*, 1992).

L'UTR al 5' dei calicivirus non sembra contenere una sequenza interna di legame per il ribosoma (IRES), e poiché la porzione N-terminale della proteina codificata dall'ORF1 è prodotta a partire da questa AUG, vicina alla terminazione in 5' (Clarke e Lambden, 2000), non è da escludere che una regione di legame possa in futuro venir riscontrata (Hardy e Estes, 1996).

L'UTR in 5' dell'RNA genomico e subgenomico è praticamente identica (Hardy e Estes, 1996), suggerendo così una probabile funzione di questa struttura nella traduzione o nella replicazione.

## 2.4 EPIDEMIOLOGIA DEI CALICIVIRUS

Numerosi studi longitudinali hanno stimato l'incidenza delle malattie gastrointestinali infettive verificatisi nella comunità (Monto e Koopman, 1980), tuttavia solo pochi studi recenti hanno utilizzato un protocollo diagnostico in grado di individuare i NoV e SaV (Koopmans *et al.*, 2008)

Lo studio Sensor ha seguito due gruppi di persone della comunità Olandese per 6 mesi ciascuno, da dicembre 1998 a dicembre 1999 (de Wit *et al.*, 2001b). L'incidenza delle forme enteriche di gastroenterite (GE) è stata stimata in 283 casi per 1000 persone/anno. Su un totale del 34% delle gastroenteriti enteriche virali riconosciute, i NoV sono risultati il patogeno virale più frequente (11% dei casi), mentre i SaV sono stati riscontrati nel 6% dei casi.

Recentemente, in un lavoro di Räsäne e colleghi sono stati esaminati, per la presenza di virus, campioni di feci provenienti da 50 bambini ricoverati per gastroenterite acuta dopo aver consumato acqua contaminata da liquami in una comunità finlandese. È stata riscontrata la presenza di diversi patogeni virali tra cui calicivirus umani in 31 di 50 campioni (62%). Tra questi, 20/31 (65%) erano Norovirus e 11 (35%) Sapovirus (Räsäne *et al.*, 2010).

Uno studio condotto in Inghilterra ha dimostrato che la frequenza dei calicivirus enterici, misurata in base alle notifiche dei medici di medicina generale, è approssimativamente il 16% di quella riscontrata in studi di comunità (Tompkins *et al.*, 1999) quali ospedali, istituti residenziali, università, prigioni (Wheeler *et al.*, 1999; Martinelli *et al.*, 2004; Mattner *et al.*, 2005; Centers for Disease Control (CDC) and prevention 2007; Leuenberger *et al.*, 2007).

Un sistema di sorveglianza generale sui focolai epidemici è stato sviluppato in Inghilterra e Galles, dal Centro per la sorveglianza delle malattie infettive (CDSC) a partire dal 1992. Dopo 3 anni, erano già disponibili informazioni su 2154 focolai (Dedman *et al.*, 1998). I test di laboratorio tramite microscopia elettronica (EM) confermarono che 709 (33%) dei focolai totali erano causati da NoV, mentre solo pochi focolai l'anno erano attribuibili a SaV (Evans *et al.*, 1998).

Anche la sorveglianza condotta in Svezia dal 1994 al 1998 ha messo in evidenza l'alta proporzione di focolai gastroenterici attribuibili a NoV (Hedlund *et al.*, 2000), precisamente 407 focolai su 676 totali. Successivi studi hanno poi confermato i NoV e SaV quali causa principale di focolai epidemici di AGE anche in Finlandia (Maunula *et al.*, 1999), Germania (Schreier *et al.*, 2000) e Olanda (Koopmans *et al.*, 2000).

Relativamente pochi studi riguardano la frequenza di calicivirus umani come singoli agenti eziologici di gastroenterite acuta sporadica o di focolai intraospedalieri tra bambini. In uno studio recente, è stato esaminato un totale di 1.129 bambini di età inferiore a 5 anni, ospedalizzati a causa di diarrea acuta. I campioni sono stati prelevati dai tre principali ospedali di Città del Messico in un periodo di 3 anni (marzo 1998- Dicembre 2000). Dopo aver analizzato tutti i campioni di feci per diversi enteropatogeni, 396 campioni risultati negativi sono stati ulteriormente esaminati per calicivirus utilizzando il metodo di RT-PCR usando primer specifici per Norovirus e Sapovirus. I Calicivirus umani sono stati rilevati nel 5,6% (22/396) dei bambini (Gutiérrez-Escolano *et al.*, 2010), dimostrando che i Calicivirus sono una importante causa di diarrea acuta pediatrica che richiede ospedalizzazione (Gutiérrez-Escolano *et al.*, 2010).

Sin dall'originale descrizione di Zahorsky di "malattia invernale scatenante vomito", è stato chiaro che la AGE indotta dai Calicivirus umani aveva una marcata stagionalità (Zahorsky, 1929). Il lavoro di Mounts e colleghi, basato su 12 studi differenti, ha dimostrato che i NoV sono predominanti durante i mesi più freddi dell'anno (Mounts *et al.*, 2000). In Europa, il picco epidemico di infezioni da Norovirus viene osservato tra novembre-aprile, con una diminuzione dell'incidenza tra maggio e giugno (Mounts *et al.*, 2000; Prato *et al.*, 2004; Mattner *et al.*, 2005; Kronema *et al.*, 2006; Medici *et al.*, 2006; Centers for Disease Control (CDC) and prevention, 2007; Mladenova *et al.*, 2008; Werber *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2011).

Le infezioni da NoV e SaV possono verificarsi ad ogni età, ma la più alta incidenza di infezioni da sapovirus si riscontra nei bambini di età inferiore ai 5 anni (de Wit *et al.*, 2001b), mentre i norovirus sono la seconda causa di infezione nella stessa fascia d'età, dopo rotavirus. In genere, i sintomi delle infezioni da norovirus nei bambini sono meno gravi di quanto accade nelle infezioni da rotavirus; tuttavia possono anche determinare sintomi acuti tali da richiedere ospedalizzazione.

In uno studio condotto nel 2002 nel Nord Italia, gli autori ricercarono norovirus e rotavirus in 426 campioni di feci di bambini di età inferiore ai 5 anni, ricoverati per gastroenterite e negativi per patogeni batterici. I risultati dimostrarono un'elevata frequenza di norovirus, implicato nel 10,4% dei casi, e frequentemente associato a rotavirus in infezioni miste. I risultati di questo studio confermarono che i rotavirus erano la causa principale di infezione (21,1%). I sintomi meno gravi nelle infezioni da norovirus e il picco invernale risultarono in linea con quanto descritto in precedenza (Medici *et al.*, 2006).

Studi di sieroprevalenza dimostrano che la maggior parte dei bambini sotto i 5 anni è normalmente già stata esposta ad un'infezione da calicivirus e che i NoV, a differenza dei SaV, sono un patogeno comune tra gli adulti (de Wit *et al.*, 2001b; Gutiérrez-Escolano *et al.*, 2010).

Va tuttavia ricordato, che gli studi basati sulle notifiche dei medici di medicina generale essenzialmente misurano le frequenze di consultazione e non le frequenze d'infezione. Dato che i calicivirus enterici causano tipicamente infezioni con sintomi piuttosto lievi, è possibile che la sottostima delle infezioni che colpiscono la popolazione sia molto elevata (Katpally *et al.*, 2011).

In aggiunta al miglioramento della pratica diagnostica, lo sviluppo delle moderne tecniche virologiche molecolari ha permesso di comprendere meglio le vie di trasmissione, l'evoluzione e le caratteristiche epidemiologiche dei norovirus.

Nel mondo, inclusa l'Europa, i NoV di GII risultano predominanti (>75%) sia nei casi sporadici che nei focolai epidemici di gastroenterite (Foley *et al.*, 2000; Donaldson *et al.*, 2008), anche se la distribuzione dei genotipi può differire tra i diversi paesi nel tempo. Nel Regno Unito, tra il 1992 e il 1998 (Hale *et al.*, 2000), due ceppi di GII (Grimsby-like e Mexico-like) hanno predominato per l'intero periodo di studio, alternandosi tuttavia da un anno all'altro. Un andamento simile fu riscontrato anche in Olanda (Koopmans, 2001), con il virus Mexico-like quale principale causa di epidemie nel 1994 e una diffusione di virus Grimsby-like dal 1995 fino alla metà del 1996 (Donaldson *et al.*, 2008).

Alcuni ceppi di NoV sono più comuni nei casi sporadici che non nei focolai epidemici, suggerendo che essi possano essere meno virulenti (Koopmans, 2001) e avere minore capacità di trasmissione. I meccanismi che regolano l'insorgenza di un ceppo virale predominante non è al momento spiegabile e una serie di motivi sono probabilmente coinvolti. L'infezione da NoV sembra generare solo un'immunità a breve termine, ma non si può escludere una pressione selettiva di tipo ceppo-specifico o cross-reattiva esercitata dallo stato immunitario della popolazione, tale da permettere l'emergenza di un nuovo ceppo epidemico (Donaldson *et al.*, 2011).

## 2.5 RELAZIONI FILOGENETICHE NEL GENERE NOROVIRUS

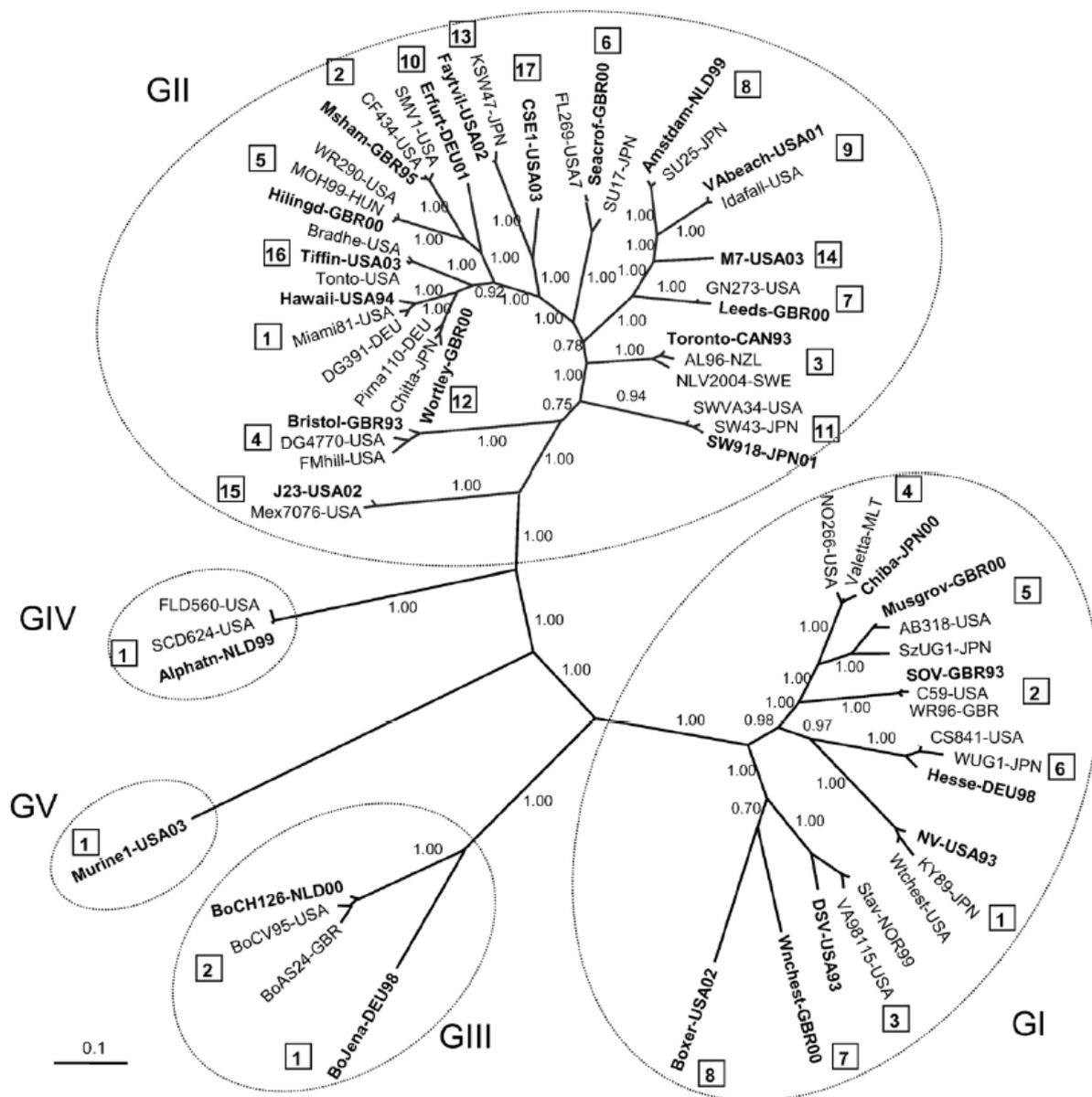
I Norovirus (NoV) sono un ampio gruppo di virus, che si diversificano sia sotto il profilo genetico che antigenico. In base alle sequenze della regione capsidica, i NoV vengono suddivisi in cinque distinti genogruppi (GI, GII, GIII, GIV e GV) (Ando *et al.*, 2000). La diversità nucleotidica che intercorre tra di essi è stimata approssimativamente intorno al 50% (Vinjé e Koopmans, 2000).

I virus appartenenti al GI ed al GII sono stati individuati nell'uomo, mentre i virus di GIII sono stati identificati solo nei bovini. Questi sono comunemente identificati come *Bovine Enteric Calicivirus* (BECs) (Fig. 2.3).

Fino a poco tempo fa si riteneva che i NoV fossero in grado d'infettare solamente l'uomo, ma studi più recenti hanno invece dimostrato che diversi ceppi infettano normalmente bovini, suini e altre specie animali (van Der Poel *et al.*, 2000; Martella *et al.* 2007). Sebbene non sia stata provata la trasmissione zoonotica dei NoV, è stato tuttavia proposto che gli animali possano rappresentare un potenziale serbatoio per l'insorgenza di nuovi ceppi o nuovi genotipi (van Der Poel *et al.*, 2000). È stato inoltre descritto un quinto genogruppo (GV) che comprende i ceppi murini di norovirus (MNV), MNV-1 e MNV-2, riscontrati in animali di laboratorio (Karst *et al.*, 2003), che presentano la capacità unica nel genere di replicarsi efficientemente *in vitro*.

All'interno dei genogruppi I e II, i ceppi di NoV, possono essere suddivisi rispettivamente in almeno 15 e 18 genotipi (Shiota *et al.*, 2007), in base all'identità di sequenza dell'intera ORF2. Identità maggiori dell'85% consentono di attribuire due ceppi virali ad uno stesso genotipo (Ando *et al.*, 2000). I diversi genotipi, con differenze di sequenza nucleotidica superiore al 15% sono classificati usando numeri progressivi per ogni genogruppo: GI.1-GI.14, GII.1-GII.17, e GIII.1 (Fig. 1.3). La diversità nucleotidica tra genogruppi (I-V) è invece superiore al 30%.

L'alto tasso di mutazione e la ricombinazione genica, che nei NoV può avvenire al livello della giunzione tra l'ORF1 e l'ORF2 mediante un meccanismo simile al crossing-over (Vinjé *et al.*, 2008), rendono spesso la classificazione alquanto complessa poiché, oltre all'individuazione di nuovi genotipi e specie, è anche frequente isolare ceppi con caratteristiche intermedie, difficili da classificare (Vinjé *et al.*, 2000).



**Figura 1.3:** Relazioni filogenetiche e nomenclatura dei NoV. L'albero è stato costruito allineando 68 sequenze di NoV. La nomenclatura dei ceppi segue questo ordine: Nome, Codice della nazione e Anno. I numeri nei riquadri indicano il numero del genotipo in ogni genogruppo (Huelsenbeck *et al.*, 2001).

### 2.5.1 RELAZIONI ANTIGENICHE

In aggiunta alla suddivisione dei ceppi virali del genere *Norovirus* in differenti genotipi è anche possibile distinguere clusters virali mediante metodiche immunologiche, anche se non sono stati

tuttora identificati veri e propri sierotipi. La classificazione più dettagliata resta ancora quella possibile con i metodi molecolari (Jiang *et al.*, 2002).

A causa della mancanza di un sistema efficiente di crescita virale *in vitro* e *in vivo* (Duizer *et al.*, 2004), la sierotipizzazione mediante test di neutralizzazione non è infatti attuabile, e resta dunque da chiarire se ciascun genotipo rappresenti o meno un sierotipo distinto.

E' tuttavia da sottolineare che alcuni genotipi di NoV sono stati caratterizzati grazie all'uso di antisieri iperimmuni, di sieri provenienti da pazienti convalescenti e per mezzo di studi di cross-esposizione.

I dati raccolti hanno evidenziato una risposta eterologa all'infezione con genotipi noti (Belliot *et al.*, 2001), ma questa cross-reattività sarebbe però limitata ai genotipi appartenenti ad uno stesso genogruppo. Tuttavia, sembra esserci cross-reattività anche tra i ceppi NV (GI.1) e HV (Hawaii virus) (GII.1) seppure filogeneticamente lontani tra di loro (Madore *et al.*, 1990).

In un lavoro recente è stato dimostrato che un anticorpo monoclonale generato contro la proteina capsidica assemblata (VLP) del ceppo GII.4 era in grado di riconoscere il capsido di diversi genogruppi e genotipi, in particolare GI.1,4,8 e 11 e GII.1 a 7 e 12 a 15, mostrando anche una debole affinità per GI.3. L'individuazione di alcuni anticorpi monoclonali ampiamente reattivi suggerisce la presenza di epitopi comuni tra i NoV appartenenti a genotipi distinti (Shiota *et al.*, 2007).

### **2.5.2 REPLICAZIONE DI NOROVIRUS ED ESPRESSIONE DEL GENOMA**

La conoscenza del meccanismo di base della replicazione di Norovirus, come il legame al recettore, la penetrazione, l'espressione genica e la maturazione del virione è stata ostacolata dalla mancanza di un sistema di colture cellulari permissive. Gran parte delle informazioni riguardo il processamento e la maturazione delle proteine virali sono pervenute da studi proteolitici *in vitro*. Molte analogie funzionali sono state messe in evidenza con virus del genere *Vesivirus*, che cresce in coltura cellulare, mentre informazioni riguardo il legame alla cellula sono state dedotte dagli studi effettuati attraverso l'espressione del gene codificante le proteine del capsido (ORF2) di NoV in sistemi ricombinanti.

In sistemi d'espressione eucariotici, come il baculovirus ricombinante in cellule d'insetto, le proteine codificate dall'ORF2 si auto-assemblano nel citoplasma cellulare in particelle simil-virali prive di genoma, o virus-like particles (VLP), che assomigliano morfologicamente ai capsidi virali. Grazie all'uso della criomicroscopia elettronica (22 Å) e all'ausilio di tecniche di ricostruzione e analisi computerizzata dell'immagine, si è potuto determinare che le VLP mimano anche antigenicamente il capsido del virus nativo, risultando quindi molto utili per studi *in vitro*.

I meccanismi molecolari della replicazione di norovirus, rimangono in maggior parte sconosciuti; tuttavia la comparazione delle sequenze e gli studi su calicivirus coltivabili hanno portato alla descrizione di molte caratteristiche funzionali del genoma virale dell'intera famiglia di virus.

Il genoma è costituito da un singolo filamento di RNA positivo covalentemente legato, nella terminazione in 5', con la proteina virale VPg (Burroughs e Brown, 1978).

Esperimenti di trasfezione hanno evidenziato l'importanza di questa proteina per l'infettività del genoma in considerazione del fatto che la sua rimozione, ad opera della proteina chinasi K, riduce la capacità traduzionale dell'RNA *in vitro* (Burroughs e Brown, 1978).

In base ai dati ottenuti sperimentalmente, il genoma virale non sembra essere tradotto per mezzo di un sito di inserimento ribosomiale interno, ma si pensa piuttosto che sia la VPg a giocare un ruolo nella traduzione dell'RNA.

Studi sul potenziale ruolo di VPg nei NoV hanno evidenziato come questa proteina legghi il fattore traduzionale 3 (eIF3) direttamente nel lisato cellulare, e sia anche in grado di complessarsi con altri eIF, inclusi la proteina legante il capsido eIF4E, la grande proteina d'impalcatura eIF4G, la proteina ribosomiale S6, e eIF2 $\alpha$ , componente del complesso ternario (Daughenbaugh *et al.*, 2003).

La VPg inibisce anche la traduzione degli RNA reporter *in vitro*, suggerendo che l'interazione osservata tra questa proteina e gli eIF sia rilevante per il processo traduzionale (Hershey e Merrick., 2000).

In ultimo, la recente scoperta di Norovirus murini coltivabili (MNV-1) è stata sfruttata per chiarire se si verificano interazioni tra VPg e gli eIF nelle cellule infette. È stato così evidenziato che la VPg di MNV-1 co-precipitava con eIF4G1, con la subunità di eIF3, e con eIF4E nelle cellule infette, e che questa VPg aveva caratteristiche simili alla proteina corrispondente di NV (Karst *et al.*, 2003).

Tutti questi dati supportano l'ipotesi che VPg giochi un ruolo nella traduzione dell'RNA virale durante l'infezione, e suggeriscono un terzo meccanismo di reclutamento ribosomiale dipendente da interazioni proteina-proteina tra la stessa VPg e gli eIF.

Questi studi hanno inoltre messo in luce la possibilità di usare MNV-1 come un modello molecolare per lo studio delle infezioni di Norovirus umani (Daughenbaugh *et al.*, 2003).

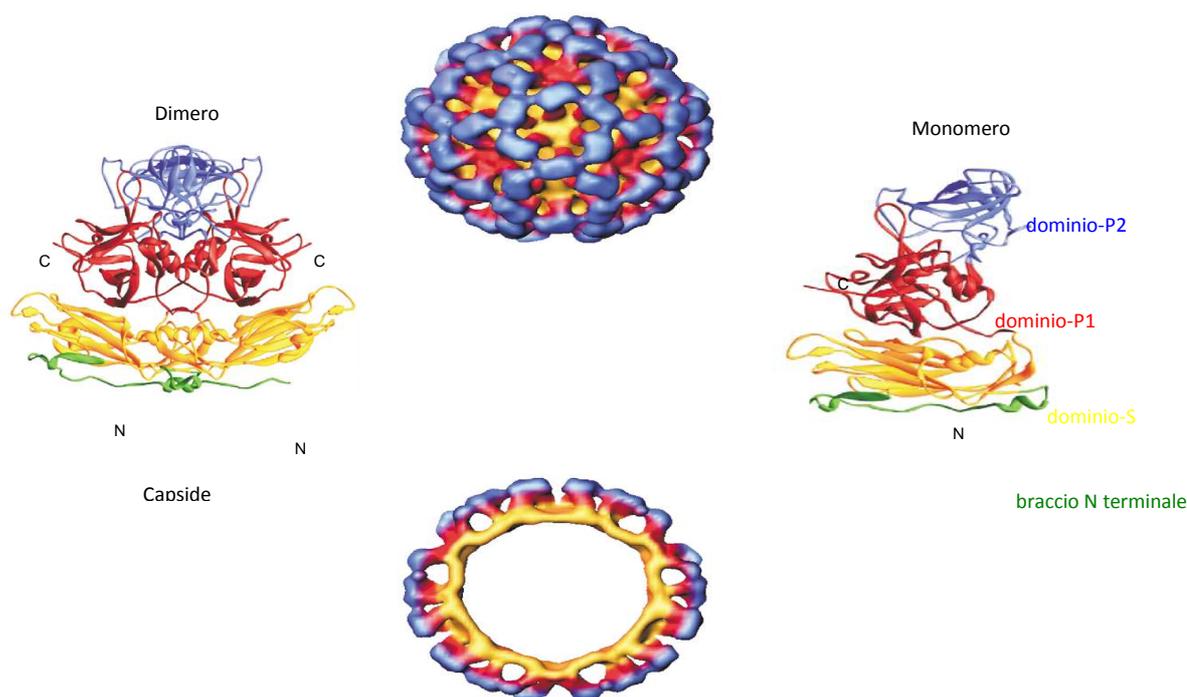
In un recente lavoro di McFadden e colleghi è stata descritta una nuova proteina di norovirus murino (MNV), l'ORF4. Questa proteina è prodotta durante l'infezione e si localizza nei mitocondri. E' stato dimostrato che l'espressione dell'ORF4 non è necessaria per la replicazione del virus in coltura cellulare ma che la stessa funziona probabilmente da fattore di virulenza, ostacolando la risposta immunitaria innata, attraverso l'inibizione dell'espressione di alcune proteine tra cui l'interferone-Beta (McFadden *et al.*, 2011).

### 2.5.3 PROTEINE STRUTTURALI

Il virione di Norovirus è composto da 90 dimeri della proteina capsidica maggiore VP1 e da una o due copie della proteina strutturale minore VP2 (Prasad *et al.*, 1994) (Fig. 4). Entrambe le proteine sono sintetizzate a partire dall'RNA subgenomico contenente le ORF 2 e 3.

**VP1.** La VP1 è costituita da 530-555 amminoacidi a seconda dei ceppi virali, che conferiscono alla proteina un peso che oscilla tra 55 e 60 kDa (Fig. 5).

La struttura del capsido di Norovirus (genogruppo I, ceppo Norwalk) è stata risolta per mezzo della cristallografia a raggi X (Prasad *et al.*, 1999), mostrando, che 180 copie di VP1 sono organizzate a formare un virione icosaedrico con simmetria T=3. La VP1 appariva ripiegata in due domini maggiori che costituiscono rispettivamente la superficie di rivestimento (dominio S) e le porzioni che da questa si estendono (dominio P) (Prasad *et al.*, 1999). I 225 amminoacidi N-terminali costituiscono il dominio S e contengono elementi essenziali per la formazione dell'icosaedro.



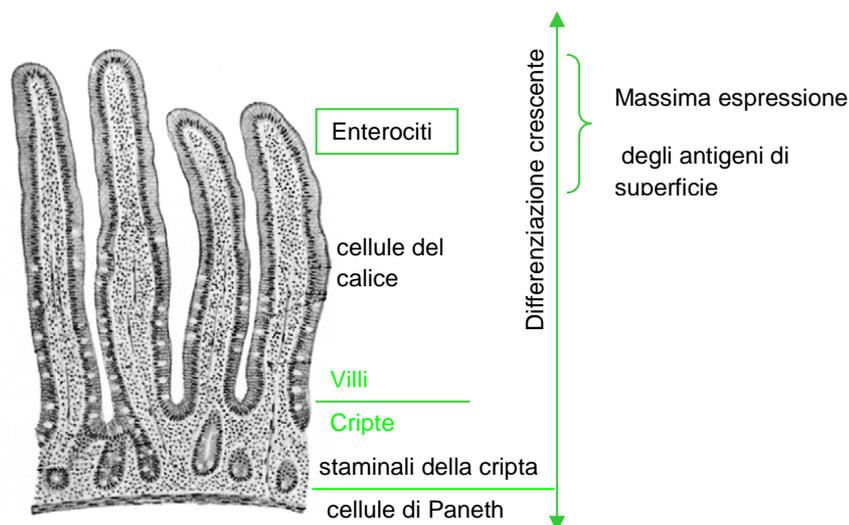
**Figura 2.1:** La struttura delle VLP di NV è stata visualizzata tramite crio-microscopia elettronica a 22 Å (porzione alta della figura) e tramite cristallografia a raggi X a 3.4 Å. Le VLP di NV sono costituite da 90 dimeri della proteina capsidica (sinistra) assemblati in  $T_{\frac{1}{4}}^3$  con simmetria icosaedrica. Ogni monomero (destra) è diviso in un braccio N-terminale (verde) che si affaccia all'interno della VLP, in un dominio di rivestimento (S-domain, giallo) che forma la superficie continua della VLP, e in un dominio che protrude (P-domain) e si estende dalla superficie del dominio S. Il dominio P è ulteriormente diviso in due subdomini, P1 e P2 (rosso e blu rispettivamente), con il subdominio P2 nella porzione più distale delle VLP. (Hardy, 2005).

tipiche protrusioni osservate tramite EM. Il dominio P2 è un'inserzione di 127 aa (aa 27-405) all'interno del dominio P1 che si colloca nella porzione più distale della superficie del monomero ripiegato. P2 è il dominio più variabile e si ipotizza che esso giochi un ruolo importante nel legame con il recettore e nell'induzione della risposta immunitaria. Inoltre si pensa anche che P2 sia il responsabile primario delle interazioni con gli antigeni AB0 del gruppo sanguigno noti per essere determinanti nella suscettibilità individuale all'infezione da norovirus (Tan *et al.*, 2003).

Comunque, l'identificazione dei domini di VP1 coinvolti nel legame alle cellule e la definizione di un autentico recettore funzionale restano limitate dalla mancanza di linee cellulari permissive con recettori adeguati. Per ora l'unica informazione nota è la similitudine di P2 con il dominio 2 del fattore di allungamento-Tu (EF-Tu) legante l'RNA. Questa è una proteina legante GTP coinvolta nel trasporto degli aminoacyl tRNA al ribosoma (Tamura *et al.*, 2000).

**VP2.** La VP2 mostra anch'essa una rilevante variabilità di sequenza tra i diversi ceppi, ed è composta da 208-268 amminoacidi con un peso molecolare che oscilla tra 22-29 kDa (Seah *et al.*, 1999). Il ruolo della VP2 nel ciclo replicativo non è conosciuto, ma sembra chiaro che essa rappresenti una proteina strutturale minore, presente in una o due copie per virione. La VP2 venne inizialmente descritta in RHDV (Glass *et al.*, 2000), ed è stato recentemente osservato che, pur non essendo necessaria per l'assemblaggio delle VLP in cellule di insetto, essa appare essenziale per la produzione di virus infettivo (Sosnovtsev *et al.*, 2005). VP2 è una proteina basica in grado probabilmente di legare e promuovere l'impacchettamento del genoma virale (Glass *et al.*, 2000). Studi di espressione della VP2 hanno messo in evidenza la presenza di un RNA subgenomico che codifica sia la VP1 che la VP2 (Neill e Mengeling, 1988), facendo ipotizzare che VP1 svolga un ruolo regolatorio nella sintesi di VP2, e che per il suo ruolo regolatorio nell'infezione naturale questa proteina necessiti di una produzione controllata (Hardy, 2005).

## 2.5.4 NOROVIRUS, MALATTIA E PATOLOGIA



**Figura 2.5:** Sezione d'intestino che mostra le cripte ed i villi rivolti verso il lumen (alto). Nelle cripte si trovano le cellule staminali dell'intestino tenue che si differenziano in cellule di Paneth, cellule del calice ed enterociti. Queste sono cellule che esprimono la maggior quantità e la più ampia varietà di carboidrati, inclusi ABH e Lewis (Green *et al.*, 1988).

I Norovirus che infettano l'uomo sono un gruppo di virus geneticamente e antigenicamente eterogeneo suddiviso in molteplici genotipi distinti appartenenti quasi tutti a GI e GII.

L'infezione da NoV ha solitamente un periodo d'incubazione di 24-48 ore (Hardy, 1999), e i sintomi tipici che insorgono sono diarrea e/o vomito, febbre e nausea (Pang *et al.*, 2000).

L'infezione è auto-limitante e le manifestazioni ad essa correlate durano generalmente dalle 12 alle 60 ore (Hardy, 1999).

La patologia associata ai NoV è stata descritta con una certa ricchezza di dettagli sin dalla sua iniziale identificazione. Nei soggetti infetti generalmente non si riscontrano lesioni gastriche (Widerlite *et al.*, 1975), ma non mancano manifestazioni patologiche intestinali come: accorciamento dei villi mucosali, ipertrofia della cripta, danneggiamento nell'assorbimento

cellulare, aumento della mitosi delle cellule epiteliali (Widerlite *et al.*, 1975), alterazione delle attività enzimatiche cellulari (Agus *et al.*, 1973) (Fig. 2.5).

I sintomi si risolvono generalmente del tutto in pochi giorni (Agus *et al.*, 1973).

Le lesioni dell'intestino tenue sopra riportate sono tipiche delle gastroenteriti virali, e apparentemente ceppi diversi di NoV causano la stessa patologia (Schreiber *et al.*, 1974).

Informazioni sull'immunità associata all'infezione da norovirus sono state ottenute a seguito della scoperta che i norovirus potevano essere trasmessi facilmente per somministrazione orale di filtrati fecali infetti (Dolin *et al.*, 1971).

A giocare un ruolo nella resistenza all'infezione sono tuttavia altri fattori, quali ad esempio gli antigeni ABO, dato che non tutti gli individui sviluppano anticorpi a seguito dell'infezione (Johnson *et al.*, 1990).

Due forme d'immunità, di breve e lunga durata, sono apparentemente associate all'infezione da norovirus. E' stato osservato come esposizioni sequenziali a ceppi virali differenti siano in grado d'indurre risposte immunitarie maggiori se comparate con quelle indotte da infezioni sequenziali omologhe. E' stato così ipotizzato che un'infezione primaria di NoV sia in grado d'indurre una memoria anticorpale piuttosto eterogenea capace di riconoscere sia epitopi del dominio S (cross-reattivi) che del dominio P (specie-specifici).

Quando ad essa segue una seconda infezione con un ceppo eterologo, questa potrebbe indurre una risposta immune secondaria verso epitopi cross-reattivi, e una risposta immune primaria contro gli epitopi ceppo-specifici. Le cellule B specifiche per gli epitopi cross-reattivi vengono così selettivamente mantenute, mentre quelle dirette contro epitopi ceppo-specifici si perderebbero (Brehm *et al.*, 2002).

Nonostante l'ovvio vantaggio dell'insorgenza di una risposta immune secondaria, la possibilità che da questa si generino anticorpi in grado di neutralizzare ceppi diversi è piuttosto ridotta (Mongkolsapaya *et al.*, 2002). Sembra certo che l'immunità indotta da norovirus non conferisce un'adeguata protezione rispetto a una seconda esposizione a virus appartenenti a genogruppi differenti. Studi di cross-esposizione, infatti, dimostrano che infezioni con NoV non conferiscono protezione l'uno rispetto all'altro (Johnson *et al.*, 1990). I casi di AGE (gastroenterite acuta) da NoV nella popolazione adulta suggeriscono che l'immunità permanente verso i Norovirus non sia largamente diffusa nella popolazione, e che i livelli anticorpali riscontrati siano piuttosto da ricondursi a ripetuta esposizione al virus.

E' stato anche possibile fare chiarezza sulla risposta specifica indotta da norovirus sfruttando come modello l'infezione da SMV. Da questi studi è risultata una predominante risposta immunitaria cellulo-mediata tipo CD4+ -Th1 (Lindesmith *et al.*, 2003).

Le informazioni circa la risposta immunitaria associata ai norovirus derivano anche da studi con Virus-Like Particles (VLPs).

Come già riportato, le VLP sono capsidi ricombinanti, immunologicamente e morfologicamente indistinguibili dal virus nativo (Jiang *et al.*, 1992). Queste sono immunogeniche nei topi quando somministrate oralmente senza adiuvanti, ed inducono la produzione di IgG e IgA (Stefano, 1984). Se somministrate all'uomo, le VLP generano un sensibile incremento di IgA specifiche anti-VLP nelle secrezioni mucose e nel 90% dei casi aumenti di IgG anti-norovirus nel siero (Tacket *et al.*, 2003).

Questi studi, oltre a consentire una maggiore comprensione delle basi dell'immunità verso i norovirus, hanno rappresentato un punto d'inizio per lo sviluppo di un possibile vaccino.

Finché la distribuzione dei genotipi continuerà però a variare col tempo, la vaccinazione non sarà tuttavia utile su vasta scala (Donaldson *et al.*, 2008). Perciò è essenziale che ai processi di sviluppo di candidati vaccini si affianchi il monitoraggio dei ceppi umani di NoV circolanti, includendo ceppi bovini e suini a potenziale trasmissione zoonotica. (Scipioni *et al.*, 2008).

### **2.5.5 EPIDEMIOLOGIA NELL'UOMO**

All'inizio degli anni '90 era tendenza comune considerare una possibile eziologia virale delle epidemie gastroenteriche o delle tossinfezioni alimentari limitatamente ai casi in cui era esclusa con certezza la presenza di un agente eziologico d'origine batterica o parassitica (Hardy, 1999).

La vicenda della nave Aurora, dove oltre 800 persone (passeggeri e personale) sono state coinvolte in un'epidemia di vomito-diarrea durante una crociera nel Mediterraneo nell'Ottobre del 2003, ha richiamato l'attenzione dei mass-media europei e italiani sul ruolo emergente dei norovirus nelle patologie acute gastrointestinali a carattere epidemico. Negli ultimi anni, questi patogeni sono risultati responsabili di un numero crescente di epidemie in Italia, in villaggi turistici, case di cura, scuole o nella popolazione (Boccia *et al.*, 2002; Le Guyader *et al.*, 2006; Goglio *et al.*, 2008; Di Bartolo *et al.*, 2011; Rimoldi *et al.*, 2011).

Nel mondo, i norovirus sono oggi ritenuti la principale causa di gastroenterite epidemica, ruolo essendo inoltre secondi solo ai rotavirus nelle gastroenteriti sporadiche in pediatria. L'infezione da norovirus ha un decorso acuto ed è autolimitante, con sintomi che solo di rado sono sufficientemente gravi da richiedere il ricovero ospedaliero, specie negli adulti. Tuttavia, la carica infettante molto ridotta e l'elevata resistenza e diffusione nell'ambiente sono in grado di scatenare epidemie anche molto vaste, per passaggio persona-persona e/o per esposizione a una fonte comune. Sebbene reali largamente sottostimati, questi agenti rivestono universalmente un ruolo di primo piano come causa di patologie gastroenteriche, ruolo reso ancor più rilevante dalla trasmissione dell'infezione attraverso alimenti che attraversano i circuiti del mercato globale (Widdowson *et al.*, 2005). Tra questi, particolare importanza assumono i frutti di mare consumati crudi o poco cotti, in particolare ostriche, ma anche le verdure fresche e i frutti di piante a basso fusto, quali lamponi e altri "berries". In entrambi i casi, un ruolo considerevole appare giocato dalle acque, rispettivamente di coltivazione o irrigazione, contaminate con feci umane, evidenza ulteriore dell'impatto che le attività dell'uomo e lo sviluppo incontrollato delle comunità abitative possono avere sull'ambiente (Widdowson *et al.*, 2005; Di Bartolo *et al.*, 2010).

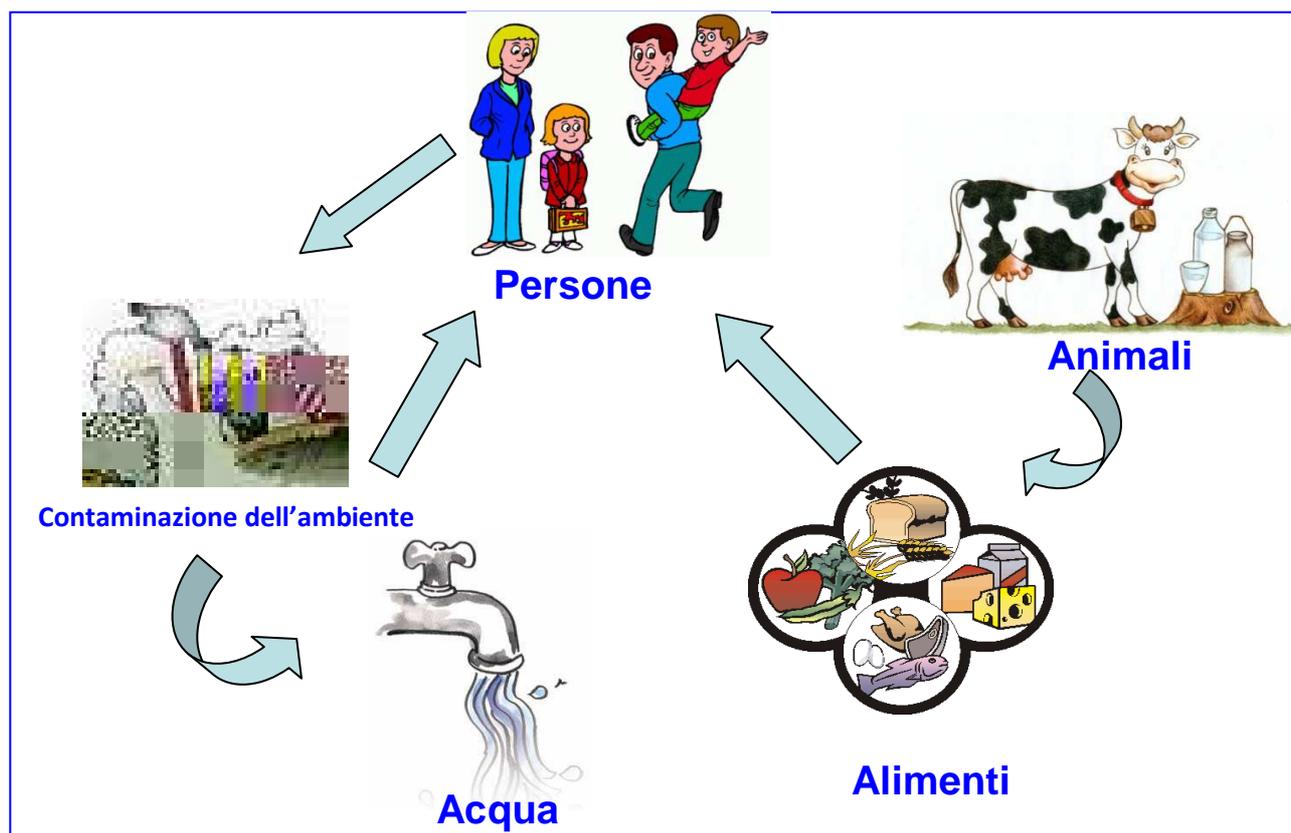
Diversi sistemi sono stati sviluppati per l'estrazione e la concentrazione dei norovirus da acque e alimenti, ma nella maggior parte dei casi l'associazione di un veicolo a un fatto epidemico è soltanto di tipo epidemiologico, e non ha conferma di laboratorio. In aggiunta alla notevole diluizione dei virus nei campioni alimentari o ambientali, la bassa sensibilità dei sistemi diagnostici molecolari è anche legata all'elevata variabilità delle sequenze genomiche virali target utilizzate nelle tecniche di amplificazione (RT-PCR) (Vinjé *et al.*, 2000).

Per gli stessi motivi, anche gli attuali sistemi immunologici non sono in grado di fornire dati utili ai fini di studiare le relazioni epidemiologiche tra diversi casi clinici o distinti focolai epidemici. Studi sulla variabilità e sull'evoluzione dei ceppi, e sui link epidemiologici sono invece resi possibili dalla identificazione del genotipo e genogruppo virale di appartenenza mediante analisi di sequenza e confronto in database. L'impiego di queste tecniche rende possibile lo studio evolutivo degli agenti virali e la loro diffusione a livello transnazionale, anche in relazione con i flussi dei prodotti alimentari dalle zone di origine, attraverso sistemi di sorveglianza integrati costituiti sia a livello europeo che negli USA (Vinjé e Koopmans, 2000; Boccia *et al.* 2002; Centers for Disease Control and prevention - CDC - , 2007). In particolare, in diversi paesi hanno partecipato al consorzio Europeo Food Borne Virus in Europe (FBVE), attraverso Progetti di ricerca e sorveglianza, per la messa a punto di sistemi integrati medico-veterinari epidemiologici e virologici, operando attraverso database condivisi via web. In tale contesto, i risultati di un'esperienza pilota di

sorveglianza condotta in Italia negli ultimi anni hanno dimostrato la circolazione nel paese di popolazioni eterogenee di norovirus e la loro somiglianza genetica con ceppi virali diffusi in altri paesi Europei. In particolare, tra la fine del 2004 e l'inizio del 2005, è stata riscontrata in diversi focolai epidemici nel Nord Italia la presenza di una variante del ceppo GII.4 Lordsdale, evolutasi nel settembre 2004 in Olanda da un ceppo predominante da anni in gran parte d'Europa (Lopman *et al.*, 2004). Queste osservazioni mostrano come anche l'Italia rientri nell'ambito della circolazione dei ceppi di norovirus maggiormente attivi in ambito Europeo, consistentemente sia con il mercato globale dei prodotti alimentari che con il crescente spostamento di persone in ambito comunitario. Ciò può in particolare essere desunto da alcuni episodi epidemici descritti negli ultimi anni.

### **2.5.6 TRASMISSIONE DI NOROVIRUS**

I NoV causano focolai attraverso diverse vie di trasmissione che coinvolgono l'uomo, gli alimenti e l'acqua. Negli ultimi anni è stato in particolare evidenziato come la contaminazione ambientale e la contaminazione di frutta e verdura cruda, giochino un ruolo importante nella diffusione di questi virus. La trasmissione diretta uomo-uomo è la via più efficiente e frequente, sia attraverso il ciclo oro-fecale sia per diffusione di particelle volatili contaminate (aerosol) generate in particolare durante il vomito (Lopman *et al.*, 2002). I focolai epidemici sono spesso il risultato di più di una via di trasmissione. Ad esempio, il personale addetto alla preparazione di alimenti può essere il responsabile primario di un focolaio epidemico, che può quindi amplificarsi tramite trasmissione uomo-uomo e/o per contaminazione ambientale (Koopmans, 2008).



**Figura 2.3** Vie di trasmissione dei norovirus.

### Trasmissione “persona-persona”.

La trasmissione “persona-persona” è considerata, almeno in Europa, la via più comune per i NoV (EFSA Panel on Biological Hazards, 2011). Dal 1992 al 1995, è stata riconosciuta la via di trasmissione principale nel 72% dei focolai di NoV in Inghilterra e Galles (Dedman *et al.*, 1998), accompagnandosi a elevati tassi di attacco (50%), anche in conseguenza della bassa dose infettiva di NoV e dagli intervalli di escrezione virale (>50%), sino a più a 2 o più settimane dopo la scomparsa dei sintomi (Glass *et al.*, 2009). In aggiunta al ciclo oro-fecale classico (Glass *et al.*, 2009), anche la trasmissione per via aerogena gioca un ruolo importante nella diffusione del virus. La frequenza di vomito associata all’infezione da NoV è infatti elevata, e i virus dispersi nell’aerosolizzazione resistono a lungo nell’ambiente senza perdita di infettività (Cheesbrough *et al.*, 1997). I numerosi focolai epidemici negli ambienti chiusi, come negli istituti di riposo e scuole, sono probabilmente correlati alla presenza di vomito nei pazienti (Caul, 1994). La via di trasmissione principale resta quella persona-persona, tuttavia negli ultimi anni sono stati descritti un numero crescente di focolai di gastroenterite causate da norovirus e conseguenti al consumo di

alimenti contaminati. Gli alimenti più spesso implicati sono i molluschi, in particolar le ostriche, le piante a basso fusto, come i lamponi, ma anche il consumo di acqua potabile contaminata (Kingsley *et al.*, 2002; Doyle *et al.*, 2004; Maunula *et al.*, 2009) o acqua potabile (Werber D *et al.*, 2009; Di Bartolo *et al.*, 2011). Nell'ambito dell'attività della rete di sorveglianza Europea FBVE sui norovirus, tra il 2000 e il 2006 vennero raccolti dati su 7637 epidemie di gastroenterite causate da norovirus. Tra quelle in cui era nota la via di trasmissione ( $n = 5.036$ ), l'88% ( $n = 4.429$ ) erano epidemie dovute a trasmissione persona-persona, il 10% ( $n = 506$ ) epidemie a trasmissione alimentare e il 2% ( $n = 76$ ) erano causate dal consumo di acqua contaminata (Kroneman *et al.*, 2008).

Epidemie dovute a NoV sono spesso collegate alla manipolazione di alimenti, che possono essere contaminati da persone infette e causare AGE se consumati crudi o poco cotti (Baert *et al.*, 2008). In molti focolai descritti, in cui erano implicato un alimento, l'origine dell'epidemia era riconducibile a un addetto alla preparazione degli alimenti con una anamnesi recente di gastroenterite (Anderson *et al.*, 2001; Boxman *et al.*, 2007; Lederer *et al.*, 2005; Sakon *et al.*, 2005). Verosimilmente, la contaminazione secondaria degli alimenti è riconducibile a scarse condizioni igieniche delle maestranze. Un esempio di questa eventualità è l'epidemia di origine alimentare dovuta a norovirus che si verificò dopo un pranzo di Natale in un ristorante in Austria nel dicembre 2007. Ventuno soggetti su 63 che parteciparono al banchetto si infettarono dopo aver consumato un alimento contaminato durante la manipolazione (Kuo *et al.*, 2009). Lavoratori asintomatici sono stati implicati come fonte in focolai di norovirus molto più frequentemente che lavoratori sintomatici. Ciò aiuta a spiegare la difficoltà di individuare e bloccare le epidemie causate da alimenti contaminati da lavoratori infetti asintomatici (Todd *et al.*, 2009). Ozawa e colleghi in Giappone hanno dimostrato che il 19% dei lavoratori asintomatici e sintomatici coinvolti nella manipolazione di alimenti risultavano positivi per norovirus, principalmente di genotipo GII.4. Inoltre, la carica virale nelle feci risultava essere simile sia in lavoratori sintomatici che asintomatici. Questo dato evidenzia il potenziale pericolo di trasmissione di questi virus, altamente contagiosi, attraverso la manipolazione degli alimenti (Ozawa *et al.*, 2007).

**Trasmissione alimentare.** Stime del ruolo della trasmissione alimentare nelle infezioni da NoV variano nei diversi paesi. In Svezia, il 16% dei focolai di gastroenterite da NoV (1994-1998) è risultato associato ad alimenti o a campioni di acqua infetti. Nel Regno Unito, gli alimenti sono stati ritenuti responsabili del 5% delle infezioni (1992-1999), e in Olanda del 17% (Koopmans *et al.*, 2000). Rispetto all'Europa, negli Stati Uniti, la trasmissione alimentare di NoV è invece ritenuta la

via di trasmissione principale (Verhoef *et al.*, 2011). Probabilmente la differenza può essere legata a differenze nei sistemi di sorveglianza.

**Molluschi e bivalvi.** Sebbene i NoV non si replicano nei tessuti dei bivalvi, questi animali filtratori sono in grado di accumulare e concentrare i virus presenti nelle acque e, se consumati crudi o poco cotti, possono diventare una fonte d'infezione (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food, 1998). In Europa, la direttiva 2003/99/EEC, nota come "direttiva zoonosi", per la prima volta indica i Calicivirus tra i patogeni con potenziale zoonotico da includere nei piani di sorveglianza. Da allora, sebbene la legislatura sia ancora lontana dal determinare i parametri di sicurezza alimentare per norovirus, questo virus è ormai richiamato in diversi Regolamenti Comunitari come virus emergente probabile causa di contaminazione negli alimenti. La normativa non prevede ancora la ricerca di virus enterici (tra cui NoV) nei bivalvi, anche se l'art. 11 comma 5 lett. B del REG 853/2004 CE, in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, lascia aperta la possibilità di "stabilire requisiti igienico-sanitari supplementari per i molluschi bivalvi vivi in collaborazione con il laboratorio comunitario di riferimento permanente, comprese le procedure per le analisi virologiche e le relative norme virologiche". Il principale problema, ad oggi, risiede nelle limitate conoscenze sulla dose infettante legate alla mancanza di sistemi di crescita *in vitro* e nella mancanza di standardizzazione dei metodi diagnostici. Negli ultimi anni, ad opera del Centro per la Normazione Europeo (CEN), sono stati sviluppati metodi basati sulla real-time PCR, per aumentare la sensibilità dei metodi diagnostici, e fornire metodi standardizzati che consentano la quantificazione del virus. Anche il Comitato Scientifico per le Misure Veterinarie in materia di Sanità Pubblica (CSMVSP) nel 2002 ha emesso un parere sui virus Norwalk-simili (NLV, Norovirus), concludendo che "gli indicatori fecali convenzionali non sono affidabili per dimostrare la presenza o assenza di NLV e che non è una pratica sicura basarsi sulla rimozione degli indicatori batterici fecali per determinare i tempi di depurazione dei frutti di mare. Il comitato ha raccomandato inoltre l'utilizzo di *E. coli* piuttosto che dei coliformi fecali, quando si utilizzano indicatori batterici per rilevare la contaminazione fecale nelle zone di raccolta dei frutti di mare".

Molluschi che soddisfano gli standard di contaminazione batterica possono quindi essere contaminati da patogeni virali (Lees, 2000), e le procedure di depurazione che rimuovono con successo i batteri sono generalmente inadeguate alla rimozione dei virus, come richiamato anche nel regolamento CEE 2073/05.

La contaminazione dei siti di allevamento con acque di scarico fa sì che i molluschi diventino un serbatoio per i molteplici ceppi infettivi circolanti nella comunità (Lees *et al.*, 2000), e indagini su focolai epidemici associati a crostacei crudi hanno infatti evidenziato la presenza d'infezioni miste con diversi genotipi virali (Le Guyader *et al.*, 2006). Queste co-infezioni pongono inoltre le condizioni per eventi di ricombinazione genica (Vinjé *et al.*, 2000), favorendo potenzialmente l'emersione di ceppi virali con maggiore virulenza.

**Frutta e verdura.** Lo sviluppo di tecniche sensibili per la tipizzazione molecolare ha contribuito a chiarire focolai epidemici di AGE di grandi dimensioni e con diffusione anche internazionale, in particolare dovuta al consumo di frutta e verdura. Tali prodotti possono essere contaminati dalle acque d'irrigazione o da concimi naturali non trattati, per contatto con acqua contaminata prima del congelamento o direttamente dagli operatori infetti al momento del raccolto e nelle successive fasi della filiera degli alimenti.

Nell'era della globalizzazione, la diffusione internazionale di alcuni prodotti pone problemi rilevanti nel controllo della filiera, nella tracciabilità e nella diagnostica virologica.

In Finlandia, sono stati riportati diversi focolai di gastroenterite da norovirus che hanno coinvolto circa 200 persone. Tutti i focolai si verificarono dopo il consumo di lamponi importati dei quali fu possibile identificare il lotto destinato al settore di ristorazione. Norovirus di genotipo GI.4 venne trovato in lamponi congelati, in due pazienti e nelle bacche. Sulla base dei risultati epidemiologici, si poté concludere che un unico lotto di lamponi surgelati era stato la fonte di tutti i focolai (Maunula *et al.*, 2009).

In Canada, tra aprile e novembre 2009, 328 campioni di verdure a foglia verde confezionati furono esaminati per la presenza di NoV e rotavirus. In totale, 275 campioni risultarono positivi per la presenza di virus, 148 (54%) erano positivi per NoV e 1 (0,4%) per rotavirus. La maggior parte dei NoV rilevati apparteneva al genogruppo I. Tuttavia, nello stesso periodo dello studio, non vi furono denunce di gastroenterite associate a questi alimenti e non furono segnalati focolai epidemici, suggerendo una scarsa notifica dei casi di gastroenterite anche in quel paese (Mattison *et al.*, 2009).

Oltre che nei frutti di bosco, norovirus è stato anche ritrovato in pomodorini (40%) e insalate di frutta (20%), come evidenziato in un lavoro eseguito in Belgio su 75 prodotti di frutta prelevati a campione, e probabilmente contaminati nelle fasi secondarie di manipolazione. Anche in questo caso, nello stesso periodo non vi furono segnalazioni di epidemie o di picchi di casi sporadici di gastroenterite (Stals *et al.*, 2011).

**Contaminazione secondaria degli alimenti.** Anche se i NoV vengono inattivati quando esposti alle alte temperature (1 min a 90°C), in aggiunta agli alimenti contaminati all'origine e consumati crudi (molluschi), qualunque piatto può essere contaminato dal personale di cucina nelle fasi di manipolazione dopo la cottura (Hedberg e Osterholm, 1993; Kilgore *et al.*, 1996).

Un esempio è rappresentato dal caso di un panettiere che aveva avuto episodi ripetuti di vomito e diarrea sia prima che durante il turno lavorativo, causando un'epidemia che coinvolse più di 3000 persone (Kuritsky *et al.*, 1984).

La potenzialità di contaminazione alimentare da vomito è stata anche accertata da analisi effettuate durante un focolaio epidemico in un hotel nel North Yorkshire, Inghilterra (Patterson *et al.*, 1997). L'ambiente contaminato, nonostante fosse stato disinfettato con un prodotto contenente cloro, conservò un quantitativo di NoV sufficiente a permettere la diffusione dell'infezione nei giorni successivi.

Data l'elevata trasmissibilità di norovirus (Daniels *et al.*, 2000), le generali regole di prevenzione suggeriscono che un lavoratore convalescente non dovrebbe essere riammesso al lavoro prima delle 48-72 ore successive alla scomparsa dei sintomi (Koopmans e Duizer, 2004). Indagini sui focolai di NoV hanno però individuato la presenza di virus nelle feci di lavoratori anche 10 giorni dopo la scomparsa dei sintomi (Parashar *et al.*, 1998). In diversi focolai, è stato inoltre riscontrato che il personale di cucina durante la fase d'incubazione aveva contaminato piatti di portata prima di sviluppare sintomi (Stolle e Sperner, 1997).

Applicare misure di controllo nella fase pre-sintomatica del lavoratore è impossibile; occorre quindi rispettare scrupolosamente le comuni pratiche di igiene personale e le procedure HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point).

**Acque contaminate e ambiente.** La capacità dei norovirus di infettare soggetti appartenenti a tutti i gruppi di età, la loro diversità genetica e l'incapacità nell'uomo di sviluppare una immunità duratura fanno dei norovirus un rischio per la popolazione mondiale. In particolare, le acque potabili e superficiali rappresentano una fonte di rischio importante. Epidemie spesso si originano per contaminazione di pozzi privati e pubblici e dei sistemi idrici urbani (Brugha *et al.*, 1999). Le riserve d'acqua possono contaminarsi nel corso di inondazioni, per infiltrazioni d'acqua contaminata durante piogge massive (Cannon *et al.*, 1991), specialmente in prossimità di impianti di depurazione (de Silva *et al.* 2007). Focolai epidemici possono anche verificarsi a causa di

sversamenti dalle acque di scarico urbano in sorgenti, ruscelli e acquedotti (Hedberg e Osterholm, 1993).

Numerose epidemie da norovirus sono state associate ad acque ricreative. Tra queste la prima, documentata nel giugno 1977 e associata alla balneazione in una piscina (Kappus, 1982) di una scuola elementare in Ohio, ha portato all'identificazione del virus di Norwalk.

Nel periodo 1971- 2000, norovirus è risultato responsabile del 4% dei focolai epidemici associati ad acque ricreative negli Stati Uniti; successivamente la percentuale è salita al 10% (Craun *et al.*, 2005).

In un lavoro di Di Bartolo e colleghi (Di Bartolo *et al.*, 2011), è stata descritta un'epidemia di gastroenterite che ha coinvolto più di 300 persone in una località vicina al lago di Garda nel 2009. L'indagine epidemiologica e quella virologica evidenziarono il coinvolgimento dell'acqua municipale, possibilmente contaminata a seguito del mal funzionamento e insufficiente manutenzione dei sistemi di filtrazione. La zona è infatti servita dall'acqua del lago di Garda, previa depurazione e filtrazione. Da 5 campioni ambientali (acque e sedimenti) e dalle feci dei soggetti affetti (40) da gastroenterite, furono individuati 3 distinti rotavirus e cinque genotipi di norovirus; due di questi erano presenti sia in campioni di pazienti sia in campioni ambientali (Di Bartolo *et al.*, 2011).

Negli USA, nel biennio 2003-2004, norovirus ha causato il 16,7% dei casi di gastroenteriti associati ad acque ricreative. Di 5 focolai epidemici descritti in dettaglio, uno coinvolse 140 persone durante una gara regionale di nuoto svolta in una piscina comunale nello stato dell'Idaho, nel Marzo 2004. Un altro focolaio si verificò in una scuola elementare durante l'utilizzo degli scivoli ad acqua: i bambini si infettarono dopo che uno di essi, già malato e affetto da diarrea, aveva utilizzato gli scivoli. La trasmissione secondaria ai familiari, caratteristica distintiva dei norovirus, portò poi a 42 il numero totale di casi (Centers for Disease Control and Prevention - CDC -, 2001).

La frequenza di epidemie da norovirus associate ad acque ricreative mette in luce la necessità dello sviluppo di tecniche che rendano possibile il monitoraggio ambientale, data la bassa dose infettante del virus.

I NoV sono inoltre particolarmente resistenti sia nelle acque che all'essiccazione. Quando comparati con un pannello di tipici inquinanti patogeni delle acque (incluso poliovirus di tipo 1, rotavirus umano, rotavirus di scimmia e batteriofago f2), i NoV sono risultati più resistenti degli altri all'inattivazione da cloro (Keswick *et al.*, 1985; Shin *et al.*, 2008; Nowak *et al.*, 2011).

Poiché le tecniche di indagine molecolare non permettono di determinare la presenza di virus infettivo, una delle priorità principali della ricerca resta la messa a punto di metodi colturali. Ad oggi, la conferma del rischio legato alla contaminazione ambientale è data dalla presenza di casi di malattia associati (EFSA Panel on Biological Hazards, 2011).

**Trasmissione negli ospedali e case di cura.** Per diverse ragioni i NoV rappresentano un rischio particolarmente alto per la salute negli ospedali e nelle case residenziali/di cura. Il virus può essere introdotto negli istituti tramite alimenti, acqua, da medici e paramedici o da visitatori infetti (Chadwick *et al.*, 2000). Dato che in queste strutture gli spazi vitali sono ristretti e che l'igiene personale potrebbe essere ridotta, le condizioni risultano anche favorevoli per la trasmissione uomo-uomo. Poiché l'infezione va a colpire persone anziane e malati, è più frequente che, in queste strutture, i NoV causino una malattia grave o addirittura letale (Centers for Disease Control and Prevention – CDC -, 2001), e i focolai risultano difficili da controllare (Mayoral *et al.*, 2000).

Gli alti tassi d'attacco tipici dei focolai di NoV non coinvolgono di norma i soli residenti e pazienti, ma i casi possono rappresentare il 30-50% del totale anche tra il personale (Mayoral *et al.*, 2000). Ciò causa due problemi differenti: (1) gli spostamenti del personale facilitano la trasmissione del virus verso nuove aree; e (2) l'assenza dal lavoro che ne consegue causa riduzione del personale per la gestione dei pazienti e perdite economiche (Caceres *et al.*, 1998).

Il sistema di sorveglianza sui casi di gastroenterite negli ospedali ha messo in evidenza la presenza della sintomatologia tipica dell'infezione da NoV (Foley *et al.*, 2000) e l'importanza della trasmissione nosocomiale (Traore *et al.*, 2000). La reale frequenza dei focolai negli istituti di ricovero e cura rimane però ancora da determinare, poiché queste strutture sono state finora escluse dagli studi longitudinali (de Wit *et al.*, 2001a).

Anche se nel corso degli ultimi anni sono stati riportati un numero crescente di segnalazioni di epidemie da norovirus a livello ospedaliero (Mattner *et al.*, 2005; Caraccio *et al.*, 2007; Centers for Disease Control and Prevention – CDC -, 2007; Leuenberger *et al.*, 2007), il nodo della gestione dei pazienti con tale infezione è quello dell'applicazione delle misure di prevenzione mediante misure igieniche. Infatti, nella maggior parte delle epidemie nosocomiali, è implicata una trasmissione persona-persona con trasporto del virus alla bocca, attraverso le mani contaminate da vomito o feci e per inalazione di aerosol prodottosi durante il vomito stesso, o per utilizzo di spazi comuni contaminati (Mattner *et al.*, 2005; Centers for Disease Control and Prevention - CDC -, 2007).

### 2.5.7 EPIDEMIOLOGIA NEGLI ANIMALI

La diffusione dei Calicivirus pressoché in tutte le specie animali note ha introdotto un'altra questione che resta ancora da chiarire: la possibile trasmissione zoonotica dell'infezione (Lopman *et al.*, 2004). I norovirus sono stati riconosciuti quale causa di infezione intestinale nel bovino, e analisi di sequenza hanno mostrato analogie con i ceppi circolanti nell'uomo, anche se gli isolati bovini sinora descritti sono classificati all'interno di un specifico genogruppo (III), distinto da quelli che includono i ceppi umani (I, II, IV) (Smiley *et al.*, 2003). In Olanda, il 31,6% degli allevamenti bovini da latte esaminati presentava almeno un campione di feci positivo e il 4,2% dei campioni fecali individuali era positivi per GIII NoV simili al Newbury Agent 2 (van der Poel *et al.*, 2003). In UK, NoV è stato messo in evidenza nel 11% dei casi di diarrea esaminati (Milnes *et al.*, 2007). In USA, la prevalenza dei calicivirus nei vitelli era del 72% in Ohio (Smiley *et al.*, 2003), 80% in Michigan e il 25% in Wisconsin (Wise *et al.*, 2004). In Germania, il 9% di campioni di feci da bovini diarroici era positivo per Jena virus; il 99% dei campioni di siero provenienti da vacche da latte positivo mostrava anticorpi verso lo stesso virus GIII (Deng *et al.*, 2003). Queste osservazioni dimostrano l'elevata prevalenza dei norovirus bovini in differenti Paesi.

Analisi condotte su campioni di feci di bovini da allevamenti del Nord Italia hanno confermato la complementarità di tratti di sequenza dei ceppi bovini con i primer impiegati comunemente per la diagnostica umana, nella regione target della RNA polimerasi (RdRp, ORF1) (Smiley *et al.*, 2003). Tuttavia, le sequenze genomiche amplificate sono risultate molto diverse dalle sequenze dei norovirus umani nei database disponibili, incluso quello FBVE, che annovera la maggiore collezione di sequenze recenti di norovirus Europei.

Al contrario, le sequenze ottenute dai bovini Italiani apparivano strettamente correlate con quelle di due diverse linee evolutive di norovirus bovino, rispettivamente appartenenti a ceppi OHIO e *Newbury-agent 2*, descritti negli USA e in Gran Bretagna. A ulteriore conferma della tipicità dei ceppi di norovirus bovino, l'analisi di alcune sequenze effettuate nella regione ORF2, codificante la proteina capsidica, ha dimostrato per questi stessi ceppi virali differenze sostanziali con le sequenze nucleotidiche e aminoacidiche note per i ceppi umani (Ando *et al.*, 2000). Sebbene i dati attuali non appaiono a favore di una ipotesi di trasmissione zoonotica dei norovirus, almeno dal bovino, recenti acquisizioni dimostrano l'elevata capacità di norovirus, sia umani sia animali, di ricombinare a livello della sequenza di giunzione tra ORF1 e ORF2, attraverso un meccanismo simile al *crossing-over*, con frequenze dell'ordine del 10%, nel corso di infezioni multiple con diversi ceppi virali

(Nayak, *et al.*, 2008). Questi *shift* genetici sono stati al momento descritti solo tra virus di una stessa specie, ma i dati restano ancora limitati (Lopman *et al.*, 2004). Conseguentemente, ne deriva la necessità di approfondire gli studi su ceppi virali di origine diversa estendendo l'analisi di sequenza anche all'ORF2, prima di escludere una trasmissione ed evoluzione zoonotica dei norovirus. Il rischio di adattamento e salto di specie, soprattutto nel caso di virus ad RNA ad elevata diffusione e resistenza ambientale, deve essere considerato realistico anche alla luce di quanto riportato recentemente per altri sistemi virali, quali coronavirus e virus influenzali (Oliver *et al.*, 2003). Inoltre, studi più recenti sembrano suggerire che il suino potrebbe giocare un ruolo di serbatoio per ceppi di norovirus di genogruppo II, potenzialmente patogeni per l'uomo (Souza *et al.* 2008).

Ad oggi, nel suino sono stati identificati ceppi appartenenti solo ai genotipi GII.11 e GII.18, mai identificati nell'uomo (Mijovski *et al.*, 2010). Nei vari paesi in cui i NoV sono stati identificati nei suini [Giappone (Sugieda *et al.*, 1998), Olanda (van der Poel *et al.*, 2000), USA (Wang *et al.*, 2005) e anche in Ungheria (Reuter *et al.*, 2010)], la prevalenza è risultata bassa, oscillando tra lo 0,35% in Giappone e il 2% in Olanda (van der Poel *et al.*, 2003). La sieroprevalenza di anticorpi anti norovirus GII nei suini appare invece elevata, superando anche il 70% in USA (Farkas *et al.*, 2005), suggerendo che il virus circoli molto di frequente nella popolazione dei suini.

Recentemente è stata descritta la presenza di norovirus nel tratto intestinale nel cane (Martella *et al.*, 2008), e in un leone morto per enterite emorragica in uno zoo di Pistoia (Martella *et al.*, 2007).

Negli ultimi anni è stato evidenziato che i NoV murini sono molto diffusi e che l'infezione è comune nella popolazione murina. Una sieroprevalenza del 22% è stata trovata in topi di laboratorio nel Nord America, (Hsu *et al.*, 2005). Avendo il virus una contagiosità molto elevata, esso viene trasmesso rapidamente tra i topi e questo spiega perchè il norovirus murino sia praticamente endemico negli stabulari (Kim *et al.*, 2010).

### **2.5.8 MALATTIA NEGLI ANIMALI.**

Nei bovini, il virus è una causa frequente di diarrea, sebbene sia stato ritrovato anche in animali asintomatici. Ceppi appartenenti a genotipi distinti, possono determinare lesioni più o meno gravi; il ceppo Newbury agent-2, ad esempio, induce anoressia, diarrea e malassorbimento di xilosio dopo un'incubazione di 12-24 ore (Scipioni *et al.*, 2008). Istologicamente, è stata riscontrata atrofia dei villi nel piccolo intestino. Dal secondo giorno dopo l'inizio della malattia clinica il virus viene ritrovato nelle feci (Dastjerdi *et al.*, 1999).

Norovirus suino è stato esclusivamente messo in evidenza in campioni fecali di suini adulti senza segni clinici di malattia (van der Poel et al, 2000; Sugieda *et al.*, 1998; Scipioni *et al.*, 2008). Nel corso di infezione sperimentale in suini gnotobiotici, è stata riscontrata la presenza di lieve diarrea (Wang *et al.*, 2005). Norovirus è stato identificato nel contenuto intestinale di un cucciolo di cane affetto da vomito e diarrea, insieme ad un parvovirus canino (CPV-2a). Il virus venne ritrovato per 22 giorni confermando la replicazione virale nel cucciolo (Martella *et al.*, 2008). Considerando che il parvovirus del cane può causare severi sintomi, la patogenicità di norovirus canino resta ancora sconosciuta poco documentata.

## **2.6 PROFILASSI VACCINALE E DISINFEZIONE**

L'alto numero di infezioni da norovirus identificate in tutto il mondo ha enfatizzato il bisogno di sviluppare protezione contro la malattia utilizzando i vaccini. Approcci per lo sviluppo di vaccini contro la malattia indotta da norovirus sono stati condotti immunizzando conigli con RHDV e con la proteina capsidica di RHDV espressa utilizzando il sistema di baculovirus. Gli esperimenti condotti hanno dimostrato un'elevata risposta immune umorale e un effetto di protezione per gli animali stessi contro la malattia. Vaccini per l'uomo sono stati anche testati in topi, in vitelli gnotobiotici e in fase I nell'uomo. Il maggior ostacolo per lo sviluppo di un vaccino è l'alta eterogeneità di norovirus. Infatti è stato dimostrato che l'immunità di norovirus è complessa e probabilmente dovuta a pre-esistenti esposizioni al virus e dalla variabilità della risposta immunitaria (Donaldson *et al.*, 2008).

Come per gli altri virus privi di envelope, i calicivirus hanno un'elevata resistenza ai trattamenti di disinfezione. Il virus permane per molte settimane nell'ambiente, resiste a temperature superiori ai 60°C e a 10 ppm di cloro, usato per disinfettare l'acqua potabile. In genere, norovirus risulta maggiormente resistente, rispetto agli altri virus, alle normali dosi di ipoclorito di sodio, che comunque risulta essere la misura più efficace di disinfezione. Di recente alcuni detergenti basati su ammine quaternarie sono stati indicati dall'agenzia per la protezione ambientale americana (EPA's Registered Antimicrobial Products Effective Against Norovirus, 2009) e sono risultati efficaci nella rimozione del virus dall'ambiente (Duizer et al., 2004).

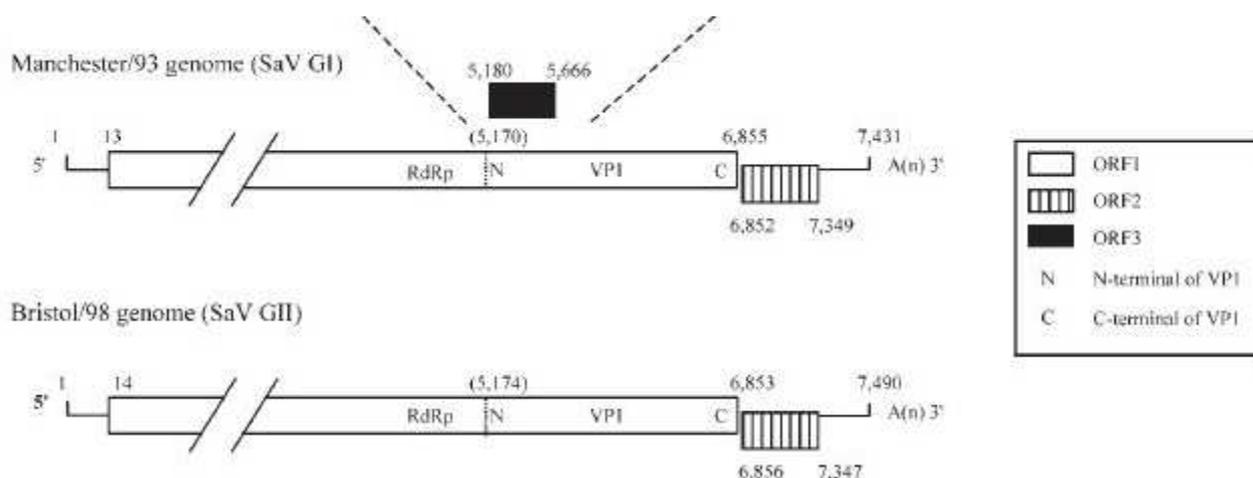
## 2.7 EZIOLOGIA: Sapovirus

### 2.7.1 INTRODUZIONE

I Sapovirus (SaV) sono stati identificati per la prima volta, mediante il microscopio elettronico (ME), nelle feci diarroiche di bambini nel 1976 ( Madeley *et al.*, 1979). Due anni dopo, campioni di feci contenenti questi virus che causarono una epidemia in una scuola a Londra vennero esaminati in microscopia elettronica, e fu dimostrata una similarità con i Calicivirus. I sapovirus sono attualmente considerati un gruppo distinto di calicivirus enterici della famiglia *Caliciviridae* (Green *et al.*, 2000).

I SaV, virus a RNA a singolo filamento, vengono divisi in 5 genogruppi (GI-GV), dei quali GI, GII, GIV e GV infettano l'uomo, mentre GIII infetta la specie suina (Figura 2.6). Nel corso degli ultimi 30 anni, sono stati compiuti notevoli progressi grazie a diversi studi sui calicivirus e il genoma del ceppo Cowden, rappresentativo di SaV, è stato caratterizzato (Hansman *et al.*, 2007). Il ceppo suino di SaV Cowden è stato adattato alla crescita *in vitro* in una linea cellulare di rene di suino. Grazie a studi *in vitro* è stato dimostrato che gli acidi biliari attivano un segnale di trasduzione che garantisce la replicazione *in vitro* e potenzialmente *in vivo* nel duodeno (Chang *et al.*, 2004; Wobus *et al.*, 2004).





**Figure 2.7.** Rappresentazione schematica del genoma di SaV GI, GIV e GV (contenente 3 ORF) e del genoma di SaV GII (contenente 2 ORF) (Hansman *et al.*, 2007).

La ORF1 codifica per le proteine non strutturali inclusa la RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp), e la proteina capsidica maggiore (VP1). L'ORF2 codifica una piccola proteina, simile alla VP2 di NoV (Atmar *et al.*, 2001), e l'ORF3 codifica una proteina con funzione sconosciuta. I ceppi umani di SaV non replicano in colture cellulari, però è stato osservato che l'espressione della proteina ricombinante VP1 in un sistema d'espressione di baculovirus o in un sistema d'espressione di mammifero assembla in VLPs che sono morfologicamente simili alle particelle virali native (Hansman *et al.*, 2007).

### 2.7.3 STUDI EPIDEMIOLOGICI E AMBIENTALI.

SaV causa gastroenterite nell'uomo, con sintomi simili ma generalmente più blandi di quelli causati da norovirus. Le infezioni da SaV colpiscono principalmente bambini al di sotto dei 5 anni, tuttavia negli ultimi anni un numero crescente di casi sporadici ed epidemie sono state descritte anche tra la popolazione adulta, sottolineando un ruolo più ampio dei SaV nell'insorgenza delle gastroenteriti (Hansman *et al.*, 2007).

Negli ultimi anni, diversi studi condotti su bambini ospedalizzati hanno dimostrato un'incidenza più elevata di gastroenteriti (AGE) legate alle infezioni da sapovirus in soggetti immunocompromessi, come i bambini sottoposti a chemioterapia. In Germania, uno studio condotto su 58 pazienti oncologici pediatrici, affetti da AGE, ha evidenziato la presenza di sapovirus in 2 casi. Dalla sequenza nucleotidica, i virus sono stati identificati come GI.1 e GII.3, ceppi in genere poco frequenti. Il contributo dell'infezione di sapovirus alla morbilità dei pazienti oncologici pediatrici e la sua possibile diffusione nosocomiale potrebbero giocare un ruolo importante nella diffusione del virus, richiedendo quindi che anche questi aspetti vengano presi in considerazione (Moser *et al.*, 2011).

Altri recenti lavori di epidemiologia nell'uomo sono stati condotti in Giappone dove sono state studiate 71 epidemie di AGE nel periodo tra luglio 2007 e maggio 2010 nella città Hiroshima. In 61 epidemie causate da virus, solo il 3,3% dei casi sono stati confermati positivi per SaV (Shigemoto *et al.*, 2011). Contemporaneamente, in Tunisia, in uno studio svolto da Sdiri-Loulizi e colleghi sono stati riscontrati 6 campioni positivi per SaV (GII.1) su 788 campioni fecali di bambini (Sdiri-Loulizi *et al.*, 2011).

La prevalenza di sapovirus nei bambini appare nel complesso significativa, come dimostrano anche numerosi studi effettuati in diverse nazione europee quali Danimarca, Germania, Francia, UK, e Italia, dove la percentuale di prevalenza riscontrata raggiungeva il 12,7% (Ike *et al.*, 2008; Iturriza-Gomara *et al.*, 2009; Johnsen *et al.*, 2009; Lorrot *et al.*, 2011; Medici *et al.*, 2012).

La trasmissione alimentare di Sapovirus è stata descritta in diverse epidemie, coinvolgendo sia bambini in mense scolastiche che adulti. Non è stato tuttavia descritto il link diretto con un alimento, ed è stato ipotizzato che la contaminazione degli alimenti fosse legata alla manipolazione da parte dei cuochi che risultarono positivi per sapovirus ( Yamashita *et al.*, 2010). La trasmissione alimentare di sapovirus è stata dimostrata raramente, probabilmente perché la diagnostica di questo virus è poco frequente. In Giappone, SaV sono stati individuati in campioni di crostacei destinati al consumo alimentare ma, diversamente da norovirus, non sono stati identificati in campioni di ostriche. Inoltre, i ceppi di SaV ritrovati nelle acque, avevano sequenze simili, ai ceppi ritrovati nei crostacei e in pazienti affetti da AGE, suggerendo che contaminazioni di SaV nell'ambiente naturale potrebbero essere legate a infezioni nell'uomo tramite trasmissione alimentare (Hansman *et al.*, 2007). SaV è stato inoltre identificato in diverse fonti d'acqua potabile, come fontane pubbliche e ghiaccio (Hoebe *et al.*, 2004; Hansman *et al.*, 2007; Sano *et al.*, 2011).

Sebbene la prevalenza di sapovirus risulti più bassa rispetto ai norovirus, forse anche a causa della scarsità degli studi specifici, va sottolineato che la ricerca del virus in campioni fognari o in campioni d'acqua potenzialmente contaminati da reflui fognari, rivela comunemente positività nell'ordine del 10%. Inoltre, il virus viene identificato durante tutti i mesi dell'anno, ed è stato anche dimostrato attraverso l'analisi di sequenza che lo stesso virus veniva rilevato anche a distanza di mesi, dimostrandone la lunga persistenza nell'ambiente naturale (Hansman *et al.*, 2007).

#### 2.7.4 SAPOVIRUS NEGLI ANIMALI

Tra gli animali, i sapovirus sono stati sinora identificati nei suini, visoni e più recentemente nel cane. Nei suini, i primi ceppi sono stati messi in evidenza già dagli anni '80; tra essi il ceppo prototipo "Cowden" è ad oggi il solo membro all'interno del genere in grado di replicare *in vitro* (Hansman *et al.*, 2007). Di recente, l'omologia di sequenza di ceppi suini identificati nella provincia di Guizhou in Cina con ceppi umani nella stessa area ha suggerito una possibile trasmissione cross-specie tra il suino e l'uomo (Shen *et al.*, 2011).

Il sapovirus circola in allevamenti suini, sia in animali sintomatici che non, e in diverse fasce di età. In Europa, la prevalenza si aggira intorno al 7,6% ed esiste un'ampia variabilità di genotipi. Infatti, oltre ai ceppi tipici del suino di GIII, sono stati descritti ceppi differenti vicini molto simili a ceppi umani. Va comunque sottolineato che, almeno in Europa, ceppi propri del suino non sono mai stati identificati nell'uomo (Reuter *et al.*, 2010).

Il sapovirus enterico del visone, "Mink Enteric Calicivirus" (MEC), è stato identificato durante un'epidemia di diarrea in un allevamento di visoni in USA, grazie all'immunoscopia elettronica condotta sui campioni fecali utilizzando un siero contenente anticorpi anti PEC. Successive analisi filogenetiche hanno raggruppato l'agente eziologico nel genere *Sapovirus* (Guo *et al.*, 2001).

In un recente lavoro, un ceppo di sapovirus è stato identificato nel cane, mostrandosi differente dai ceppi identificati in precedenza ed essendo per questo classificato in un nuovo genogruppo (Li *et al.*, 2011).

Infine, sequenze di SaV sono state identificate di recente in ostriche, ed è stata riscontrata un'identità nucleotidica elevata con ceppi identificati in feci di pazienti con gastroenterite e in acque reflue nella stessa area geografica. Questo lavoro ha riportato la prima segnalazione di SaV in

ostriche che soddisfacevano i requisiti di legge per il consumo di alimenti crudi in Giappone (Ueki *et al.*, 2010).

### **2.7.5 MALATTIA NEGLI ANIMALI**

Come descritto in precedenza, il primo ceppo Cowden, venne isolato dalle feci di un suinetto affetto da diarrea. La dimostrazione che i sintomi erano causati dal virus identificato venne dalla somministrazione orale delle feci degli animali affetti in suini gnotobiotici, determinando insorgenza di diarrea e rilascio del virus. Il danno osservato a livello istologico fu l'atrofia dei villi nel piccolo intestino (Saif *et al.*, 1980).

La scoperta del sapovirus del visone avvenne in USA in un'epidemia di diarrea all'interno di un allevamento. La causa dell'infezione venne imputata al consumo da parte dei visoni di fegati e di reni di suino crudi, sebbene questa sia rimasta una ipotesi priva di conferme virologiche (Guo *et al.*, 2001).

## **2.8 NOROVIRUS E SAPOVIRUS: AGENTI DI ZONOSI?**

L'identificazione di norovirus e sapovirus nel mondo animale ha sollevato la questione di una possibile trasmissione zoonotica di questi virus all'uomo (Bank-Wolf *et al.*, 2010). Ad oggi, non esistono evidenze dirette di trasmissione dagli animali all'uomo. Tuttavia, studi di sieroprevalenza hanno evidenziato anticorpi contro norovirus animale nell'uomo e anticorpi anti-norovirus umano in suini (Han *et al.*, 2005). La questione della trasmissione di questi due virus, NoV e SaV, tra animali e uomo e viceversa, e la domanda se gli animali rappresentino un serbatoio di malattie enteriche per l'uomo (Guo *et al.*, 2001 a) restano aperte.

### **2.8.1 RICOMBINANTI TRA CALICIVIRUS ANIMALI E UMANI.**

La ricombinazione è un evento comune in norovirus e sapovirus (Bull *et al.*, 2005; Hansman *et al.*, 2007), e di regola avviene mediante crossing-over nella regione compresa tra il gene per la proteina

capsidica (ORF2 dei Norovirus e ORF1 dei Sapovirus) e il gene della RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp). Dalla comparazione delle sequenze dei genomi di due ceppi di sapovirus umano (SW278 e Ehime1107) è stata osservata una differenza nucleotidica dopo la regione RdRp indicando un possibile sito di ricombinazione nella giunzione dell'RdRp-VP1 (Hansman *et al.*, 2007).

In genere, gli eventi di ricombinazione coinvolgono ceppi di genotipi diversi appartenenti allo stesso genogruppo e hanno una frequenza, almeno per quanto riguarda i norovirus, intorno al 14% (Phan *et al.*, 2007). Sono stati descritti eventi di ricombinazione tra norovirus suino e ceppi umani, ma una doppia infezione dell'ospite non può essere tuttavia esclusa (Wang *et al.*, 2005a).

Hansman ha descritto la ricombinazione tra ceppi di differenti genogruppi, GII e GIV del genere *Sapovirus*. E' anche possibile che l'evento di ricombinazione includa anche un rappresentante del GIII (porcine enetric Sapovirus) (Hansman *et al.*, 2005).

Comunque, coinfezioni con virus umani e virus animali potrebbero dare vita attraverso eventi di ricombinazione a una generazione di nuovi virus con diverso potenziale patogeno e alterato tropismo sia nelle specie animale che umana.

Parte sperimentale:  
VIRUS DELL'EPATITE E

# SEZIONE SPERIMENTALE: *VIRUS* *DELL'EPATITE E*

In questa sezione verranno illustrati i risultati ottenuti nel corso degli studi relativi al virus dell'Epatite E (HEV).

In sintesi:

- Ad oggi, non esiste un sistema cellulare per la replicazione *in vitro* di HEV e ciò limita fortemente gli studi sulla replicazione, patogenesi e immunologia di HEV. In alternativa ai sistemi *in vitro*, l'espressione del capsido virale e la produzione di reattivi immunologici costituiscono una possibilità per la caratterizzazione del virus. Lo scopo del lavoro è stato la produzione di antigeni virali attraverso il clonaggio e l'espressione in sistemi ricombinanti (sistema ricombinante di baculovirus e il sistema Semliki Forest Virus Replicon) della proteina del capsido di un ceppo di HEV di origine suina identificato in Italia. L'antigene espresso è stato utilizzato per la produzione di sieri policlonali e anticorpi monoclonali utili ai fini diagnostici e per la caratterizzazione virale (CAPITOLO 3).
  
- Ricerca del virus HEV, in campioni di feci, bile e fegato prelevati, da suini al macello. Lo scopo di questo lavoro è stato lo studio delle correlazioni tra ceppi suini e umani mediante analisi di sequenza, fornendo elementi utili a valutare il potenziale zoonosico di HEV e i rischi di cross-contaminazione nelle fasi di macellazione del suino (CAPITOLO 4).
  
- Messa a punto di test diagnostici per la ricerca di anticorpi contro HEV nel suino, basati su antigene espresso in sistemi ricombinanti. Utilizzo dei test sviluppati (ELISA, Western blotting e immunocitochimica) per uno studio di sieroprevalenza in suini e in cinghiali (CAPITOLO 4).

## CAPITOLO 3: Caratterizzazione antigenica e molecolare di HEV

La diagnosi clinica dell'epatite E umana è stata fino ad oggi limitata dal numero ridotto di laboratori e/o strutture ospedaliere che effettuano i test per questa malattia, ma soprattutto dalle poche conoscenze che si hanno sul virus, dovute anche alla mancanza di un sistema di crescita *in vitro*.

I sintomi clinici di epatite E umana spesso non sono distinti da altri tipi di epatite virale acuta, e la diagnosi definitiva quindi deve basarsi su prove di laboratorio, eseguite di norma mediante test ELISA e/o PCR. Lo stesso approccio viene utilizzato per la diagnosi di infezione da HEV nei suini.

Proprio per la mancanza di sistema di crescita *in vitro*, grossi passi in avanti sono stati fatti nella messa a punto di metodi molecolari, quali trascrizione inversa e PCR (RT-PCR) e real-time RT-PCR (Huang *et al.*, 2002; Banks *et al.*, 2004; Jothikumar *et al.*, 2006; Panda *et al.*, 2007), sia per il suino che per l'uomo. Tuttavia, sebbene queste tecniche permettano di evidenziare la presenza di genoma virale e di quantificarlo, esse non consentono di determinare la presenza di virus infettante nei campioni saggiati (Mushahwar *et al.*, 2008). Inoltre, l'ampia variabilità nucleotidica all'interno dei ceppi umani e suini pone dubbi sulla capacità di questi metodi di identificare tutti i ceppi circolanti, e richiede attenzione allo sviluppo di nuovi primer.

La diagnosi sierologica viene effettuata di frequente: in particolare, nei casi clinici umani, viene eseguita la ricerca di IgM anti-HEV. La diagnosi sierologica si basa sull'utilizzo di antigene virale ricombinante, la proteina capsidica, espressa in sistemi cellulari diversi. Stante l'appartenenza dei quattro genotipi di HEV, sia di origine umana che suina ad un unico sierotipo, la proteina capsidica ricombinante umana di HEV cross-reagisce con anticorpi anti-HEV suino, e viene per questo utilizzata in molti lavori di valutazione sierologica della prevalenza di anticorpi nei suini (Meng *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2008; de Oya *et al.*, 2009; Rose *et al.*, 2010).

In questo capitolo saranno riportati i risultati di alcune prove di produzione di antigeni virali sintetici ottenuti attraverso il clonaggio e l'espressione in sistemi ricombinanti (baculovirus e il replicone di Semliki Forest Virus, SFVr) della proteina del capsido di un ceppo di HEV di origine suina. L'espressione di proteine strutturali virali che auto-assemblano in virus-like particle (VLP) utilizzando il sistema baculovirus, è stata descritta per diversi virus a DNA e a RNA (Noad *et al.*, 2003). Le VLP prodotte da questo sistema solitamente hanno proprietà fisiche e immunogeniche simili al virus wild type (Li *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 2010). Le sequenze dell'ORF2 di ceppi umani

di HEV sono state efficacemente espresse in cellule d'insetto; tuttavia, nel caso dei ceppi di HEV suino, solo in un caso la proteina ha assemblato in VLP, e solo dopo aver sostituito diversi aminoacidi rispetto alla sequenza originale (Rose *et al.*, 2010). I primi studi effettuati sulla capacità della proteina capsidica di auto assemblare in VLP, vennero condotti utilizzando un ceppo di HEV umano. Venne evidenziato che, per ottenere le VLP, era necessaria l'espressione di una forma deleta di 111 aa all'N-terminale della ORF2. Inoltre, venne anche dimostrato che, se espressa dal gene ORF2 con due delezioni, rispettivamente all'N-terminale e al C-terminale, la proteina assemblava in VLP che avevano una dimensione più piccola (diametro di 23,7 nm invece di 27 nm), rispetto al virus *naïve*. I risultati nel complesso suggeriscono che la proteina del capsido viene processata attraverso delezioni nella porzione N- e C-terminale, forse attraverso proteasi dell'ospite, prima o durante l'assemblaggio del virus (Li *et al.*, 1997). Ed è per questo che nel lavoro presentato in questo capitolo la proteina capsidica ORF2 di un ceppo suino di HEV identificato in Italia è stata espressa sia con una delezione di 111 aa all'N-terminale sia con un'ulteriore delezione di 59 aa nella porzione C-terminale, utilizzando il metodo di baculovirus ricombinante e il metodo SFVr.

L'antigene espresso è stato utilizzato per la produzione di sieri policlonali e anticorpi monoclonali utili ai fini diagnostici e per la caratterizzazione virale.

## **3.1 ESPRESSIONE DI ANTIGENI VIRALI MEDIANTE IL SISTEMA BACULOVIRUS E PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI.**

### **3.1.1 INTRODUZIONE**

Di recente, la presenza di HEV nel suino è stata descritta in numerosi paesi industrializzati (Aggarwal *et al.*, 2011) compresa l'Italia (Caprioli *et al.*, 2007; Di Bartolo *et al.*, 2008; Di Bartolo *et al.*, 2011).

Nel 2006, uno studio effettuato su suini clinicamente sani provenienti da 6 allevamenti nel nord Italia ha evidenziato una elevata prevalenza di HEV, appartenente al genotipo 3 (Di Bartolo *et al.*, 2008). Il genotipo 3 è presente nei paesi industrializzati, Europa e America compresi, associato a casi sporadici nell'uomo, ed è stato anche descritto nei suini, cinghiali e cervi (De Deus *et al.*, 2007; Boadella *et al.*, 2010; Di Bartolo *et al.*, 2011). E' proprio sul genotipo 3, sulla stretta correlazione

dei ceppi identificati nell'uomo e in questi animali, in particolare nel suino, e su una serie di evidenze epidemiologiche, che si basa l'ipotesi della trasmissione zoonotica di HEV.

Data la mancanza di un idoneo sistema cellulare per la crescita del virus *in vitro*, l'espressione del capsido virale in sistemi d'espressione ricombinanti, costituiscono la sola possibilità reale per la produzione di reattivi immunologici e la caratterizzazione del virus.

La proteina del capsido virale di un ceppo di HEV suino g3, identificato in Italia nel 2006, è stata clonata ed espressa nel sistema eucariotico ricombinante di Baculovirus, e utilizzata per produrre sieri policlonali e anticorpi monoclonali murini, successivamente caratterizzati parzialmente. Il sistema ricombinante di baculovirus è stato scelto perché è un sistema eucariotico e perché offre diversi vantaggi rispetto ai sistemi procariotici, tra i quali la corretta formazione di ponti disolfuro e modificazioni post-traduzionali (glicosilazione, fosforilazione e acetilazione).

### 3.1.2 MATERIALI E METODI

**RT-PCR e clonaggio.** L'RNA totale è stato estratto da un campione di bile di un suino clinicamente sano (positivo per HEV, denominato swine85/G.3/08/IT), utilizzando il kit Qiamp Viral (Qiagen). L'RNA ottenuto è stato utilizzato per sintetizzare il cDNA mediante oligo(dT)<sub>20</sub> e l'enzima SuperScript<sup>TM</sup> III (First-Strand SuperScript<sup>TM</sup> III Synthesis System, Invitrogen), sfruttando quindi come stampo la regione poli-A del genoma virale. Il cDNA ottenuto è stato amplificato mediante PCR con il primer FΔ111ORF2(5'-GC TCT AGA GC ATG GCC GTA TCA CCG GCT CCC GAT ACA GCC-3'), fiancheggiato dal sito enzimatico di restrizione *Xba*I (sottolineato) che appaia alla porzione N-terminale dell'ORF2 esattamente 333 nt a valle dell'ATG (il codone di inizio inserito è indicato in grassetto), e RORF2 (5'-GAC TCG AGA TTA AGA CTC CCG GGT TTT ACC-3'), fiancheggiato dal sito enzimatico di restrizione *Xho*I (sottolineato) che appaia alla porzione c-terminale dell' ORF2 (il codone di stop indicato in grassetto). In alternativa, una seconda PCR è stata effettuata con il primer Rc59ORF2 (5'-GAC TCG AGA TTA CGC AAG GGC CGA ATG TG-3'), fiancheggiato dal sito di restrizione *Xho*I (sottolineato), che appaia 177 nt a monte del codone di stop della ORF2 e contiene un sito di stop, indicato in grassetto. Le due coppie di primer consentono di amplificare la regione di 1,7 kb, corrispondente alla ORF2 priva dei primi 111 aa, oppure una regione di 1,5 kb corrispondente ad una delezione dei primi 111 amminoacidi e degli ultimi 59 amminoacidi, della regione capsidica (ORF2) del ceppo suino HEV swine85/G.3/08/IT (Acc. No. GU117636). Una metionina (in grassetto nell'oligonucleotide FΔ111ORF2) è stata

introdotta tra *Xba*I e i 112 amminoacidi residui. Il frammento di 1,7 kb ottenuto, fiancheggiato da *Xba*I e *Xho*I, è stato clonato negli stessi siti di restrizione del vettore donatore pFastBac<sup>TM</sup>1 (Invitrogen), e i costrutti ottenuti, denominati pFastBO85 $\Delta$ ORF2 e pFastBO85 $\Delta$ -59ORF2, sono stati trasformati nel ceppo batterico *E. coli* DH10Bac (Invitrogen). All'interno del batterio ospite, l'avvenuta ricombinazione tra il vettore donatore (pFastBO85 $\Delta$ ORF2 o pFastBO85 $\Delta$ -59ORF2) e il plasmide ricevente presente ha portato alla formazione del vettore BacHEV $\Delta$ 111ORF2 o BacHEV $\Delta$ 111/-59ORF2. Questo corrisponde all'intero genoma del baculovirus, in cui risulta inserito, a valle del promotore forte della poliedrica, il frammento della ORF2 clonato. La conferma dell'avvenuta ricombinazione e del corretto frame di lettura è stato verificato mediante analisi di sequenza nucleotidica (Acc. No. GU556929), confermando l'identità del ceppo suino come genotipo 3 subtipo e (g3e) e verificando anche il corretto frame. Il baculovirus ricombinante estratto dal ceppo batterico è stato usato per trasfettare cellule d'insetto Sf9 (linea cellulare di *Spodoptera frugiperda*) e Tn5 (BTI-TN -5B1-4 High Five cells), per generare uno stock virale ad alto titolo idoneo per esprimere efficientemente la proteina.

### **Produzione del bacmide BacHEV $\Delta$ 111ORF2-his**

In analogia a quanto descritto, lo stesso frammento della ORF2 è stato utilizzando per generare una fusione tradizionale all'N-terminale con una coda di istidine. A tale scopo, è stata condotta una nuova PCR utilizzando lo stesso stampo, il primer RORF2, e un nuovo primer oligonucleotidico, denominato F $\Delta$ 111HEV<sub>ist</sub> (5'-GCT CTA GAG CAT G CA CCA CCA CCA CCA CGC CGT ATC ACC GGC TCC CGA TAC AGC C -'3), in cui, oltre al sito di restrizione *Xba*I (sottolineato), sono presenti il codone di inizio ATG (in grassetto), la coda di istidine (in corsivo) e la porzione dal 112 aminoacido della ORF2. Il frammento di DNA di 1,7 kb ottenuto, privo dei primi 111 aa e con una coda di poli-istidine all'N-terminale, è stato clonato nel vettore donatore pFastBac<sup>TM</sup>1 (Invitrogen), generando, come riferito nel paragrafo precedente, il bacmide ricombinante denominato BacHEVHis $\Delta$ 111ORF2.

### **Preparazione e purificazione dell'antigene ricombinante**

Dieci fiasche di monostrati cellulari di Sf9 e Tn5 (T75 cm<sup>2</sup>), adattate a crescere in Sf900 medium (Gibco) e EX-CELL 401 medium (JRH, Lenexa, KS), sono state infettate con BacHEV $\Delta$ 111ORF2, BacHEV $\Delta$ 111/-59ORF2 o con il BacHEVHis $\Delta$ 111ORF2. La proteina ricombinante è stata ottenuta dopo 6 giorni dall'infezione, quando era presente un diffuso effetto citopatico. Le cellule sono state raccolte e lisate mediante 3 cicli di congelamento e scongelamento. L'estratto cellulare proteico è stato poi analizzato mediante SDS-Page. Una proteina di 55 kDa è stata prodotta ad alte concentrazioni nel citoplasma delle cellule, ed è stata specificatamente riconosciuta da un siero iperimmune, usato come controllo positivo (gentilmente fornito da Dr. Nicole Pavio, ANSES-ENVA-INRA, Maisons-Alfort, France; Rose *et al.*, 2010). La proteina è stata parzialmente purificata mediante cromatografia a scambio ionico usando Macro-Prep Hydroxyapatite column (BIO-RAD), seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Per la purificazione della proteina con la coda di istidine è stato usato un metodo cromatografico in cui la resina di acido nitroacetico lega uno ione nichel, che a sua volta viene chelato dalle istidine della proteina (Ni-NTA)(Qiagen).

In dettaglio, l'estratto proteico è stato ottenuto lisando le cellule mediante impiego di un sonicatore. Il sedimento ottenuto è stato risospeso (5 ml/gr di peso bagnato) nel tampone di lisi B (8 M urea; 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-HCl; 10 mM imidazolo; 20 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; pH 8,0) e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora. Successivamente il lisato è stato centrifugato a 10000 x g per 20 minuti, e al sopranatante chiarificato è stata aggiunta la resina Ni-NTA (QIAGEN) (1 ml di soluzione contenente la resina al 50% per 4 ml di lisato) per 1 ora a temperatura ambiente. La resina è stata lavata due volte con 4 ml del tampone C (8 M urea; 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-HCl; 10 mM imidazolo; 2 M NaCl, pH 6,3). L'eluizione della proteina è stata infine effettuata mediante i tamponi D (8 M urea; 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-HCl; 10 mM imidazolo, pH 5,9) (quattro eluizioni di 0,5 ml ciascuna), ed E (8 M urea; 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-HCl; 250 mM imidazolo, pH 4,5) (quattro eluizioni di 0.5 ml ciascuna).

Dopo visualizzazione su gel di SDS-PAGE (poly-acrylamide gel electrophoresis), le frazioni proteiche sono state dializzate in tampone di rinaturazione (0,1% Tween 20; 0,1 M Tris-HCl, pH 8; 0,1 M NaCl; 0,1%  $\beta$ -mercaptoetanol; 8 M urea; 1 mM EDTA) per 16 ore a 4° C in agitazione costante. In seguito, la concentrazione di urea è stata ridotta lentamente, mediante diluizioni seriali al raddoppio con quantità crescenti di tampone rinaturante (50 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20), fino ad arrivare ad una concentrazione di urea di 0,25 M. La dialisi finale è stata eseguita nel solo tampone rinaturante.

Nel testo di questa tesi, la proteina con la coda di istidine verrà esplicitamente segnalata; dove non specificato, ci si riferirà all'antigene senza la coda di istidine.

**Immunizzazione di topi Balb/c con la proteina capsidica ricombinante.** Tre topi Balb/c di 12 settimane sono stati inoculati per via intraperitoneale con 0,5 ml di una preparazione 1:1 di proteina capsidica (15 µg) purificata e adiuvante completo di Freund (Sigma). Due dosi di richiamo sono state somministrate a intervalli di due settimane impiegando adiuvante incompleto di Freund (Sigma). Dopo 14 giorni dall'ultimo inoculo, campioni di sangue sono stati prelevati dai topi immunizzati, e i sieri sono stati analizzati in ELISA, Western blotting e colorazione immunocitochimica di cellule infette (Immunoperossidasi) per verificare la presenza di anticorpi anti-HEV, utilizzando la proteina capsidica purificata come antigene e utilizzando il siero policlonale suino come controllo positivo (Rose *et al.*, 2010).

**Western blotting.** La proteina capsidica espressa di HEV è stata corsa su un gel di SDS-PAGE e quindi trasferita su membrana di nitrocellulosa mediante un apparato per blot semidry (BIO-RAD). La membrana è stata quindi incubata per 18 h a 4°C in PBS contenente 5% latte. Successivamente, essa è stata incubata con siero policlonale positivo (vedi prima), diluito 1:1000 in PBS con 1% di latte, per 90 min a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi con PBS 0,05% Tween 20, la membrana è stata incubata per 1 ora, con una diluizione 1:12000 di anticorpo anti-IgG (H+L) di suino coniugato con fosfatasi alcalina (SIGMA). L'avvenuto legame dell'anticorpo è stato quindi rilevato mediante colorazione con NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium/bromo-cloro-indolilfosfato, Pierce).

**ELISA.** Piastre da 96 pozzetti in polistirene trattato per ELISA (NUNC) sono state sensibilizzate con 50 µl di una sospensione in PBS di antigene ricombinante ORF2 di HEV (0,01 µg/pozzetto) e incubate per 18 h a 4°C. Le piastre sono state successivamente incubate con PBS al 5% di latte per 1 h a 37°C. Dopo 2 lavaggi con PBS 0,1% Tween-20, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 50 µl di siero alla diluizione di 1:1000 in PBS con 0,5% latte. Dopo 90 min a 37°C, sono stati eseguiti 3 lavaggi con PBS 0,1% di Tween 20, ed è stato quindi aggiunto l'anticorpo anti-IgG (H+L) di suino, coniugato con fosfatasi alcalina (SIGMA), alla diluizione 1:12000 in PBS con 2,5% di latte. Dopo 1 h a 37°C, la reazione è stata evidenziata con p-nitrofenol fosfato (Sigma) in tampone 10mM dietanolamina, pH 10. La densità ottica (OD) è stata rilevata mediante lettura spettrofotometrica a

una lunghezza d'onda di 405 nm. Il cut-off è stato stabilito per ogni test in accordo con i controlli interni secondo la formula:  $(OD \text{ controllo positivo} - OD \text{ controllo negativo}) \times 0,15 + OD \text{ controllo negativo}$ .

**Immunocitochimica.** La specificità di legame degli anticorpi nei sieri di suino verso la proteina capsidica del ceppo suino di HEV espressa è stata determinata mediante colorazione di cellule Sf9 esprimenti la proteina ricombinante. A tal fine, cellule Sf9 sono state cresciute su piastre a 96 pozzetti e infettate con baculovirus ricombinante BacHEV $\Delta$ 111ORF2, che esprime la proteina capsidica  $\Delta$ 111HEV, o con un baculovirus non ricombinante, come controllo negativo. Dopo 72 ore, le cellule infettate sono state fissate con una soluzione di PBS e metanolo 1:1, per 3 minuti a temperatura ambiente, e successivamente con metanolo assoluto per 20 minuti. Dopo 3 lavaggi con PBS, i monostrati cellulari sono stati incubati con i sieri (diluizione 1:1000) in PBS all'1% di BSA e la piastrina è stata incubata per 90 minuti a 37°C. I monostrati cellulari sono stati quindi lavati e incubati per 1 ora a 37°C con anticorpo secondario anti-IgG (H+L) di suino coniugato con perossidasi (Sigma), diluito 1:3000, o con l'anticorpo secondario anti-IgG (H+L) murino coniugato con perossidasi (Bio-rad), diluito 1:3000 in PBS all'1% di BSA. La colorazione è stata sviluppata tramite reazione con amino-ethylcarbazole (AEC) in 50mM di tampone acetato, pH 6.

Analoghi protocolli operativi sono stati effettuati con la proteina contenente la coda di istidine. In aggiunta, la presenza della coda ha permesso di utilizzare un anticorpo commerciale che lega in maniera specifica le istidine.

**Fusione.** Per la produzione di anticorpi monoclonali (MAb) specifici verso HEV, i topi immunizzati che mostravano una sierconversione verso la proteina capsidica di HEV in ELISA hanno ricevuto un'ulteriore dose di richiamo per endovena quattro giorni prima di essere sacrificati per la fusione. Dopo eutanasia, la milza è stata rimossa, risospesa in terreno Dulbecco modificato (D-MEM) e omogenizzata. La risultante sospensione cellulare è stata trattata per 5 minuti con una soluzione ipotonica di NH<sub>4</sub>Cl allo 0,83% in acqua a 4°C per lisare gli eritrociti. I linfociti splenici sono stati quindi purificati per centrifugazione attraverso un cuscino di FBS (10 ml) a 1.000 rpm per 8 minuti a temperatura ambiente. Decantato il supernatante, il sedimento di linfociti è stato risospeso in 20 ml di D-MEM, e il numero delle cellule presenti è stato determinato, con conta al microscopio ottico, usando un colorante vitale (0,4% Tripan blu in PBS).

Cellule di mieloma FOX-NY provenienti da topi singenici, in rapporto di 1:5 rispetto al numero totale di linfociti isolati, sono state lavate con D-MEM senza siero e unite alla sospensione di linfociti. La sospensione mista di cellule è stata raccolta mediante centrifugazione a 1.000 rpm per 8 minuti e risospesa per la fusione in 1 ml di polietilen-glicole (MW 3700 Sigma) diluito al 50% in D-MEM. Dopo agitazione per 60 secondi, quantità crescenti di D-MEM sono state aggiunte alla sospensione ad intervalli di un minuto, fino a raggiungere il volume finale di 25 ml. Dopo un'ulteriore centrifugazione a 1.000 rpm per 8 minuti, le cellule sedimentate sono state risospese in terreno selettivo AAT (D-MEM 2x contenente il 15% di FBS, e addizionato con  $4 \times 10^{-7}$  M di amminopterina,  $8 \times 10^{-5}$  M adenina e  $1,6 \times 10^{-5}$  M timidina), seminate in piastri a 96 pozzetti (200  $\mu$ l per pozzetto), e incubate a 37°C in atmosfera di CO<sub>2</sub> all'8%. Le colture clonali sviluppate in tali condizioni sono solo quelle originate dalla fusione tra cellule parentali di mieloma con linfociti splenici.

**Purificazione degli anticorpi monoclonali e determinazione dell'isotipo.** Cinquecento microlitri di campione contenenti gli anticorpi monoclonali anti-HEV sono stati diluiti in 5 ml di tampone di legame (20 mM tampone fosfato pH 7,0), filtrati (0,45  $\mu$ m) e sottoposti a cromatografia per affinità, su una colonna (diametro 0,8 cm, altezza 10 cm, volume 5 ml) di proteina G immobilizzata su agarosio (Pierce) precedentemente equilibrata in tampone fosfato. La proteina G è in grado di legare il frammento Fc di tutte le immunoglobuline di isotipo IgG.

Dopo lavaggio con 50 ml di tampone fosfato, le immunoglobuline legate alla proteina G sono state eluite con tampone 20mM glicina, pH 3,0 in un volume di 6 ml. Il pH è stato neutralizzato con 1 M Tris-HCl pH 8,8, e l'anticorpo eluito è stato quindi dializzato in tampone fosfato.

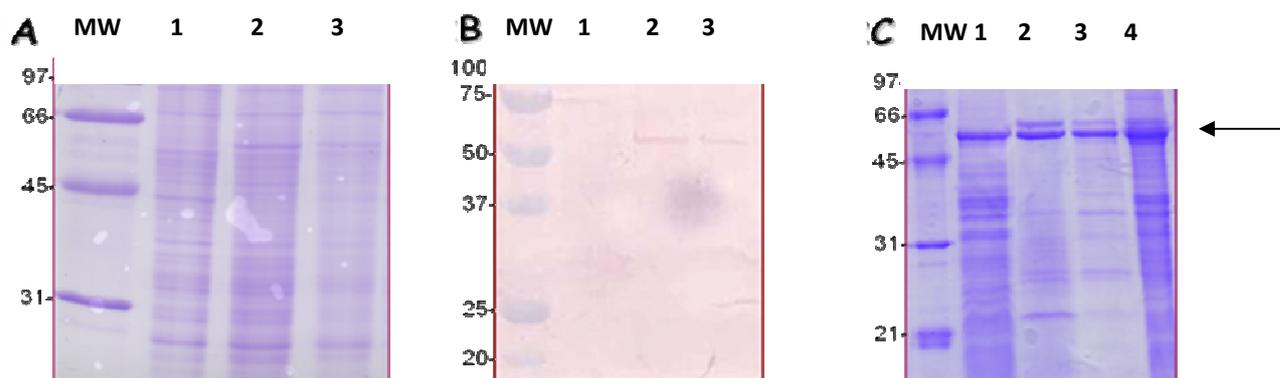
Il livello di purezza dell'anticorpo purificato è stato verificato mediante separazione elettroforetica su gel di SDS-Page 12%. La concentrazione della proteina è stata determinata con il metodo di Bradford (BIO-RAD) e un'immunoglobulina di topo a concentrazione nota, per la costruzione di una curva standard di riferimento.

La determinazione dell'isotipo degli anticorpi monoclonali è stata effettuata tramite saggio ELISA usando un *kit* per anticorpi prodotti in topo (Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents, Sigma).

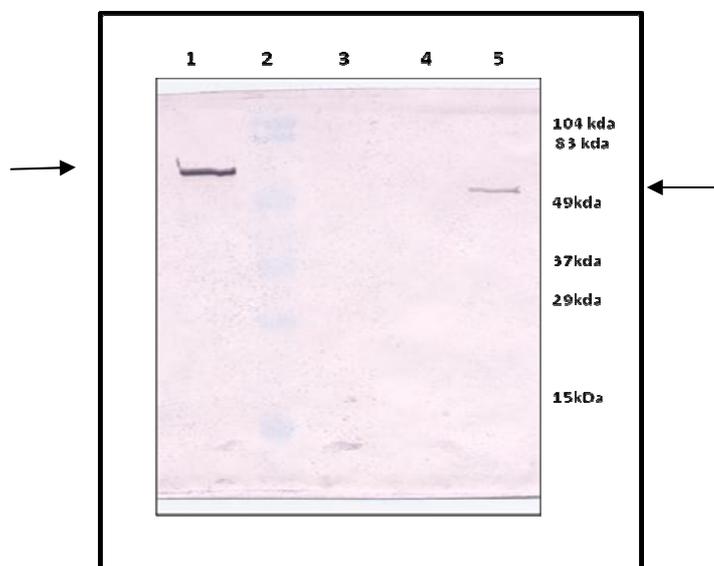
**Produzione di MAb verso un ceppo di HEV suino di origine francese.** Topi Balb/c sono stati immunizzati con 25 µg di VLP prodotte a partire da un ceppo di HEV suino francese (gentilmente fornito da Dr. Nicole Pavio, ANSES-ENVA-INRA, Maisons-Alfort, France; Rose *et al.*, 2010) usando adiuvante di Freundt i.p. La proteina ORF2 di HEV (Acc. No. AY585859), subtipo 3a, è stata espressa utilizzando il sistema baculovirus ricombinante, producendo VLP come descritto nel lavoro di Rose e colleghi (2010).

### 3.1.3 RISULTATI

**Espressione della proteina capsidica di HEV suino genotipo 3.** L'espressione della proteina del capsid virale è stata condotta infettando cellule di insetto Sf9 o Tn5 con il baculovirus ricombinante BacHEV $\Delta$ 111ORF2, contenente la delezione N-terminale della regione della proteina capsidica, o con BacHEV $\Delta$ 111/-59ORF2, che contiene anche una seconda delezione di 59 aa nella porzione C-terminale. Dopo 7 giorni dall'infezione, i monostrati cellulari mostravano evidente effetto citopatico e le cellule sono state raccolte, lisate ed esaminate mediante SDS-PAGE e Western blotting (WB) (Fig. 3.1). Per la proteina con la sola delezione all'N-terminale, i risultati sono riportati nella figura 3.1. Sia le cellule Tn5 (fig 3.1 A-B) che le cellule Sf9 (fig. 3.1 C) esprimevano una proteina di 55kDa, presente sia all'interno delle cellule (fig. 3.1 C linea 2: cellule) che nel sovrinatante di coltura (fig. 3.1 linea 3: medium), sebbene il livello di espressione fosse superiore nelle cellule Sf9 (fig.3.1 C). La proteina visualizzata al microscopio elettronico mediante colorazione negativa non assemblava in *Virus-like particles* (VLP), risultando insolubile, nonostante diversi tentativi fatti, utilizzando condizioni di crescita diverse (dati non riportati). La proteina  $\Delta$ 111ORF2 è stata quindi parzialmente purificata usando cromatografia a scambio ionico (vedi Materiali e Metodi 3.1.2). Per quanto riguarda la proteina con la doppia delezione, HEVORF2 $\Delta$ 111/-59ORF2, sono stati ottenuti risultati molti simili, riportati nella figura 3.2. La proteina non assemblava, ma veniva espressa efficacemente ed era riconosciuta dai reattivi immunologici disposizione utilizzati, compreso il siero suino ottenuto con il virus wild-type. Le due proteine espresse, apparivano quindi simili alla proteina nativa dal punto di vista antigenico.



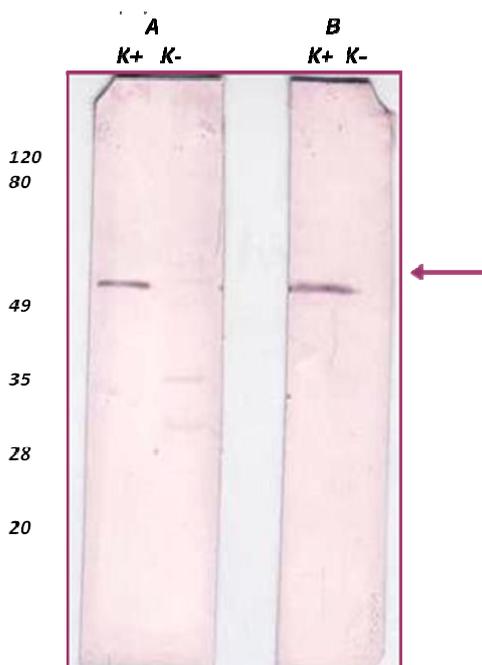
**Figura 3.1** Analisi della proteina capsidica ricombinante di un ceppo suino HEV $\Delta$ 111ORF2 ottenuta da cellule Sf9 e Tn5 infettate con BacHEV $\Delta$ 111ORF2. A) SDS-PAGE di estratti proteici di cellule Tn5 infettate con BacHEV $\Delta$ 111ORF2. B) Western blotting su membrana di nitrocellulosa contenente le proteine totali delle cellule Tn5, ibridizzata con siero policlonale suino anti-HEV. La freccia indica la banda proteica attesa (55-kDa). C) Analisi di cellule Sf9 infettate con alto titolo di BacHEV $\Delta$ 111ORF2. Linea 1: pellet cellulare; linea 3: lisato cellulare infetto; linea 4: supernatante di coltura. MW: marker di peso molecolare (Low Range, Biorad).



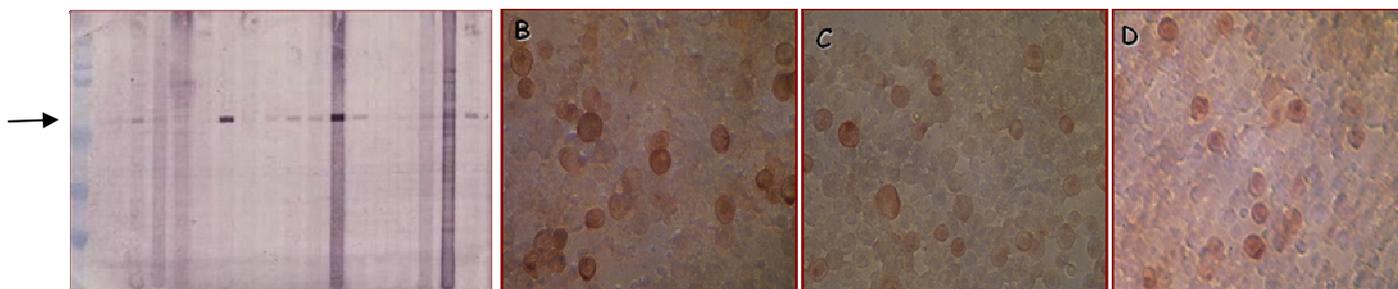
**Figura 3.2** Analisi della proteina capsidica ricombinante di un ceppo suino HEV $\Delta$ 111/-59ORF2 ottenuta da cellule Sf9 infettate con BacHEV $\Delta$ 111/-59ORF2. Western blotting: membrana di nitrocellulosa contenente le proteine totali delle cellule Sf9 infettate con baculovirus BacHEV $\Delta$ 111/-59ORF2 incubata con siero policlonale suino anti-HEV. Le frecce indicano la banda proteica attesa (50-kDa) e la banda del controllo positivo di (55 kDa). Linea 1: lisato cellulare infetto con BacHEV $\Delta$ 111ORF2 (usato come controllo positivo); linea 2: marker di peso molecolare

(Low Range prestained, Biorad); linea 3: lisato cellulare non infetto; linea 4: supernatante di coltura; linea 5: lisato cellulare di cellule infettate con BacHEV $\Delta$ 111/-59ORF2.

**Anticorpi monoclonali (MAbs).** I sieri dei topi immunizzati con la proteina capsidica HEV $\Delta$ 111ORF2 sono stati analizzati in esperimenti di Western blotting utilizzando antigene ricombinante purificato. I sieri riconoscevano una sola banda relativa alla proteina con la taglia attesa (55 kDa) (fig. 3.3, A), identica alla proteina riconosciuta da un siero iperimmune suino di controllo contenente anticorpi anti-HEV (fig. 3.3, B). Confermata la positività dei sieri, gli animali sono stati sacrificati per produrre un pannello di anticorpi monoclonali (MAbs), secondo protocolli consolidati presso il Laboratorio. I MAbs sono stati esaminati mediante ELISA e WB, utilizzando la proteina capsidica di HEV parzialmente purificata. Quattro dei 10 MAbs sono risultati positivi in ELISA e in WB, essendo verosimilmente diretti contro epitopi lineari della proteina (Fig. 3.4 A). Infine, il legame dei MAbs alla proteina capsidica di HEV è stato saggiato mediante colorazione immunocitochimica di monostrati di cellule Sf9 infettati con baculovirus ricombinante BacHEV $\Delta$ 111ORF2, utilizzando come controlli positivi un siero suino e uno murino positivi per anticorpi contro HEV (Fig. 3.4 BC). Otto MAbs hanno prodotto una colorazione specifica negli esperimenti di immunocitochimica (Fig. 3.4 D, test condotto con uno dei 10 MAbs), confermando il riconoscimento specifico della proteina capsidica espressa da parte degli anticorpi prodotti.



**Figura 3.3** Western Blotting con estratto proteico di cellule Sf9 infettate (K+) e non infette (K-), immuno-colorato con sieri policlonali murini (A) e con siero suino positivo per HEV (B)



**Figura 3.4** A) Esperimenti di WB condotti utilizzando proteina capsidica di HEV parzialmente purificata e i MAbs prodotti. B), C), D). Immunocitochimica su monostrati di cellule Sf9 infettati con BacHEVΔ111ORF2, colorati con sieri policlonali suino (B) e murino (C), come controlli positivi, e con gli anticorpi monoclonali generati (D).

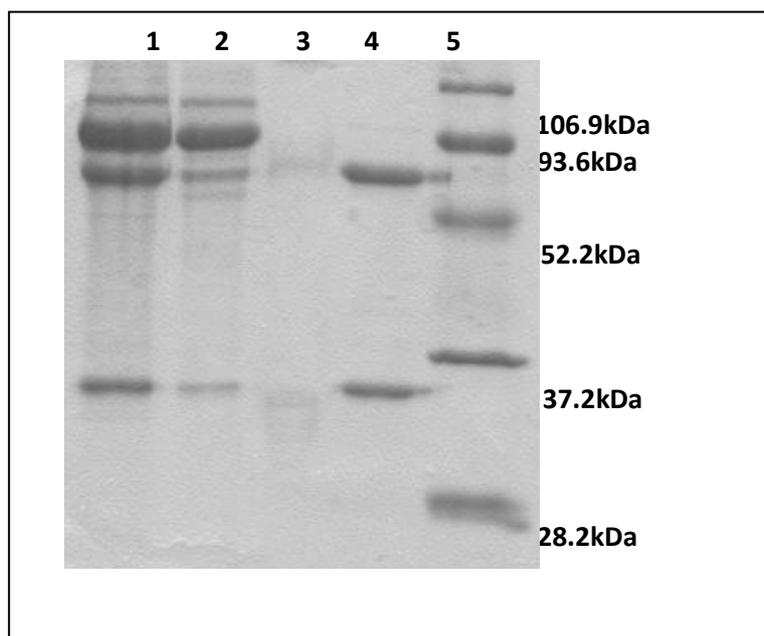
**MAbs ottenuti contro VLP di HEV di un ceppo di HEV suino francese.** Topi Balb/c sono stati immunizzati con 25 µg di VLP di un ceppo suino di HEV (Dr. Nicole Pavio, ANSES-ENVA-INRA, Maisons-Alfort, France; Rose *et al.*, 2010).

Quattro anticorpi monoclonali (MAbs) sono stati generati dalla fusione di splenociti con cellule murine di mieloma (FOX, vedi materiali e metodi 3.1.2) e caratterizzati mediante Western blotting e ELISA.

MAbs	Western blotting	Elisa HEV
<b>2H4</b>	-	+
<b>1H10</b>	-	+
<b>1B5</b>	-	+
<b>1A8</b>	-	+

**Tabella 3.1** Quattro degli anticorpi monoclonali ottenuti contro le VLP di HEV di un ceppo francese sono stati caratterizzati mediante ELISA e WB.

**Caratterizzazione degli anticorpi monoclonali prodotti.** Tutti gli anticorpi monoclonali prodotti sono stati purificati e quantizzati (fig.3.5), e titolati mediante ELISA. Il test ha confermato il legame specifico degli anticorpi purificati alla proteina capsidica di HEV, ma non alle VLP di un virus eterologo (VLP di BEC, Zakhour *et al.*, 2010); inoltre, gli anticorpi monoclonali diretti contro la proteina lineare del ceppo suino italiano mostravano una efficienza di legame anche per le VLP del ceppo suino francese di HEV (tabella 3.2) sempre di g3.



**Figura 3.5:** Analisi mediante SDS-PAGE dell'anticorpo 2B1 nei diversi stadi di purificazione. Linea 1: campione originale (0,1  $\mu$ l di 500  $\mu$ l); Linea 2: effluente (10 $\mu$ l di 15 ml); Linea 3: eluato (10  $\mu$ l di 7 ml); Linea 4: eluato concentrato (1  $\mu$ l di 2 ml); Linea 6: marker di peso molecolare (Low Range, Biorad).

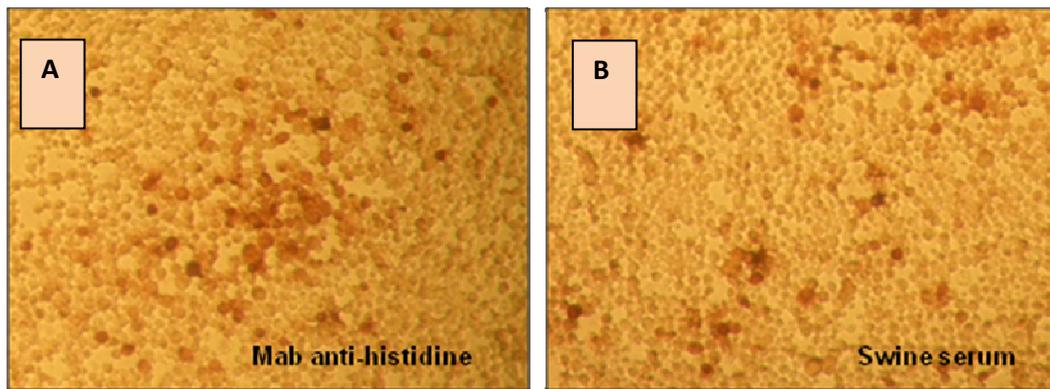
MAbs	Isotipo	Proteina capsidica ceppo HEV suino italiano			VLP ceppo HEV suino francese	
		ELISA	WB	IPA	ELISA	WB
<b>2B1</b>	IgG1	+	+	+	+	+
<b>3E12</b>	IgG1	+	+	-	+	+
<b>1D3</b>	IgG1	+	+	+	+	+
<b>2F2</b>		+	+	+	+	+

**Tabella 3.2** Quattro degli anticorpi monoclonali ottenuti sono stati caratterizzati mediante ELISA e WB. Gli anticorpi reagivano sia con la proteina capsidica ricombinante di HEV del ceppo italiano, sia con le VLP di HEV prodotte in Francia (Rose *et al.*, 2010).

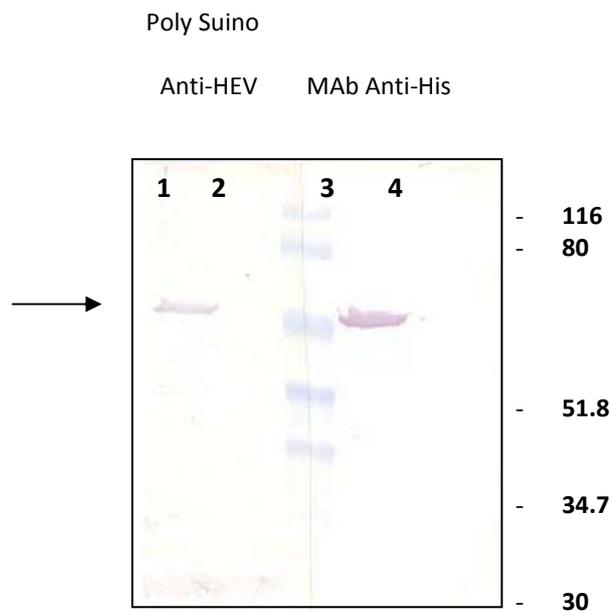
ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay; WB = Western blotting; IPA = immunocitochimica, colorazione di cellule Sf9 infettate con BacHEV $\Delta$ 111ORF2;

**Produzione del bacmide BacHEV $\Delta$ 111ORF2-his.** La proteina capsidica del ceppo suino italiano di HEV espressa con il sistema del baculovirus ricombinante non è risultata nella produzione di VLP, e per questo è stato possibile ottenerne solo una parziale purificazione. Successivamente, la proteina è stata espressa con lo stesso sistema, ma producendo una proteina di fusione contenente una coda di istidina nella porzione N-terminale, utilizzata per la purificazione mediante cromatografia di affinità.

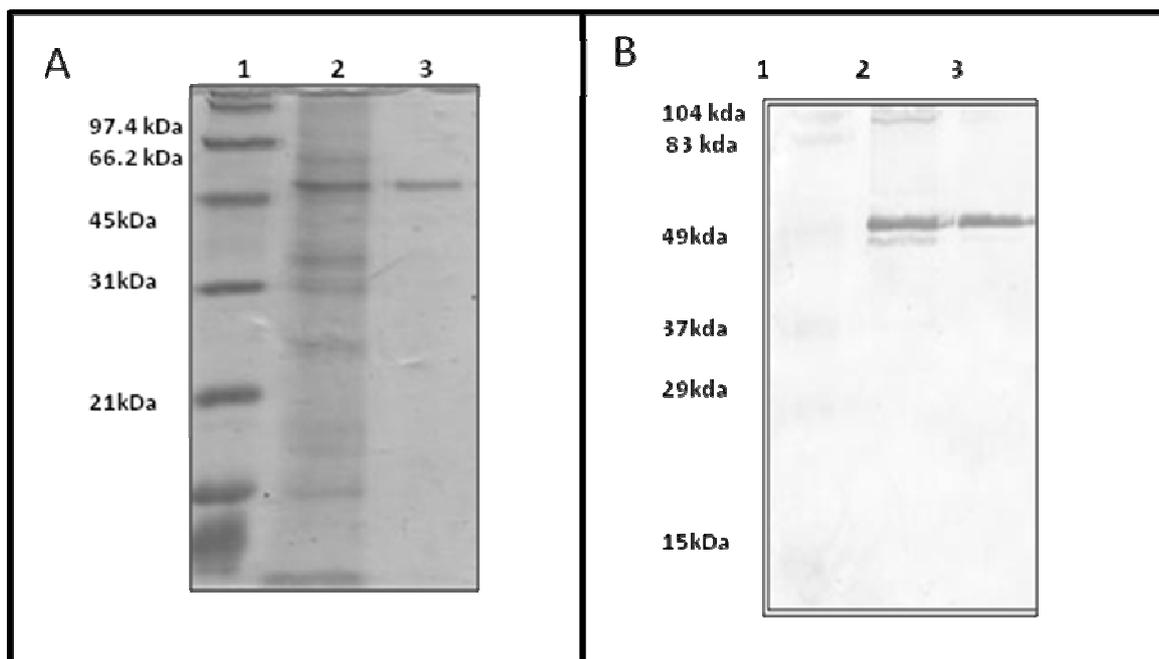
L'espressione della proteina capsidica in Sf9 infettate con BacHEV $\Delta$ 111ORF2his è stata confermata con IPA e WB, usando un anticorpo commerciale anti-istidina (fig. 3.6 A) e un siero iperimmune anti-HEV (fig. 3.6 B e fig. 3.7). Il test è risultato nella colorazione di una proteina presente nell'estratto cellulare, con il peso molecolare atteso di 55 kDa. La proteina è stata purificata in condizioni denaturanti, essendo espressa in forma insolubile (fig. 3.8) (vedi materiali e metodi 3.1.2). Nonostante la proteina rinaturata venisse riconosciuta dal siero iperimmune anti-HEV (fig. 3.8 B) in WB, non era invece riconosciuta mediante ELISA, possibilmente per un folding non corretto durante la procedura di rinaturazione.



**Figura 3.6** Immunocitochimica usando MAb anti-His and un siero policlonale suino specifico per il ceppo suino di HEV (Rose *et al.*, 2010) .



**Figura 3.7** Analisi di Western blotting della proteina HEVΔ111ORF2-his. Linee 1-2: siero policlonale suino anti-HEV; linee 3-4: anti-His MAb. Il marker molecolare è mostrato. La freccia indica la posizione della proteina ricombinante HEV ORF2.



**Figura 3.8 SDS-PAGE e Western blotting.** Pannello A: SDS-PAGE e pannello B: Western blotting utilizzando un siero policlonale suino anti-HEV (Rose *et al.*, 2010). Linea 1: marker di peso molecolare (Low Range, Biorad); Linea 2: lisato cellulare ottenuto da cellule infettate (controllo positivo); Linea 3: proteina purificata.

### 3.1.4 DISCUSSIONE

Per molti virus, i test immunoenzimatici (ELISA) commerciali sono risultati una buona alternativa ai metodi molecolari per lo screening di campioni clinici, data la loro semplicità, rapidità e la possibilità di essere utilizzati per studi con un elevato numero di campioni.

Nel caso di HEV, sono presenti in commercio vari kit diagnostici ELISA, che, a fronte di una specificità elevata, appaiono tuttavia solo parzialmente adeguati in termini di sensibilità (Blacksell *et al.*, 2007; Peralta *et al.*, 2009). La scarsa efficienza è verosimilmente correlata alla variabilità antigenica di HEV.

Questo studio è stato condotto al fine di valutare la possibilità di sviluppare reagenti impiegabili in nuovi test diagnostici ELISA per la ricerca di anticorpi anti-HEV in campioni biologici, attraverso

la produzione e la caratterizzazione di anticorpi policlonali e monoclonali (MAb) diretti contro la proteina capsidica ORF2, che rappresenta l'antigene principale del virus. Come riportato nel capitolo 4, l'antigene prodotto è risultato un ottimo reattivo per gli studi sierologici. Per la produzione di antigene virale, è stato clonato il gene corrispondente alla regione dell'ORF2 di un ceppo di HEV di genotipo g3 (suino) identificato in Italia, mediante il sistema ricombinante di Baculovirus. Il ceppo suino utilizzato nello studio (swine85/G.3/08/IT) (Di Bartolo *et al.*, 2008) è derivato da un campione di bile suina, ed era simile ai ceppi g3 tipicamente circolanti nei suini sia in Europa che nel resto del mondo. La proteina prodotta era riconosciuta in maniera specifica da sieri di suini infetti, dimostrandosi simile antigenicamente alla proteina capsidica del virus *naive*.

Questa è stata parzialmente purificata e utilizzata per generare anticorpi monoclonali in topi immunizzati per via parenterale. La milza dei topi che presentavano sieroconversione verso l'ORF2 di HEV è stata utilizzata per la produzione di MAb. I 10 MAb ottenuti hanno evidenziato reattività sia in Western blotting che in ELISA e in IPA, risultati compatibili con il riconoscimento di epitopi lineari. Quattro dei 10 anticorpi monoclonali prodotti sono stati in parte caratterizzati, e riconoscevano un epitopo lineare della proteina, come rivelato dal loro legame alla proteina in Western blotting. Inoltre, le analisi mediante ELISA hanno dimostrato che questi anticorpi monoclonali riconoscevano sia l'antigene lineare del ceppo suino italiano, sia le VLP ottenute da un ceppo francese.

Risultati simili sono stati anche ottenuti con anticorpi monoclonali prodotti utilizzando le VLP del ceppo suino francese (Rose *et al.*, 2010), che riconoscevano in test ELISA sia la proteina ORF2 prodotta del ceppo italiano con una sola delezione, sia le VLP di HEV.

Inoltre, è stato dimostrato, mediante test ELISA e Western blotting sia contro le VLP di HEV con doppia delezione, (Rose *et al.*, 2010) che contro la proteina lineare con delezione unica all'N-terminale, che gli anticorpi monoclonali riconoscevano non solo gli epitopi immunodominanti presenti sulla superficie di VLP di HEV suino francese (Rose *et al.*, 2010), ma anche un epitopo immunodominante presente nella regione 111-601 aa (capitolo IV di questa tesi). Inoltre la proteina prodotta non assemblata in VLP risultava antigenicamente simile al capsido virale nella sua forma strutturata. Infatti gli anticorpi prodotti riconoscevano anche le VLP di un ceppo g3 suino identificato in Francia.

Questo studio preliminare fornisce informazioni sulla struttura antigenica delle particelle di HEV, implicando che tra i residui 111-601 aa della proteina capsidica è presente un epitopo immunodominante riconosciuto dai MAb anche sulla superficie delle VLP.

Gli anticorpi monoclonali descritti in questo studio risultano utilizzati in successivi studi per la caratterizzazione molecolare di HEV, attraverso saggi ELISA di competizione epitopica, per individuare gli amminoacidi coinvolti nel riconoscimento Ag-Ab di anticorpi diversi mediante tecniche di epitope-mapping.

Nell'ultima parte di questo studio, poiché la proteina ottenuta dal ceppo di HEV suino italiano appartenente al g3 è risultata non assemblata e quindi non facilmente purificabile, la stessa è stata espressa con un coda di istidina ed è stata purificata in condizioni denaturanti. Tuttavia la proteina purificata e rinaturata ha mostrato bassa efficienza in ELISA, probabilmente dovuta ad errato folding durante la rinaturazione.

## **3.2 SISTEMA D'ESPRESSIONE: SEMLIKI FOREST VIRUS REPLICON**

### **3.2.1 INTRODUZIONE**

In questo studio la proteina capsidica di un ceppo di HEV di origine suina è stata espressa in cellule di mammifero utilizzando il sistema ricombinante Semliki Forest Virus replicon (SFVr).

E' stato utilizzato un plasmide contenente il cDNA genomico di SFV, che presenta il promotore dalla DNA polimerasi SP6 da cui avviene la trascrizione *in vitro* delle sequenze clonate, i geni codificanti il complesso della replicasi di SFV, il promotore subgenomico interno di SFV e il segnale di poliadenilazione.

La regione che codifica le proteine strutturali di SFV è sostituita con un sito di clonaggio a livello del quale vengono inseriti i geni eterologhi, la cui espressione è regolata dal promotore subgenomico ad elevata efficienza di SFV (Liljestrom *et al.*, 1994). Il costrutto SFV viene trascritto *in vitro* e l'RNA ottenuto viene utilizzato per trasfettare cellule fibroblastoidi di criceto (BHK-21).

La proteina del capsido del virus dell'epatite E (HEV) è codificata dalla open reading frame 2 (ORF 2) e presenta un'espressione variabile quando espressa in cellule d'insetto, e ancora non sono del tutto chiari i meccanismi della sua maturazione in cellule permissive. Il sistema SFVr è stato

pertanto valutato come possibile alternativa al baculovirus ricombinante sia per l'ampia gamma di cellule di mammifero utilizzabili come ospite che per l'alto livello di espressione.

### 3.2.2 MATERIALI E METODI

**Cellule.** Cellule BHK-21 sono state coltivate in terreno Glasgow minimal essential medium (MEM) con il 5 % di siero fetale di bovino (FBS), 10% di fosfato di triptosio, e 10 mM HEPES. Le cellule di BSR (un clone di BHK-21) sono state coltivate in Glasgow MEM supplementato con 10% FBS, penicillina (5 U/ml) e streptomicina (5 µg/ml). Le cellule sono state incubate a 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

**Costrutto del pSFV ricombinante.** Sono stati clonati sia il gene ORF2 di HEV con una delezione all'N-terminale priva dei primi 111 aminoacidi della proteina capsidica sia un secondo frammento che la presenta anche seconda delezione di 59 aminoacidi nella porzione C-terminale. Per ottenere il prodotto di PCR è stato utilizzato il ceppo swine85/G.3/08/IT. Il cDNA ottenuto dalla coda poli-A del virus è stato utilizzato in una reazione di PCR con primers FΔ111ORF2 (5'-GC AGATCT GC ATG GCC GTA TCA CCG GCT CCC GAT ACA GCC-3'), fiancheggiato dal sito enzimatico di restrizione *Bgl*II (sottolineato), e RORF2 (5'-GAC TCG AGA TTA AGA CTC CCG GGT TTT ACC-3'), fiancheggiato dal sito enzimatico di restrizione *Bgl*II (sottolineato), o alternativamente con il primer Rc59ORF (5'-GAC TCG AGA TTA CGC AAG GGC CGA ATG TG-3'). Le due coppie di primer consentono di amplificare la regione di 1,7 kb, corrispondente alla ORF2 priva dei primi 111 aa, oppure una regione di 1,5 kb corrispondente a delezioni dei primi 111 aminoacidi e degli ultimi 59 aminoacidi nella regione capsidica (ORF2) del ceppo swine HEV. I frammenti ottenuti sono stati clonati in un vettore commerciale pGEM (Promega), per essere poi recuperati mediante una digestione con l'enzima di restrizione *Bam*HI e successivamente clonati nello stesso sito del vettore donatore pSFV-1 (Invitrogen). I costrutti ottenuti pSFV-1 BO85ΔORF2 e pSFV-1 BO85Δ/-59ORF2 sono stati linearizzati con l'enzima di restrizione *Spe*I.

**Trascrizione *in vitro* ed elettroporazione.** I virus ricombinanti sono stati prodotti in cellule BHK-21 seguendo il protocollo di Liljestrom e Garoff (Berglund *et al.*, 1993; Liljestrom e Garoff, 1991; Liljestrom e Garoff, 1994) usando pSFV-1 e il plasmide helper pSFV-H2. I costrutti lineari ottenuti sono stati utilizzati in una reazione *in vitro*, mediante l'enzima SP6 (Promega) a partire dal

promotore corrispondente, per generare un trascritto sintetico. Questo è stato inserito nelle cellule permissive BHK-21 mediante elettroporazione (Bio-Rad). Il titolo virale è stato determinato utilizzando un test di immunocitochimica usando un siero policlonale suino positivo (Rose *et al.*, 2010).

**Analisi delle proteine delle cellule infettate con SFVr.** Cellule BHK-21 trasfettate, sono state replicate lasciate in coltura per 16 ore, e successivamente sono state sottoposte a centrifugazione a 3.000 rpm per 20 minuti. Sia il supernatante che il pellet delle colture cellulari infettate sono stati usati per la purificazione delle proteine. Il sovrinatante é stato ultracentrifugato a 35.000 rpm per 2 ore a 4° C, e il sedimento é stato risospeso in tampone PBS e conservato a 4°C. Il pellet cellulare è stato invece risospeso in tampone RIPA (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM b-glycerophosphate,) per garantire la completa lisi delle cellule. La sospensione è stata chiarificata per centrifugazione e il pellet è stato utilizzato per l'estrazione delle proteine. Frazioni del pellet e del supernatante sono state raccolte per essere analizzate in elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) (fig. 3.9 B).

**ELISA.** La metodica ELISA impiegata è la stessa descritta nel paragrafo 3.1.2.

**Western blotting.** La metodica WB impiegata è la stessa descritta nel paragrafo 3.1.2.

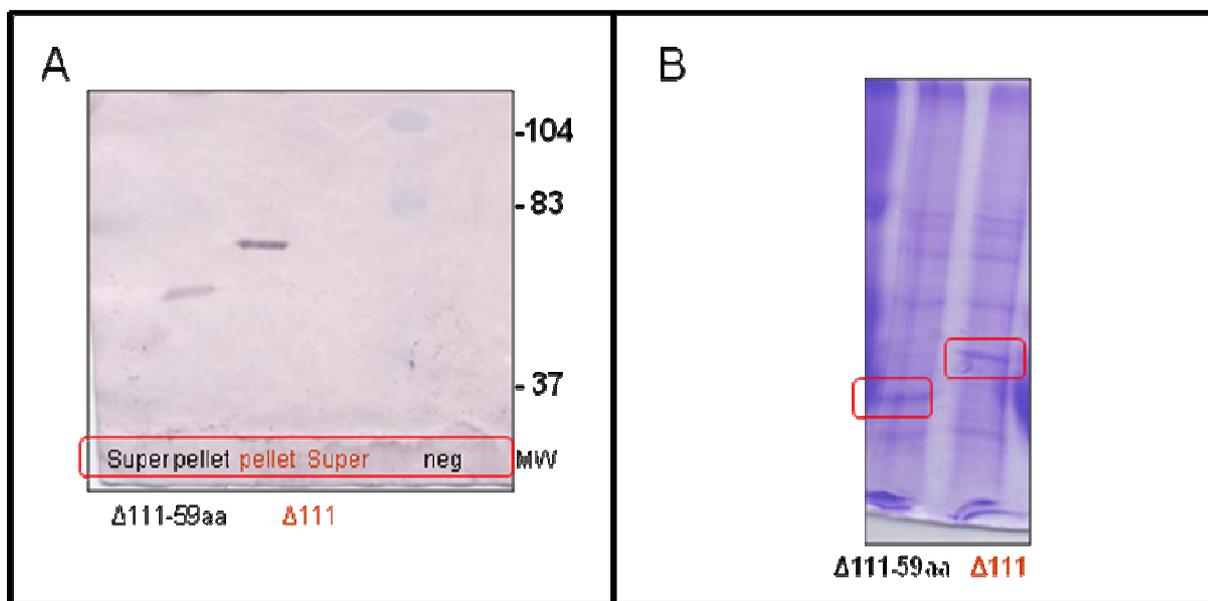
**Immunocitochimica.** La metodica impiegata è la stessa descritta nel paragrafo 3.1.2.

### 3.2.3 RISULTATI

#### Analisi del prodotto purificato con un siero policlonale suino anti-HEV

L'estratto proteico ottenuto da cellule BHK-21 infettate è stato analizzato mediante SDS-PAGE e WB utilizzando come controllo positivo siero iperimmune suino (Rose *et al.*, 2010).

Segnali specifici, corrispondenti per peso molecolare alla banda proteica di peso molecolare atteso di 55 kDa, relativa a  $\Delta 111$ ORF2 HEV/ BO85, e ad una più piccola di 45 kDa, corrispondente a  $\Delta 111$ /-59aa ORF2 HEV/BO85, sono stati osservati in WB e confermati in SDS-PAGE (fig. 3.9).

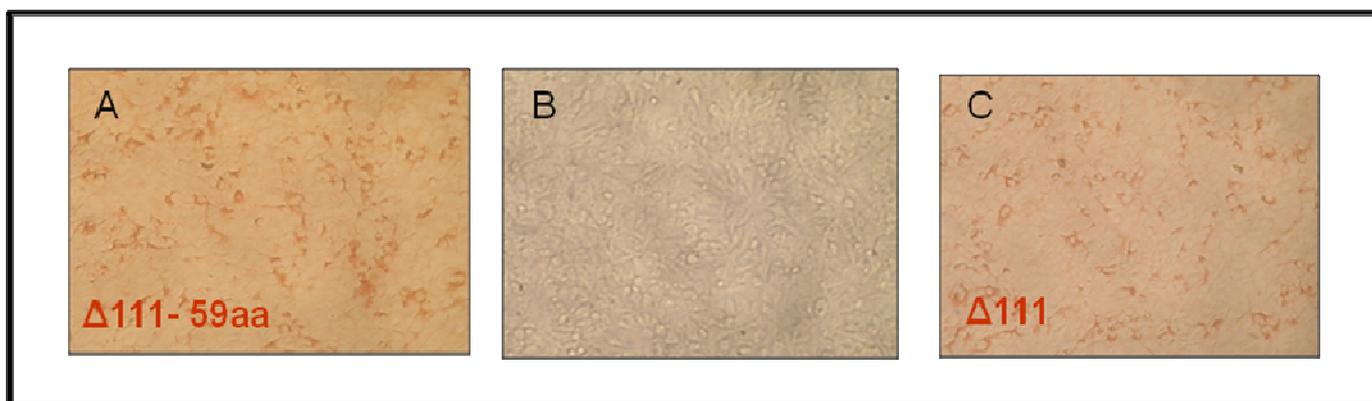


**Figura 3.9** Western blotting e SDS-PAGE della proteina capsidica, con una o due delezioni, espressa con il sistema di SFVr

#### Immunoperossidasi (IPA) delle cellule BHK-21 infettate con SFVr $\Delta 111$ ORF2 HEV/BO85 e SFVr $\Delta 111$ /-59aa ORF2 HEV/BO85

Per confermare ulteriormente la specificità di legame dei sieri iperimmuni è stato eseguito un test di colorazione immunocitochimica, mediante immunoperossidasi, su monostrati di cellule BSR ( $4,8 \times 10^5$  cellule/pozzetto) infettati con SFVr esprime la proteina ricombinante con una o entrambe le delezioni. Questo esperimento ha evidenziato la capacità del siero iperimmune di legare in maniera

efficiente e specifica entrambe le proteine prodotte, mettendo in evidenza una colorazione intracitoplasmatica in corrispondenza dei foci di replicazione virale (Fig.3.10).



**Figura 3.10:** Colorazione mediante immunoperoxidasi di cellule BSR infettate con SFVr esprime le proteine ricombinanti del ceppo suino di HEV e marcate con il siero iper-immune (1:1000).

### 3.2.4 DISCUSSIONE

Il sistema SFVr permette di ottenere particelle virali ad elevato titolo, grazie alla alta efficienza trascrizionale tipica dell'alphavirus (Lundstrom *et al.*, 1994; Lundstrom *et al.*, 1995).

L'infezione da parte di SFV è citolitica e induce morte cellulare per apoptosi. E' prevedibile ipotizzare che i corpi apoptotici possano essere riconosciuti da cellule APC favorendo così il processamento e la presentazione dell'antigene in associazione a molecole MHC-I e MHC-II, aumentando il "cross-priming". Inoltre, poiché la replicazione di SFV avviene esclusivamente a livello citoplasmatico, questo metodo consente di eliminare i problemi di riduzione d'espressione genica legati alla disponibilità dei fattori trascrizionali nucleari, ai fenomeni di splicing e di trasporto nucleo-citoplasma.

Poiché la proteina nativa del capsido di particelle virali di HEV non è stata caratterizzata, non è chiaro se modificazioni post-traduzionali (maturazione proteolitica e assemblaggio in cellule d'insetti, glicosilazione in cellule di mammifero) sono rilevanti per il ciclo di replicazione del virus in epatociti. Per iniziare ad affrontare questo problema, può essere utilizzata la proteina ORF2

espressa nel sistema SFV replicon (SFVr). La replicazione di SFVr avviene esclusivamente a livello citoplasmatico, pertanto questo metodo può consentire di ridurre i problemi di modificazione post-traduzionale, inclusa la eventuale glicosilazione riportata da altri lavori per la proteina di ORF2 di HEV (Tam *et al.*, 1991). Questi aspetti specifici saranno studiati in ulteriori studi sul successivo destino intracellulare della proteina ORF2 glicosilata e non. A tale scopo, l'SFVr ORF2 HEV potrà essere utilizzato in cellule di epatociti (HepG2) per l'analisi di meccanismi cellula-specifici implicati nei processi di maturazione e assemblaggio.

### **3.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI RIPORTATI NEL CAPITOLO**

La diagnosi sierologica di infezione da HEV viene effettuata generalmente con test ELISA o, meno comunemente, con Western blotting. Gli antigeni usati nei test sono proteine ricombinanti o peptidi sintetici che corrispondono ad epitopi immunodominanti delle proteine strutturali del virus ORF2 e ORF3 (Meng *et al.*, 1997; Emerson *et al.*, 2003). Antigeni ricombinanti derivati da ORF2 hanno in genere una sensibilità e specificità maggiore. Inoltre, epitopi della proteina ORF2 possono indurre anticorpi neutralizzanti, i quali sono maggiormente conservati tra i differenti ceppi virali (90,5%) rispetto a quelli di ORF3 (73,5%) (Wibawa *et al.*, 2004). Fino ad oggi, ORF2 o suoi frammenti sono stati espressi con successo in diversi sistemi ricombinanti quali cellule procariotiche, lieviti, cellule animali (particolarmente utilizzate quelle d'insetto) e cellule vegetali (Wibawa *et al.*, 2004). I test sierologici sono in grado di differenziare tra IgM e IgG, utile permettendo di distinguere un'infezione acuta da pregressa, dal momento che IgM anti-HEV si ritrovano nel siero solo durante le prime due settimane dall'inizio della sieroconversione, a differenza degli anticorpi di classe IgG, più persistenti.

I test sierologici attualmente presenti in commercio sono molto diversi tra loro con differenti sensibilità e specificità, rendendo talvolta difficile l'interpretazione e la comparazione dei risultati riportati nei diversi studi.

I ceppi di HEV di origine suina sono geneticamente e antigenicamente correlati a quelli umani, e in letteratura è ampiamente riportato come molti epitopi, in particolare quelli di ORF2, siano condivisi tra ceppi anche di diversa origine (Meng *et al.*, 1997; Haqshenas *et al.*, 2002; Engle *et al.*, 2002; Choi and Chae, 2003; Huang *et al.*, 2004; Wibawa *et al.*, 2004). Per l'individuazione degli anticorpi anti-HEV nel siero suino sono comunemente utilizzati anche antigeni virali derivanti da ceppi umani, sostituendo l'anti-anticorpo marcato di rivelazione (Meng *et al.*, 1997), a riprova che i ceppi di origine umana condividono uno o più epitopi con quelli suini.

Il lavoro presentato in questo capitolo ha riguardato la produzione del capsido virale di un ceppo di HEV suino, e la sua successiva utilizzazione per produrre antisieri e anticorpi monoclonali, idonei per caratterizzare i virus e per la messa a punto di test diagnostici per il suino (vedi Capitolo 4). La proteina capsidica ORF2 di HEV è critica per l'induzione della risposta anticorpale, quale costituente strutturale del capsido virale (Panda *et al.*, 2007; Aggarwal e Jameel, 2008). La proteina capsidica è stata espressa in forma delecta, utilizzando diversi sistemi d'espressione. Lo scopo era quello di ottenere la proteina nella sua forma assemblata, VLP, che tuttavia non sono state ottenute con il sistema del baculovirus. Come alternativa, è stato successivamente utilizzato il sistema di Semliki Forest Virus replicon, ma una conferma dell'avvenuto assemblaggio della proteina, sicuramente espressa in grandi quantità in tale sistema non è ancora stata ottenuta.

Le difficoltà incontrate nell'assemblaggio della proteina ORF2 di g3 HEV suino meritano approfondimenti. Infatti, VLP sono state efficientemente ottenute da altri autori impiegando lo stesso sistema baculovirus di questo lavoro di tesi, utilizzando seppure a partire da un ceppo virale di genotipo 1, di derivazione umana. Questo suggerisce l'esistenza di differenze importanti tra virus suino e umano o di diverso genotipo nei processi di folding e di assemblaggio all'interno della cellula ospite.

L'importanza di un corretto folding della proteina capsidica è anche avuta suggerita dai risultati ottenuti purificando la proteina ricombinante, con la coda di istidine, in condizioni denaturanti. Dopo la sua rinaturazione questa appariva infatti riconosciuta efficientemente da alcuni anticorpi in WB, che viene effettuato in condizioni denaturanti, mentre risultava scarsamente antigenica con altri anticorpi in test ELISA, sensibili alla conformazione dei siti antigenici. Queste osservazioni al suggeriscono che la procedura di rinaturazione della proteina purificata non ha assicurato il recupero completo del *folding* originale, forse anche per interferenza della coda di istidine. Nonostante una parziale compromissione della struttura secondaria della proteina, e di alcuni siti antigenici, la generale conservazione delle proprietà antigeniche della proteina ricombinante è stata tuttavia confermata dai saggi ELISA, Western blotting e di immunocitochimica. Sieri policlonali prelevati da topi inoculati con la proteina ricombinante e anticorpi monoclonali prodotti contro la proteina, con una sola o due delezioni, erano infatti in grado di riconoscere anche la proteina capsidica ORF2 non purificata.

## **CAPITOLO 4: Epidemiologia di HEV**

L'epatite E è un problema emergente di sanità pubblica non solo nei Paesi in via di sviluppo, dove le condizioni igienico-sanitarie sono inadeguate, ma anche nei Paesi industrializzati, come quelli Europei, considerati fino a poco tempo fa a basso rischio. L'infezione nei Paesi industrializzati è correlata soprattutto a viaggi nelle zone endemiche, ma più recentemente viene riscontrata con crescente frequenza anche in soggetti senza anamnesi di viaggi all'estero. Diverse evidenze suggeriscono che i casi di infezione autoctona hanno probabilmente origine zoonotica (Aggarwal *et al.*, 2000; Clemente-Casares *et al.*, 2003; Emerson and Purcell, 2003; Lewis *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006; Panda *et al.*, 2007; Teo, 2006; Dalton *et al.*, 2007; Norder *et al.*, 2009; Rutjes *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2009). Sebbene le vie di trasmissione di HEV siano ancora relativamente poco documentate, un numero crescente di studi indica i suini come principale serbatoio, in particolare per i genotipi 3 e 4, a cui appartengono ceppi virali comuni all'uomo e al suino (Dalton *et al.*, 2008). In questo capitolo verranno riportati i risultati di diversi lavori che portano un contributo significativo alle conoscenze relative all'epidemiologia delle infezioni di HEV nel suino, nel cinghiale e in parte nell'uomo, con particolare riferimento alla situazione italiana.

### **4.1 PRESENZA DI HEV IN SUINI AL MACELLO IN ITALIA.**

#### **4.1.1 INTRODUZIONE**

Il primo ceppo animale di HEV è stato identificato in un suino negli USA nel 1997 (Meng *et al.* 1997), risultando strettamente correlato a ceppi umani identificati sullo stesso territorio. Da allora, molti lavori pubblicati hanno descritto casi umani sporadici di epatite E, supportando l'ipotesi che la trasmissione di HEV all'uomo dai suini, dai cinghiali e dai cervi, sia legata al consumo di carne (e salsicce) cruda o poco cotta. Le sequenze genomiche identificate negli alimenti coinvolti (carne di cinghiale e cervo, salsiccia di fegato di suini), o direttamente negli animali, hanno un'elevata identità di sequenza tra di loro (Matsuda *et al.* 2003; Tei *et al.* 2003; Yazaki *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005, Colson *et al.*, 2010). In Giappone e in USA, il 2% e l'11% di fegati di suino commercializzati

sono risultati positivi per la presenza di RNA di HEV (Yazaki *et al.*, 2003; Feagins *et al.*, 2007). In Italia, il primo caso autoctono di epatite E venne descritto (Zanetti *et al.*, 1999) nel 1997, e il virus identificato apparteneva al genotipo 3. Successivi studi sono stati condotti su suini allevati nel Nord Italia (Caprioli *et al.*, 2007; Di Bartolo *et al.*, 2008) indicando un'ampia circolazione di HEV negli allevamenti di maiali.

Lo studio che viene di seguito descritto intendeva valutare la presenza di HEV in suini al macello e la correlazione genetica tra virus riscontrati in suini italiani con altri ceppi, umani e suini, circolanti in Europa. Anticorpi contro HEV sono stati determinati utilizzando un ELISA commerciale adattato alla ricerca di anticorpi nel siero dei suini. Inoltre, l'RNA di HEV è stato ricercato in campioni di bile, fegato e feci di animali macellati.

#### 4.1.2 MATERIALI E METODI

Campioni. Nei mesi di Novembre e Dicembre 2008, campioni di bile, feci, fegato e sieri sono stati raccolti in parallelo da 48 suini clinicamente sani in un macello della provincia di Bologna. Gli animali analizzati provenivano da 10 allevamenti della stessa area geografica e appartenevano a due classi di età:

- Animali giovani (3-4 mesi): 20 animali
- Animali adulti (9-10 mesi): 28 animali

I campioni di feci sono stati raccolti con tamponi sterili dopo aver praticato una breccia nel tratto distale del grosso intestino, e conservati a -80 °C fino al momento del loro impiego. Per l'analisi, sono state preparate sospensioni fecali al 10% in acqua sterile; dopo agitazione per circa 2 min al vortex, il materiale grossolano è stato eliminato attraverso centrifugazione a 3000 rpm per 20 min a 4°C. I sopranatanti chiarificati sono stati utilizzati per l'estrazione di RNA genomico virale.

I campioni di bile sono stati raccolti mediante aspirazione con una siringa sterile posizionata all'interno di un'apertura praticata nella parete della cistifellea. Per l'analisi, sono state preparate diluizioni 1:10 in acqua sterile. Sia le bili *in toto* che le soluzioni diluite sono state conservate a -80°C. I campioni di fegato sono stati prelevati, mediante forbici sterili, dai bordi dell'organo mentre i sieri sono stati ricavati per spremitura del coagulo intracardiaco. Anche questo materiale è stato conservato a -80°C dopo il prelievo.

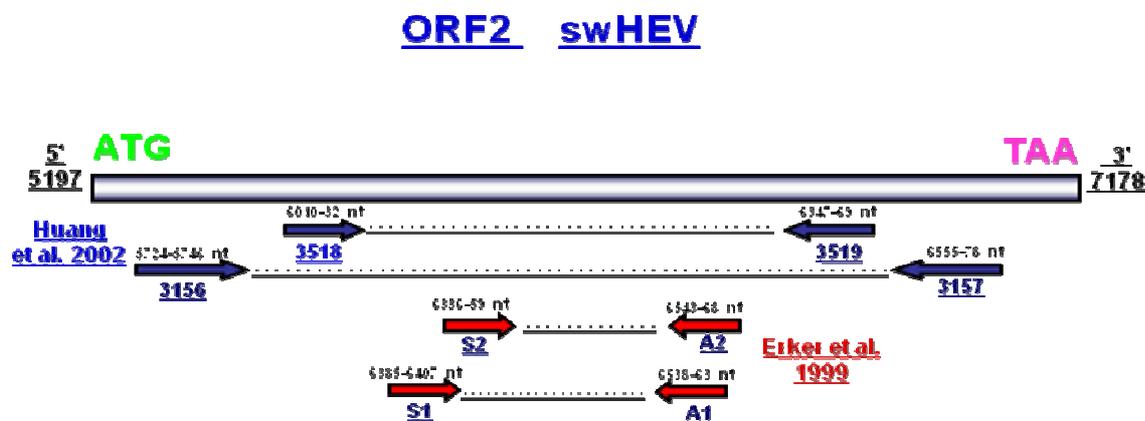
## Estrazione di RNA e RT-PCR e *nested*-PCR

Per l'estrazione di RNA virale dai campioni di feci e di bile (140 µl di sospensione fecale o di bile diluita) è stato utilizzato il kit commerciale QIAamp Viral RNA Extraction (QIAGEN, Hilden, Germany), seguendo le istruzioni del produttore.

Ad una quantità di 250 mg di fegato, precedentemente tagliato a piccole fette sottili con un bisturi sterile, è stato aggiunto 1 mL di tampone di lisi. Il tessuto è stato dissolto con un omogeneizzatore Tissue Lyser (QIAGEN, Hilden, Germany). Il lisato è stato centrifugato per 3 minuti a 13000 rpm per due volte, e il sopranatante chiarificato è stato utilizzato per l'estrazione di RNA virale utilizzando il kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), seguendo le indicazioni del produttore.

Per entrambi i protocolli di estrazione, controlli negativi sono stati inseriti ogni cinque campioni, al fine di controllare eventuali contaminazioni.

L'RNA di HEV estratto è stato immediatamente retroscritto in cDNA e amplificato in un'unica reazione, utilizzando il kit SuperScript III One-Step RT-PCR, utilizzando Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Per identificare il gene dell'ORF2, codificante la proteina capsidica, sono stati applicati due protocolli di RT-*nested*-PCR che utilizzavano ciascuno due diverse coppie di oligonucleotidi, disegnati da Erker *et al.*, 1999a (protocollo 1; primers A1/S1 e A2/S2) e da Huang *et al.*, 2002 (protocollo 2; primers 3156/3157 e 3158/3159). La posizione degli oligonucleotidi utilizzati è riportata nella Figura 4.1.



La lunghezza dell'ORF2 è pari a 1981 nt

**Figura 4.1:** Posizione delle diverse coppie di oligonucleotidi S1/A1; S2/A2 (Erker *et al.*, 1999); 3156/7; 3158/9 (Huang *et al.*, 2002) sul gene dell'*ORF2* di HEV.

Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per le reazioni di RT-PCR sono riportate nella tabella 4.1:

NOME PRIMER	SEQUENZA PRIMER
<b>A1</b>	CTTGTCRTGYTGGTTRTCATAATC
<b>S1</b>	GACAGAATTRATTCGTCGGCTTGG
<b>3156</b>	AAT(C)TATGCC(A)CAGTACCGGGTTG
<b>3157</b>	CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC

**Tabella 4.1:** Nomi e sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per la reazione di RT-PCR nel protocollo 1 (A1/S1) e nel protocollo 2 (3156/3157).

Il programma di amplificazione consisteva di una reazione di RT a 45°C per 30 min, seguita da un ciclo di denaturazione a 94°C per 2 minuti, e da 40 cicli di PCR come segue: 30 secondi a 94°C (denaturazione), 55 secondi a 48°C (appaiamento), 1 minuto e 20 secondi a 68°C (polimerizzazione), seguiti da un'estensione finale di 5 minuti a 72°C.

Per aumentare la sensibilità diagnostica, un'aliquota dei campioni amplificati mediante RT-PCR è stata successivamente analizzata con un test di *nested*-PCR. Gli oligonucleotidi utilizzati per entrambi i protocolli sono riportanti nella tabella 4.2:

NOME PRIMER	SEQUENZA PRIMER
<b>A2</b>	GTCRTGYTGGTTRTCATAATCCTG
<b>S2</b>	GTYGTCTCRGCCAATGGCGAGC
<b>3158</b>	GTT(C)ATGC(T)TT(C)TGCATACATGGCT
<b>3159</b>	AGCCGACGAAATC(T)AATTCTGTC

**Tabella 4.2:** Nomi e sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per la reazione di *nested* PCR nel protocollo 1 (A2/S2) e nel protocollo 2 (3158/3159).

L'amplificazione è stata eseguita utilizzando come stampo il DNA ottenuto dalla precedente RT-PCR. Dopo una prima denaturazione a 94°C per 10 minuti, sono stati effettuati 38 cicli nelle seguenti condizioni: 15 secondi a 94°C, 30 secondi a 52°C, 1 minuto a 72°C, seguiti da uno step finale di polimerizzazione a 72°C di 7 minuti.

Per evitare contaminazioni crociate, in ogni reazione di RT-*nested*-PCR sono stati inseriti adeguati controlli positivi e negativi.

### **Sequenziamento e analisi filogenetica**

Il DNA degli ampliconi positivi è stato prelevato dal gel con un bisturi monouso e sottoposto ad una procedura di purificazione, utilizzando il QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany), seguendo le specifiche del produttore. Il DNA è stato eluito in un volume di 30 µl di acqua e successivamente quantificato per la reazione di sequenziamento nucleotidico di entrambi i filamenti. Trenta ng di ciascun campione purificato sono stati sequenziati (ABI Prism 310 DNA sequenze, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Kit (version 3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizzando gli oligonucleotidi A2/S2 o 3158/3159. Le sequenze ottenute (Acc. No. HM769970; HM769971; HM769972; HM769973; HM769974; HM769975; HM769976 HM769977; HM769978; HM769979; HM769980; HM769981; HM769982; HM769983) sono state allineate con software DNASIS (Hitachisoft) a sequenze di ceppi di riferimento, suini e umani, presenti nella banca dati (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). L'analisi filogenetica è stata condotta con il software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), e il dendrogramma è stato ottenuto con il metodo UPGMA.

### **Statistica**

Per determinare possibili differenze nella prevalenza di HEV in relazione alle due diverse classi di età degli animali, giovani (3-4 mesi) e adulti (9-10 mesi), e in relazione ai differenti tessuti e organi esaminati (bile, feci, fegato, siero), è stata condotta una regressione logistica. In via preliminare, la proporzione di animali positivi è stata valutata usando il test del  $\chi^2$ . I fattori che presentavano un valore di  $P < 0,15$  sono stati successivamente inseriti nel modello di regressione logistica. Il modello è stato basato sul simultaneo ingresso di tutte le variabili, e la sua efficacia è stata stabilita in base al

valore di likelihood-ratio e al test di Hosmer-Lemeshow. I valori di odds ratio (OR) e l'intervallo di confidenza al 95% (95% CI) sono stati calcolati in base ai valori finali di regressione logistica. Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software SPSS 12.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### 4.1.3 RISULTATI

#### Identificazione di RNA genomico di HEV mediante RT-PCR

RNA di HEV è stato identificato in 31 dei 48 suini esaminati (64,4%), in almeno una delle matrici esaminate; i risultati sono stati ottenuti inizialmente con una *nested* RT-PCR amplificando un frammento di 145 nucleotidi dell'ORF2 (Erker *et al.*, 1999).

I risultati dell'identificazione della presenza del genoma virale nelle feci, bile e fegato, in funzione dell'età degli animali sono riportati in tabella 4.3.

La bile risultava la matrice più frequentemente positiva per la presenza di RNA di HEV (23/45), seguita dalle feci (16/48) e dai fegati (10/48). L'RNA genomico di HEV è stato riscontrato in entrambi i gruppi di suini: 3-4 mesi d'età (19/29); 9-10 mesi di età (12/28). Nei suini giovani, la prevalenza di HEV nella bile o nelle feci era significativamente più alta che nei suini di età superiore ( $\chi^2=3.94$ ,  $p=0.047$ ;  $\chi^2=15.47$ ,  $p=0.001$ ). Al contrario, la proporzione di fegati positivi per HEV nelle due classi di età non è risultata statisticamente differente ( $p>0.05$ ).

La prevalenza osservata in suini di 3-4 mesi era significativamente più elevata ( $\chi^2=13.87$ ;  $p=0.001$ ), essendo infatti risultati positivi 19 di 20 animali esaminati (95%); in animali adulti (9-10 mesi), invece, la prevalenza era del 42,9% (12 positivi di 28 esaminati).

Inoltre, 17 animali sono risultati positivi per diverse matrici (tabella 4.4). In un solo suino, l'RNA di HEV è stato identificato in tutte e tre le matrici esaminate, mentre 9 suini sono risultati positivi nella bile e feci, 5 nella bile e fegato e 2 per fegato e feci.

Per ottenere frammenti di DNA più lunghi, 33 campioni (14 bili, 12 feci e 7 fegati), positivi in prima analisi, sono stati analizzati usando un secondo protocollo di *nested*-RT-PCR (Huang *et al.*, 2002), che amplifica un frammento dell'ORF2 di 320 nucleotidi. In 18 dei 33 campioni, i positivi sono stati confermati con i due metodi di RT-*nested*-PCR.

**Tabella 4.3.** Presenza di RNA di HEV in bile, feci e fegato da suini, per età

Matrice	Numero di campioni esaminati/ HEV positivi (%)					
	Giovani (3-4 mesi)		Adulti (9-10 mesi)		Totale	
Bile, feci e fegato	0/20	(0,0)	1/28	(3,6)	1/48	(2,1)
Bile e feci	9/20	(45,0)	0/28	(0,0)	9/48	(18,8)
Bile e fegato	2/20	(10,0)	3/28	(10,7)	5/48	(10,4)
Feci e fegato	2/20	(10,0)	0/28	(0,0)	2/48	(4,2)
Solo bile	2/20	(10,0)	6/28	(21,4)	8/48	(16,7)
Solo feci	2/20	(10,0)	2/28	(7,1)	4/48	(8,3)
Solo fegato	2/20	(10,0)	0/28	(0,0)	2/48	(4,2)
Totale bili <sup>a</sup>	13/19	(68,4)	10/26	(38,5)	23/45	(51,1)
Totale feci	13/20	(65,0)	3/28	(10,7)	16/48	(33,3)
Totale fegato	6/20	(30,0)	4/28	(14,3)	10/48	(20,8)
Suini positivi in almeno un campione	19/20	(95,0)	12/28	(42,9)	31/48	(64,6)
Suini positivi in più campioni	1/20	(5,0)	16/28	(57,1)	17/48	(35,4)

<sup>a</sup> Per 3 dei 48 animali, la bile non era disponibile.

**Tabella 4.4.** Presenza di RNA di HEV in differenti campioni di suini sieropositivi e sieronegativi.

	Campioni positivi per RNA HEV in:			No. di suini
	Bile	Fegato	Feci	
<b>HEV Sieropositivi</b>	-	-	-	(15) <sup>a</sup>
	+	-	-	(7)
	+	+	-	(3)
	+	+	+	(1)
	+	-	+	(8)
	-	-	+	(3)
	-	+	+	(1)
	-	+	-	(2)
<b>Totale</b>	<b>19</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>(40)</b>
<b>HEV Sieronegativi</b>	-	-	-	(2)
	+	-	-	(0)
	+	+	-	(2)
	+	+	+	(0)
	+	-	+	(0)
	-	-	+	(1)
	-	+	+	(1)
	-	+	-	(0)
<b>Totale</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>(6)</b>
<b>TOTALE</b>	<b>21<sup>b</sup></b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>(46)<sup>c</sup></b>

<sup>a</sup> In parentesi é indicato il numero di suini positivi per RNA di HEV nella linea corrispondente.

<sup>b</sup> In grassetto é indicato il numero dei campioni di campioni positivi per RNA di HEV, nel gruppo di animali.

<sup>c</sup> Due dei 48 suini totali analizzati in questo studio non sono stati inclusi, perché i loro sieri non erano disponibili per l'analisi sierologica.

### Sieroprevalenza di anticorpi anti-HEV in suini.

Quaranta di 46 sieri suini esaminati (87%) sono risultati positivi utilizzando un ELISA commerciale (paragrafo 4.2.2) adattato all'identificazione di anticorpi IgG di suino. Sieri policlonali suini sono stati utilizzati come controllo positivo e negativo. La sieroprevalenza è risultata più elevata nei suini di 9-10 mesi (25 positivi/27 totali; 96,6%), che in animali di 3-4 mesi, nei quali la sieroprevalenza di anticorpi nei sieri era 78,9% (15/19); tale differenza non è tuttavia risultata statisticamente significativa ( $p > 0.05$ ). La proporzione di campioni RNA positivi di bile, feci e fegati non era significativamente diversa ( $p > 0.05$ ) tra suini sieronegativi e sieropositivi per Ig. Tuttavia,

25 di 40 (62,5%) suini sieropositivi per Ig erano anche positivi per la presenza di genoma di HEV in bile, fegato e/o feci, mentre 15 (37,5%) erano negativi per la presenza di RNA virale in tutti i campioni (Tabella 4.4).

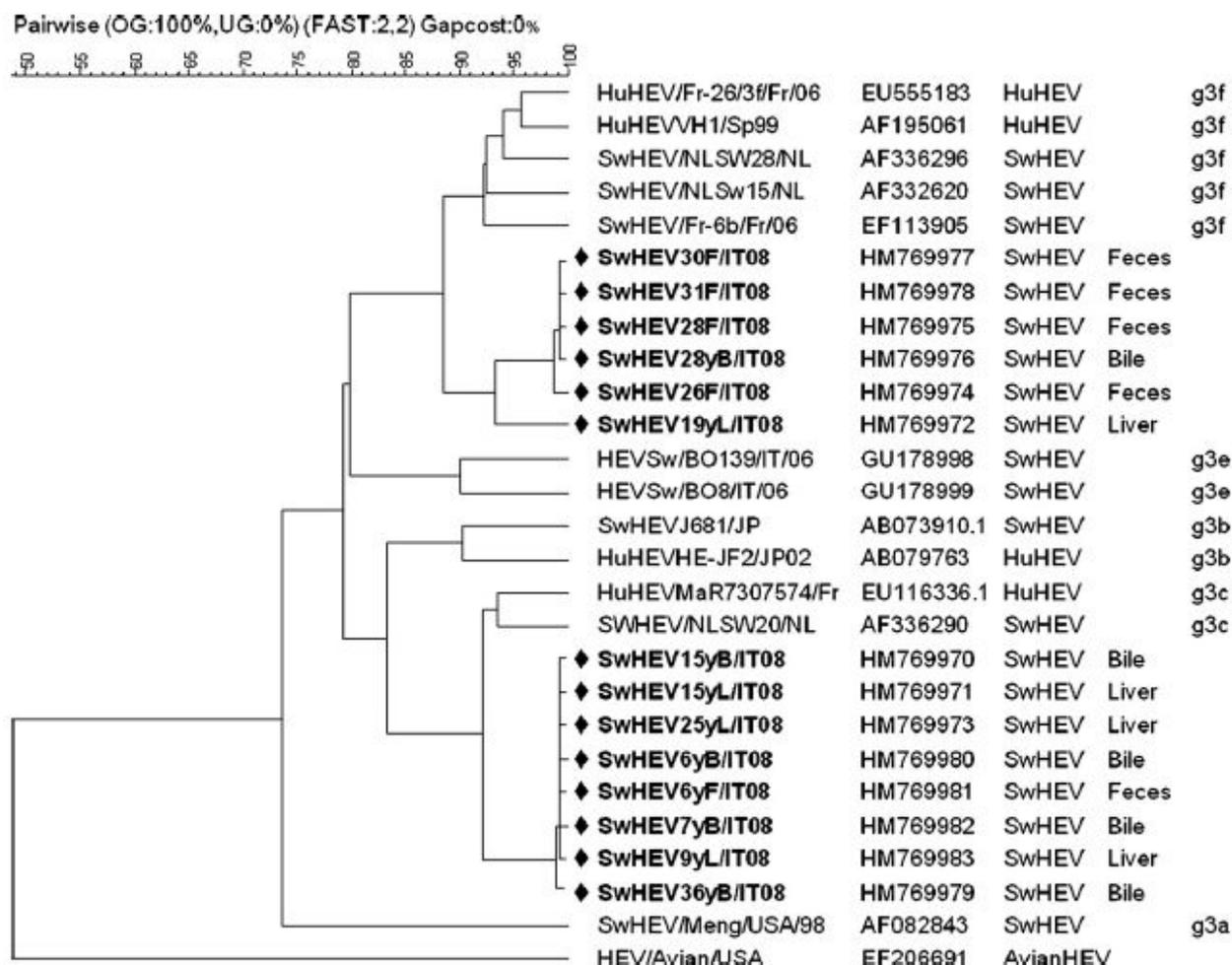
Due dei 6 (33,3%) animali sieronegativi erano negativi per la presenza di RNA virale in tutti i campioni, mentre i rimanenti 4 (66,7%) suini erano positivi per il genoma di HEV nella bile, fegato e/o feci (tabella 4.4).

Per due animali, i campioni di siero non sono stati raccolti.

### **Sequenziamento e analisi filogenetica**

Sequenze del frammento diagnostico (320 nucleotidi) del gene della proteina capsidica di HEV sono stati ottenuti da 14 campioni (5 da bile, 5 da feci e 4 da fegato) e depositati in NCBI GenBank. Le sequenze di HEV sono state ottenute dal fegato e dalla bile prelevati da uno stesso animale, in un caso, e da bile e feci di altri tre suini. In questi casi, sono state ritrovate identità nucleotidiche del 100% tra sequenze di HEV ottenute dalle differenti matrici dello stesso suino. Dopo sequenziamento e analisi comparativa con i 4 genotipi conosciuti di HEV, tutte le sequenze sono risultate appartenere al genotipo g3, raggruppate nei sottotipi c o f, in analogia a quanto riportato per HEV umano e suino in altre aree dell'Europa (Fig 4.2). I due cluster g3c e g3f mostravano tra loro identità nucleotidica del 79%. Gli otto ceppi di HEV che formano il cluster g3c presentavano tra loro un'identità nucleotidica del 98,9-100%.

Ulteriori sequenze sono state ottenute da 12 campioni di feci e 5 di fegato, usando un protocollo di *nested* RT-PCR che amplifica un frammento di 121 nucleotidi (Erker *et al.*, 1999); anche questo gruppo di sequenze ha confermato che tutti i ceppi di suino appartenevano al genotipo g3 sottotipi c e f. Per rispetto ad altri ceppi di HEV suino di sottotipo f descritti in Italia precedentemente (Di Bartolo *et al.*, 2008), quelli qui riportati mostravano un'identità nucleotidica dall'85% al 100%. I ceppi appartenenti al sottotipo c mostravano invece un'identità nucleotidica dell'80,9% con un ceppo suino recentemente riportato in Italia da Di Martino *et al.* 2010.



**Figura 4.2** Dendrogramma, disegnato utilizzando il metodo UPGMA e un ceppo aviario di HEV (Stati Uniti, Acc. No. AY535004), come *outgroup*. Il dendrogramma è basato sulla parziale sequenza del frammento ORF2. Il numero di accesso, l'origine e il genotipo sono stati riportati per tutti i ceppi, l'origine dei ceppi identificati in questo studio è stata riportata nel dendrogramma. I ceppi relativi al presente lavoro di tesi sono indicati con il simbolo ◆ in grassetto.

#### 4.1.4 DISCUSSIONE

Il presente studio è stato pianificato per approfondire le osservazioni emerse da precedenti studi in Italia, che dimostravano un'elevata circolazione di HEV in animali clinicamente sani in allevamento (Caprioli *et al.*, 2007; Di Bartolo *et al.*, 2008). E' stata quindi valutata la presenza del virus HEV in animali in fase di macellazione, o nella fase immediatamente precedente alla commercializzazione dei prodotti carnei di origine animale. In questo lavoro, il 64,6% (31 di 48 suini esaminati) sono risultati positivi per la presenza del genoma di HEV mediante *nested* RT-PCR, con alcune differenze in base all'età dei soggetti: nei suini giovani (3-4 mesi d'età), la prevalenza era del 95% (19 di 20), mentre negli adulti (9-10 mesi di età) la prevalenza era più bassa,

pari al 42,9% (12/28). E' stato recentemente riportato che in molti paesi Europei, compresa l'Italia (Di Bartolo *et al.*, 2008), animali positivi per HEV sono stati riscontrati in tutte le fasce d'età (Fernandez-Barredo *et al.* 2006; de Deus *et al.*, 2007; Leblanc *et al.*, 2007; McCreary *et al.*, 2008; Breum *et al.*, 2010). La prevalenza di HEV più elevata dimostrata negli animali giovani rispetto agli adulti è in linea con l'ipotesi che, come accade per altre malattie infettive, gli animali giovani siano più recettivi. Ciò potrebbe essere dovuto ad una immunità passiva di origine materna non completamente o non più protettiva oppure a successive reinfezioni (Fernandez-Barredo *et al.*, 2006). Uno dei risultati più significativi di questo studio è la simultanea identificazione del genoma virale in tessuto (fegato) e escreti (bile e feci) dallo stesso suino. I risultati ottenuti confermano che la bile era il campione più di frequente riscontrato positivo (23/45), seguita da campioni fecali (16/48) e fegato (10/48).

Halbur e colleghi hanno dimostrato che l'RNA di HEV è presente per periodi più lunghi e con frequenza più elevata nella bile rispetto a fegato, feci e siero (Halbur *et al.*, 2001). Questo risultato suggerisce che, in sede di macellazione, la bile possa rappresentare un importante veicolo di trasmissione per il personale che lavora le carni di maiale, e un'importante fonte di cross-contaminazione. E' da considerare tuttavia che la rottura accidentale della cistifellea in sede di macellazione è un evento non particolarmente frequente.

La prevalenza più bassa riscontrata nei campioni di fegato, rispetto a bile e feci, può essere spiegata ipotizzando che la distribuzione del virus si realizzi in modo differente e non omogeneo all'interno del fegato (infezione focale), e che probabilmente il campionamento non sia stato sempre rappresentativo dell'intero organo, soprattutto in considerazione della quantità modesta (250 mg) prevista al metodo di campionamento, a differenza di quanto avviene per le altre due matrici, bile e feci (Rutjes *et al.*, 2009).

In questo studio, tutti gli animali apparivano clinicamente sani, in linea con i dati presenti in letteratura, i quali sostengono che l'infezione nel suino evolve in maniera asintomatica (Clemente-Casares *et al.*, 2003; Banks *et al.*, 2004a; Zheng *et al.*, 2006; Fernandez-Barredo *et al.*, 2006). L'apparente apatogenicità del virus non esclude, però, la possibilità di una sua evoluzione in forme più virulente, in grado di causare forme cliniche di malattia, in analogia con quanto è accaduto in passato per il PCV2 (Porcine Circo Virus 2) (de Deus *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2007).

La maggiore prevalenza del genotipo 3 di HEV rilevata in questo studio (64,4%) rispetto a quanto osservato precedentemente in Italia (5,8%, Caprioli *et al.*, 2007; 42%, Di Bartolo *et al.*, 2008; 7,3%, Di Martino *et al.*, 2010; 29,9%, Martelli *et al.*, 2010), può essere dovuta in parte al numero di campioni analizzati dallo stesso animale, che ha consentito di incrementare la sensibilità diagnostica

per l'identificazione di RNA di HEV. La numerosità dei campioni ottenuti ed analizzati dal singolo soggetto potrebbe essere cruciale per l'efficienza della diagnosi molecolare (de Deus *et al.*, 2007; Vasickova *et al.*, 2009). Anche il metodo d'identificazione potrebbe essere cruciale. Infatti, i risultati confermano una differente sensibilità di diversi metodi, suggerendo che l'uso di più protocolli potrebbe aumentare la sensibilità diagnostica molecolare (Vasickova *et al.*, 2009).

Come aiuto alla diagnosi per studi epidemiologici sulla prevalenza di HEV, diversi test immunologici sono stati sviluppati per la ricerca di anticorpi contro HEV. Tuttavia, l'utilizzo di peptidi dei genotipi 1 e 2 come antigeni è probabilmente più idoneo alla diagnosi sierologica nell'uomo che non nell'animale. Studi più recenti suggeriscono che antigene del genotipo 3 derivato da ceppi suini potrebbe essere un migliore candidato per analizzare i sieri di suino (Rose *et al.*, 2010). Infatti, sebbene si consideri la presenza di un solo sierotipo di HEV (Lu *et al.*, 2006), suggerita dalle differenze solo minime tra proteine ORF2 di origini umane e suine (Arankalle *et al.*, 2007), non si può escludere il raggiungimento di una maggiore specificità e sensibilità dall'utilizzo di antigene di origine suina. Ad oggi, i test ELISA commerciali per sieri umani vengono comunemente utilizzati anche per esaminare sieri animali, previa sostituzione dell'anticorpo secondario anti-immunoglobuline con uno specifico per la specie animale in analisi. Con un simile approccio, sono stati investigati i sieri suini in questo studio.

La presenza di anticorpi diretti contro HEV è stata rilevata in 40 dei 46 sieri suini (87%) esaminati, risultando più alta in confronto alla presenza del genoma virale (64,4%). Questo essere può essere giustificato dalla presenza di anticorpi riconducibili a pregresse infezioni. Inoltre, la sieroprevalenza aumenta con l'età, passando da 78,9% nei suini di 3-4 mesi a 92,6% in suini di 9-10 mesi. Come descritto in altri lavori (de Deus *et al.*, 2008; Seminati *et al.*, 2008), la sieroprevalenza di Ig aumenta con la probabilità di contatto con il virus nel corso della vita dell'animale. In questo studio, le due differenti fasce d'età hanno mostrato una moderata differenza nella sieropositività, indicando che già nei suini d'età 3-4 mesi l'esposizione al virus è stata frequente, in linea con una larga circolazione dei HEV negli allevamenti.

## **4.2 VALUTAZIONE DI METODI PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI INFEZIONE DA HEV IN SUINI DOMESTICI E SELVATICI**

### **4.2.1 INTRODUZIONE**

Diversi studi supportano l'ipotesi di trasmissione zoonotica di HEV da suini domestici e selvatici all'uomo. I virus circolanti nei suini e nell'uomo della stessa area geografica sono geneticamente correlati (van der Poel *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2003; Widdowson *et al.*, 2003), e casi di epatite acuta sono stati descritti in soggetti che avevano consumato carne cruda di cervo, suino o cinghiale (Matsuda *et al.*, 2003; Tei *et al.*, 2004), così come è stata descritta la presenza di genoma virale in fegati di suino commercializzati (Bouwknegt *et al.*, 2007; Feagins *et al.*, 2007). La mancanza di un sistema efficiente di coltura cellulare ha fortemente limitato le conoscenze sulla replicazione del virus e poche informazioni sono disponibili sull'infezione nell'uomo, sulla durata della viremia di HEV e sull'eliminazione del virus che comunque si considera di breve durata (Purcell e Emerson, 2001; Panda *et al.*, 2007; Mushahwar *et al.*, 2008; Peralta *et al.*, 2009), mentre le IgG perdurano per diversi anni. Si ipotizza che anche negli animali gli anticorpi specifici per HEV possano permanere a lungo mentre il periodo di tempo durante il quale è possibile evidenziare la presenza di RNA virale è più breve (Panda *et al.* 2007; Kanai *et al.*, 2010). Il corso dell'infezione sperimentale di HEV in suini è stato studiato in maggior dettaglio da Bouwknegt e colleghi. L'escrezione fecale di HEV iniziava dal settimo giorno post-infezione (p.i.), durando mediamente 23 giorni (range: 19-28); la viremia era evidenziabile 13 (p.i.) (range: 8-17) perdurando 11 giorni (range: 8-13). La presenza di anticorpi è stata rilevata a partire dal 13° giorno (p.i.) (range: 10-16) (Bouwknegt *et al.*, 2009).

Nel suino, la valutazione della presenza di anticorpi specifici anti-HEV viene di solito eseguita utilizzando kit commerciali che impiegano la proteina capsidica di HEV umano come antigene. Recenti studi (Peralta *et al.*, 2009; Rose *et al.*, 2010) hanno tuttavia dimostrato che l'impiego di uno specifico antigene di derivazione suina consente un incremento della sensibilità del test.

Nel corso del presente studio, la proteina capsidica di un ceppo italiano di HEV, isolato da suino e appartenente al genotipo 3 (capitolo III di questa tesi), è stata utilizzata come antigene per il riconoscimento di specifici anticorpi anti-HEV in suini e cinghiali in Italia. A questo scopo, sono stati raccolti 112 sieri di suini da 5 allevamenti e da un macello e 22 sieri di cinghiali a vita libera, e la presenza di anticorpi anti-HEV è stata valutata mediante test ELISA e Western blotting, messi a punto in questo lavoro con antigene suina ricombinante. L'efficienza dei test è stata valutata

confrontando i risultati ottenuti con un test di ELISA commerciale basato su un antigene umano e adattato per la ricerca di anticorpi nei sieri di cinghiale e suini.

#### 4.2.2 MATERIALI E METODI

**Produzione e purificazione dell'antigene, e immunizzazioni di topi Balb/c.** Sono state impiegate le stesse tecniche descritte nel capitolo III di questa tesi.

**Campioni: sieri di suino e di cinghiale.** Sono stati esaminati 133 sieri. Sessantaquattro sieri sono stati prelevati da suini appartenenti a 5 allevamenti in diverse località della Sardegna (Masia *et al.*, 2009), 22 sieri sono stati raccolti da cinghiali nella stessa Regione, e 47 sieri da suini macellati in uno stabilimento del Nord Italia (Di Bartolo *et al.*, 2011). Tutti i sieri provenivano da animali clinicamente sani. I sieri sono stati conservati a -20°C prima dell'uso.

**Western blotting.** La proteina capsidica ricombinante di HEV è stata corsa su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) e quindi trasferita su membrana di nitrocellulosa, mediante un apparato per blot semidry (Bio-rad). La membrana è stata bloccata per 18 h a 4°C in PBS contenente 5% latte, e successivamente è stata incubata con i sieri animali, diluiti 1:500 in PBS con l'1% di latte per 90 min a temperatura ambiente. Dopo lavaggi con PBS 0.05% Tween 20, la membrana è stata incubata per 1 ora, con una diluizione 1:12000 di anticorpo anti-IgG (H+L) di suino coniugato con fosfatasi alcalina (SIGMA). L'avvenuto legame dell'anticorpo è stato quindi rilevato mediante colorazione con NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium/bromo-cloro-indolilfosfato, Pierce). Un siero iperimmune di suino (Rose *et al.*, 2010) è stato usato come controllo positivo.

**Allestimento della metodica ELISA per la ricerca di anticorpi (IgG) anti-HEV in suini e cinghiali.** Piastre da 96 pozzetti in polistirene trattato per ELISA (NUNC) sono state sensibilizzate con 50 µl di una sospensione in PBS di antigene ricombinante ORF2 di HEV (0,01 µg/pozzetto) ed incubate per 18 h a 4°C. Le piastre sono state bloccate con PBS al 5% di latte per 1 h a 37°C. Dopo 2 lavaggi con PBS 0,1% Tween 20, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 50 µl di ciascun siero, in triplicato, alla diluizione di 1:80 in PBS con 0,5% latte. Dopo 90 min a 37°C, sono stati eseguiti 3 lavaggi con PBS 0,1% di Tween 20, ed è stato quindi aggiunto anticorpo anti-IgG (H+L) di suino, coniugato con fosfatasi alcalina (SIGMA), alla diluizione 1:12000 in PBS con 2,5% di latte. Dopo 1 h a 37°C, la reazione è stata evidenziata con p-nitrofenol fosfato (Sigma) in tampone 10mM dietanolamina, pH 10. La densità ottica (OD) è stata rilevata mediante lettura spettrofotometrica a

una lunghezza d'onda di 405 nm. Il cut-off è stato stabilito per ogni test in accordo con i controlli interni secondo la formula:  $(OD: \text{controllo positivo} - OD \text{ controllo negativo}) \times 0,15 + OD \text{ controllo negativo}$ .

**Immunocitochimica.** Cellule Sf9 sono state coltivate su piastre a 96 pozzetti e infettate con baculovirus ricombinante BacHEV $\Delta$ 111ORF2, che esprime la proteina capsidica  $\Delta$ 111HEV, o con un baculovirus non ricombinante, come controllo negativo. Dopo 72 ore, le cellule infettate sono state fissate con una soluzione di PBS e metanolo 1:1, per 3 minuti a temperatura ambiente, e successivamente con metanolo assoluto per 20 minuti. Dopo 3 lavaggi con PBS, i monostrati cellulari sono stati incubati con i sieri animali (diluizione 1:20) in PBS all'1% di BSA, e la piastrina è stata incubata per 90 minuti a 37°C. I monostrati cellulari sono stati quindi lavati e incubati per 1 ora a 37°C con anticorpo secondario anti-IgG (H+L) di suino, coniugato con perossidasi (Sigma), diluito 1:3000 in PBS all'1% di BSA. La colorazione è stata sviluppata tramite reazione con aminoethylcarbazole (AEC) in 50mM di buffer di acetato, pH6.

**Valutazione dell'accuratezza dei due test ELISA e del Western blotting.** In assenza di un test di riferimento (*gold standard*) per la diagnosi sierologica dell'infezione da HEV, è stato utilizzato un approccio statistico di tipo bayesiano (Joseph *et al.*, 1995) ai fini di determinare la prevalenza di HEV nelle popolazioni di suini e cinghiali e di stimare le proprietà dei test diagnostici utilizzati. La procedura di valutazione ha confrontato i risultati forniti da 2 differenti test ELISA, considerati tra loro dipendenti in quanto strutturalmente simili (i. ORF2-ELISA, messo a punto utilizzando l'antigene derivato da un ceppo di HEV g3; e ii. ELISA-kit, kit commerciale adattato all'impiego sul suino, con impiego di anticorpo secondario specie-specifico), con quelli forniti da un terzo test (Western blotting), condizionalmente indipendente degli altri due test. Questo modello è un'estensione del modello di dipendenza condizionale bayesiano (Branscum *et al.*, 2005), e consente la valutazione dell'accuratezza diagnostica in assenza di un *gold standard*.

La distribuzione *beta* [Be(*a*, *b*)] a priori è stata utilizzata per i parametri di interesse (sensibilità, specificità e proporzione di animali sieropositivi). In teoria delle probabilità e in statistica, la distribuzione B (Beta) è una distribuzione di probabilità continua definita da due parametri *a* e *b* sull'intervallo unitario [0,1]. Questa distribuzione trova particolare utilizzo nella statistica bayesiana perché governa la probabilità *p* di un processo di Bernoulli a posteriori dell'osservazione di *a* - 1 "successi" e *b* - 1 "fallimenti", quando *p* è a priori distribuita uniformemente tra 0 e 1. Nella teoria delle probabilità, un processo di Bernoulli è un particolare processo aleatorio discreto di variabili indipendenti. Un processo di Bernoulli può essere considerato come una sequenza infinita di lanci

di una moneta (non truccata). Ogni singolo lancio è detto prova di Bernoulli. In particolare, essendo le variabili indipendenti, la probabilità di una prova di Bernoulli non è influenzata dal risultato delle precedenti (che quindi non possono fornire alcuna informazione sulla nuova prova).

Per la sensibilità e la specificità di entrambi i test ELISA è stata usata una distribuzione *beta* simile a quella impiegata nel lavoro di Rose et al. (2010).

Per ORF2-ELISA sono stati assunti i seguenti valori:

- sensibilità:  $>0,9$ 
  - moda: 0,95
  - 95% di probabilità che la distribuzione dei valori venga descritta dalla distribuzione  $Be(99,70, 6,19)$ ;
- specificità  $>0.95$ 
  - moda: 0,99
  - 95% di probabilità che la distribuzione dei valori venga descritta dalla distribuzione  $Be(88.28, 1.88)$ .

Per ELISA-kit sono stati assunti i seguenti valori:

- sensibilità  $>0.6$ 
  - moda: 0,9
  - 95% di probabilità che la distribuzione dei valori venga descritta dalla distribuzione  $Be(8.30, 1.81)$
- specificità  $>0.95$ 
  - moda: 0.99
  - 95% di probabilità che la distribuzione dei valori venga descritta dalla distribuzione  $Be(88.28, 1.88)$ .

I sieri di suino e cinghiale sono stati ulteriormente esaminati per la presenza di anticorpi anti-HEV con un terzo test, di Western blotting, al quale era attribuita una specificità del 100%. Per la modellizzazione dei valori di sensibilità, è stata utilizzata una distribuzione Beta con moda=0,85 e 5° percentile=0,70. Per la modellizzazione dei valori di specificità, è stata utilizzata una distribuzione Beta con moda=0.98 e 5° percentile=0,95.

Per i suini, i dati di sieroprevalenza individuale desunti da precedenti valutazioni (Di Bartolo *et al.*, 2011; Jiménez de Oya *et al.*, 2011), indicavano che la proporzione di sieropositivi è  $>20$  con una moda di 0,35, che consente di stimare una distribuzione a priori descritta da  $Be(7,30, 12,71)$ .

Per i cinghiali, in accordo con quanto riportato da Rutjes et al. (2010), è stato assunto che la proporzione attesa di animali sieropositivi sia  $>20$  con una moda di 0,25, che consente di stimare una distribuzione a priori descritta da  $Be(3,13, 7.39)$ .

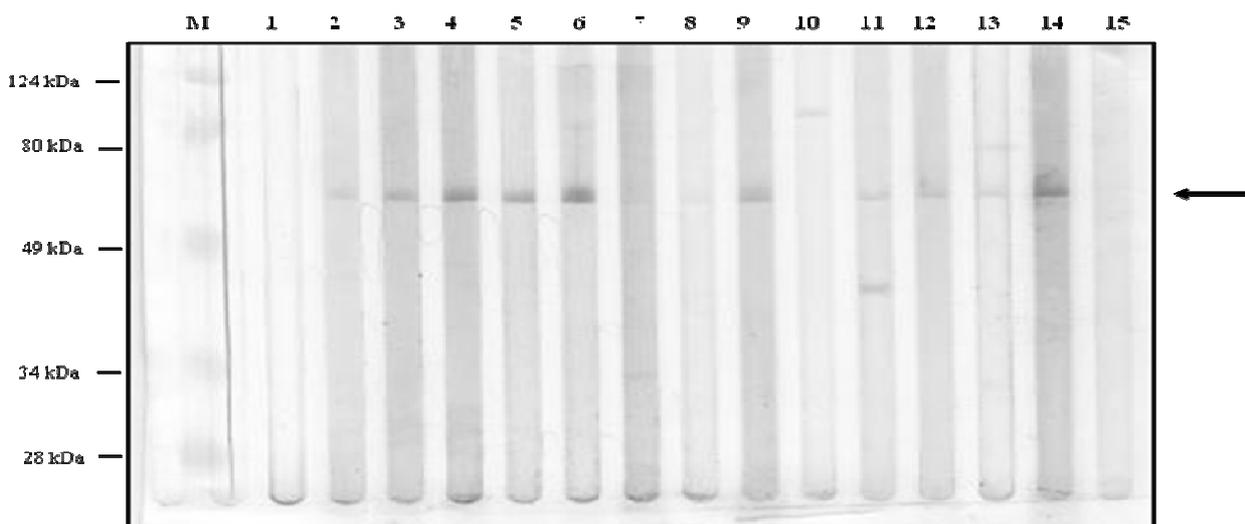
L'analisi bayesiana è stata condotta utilizzando BayesDiagnosticTests Version 2.1 Software Package (<http://www.medicine.mcgill.ca/epidemiology/Joseph/Bayesian-Software-Diagnostic-Testing.html>), che utilizza i metodi descritti da Joseph et al. (1995).

Il grado di associazione tra i risultati dei due test ELISA è stato valutato calcolando il coefficiente di correlazione non parametrico di Spearman ( $\rho$ ).

### 4.2.3 RISULTATI

**Espressione della proteina capsidica di HEV suino genotipo 3.** I risultati sono già stati riportati nel capitolo III di questa tesi.

**Western blotting.** Un totale di 123 sieri sono stati prelevati da suini (n° 111) e cinghiali (n° 22), e analizzati mediante WB, usando la proteina capsidica ricombinante del ceppo suino di HEV. Ottantuno dei 111 sieri suini (77%) riconoscevano una banda corrispondente alle dimensioni attese (55kDa) per la proteina capsidica  $\Delta 111ORF2$ . La stessa banda proteica era riconosciuta da un siero suino di controllo, contenente anticorpi contro HEV (fig. 4.3). Al contrario, nessuno dei 22 sieri di cinghiale esaminati è risultato positivo a questo test.

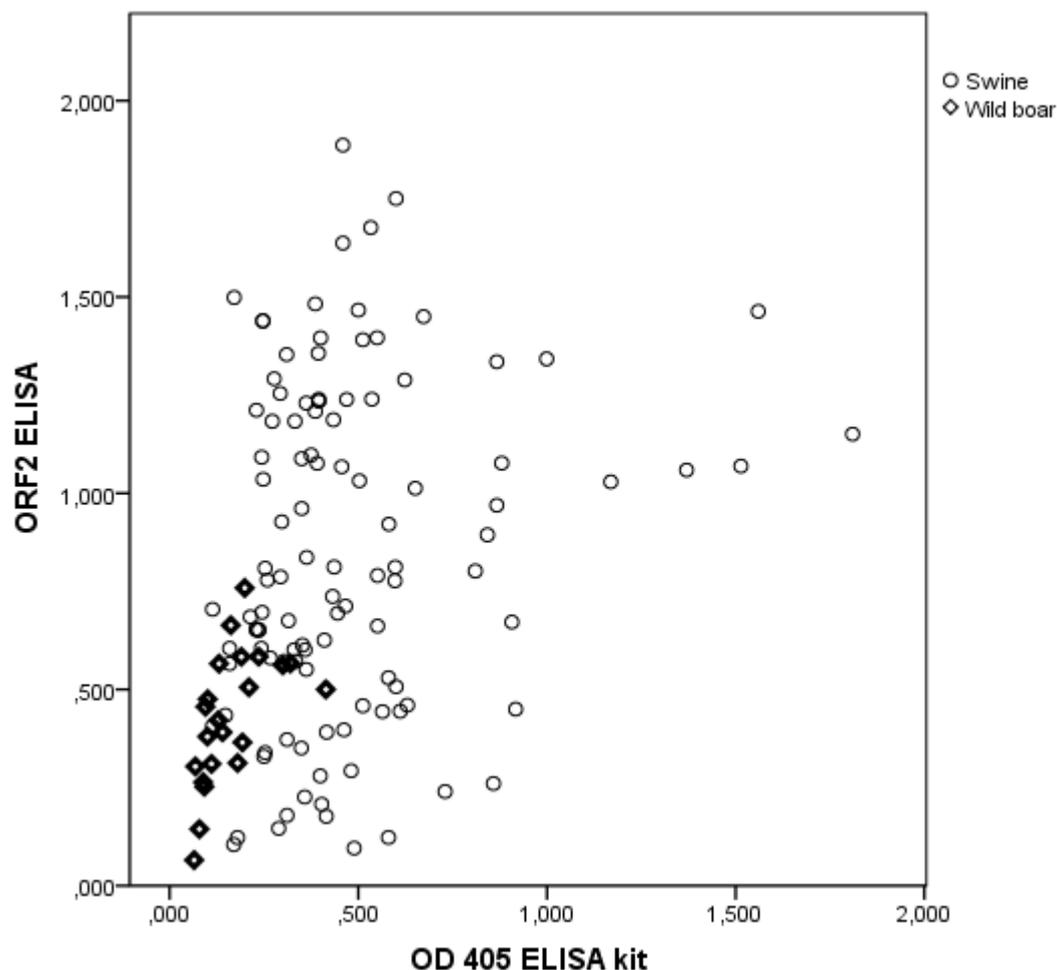


**Fig. 4.3. Western blotting.** I sieri suini riconoscono specificatamente una singola proteina del peso molecolare di 55kDa. Linea 14: controllo positivo; linea 15: controllo negativo.

**Test ORF2-ELISA basato sulla proteina capsidica del ceppo suino di HEV.** La concentrazione ottimale di cattura dell'antigene usata nel test ORF2-ELISA è stata stabilita combinando diluizioni di un siero suino iperimmune anti-HEV e della proteina capsidica ricombinante (dati non riportati). La concentrazione ottimale dell'antigene è stata ottenuta con 0.01 µg/per pozzetto di antigene. Dopo gli esperimenti preliminari, i sieri suini e di cinghiale sono stati diluiti 1:20, e analizzati con il test ORF2-ELISA. Novantotto sieri di suino su 111 esaminati sono risultati positivi (88,3%, tab.1); 75 di essi reagivano positivamente anche in WB (tab. 1). Diciotto dei 22 sieri di cinghiale esaminati sono risultati positivi (81,8%) mediante ORF2-ELISA, risultato contro l'assenza già riportata di risultati positivi in WB (tab.4.5).

		Western blotting				
		+		-		
		ORF2-ELISA		ORF2-ELISA		
Animali		+	-	+	-	
Suini	ELISA kit	+	71	6	21	5
		-	4	0	2	2
	<b>Totale</b>		75	6	23	7
Cinghiali	ELISA kit	+	0	0	8	0
		-	0	0	10	4
	<b>Totale</b>		0	0	18	4

**Tabella 4.5.** Risultati dei campioni di siero suini e di cinghiali analizzati con i test: Western Blotting, ELISA-kit e ORF2-ELISA.



**Figura. 4.4.** Correlazione tra i valori di OD di ORF2-ELISA e ELISA-kit (Nonparametric Spearman's rho = 0.317).

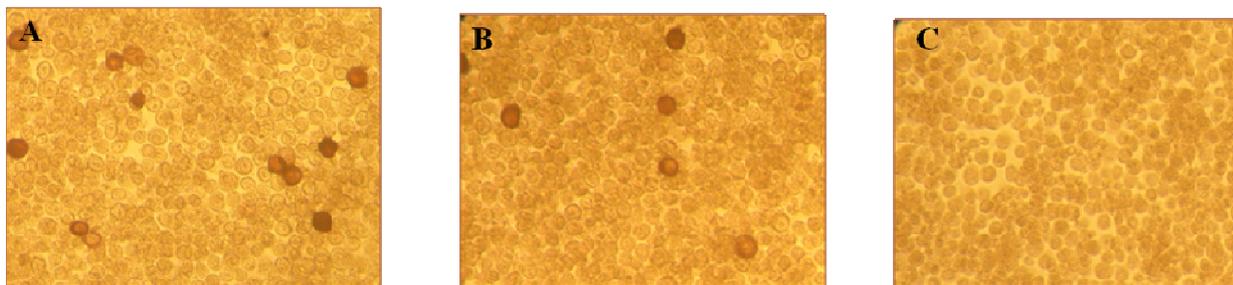
**Test commerciale (ELISA-kit).** I sieri raccolti sono stati esaminati usando un kit ELISA commerciale (BioChain. Inc. USA) sviluppato per l'identificazione di anticorpi anti-HEV nell'uomo e adattato per analizzare i sieri di suino.

Centotré sieri, compresi i 48 sieri di suino esaminati precedentemente (vedi paragrafo 4.1 in questo stesso capitolo; Di Bartolo *et al.*, 2011) sono stati riconfermati positivi con il kit ELISA (91,8%).

Solo 8 dei 22 sieri di cinghiale (34,4%) analizzati sono risultati positivi; per altri 10 sieri di cinghiale la positività riscontrata nel test ORF2-ELISA non è stata confermata con il test commerciale (tab. 4.5).

**Immunocitochimica.** Per ulteriore conferma della specificità dei test utilizzati, è stato condotto un test di colorazione immunocitochimica indiretto utilizzando cellule Sf9 infettate con baculovirus ricombinante che esprimeva  $\Delta 111$ ORF2. I sieri raccolti in questo studio sono stati utilizzati per la

colorazione delle cellule infette. I risultati hanno mostrato una colorazione indicativa di una reazione antigene-anticorpo per 20 dei 133 sieri esaminati (Fig. 4.5). Nessuna cross-reattività degli anticorpi è stata osservata con antigeni eterologhi.



**Fig. 4.5.** colorazione immunocitochimica di cellule Sf9 infettate con BacHEV $\Delta$ 111ORF2. Dopo aver fissato le cellule, queste sono state incubate con un siero policlonale suino (A), un campione di siero (B) e un siero negativo suino (C). Dopo incubazione con anticorpo secondario anti-suino IgG-HRP, la reazione è stata sviluppata con AEC.

#### **Stima bayesiana di sensibilità e specificità dei due test ELISA (ELISA-ORF2 e ELISA-kit) e del WB.**

Relativamente ai sieri suini (tab. 4.6) i risultati sono stati i seguenti:

- test WB
  - valore medio stimato di sensibilità: 0,786 [0,712-0,852]
  - valore medio stimato di specificità: 0,973 [0,943-0,993]
- ORF2-ELISA
  - valore medio stimato di sensibilità: 0,938 [0,900-0,968]
  - valore medio stimato di specificità: 0,975 [0,931-0,997]
- ELISA-kit
  - valore medio stimato di sensibilità: 0,935 [0,882-0,973]
  - valore medio stimato di specificità: 0,643 [0,396-0,867]

La media stimata della distribuzione di probabilità a posteriori della proporzione di suini sieropositivi, date le caratteristiche dei test (prevalenza stimata), era di 0,851 [0,782-0,910].

Gli intervalli di credibilità (Credibility Interval) risultavano elevati in considerazione della grande incertezza delle informazioni a priori. La sensibilità dell'ELISA-kit risultava comunque più bassa

rispetto a quella dell'ORF2-ELISA, mentre i valori di specificità erano sensibilmente più elevati nell'ELISA-ORF2.

Relativamente ai sieri di cinghiale (tab. 4.6) i risultati sono stati i seguenti:

- test WB
  - valore medio stimato di sensibilità: 0,521 [0,376-0,668]
  - valore medio stimato di specificità: 0,975 [0,945-0,993]
  
- ORF2-ELISA
  - valore medio stimato di sensibilità: 0,949 [0,903-0,981]
  - valore medio stimato di specificità: 0,969 [0,911-0,997]
  
- ELISA-kit
  - valore medio stimato di sensibilità: 0,599 [0,404-0,792]
  - valore medio stimato di specificità: 0,875 [0,676-0,985]

La media stimata della distribuzione di probabilità a posteriori della proporzione di suini sieropositivi, date le caratteristiche dei test (prevalenza stimata), era di 0,61 [0,414-0,790].

Anche in questo caso, gli intervalli di credibilità (Credibility Interval) risultavano elevati in considerazione della grande incertezza delle informazioni a priori. I valori di sensibilità e specificità dell'ELISA-kit sono risultati sensibilmente inferiori rispetto a quelli dell'ORF2-ELISA.

L'analisi dei valori di densità ottica forniti dai 2 test ELISA ha messo in evidenza una significativa correlazione ( $\rho$  di Spearman = 0,317;  $p < 0,001$ ) (Fig. 4.6).

<b>Animale</b>	<b>test</b>		<b>media</b>	<b>S.D.</b>	<b>95% Credibility interval<sup>a</sup></b>
Suini		<b>Prevalenza stimata</b>	0,851	0,033	0,782-0,910
	ELISA ORF2	Sensibilità	0,938	0,017	0,900-0,968
		Specificità	0,975	0,018	0,931-0,997
	ELISA kit	Sensibilità	0,935	0,023	0,882-0,973
		Specificità	0,643	0,122	0,396-0,867-
	Western Blot	Sensibilità	0,786	0,036	0,712-0,852
Specificità		0,973	0,013	0,943-0,993	
Cinghiali		<b>Prevalenza stimata</b>	0,612	0,096	0,414-0,790
	ELISA ORF2	Sensibilità	0,949	0,0200	0,903-0,981
		Specificità	0,969	0,023	0,911-0,997
	ELISA kit	Sensibilità	0,599	0,099	0,404-0,792
		Specificità	0,875	0,082	0,676-0,985
	Western Blot	Sensibilità	0,521	0,075	0,376-0,668
		Specificità	0,975	0,012	0,945-0,993

<sup>a</sup> equivalente bayesiano dell'intervallo di confidenza

**Tabella 4.6.** Stima bayesiana delle caratteristiche diagnostiche dell'ELISA kit, ORF2-ELISA e Western blotting nelle popolazioni di suini e cinghiali studiate.

#### 4.2.4 DISCUSSIONE

In questo studio, la proteina capsidica di HEV di un ceppo suino italiano g3 (dettagli nel capitolo 3 di questa tesi) è stata utilizzata per la messa a punto di test immunologici ELISA e WB, successivamente impiegati sieri di suino e cinghiale raccolti in Sardegna e in Emilia-Romagna. In assenza di un test sierologico di riferimento (*gold standard*) per la diagnosi di infezione da HEV nel suino, un'analisi comparativa della sensibilità e della specificità dell'ORF2-ELISA, dell'ELISA-kit e del WB è stata realizzata mediante un modello bayesiano. La sensibilità di ORF2-ELISA per l'esame di sieri suini risultava simile a quella ELISA-kit commerciale (93,8% vs 93,5%) mentre la specificità era sicuramente migliore (97,5% vs 64,3%). La maggiore specificità diagnostica è verosimilmente da imputare all'origine dell'antigene utilizzato, strutturalmente più simile (in quanto appartenente al genotipo 3) ai ceppi di HEV circolanti, nella popolazione suina Italiana.

Nell'esame dei sieri di cinghiale, l'accuratezza diagnostica dell'ORF2-ELISA risultava nettamente superiore a quella dell'ELISA-kit commerciale sia in termini di sensibilità (94,9% vs 59,9%) che di specificità (96,9% vs 87,5%). Queste osservazioni, fanno ipotizzare parziali differenze antigeniche dei ceppi di HEV circolanti nelle popolazioni di suini domestici e selvatici.

Il test Western blotting mostrava una elevata specificità sia nell'esame dei sieri suini (97,3%) sia di cinghiale (97,5%). La sensibilità diagnostica era tuttavia più elevata per i sieri suini (78,6% vs 52,1%). Anche in questo caso, le spiegazioni potrebbero essere quelle precedentemente espresse.

La generale minore sensibilità diagnostica (sia nel domestico, sia nel selvatico) del WB rispetto ai 2 test ELISA potrebbe essere spiegata dal fatto che per una reazione positiva al WB è necessaria una più alta concentrazione di anticorpi.

In conclusione, il test ELISA messo a punto nel corso della prova (ORF2-ELISA) è un test più accurato rispetto all'ELISA commerciale. L'utilizzo di antigeni maggiormente rappresentativi dei ceppi di HEV circolanti in Italia potrebbe risultare uno strumento utile per gli studi di siero prevalenza anticorpale nel suino in Italia. In aggiunta, l'ORF2 ELISA è un test a basso costo.

Le differenze tra i risultati ottenuti esaminando sieri di cinghiali e di suini potrebbero essere anche relazionate ai differenti ceppi infettanti le due specie animali o a differenze nella biologia della popolazione dei cinghiali considerati. Studi futuri valutare potranno valutare l'efficienza di una proteina capsidica di HEV di cinghiale come antigene specie-specifico per test ELISA. ORF2-ELISA basato sull'antigene della proteina capsidica dei suini appare in generale un test efficiente per la ricerca di anticorpi IgG specifici anti-HEV in sieri di suino e di cinghiale, e può essere utilizzato per la diagnosi di infezione, per studi di sieroprevalenza ed epidemiologici. Nonostante l'esiguità campionaria dei sieri di cinghiale, il test sembra tuttavia funzionare efficientemente anche in questa specie. Nell'insieme i dati confermano una sieroprevalenza molto elevata, 97% (129/133) confermando l'ampia circolazione del virus HEV e delle infezioni in suini e cinghiali nelle aree studiate della Sardegna e dell'Emilia-Romagna (Masia *et al.*, 2009; Di Bartolo *et al.*, 2008; Caprioli *et al.*, 2007; Martelli *et al.*, 2008).

## **4.3 RICERCA DI ANTICORPI ANTI HEV IN SIERI UMANI UTILIZZANDO LA PROTEINA CAPSIDICA RICOMBINANTE DEL CEPPO ITALIANO SUINO g3**

### **4.3.1 INTRODUZIONE**

In molti paesi industrializzati, è segnalato un numero crescente di casi autoctoni di infezione da HEV, causati da ceppi virali appartenenti al genotipo g3 (Buti *et al.*, 2004; Dalton *et al.*, 2008; Herremans *et al.*, 2007; Ijaz *et al.* 2009; Mansuy *et al.*, 2004; Pérez-Gracia *et al.*, 2004; Preiss *et al.*, 2006), largamente circolanti in Europa anche negli animali (suini, cinghiali e cervi). I ceppi di HEV g3 rilevati nei casi umani di epatite E e nei suini della stessa area geografica sono spesso risultati strettamente correlati geneticamente (van der Poel *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2003; Pérez-Gracia *et al.*, 2004; ). La possibilità di trasmissione zoonosica dell'HEV dal suino all'uomo è confermata dalle descrizioni di casi di epatite acuta in soggetti che avevano consumato carne cruda di cervo, fegati di suino, o fegati di cinghiale (Matsuda *et al.*, 2003; Tei *et al.*, 2003), ed è significativo a tal fine il recente ritrovamento di RNA genomico di HEV e virus infettivi in fegati in commercio in USA, Olanda e Giappone (Bouwknegt *et al.*, 2007; Feagins *et al.*, 2007).

La mancanza di un sistema di coltura cellulare per la replicazione del virus *in vitro* ha ostacolato l'uso di antigeni virali naturali per la diagnosi sierologica, quindi, differenti peptidi sintetici e polipeptidi ricombinanti sono stati esaminati per la messa a punto di sistemi diagnostici in grado di evidenziare gli anticorpi specifici anti HEV, sia nell'uomo sia negli animali (Emerson *et al.*, 2003; Pintò *et al.*, 2007). Attualmente, sono disponibili kit commerciali disegnati per la diagnosi sierologica in sieri e plasma umani, che utilizzano come antigene corti frammenti delle proteine ricombinanti ORF2 e ORF3 di ceppi di HEV appartenenti al g1 e g2, ma non al g3, genotipo comune nei suini e nell'uomo nei paesi industrializzati (Meng *et al.*, 2003; Pintò *et al.*, 2007). Vari lavori suggeriscono che i test commerciali non sono ottimizzati per la ricerca di anticorpi nei sieri di pazienti con infezione da HEV g3 (Daniel *et al.*, 2004; Herremans *et al.*, 2007).

Lo scopo di questo lavoro è stato l'utilizzo della proteina ricombinante di un ceppo suino g3 italiano (capitolo 3, e paragrafo 4.2 in questo capitolo) per la ricerca di anticorpi anti-HEV in sieri umani.

### 4.3.2 MATERIALI E METODI

**Campioni.** I sieri umani in esame derivano da uno studio condotto presso l’Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “Lazzaro Spallanzani” di Roma, provenienti relativo a soggetti affetti da epatite acuta non A, non B, non C, precedentemente esaminati per la ricerca di anticorpi anti-HEV con test ELISA commerciale (La Rosa *et al.*, 2011). Sono stati utilizzati 12 sieri umani positivi al test ELISA commerciale per HEV. Un ulteriore siero (n° 13) aveva fornito esito negativo ai test per la diagnosi di tutte le forme di epatite.

GENOTIPI HEV	g1	g3
SIERI UMANI positivi	n°1; n°8; n°9; n°10; n°11; n°12	n°2; n°3; n°4; n°5; n°6; n°7;

**Tabella 4.7** Campioni sieri umani.

**Produzione e purificazione dell’antigene.** Sono state utilizzate le stesse metodiche descritte nel capitolo 3 di questa tesi (materiali e metodi 3.1.2).

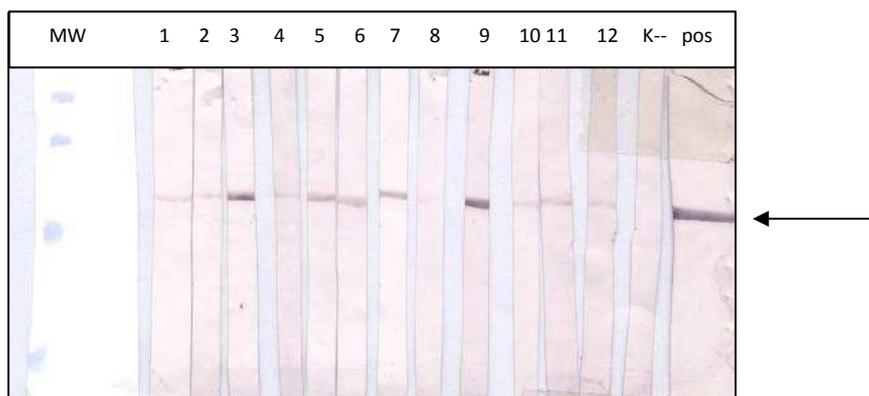
**Western blotting.** E’ stata utilizzata la stessa metodica descritta nel paragrafo 4.2.2 di questa tesi. I sieri umani sono stati utilizzati alla diluizione di 1:100 in PBS con 1% di latte, e in ultimo la membrana è stata incubata con una diluizione 1:3000 di anticorpo anti-IgG (H+L) umane, coniugato con fosfatasi alcalina (SIGMA).

**ELISA-ORF2 per la ricerca di anticorpi (IgG) anti-HEV in sieri umani.** E’ stata utilizzata la stessa metodica descritta nel paragrafo 4.2.2 di questa tesi. I sieri sono stati esaminati in triplicato, alle diluizioni di 1:50; 1:100; 1:200; 1:400 in PBS con 2,5% latte; successivamente la piastra è stata incubata con l’anticorpo anti-IgG (H+L) umane, coniugato con fosfatasi alcalina (SIGMA), alla diluizione di 1:3000 in PBS con 2,5% di latte.

### 4.3.3 RISULTATI

#### Western blotting

Undici sieri umani dei 12 esaminati (fig. 4.6) hanno riconosciuto in maniera specifica la stessa proteina delle dimensioni attese (55kDa), confermando la presenza di anticorpi anti HEV diretti contro la proteina capsidica e i risultati del test ELISA commerciale. Queste osservazioni confermano la presenza di epitopi comuni tra la proteina capsidica di HEV suino g3 espressa in baculovirus ricombinante e quelle di HEV g1 e g2 umani, presenti nel test commerciale.



**Figura 4.6.** Analisi di 12 sieri umani, esaminati contro la proteina ricombinante ORF2 di un ceppo suino g3, mediante Western blotting. La freccia indica le bande corrispondenti alla proteina ricombinante. Linee 1-12 sieri umani, siero 13 controllo negativo linea 14 controllo positivo (siero policlonale suino anti-HEV), MW= marker.

**ELISA-ORF2.** Undici dei 12 sieri esaminati sono risultati positivi anche al test ELISA basato sull'antigene del ceppo HEV g3 di suino; peraltro i valori di OD ottenuti confermavano i risultati del Western blotting. Il segnale più marcato nel WB corrispondeva ad un valore di assorbanza più alto. Il siero umano risultato negativo in WB si è confermato tale anche nel test ELISA-ORF2.

### 4.3.4 DISCUSSIONE

La proteina capsidica del ceppo suino di HEV g3 è stata riconosciuta in maniera specifica dai sieri umani precedentemente risultati positivi ad un test ELISA commerciale che impiega antigeni di

HEV di genotipo 1 e 2. I sieri in esame erano anche risultati positivi alla ricerca di RNA di HEV g3 o g1, come riportato in Tabella 4.5 (La Rosa *et al.*, 2010). Già studi precedenti (Mast *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 1997) hanno dimostrato che la proteina ricombinante ORF2 g3, utilizzata come antigene in ELISA, riconosce efficientemente anticorpi anti-HEV in sieri umani, di scimpanzé e in suini.

L'antigene g3 ricombinante descritto in questo lavoro di tesi è stato riconosciuto in maniera specifica dai sieri di pazienti infettati con entrambi i genotipi g1 e g3, supportando ulteriormente l'esistenza di un unico sierotipo di HEV. Tuttavia, non si può escludere che la positività anticorpale riscontrata nei sieri dei pazienti possa originare da un'infezione pregressa con un genotipo di HEV diverso da quello identificato all'atto dell'arruolamento del paziente.

I risultati ottenuti con l'ELISA-ORF2 utilizzando la proteina ricombinante del ceppo di origine suina italiano dimostrano la validità del test sia in termini di sensibilità che di specificità. Confrontato con un test commerciale basato su antigeni di g1 e g2, il test messo a punto in questo lavoro test risulta essere un test sensibile e idoneo per la ricerca di anticorpi sia in sieri di suino che in sieri umani, specialmente quando si ipotizzi il coinvolgimento di HEV g3. I dati qui riportati confermano che l'antigene g3 reagisce con livelli simili di sensibilità sia con anticorpi stesso verso il genotipo g3 nei suini sia con anticorpi verso i genotipi g1 e g3 nell'uomo. Conseguentemente, il test ELISA-ORF2 potrebbe essere utile per investigare anticorpi contro virus di diversi genotipi, sia per il basso costo che per la facilità di utilizzo. In un lavoro condotto da Engle e colleghi, nel quale sono stati usati un antigene di origine umana (Sar-55) e uno suino (ceppo suino identificato da Meng) mediante test ELISA, gli autori hanno dimostrato che entrambi gli antigeni erano intercambiabili rispetto alla loro abilità di riconoscere gli anticorpi anti-HEV in sieri umani e di suino (Engle *et al.*, 2002).

Tuttavia, il numero di sieri umani esaminati in questo lavoro è esiguo, e non consente di escludere una maggiore specificità di antigene e anticorpi omologhi per genotipo, e ulteriori analisi su un campione più ampio saranno necessarie.

## 4.4 DISCUSSIONE DEI RISULTATI RIPORTATI NEL CAPITOLO

Gli studi condotti confermano l'elevata circolazione del virus HEV all'interno degli allevamenti suini italiani, sia in animali giovani che in animali di età più avanzata. In sede di macellazione il genoma di HEV è stato evidenziato nella bile e nelle feci, ma anche nel fegato, sito d'elezione della replicazione del virus ma, soprattutto, organo che può essere destinato al consumo umano. A fronte di questa larga diffusione all'interno dell'allevamento suinicolo intensivo, non è stata evidenziata alcuna presenza di alterazioni patologiche macroscopicamente evidenti negli animali, che risultavano essere clinicamente sani. Ciò potrebbe confermare l'ipotesi che l'infezione da HEV evolva, nel suino, in modo asintomatico. Questo aspetto è di particolare rilievo in quanto animali infetti ma clinicamente sani vengono inoltrati al macello, inseriti nella filiera produttiva potendo quindi rappresentare una potenziale fonte di infezione diretta o indiretta, mediante cross-contaminazioni di alimenti consumati crudi, per il consumatore.

E' stata valutata anche la presenza di anticorpi anti HEV in sieri suini. Come antigene è stata utilizzata la proteina capsidica di un ceppo suino di HEV, codificata dall'ORF2, che ad oggi è ritenuta la regione più importante ai fini della risposta anticorpale, essendo l'unica componente accertata del capside virale (Panda *et al.*, 2007; Aggarwal e Jameel, 2008). Lo screening ha evidenziato una sieroprevalenza media di Ig del 64,5%, con valori più bassi (60%) negli animali più giovani (3-4 mesi) e più elevati (68%) negli animali di 9-10 mesi.

Nell'ambito del progetto di Dottorato di Ricerca, è stato messo a punto e utilizzato un antigene espresso a partire da un ceppo suino italiano (vedi capitolo 3 di questa tesi). Questo antigene sintetico deriva da un ceppo di HEV appartenente al g3, genotipo riscontrato tipicamente nel suino e nei casi umani nei paesi industrializzati. Tale antigene è stato utilizzato per la messa a punto di test ELISA (ELISA-ORF2) e Western blotting. Lo scopo ultimo del lavoro era la valutazione dell'efficienza diagnostica di questi test in alternativa ai test commerciali, basati su antigeni di genotipo g1 o g2, mai identificati nel suino. La valutazione della validità dei test ELISA e Western Blotting messi a punto è stata realizzata esaminando sieri di suino e cinghiale provenienti dalla Sardegna e sieri di suino prelevati in un macello del Nord Italia (4.2, capitolo IV). I sieri sono stati esaminati utilizzando 3 distinti test sierologici: a) ELISA-ORF2, b) Western blotting e, c) ELISA

commerciale per la diagnosi di infezione nell'uomo, adattato per l'uso nel suino. Per la messa a punto dei primi due test è stato utilizzato l'antigene ricombinante prodotto nello studio. In assenza di un *gold standard*, per la valutazione dell'accuratezza diagnostica dei 3 test è stato utilizzato un approccio bayesiano. Il test commerciale ha evidenziato positività in 110/133 sieri (87%), tutti confermati positivi anche in ELISA-ORF2. Tuttavia, solo 85 sieri sono stati confermati positivi in WB. Utilizzando il test ELISA commerciale, la sieroprevalenza nei cinghiali è risultata pari al 27% (6/22); solo per 2 sieri, la positività è stata riconfermata anche dagli altri due test. Presumibilmente, i test per la ricerca degli anticorpi anti-HEV nel cinghiale necessitano di ulteriore messa a punto, e conseguentemente i dati riferiti ai cinghiali qui presentati da necessitano di ulteriore conferma. La valutazione bayesiana dell'accuratezza diagnostica dei 3 test impiegati ha evidenziato la validità del test ELISA-ORF2 per la ricerca di anticorpi specifici di suino. Il test basato sull'antigene g3 è maggiormente sensibile rispetto al test commerciale che impiega antigeni di derivazione umana (g1 e g2), e il suo utilizzo potrebbe quindi migliorare le possibilità diagnostiche relative alla ricerca di anticorpi anti-HEV nei suini e possibilmente anche nei casi umani di probabile origine zoonotica, causati da ceppi di HEV appartenenti al genotipo 3.

I dati ottenuti evidenziano un'elevata sieroprevalenza di immunoglobuline anti-HEV nei suini confermando quindi la circolazione endemica di HEV anche negli allevamenti italiani, come nel resto d'Europa.

L'utilizzo della proteina ricombinante capsidica di HEV quale antigene per la ricerca di anticorpi anti-HEV in sieri umani ha confermato la versatilità dell'antigene espresso, e ha confermato la cross-reattività tra genotipi diversi, essendo i sieri umani risultati positivi anche per RNA di HEV appartenenti a g1 e g3.

Parte sperimentale:  
*CALICIVIRUS*

## SEZIONE SPERIMENTALE: CALICIVIRUS

In questa sezione sperimentale verranno presentati i risultati ottenuti nel corso delle ricerche condotte sui calicivirus (norovirus e sapovirus). In sintesi:

- Ricerca, mediante tecniche di biologia molecolare, di norovirus e sapovirus in suini clinicamente sani, e ricerca di norovirus in vitelli affetti da diarrea. E' stata condotta un'analisi filogenetica sui ceppi virali suini, bovini e umani identificati in Italia, attraverso il confronto con ceppi virali identificati in altri paesi. Lo scopo è stato quello di valutare la diffusione dell'infezione e di acquisire maggiori informazioni sulla distribuzione dei diversi ceppi di questi virus circolanti sul territorio nazionale (CAPITOLO 5 e CAPITOLO 6).
- Messa a punto di esperimenti di immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo monoclonale (MAb) generato contro le VLP di un ceppo GII.4 di norovirus umano. Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare il legame del MAb a diversi genotipi e varianti di norovirus e di investigare possibili metodi per la concentrazione del virus (CAPITOLO 7).
- Valutazione dell'attivazione del sistema immunitario umano utilizzando VLP di norovirus umano GII.4 su cellule umane mononucleate del sangue periferico (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare la risposta immunitaria di norovirus utilizzando PBMC e proteina ricombinante assemblata in VLP per sopperire all'assenza di tecniche per la coltivazione in vitro di norovirus (CAPITOLO 8).

Complessivamente, i risultati hanno contribuito ad ampliare le conoscenze sull'epidemiologia, la filogenesi e la biologia dell'infezione causate dai calicivirus sia umani che animali, verificare anche in relazione alle possibili correlazioni tra ceppi umani e animali.

## CAPITOLO 5: NOROVIRUS E SAPOVIRUS: EPIDEMIOLOGIA

Sapovirus (SaV) e norovirus (NoV), virus della famiglia *Caliciviridae*, sono noti quali causa importante di gastroenterite acuta (AGE) nell'uomo (Green *et al.*, 2001; Vinje *et al.*, 2000; Koopmans *et al.*, 2001). I due virus differiscono nella loro epidemiologia e nello spettro d'ospite. Le infezioni da NoV sono comuni in tutte le fasce d'età e vengono considerati responsabili di oltre il 60% di tutte le gastroenteriti acute in USA (Glass *et al.*, 2009), ma anche in alcuni paesi europei come l'Olanda (Svraka *et al.*, 2010). Le infezioni causate da sapovirus sono meno frequenti, e ciò è dovuto probabilmente anche al fatto che il virus è meno noto e raramente ricercato in maniera specifica. In genere, i SaV sono riconosciuti principalmente quale causa di AGE nei bambini al di sotto dei 5 anni (Hansman *et al.*, 2006; Phan *et al.*, 2006; Hansman *et al.*, 2007; Ike *et al.*, 2008). A partire dalla scoperta dei SaV nel suino nel 1980 (Saif *et al.*, 1980), solo pochi studi sono stati condotti per studiarne l'epidemiologia molecolare. Sapovirus ricombinanti sono stati descritti in entrambe le specie umana e suina (Hansman *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). E' stato dimostrato che i ceppi sapovirus del suino Cowden e LL/14/02/US, rappresentativi del genogruppo III, inducono malattie enteriche e lesioni in suini infettati sperimentalmente (Flynn *et al.*, 1988; Guo *et al.*, 2001). In un primo momento, tutti i ceppi di suino sono stati raggruppati nel GIII, molto distanti dagli altri genogruppi che includono i ceppi infettanti l'uomo. Tuttavia, recentemente sono stati identificati ceppi di SaV nel suino che all'analisi di sequenza sono risultati non appartenere al GIII, e appaiono geneticamente più vicini ai ceppi umani GI e GV (Martella *et al.*, 2008).

I norovirus umani sono virus ad elevata variabilità genetica e vengono classificati in cinque genogruppi (GI - GV). Il GII raccoglie i ceppi più frequenti nell'uomo (Donaldson *et al.*, 2008). Nello stesso genogruppo, sono racchiusi i 3 genotipi identificati nel suino GII.11, GII.18, e GII.19 (Wang *et al.*, 2006). La presenza di ceppi di norovirus nel suino è stata descritta in Europa, Giappone, Stati Uniti (Sugieda *et al.*, 1998; van der Poort *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005). Ceppi di NoV sono stati rilevati in campioni di feci e in contenuti intestinali in suini adulti, al momento della macellazione. Ceppi di NoV suino non sono stati mai identificati nell'uomo, mentre è stata segnalata l'identificazione di un ceppo GII.4-like, il più frequente nelle infezioni nell'uomo, in un ceppo suino in Canada (Mattison *et al.*, 2007). Inoltre, sono state condotte con successo infezioni sperimentali con un ceppo di GII.4 di norovirus umano in suini gnotobiotici; in questi esperimenti,

sono stati effettuati diversi passaggi di norovirus umano in suini, i quali presentavano diarrea e rilascio del virus. La presenza di replicazione di norovirus umano in questi suini è stata dimostrata con prove di immunofluorescenza, che hanno confermato la presenza di proteine virali strutturali e non strutturali negli enterociti (Souza *et al.*, 2007). Il lavoro di Souza e colleghi ha dimostrato che i suini sono recettivi all'infezione causata da norovirus umano GII.4 e manifestano i sintomi, suggerendo che i suini potrebbero essere considerati serbatoi d'infezione per norovirus trasmissibili per via zoonotica.

La potenziale trasmissione di questi virus dal suino all'uomo ha destato diverse preoccupazioni per la Sanità Pubblica, rendendo necessari studi per definire quale sia l'epidemiologia di questi virus e per identificare gli eventuali serbatoi animali.

Nel presente capitolo saranno descritte la diversità genetica, l'incidenza, e l'epidemiologia molecolare di questi virus in allevamenti di suini nel Nord Italia.

## **5.1 IDENTIFICAZIONE DI CEPPI DI SAPOVIRUS E NOROVIRUS IN SUINI ASINTOMATICI IN ALLEVAMENTI DELL'EMILIA ROMAGNA.**

### **5.1.2 INTRODUZIONE**

Norovirus e Sapovirus hanno un genoma ad RNA monocatenario e, sebbene l'organizzazione genomica vari tra i due generi, in entrambi il genoma codifica per un repertorio simile di proteine non strutturali (inclusa la RNA polimerasi RNA dipendente), per una proteina capsidica principale e per una proteina le cui funzioni restano sconosciute. I NoV e SaV sono la seconda causa di ricovero ospedaliero per gastroenterite (AGE) pediatrica e i NoV da soli sono responsabili di oltre il 50% delle epidemie di AGE nell'adulto. NoV e SaV infettano anche animali domestici e da reddito, e in particolare i suini e i bovini sono potenziali serbatoi di infezione per l'uomo.

Durante il primo semestre del 2006 e del 2008, 201 campioni fecali sono stati prelevati da suini clinicamente sani provenienti da 10 allevamenti. I campioni fecali sono stati analizzati per

Norovirus e Sapovirus mediante un saggio di trascrizione inversa e PCR utilizzando la coppia di primer p289-p290 (Jang *et al.*, 1999), amplificando una regione conservata all'interno dell'RNA polimerasi RNA dipendente (RdRP). Il metodo permette di individuare sia ceppi di Sapovirus (PEC) che di Norovirus suino.

### 5.1.2 MATERIALI E METODI

**Campioni.** Durante il primo semestre del 2006 e del 2008, 201 campioni fecali sono stati prelevati da altrettanti suini clinicamente sani provenienti da 10 allevamenti, di cui 5 localizzati nella regione Emilia-Romagna e 5 nella regione Sicilia.

**Estrazione dell'RNA e RT-PCR.** L'RNA genomico totale è stato estratto da sospensioni fecali al 10% (in acqua) mediante il kit Qiam-Viral RNA (Qiagen). L'RNA ottenuto è stato retrotrascritto (RT) e amplificato mediante il kit Superscript III One Tube (Invitrogen), utilizzando la coppia di primer p289-290, che appaiano in una regione della RdRp conservata nei Calicivirus, e amplificano un frammento di 319 bp per NoV e di 331bp per i Sapovirus.

Primers:

- Forward: p290 5'-GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC-3' (Jiang *et al.*, 1999)
- Reverse: p289 5'-TGACAATGTAATCATCACCATA-3' (Jiang *et al.*, 1999)

**Analisi di sequenza.** Gli amplificati ottenuti sono stati sequenziati utilizzando ABI PRISM BigDye Terminator kit version 2.0 (Applied Biosystems); le sequenze ottenute sono state analizzate con il software DNASIS Max 2.0 (Hitachi) e il dendrogramma è stato costruito con il software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) con il metodo UPGMA.

### 5.1.3 RISULTATI

Dall'analisi dei campioni condotta mediante RT-PCR, 14 di 201 suini sono risultati positivi per la presenza di RNA virale (Tab. 5.1). Nel complesso, 5 allevamenti sono risultati positivi con una prevalenza che variava dal 2,7% al 25%. La differente numerosità campionaria degli allevamenti non ha permesso di stabilire una prevalenza media statisticamente significativa. Confrontando le prevalenze tra le varie classe di età solo animali di età compresa tra i 3-4 mesi e animali adulti con età uguale o superiore a 1 anno sono risultati positivi per Sapovirus all'analisi per RT-PCR. In particolare, come confermato dall'analisi di sequenza, un solo campione di età compresa tra i 3 e 4 mesi è risultato positivo per la presenza di RNA genomico corrispondente a un ceppo suino di Norovirus.

Età	RT-PCR Noro/Sapo		Totale campioni analizzati
	neg	pos	
1 mesi	13		13
1-3 mesi	2		2
3-4 mesi	27	8 (+1 Norovirus)	36
6-8 mesi	30		30
8-10 mesi	16		16
≥12 mesi	52	2	54
Nd	47	3	50
Totale complessivo	187	14	201

**Tabella 5.1** Prevalenza di sapovirus e norovirus in campioni di feci raccolti da suini asintomatici tra il 2006 e il 2008.

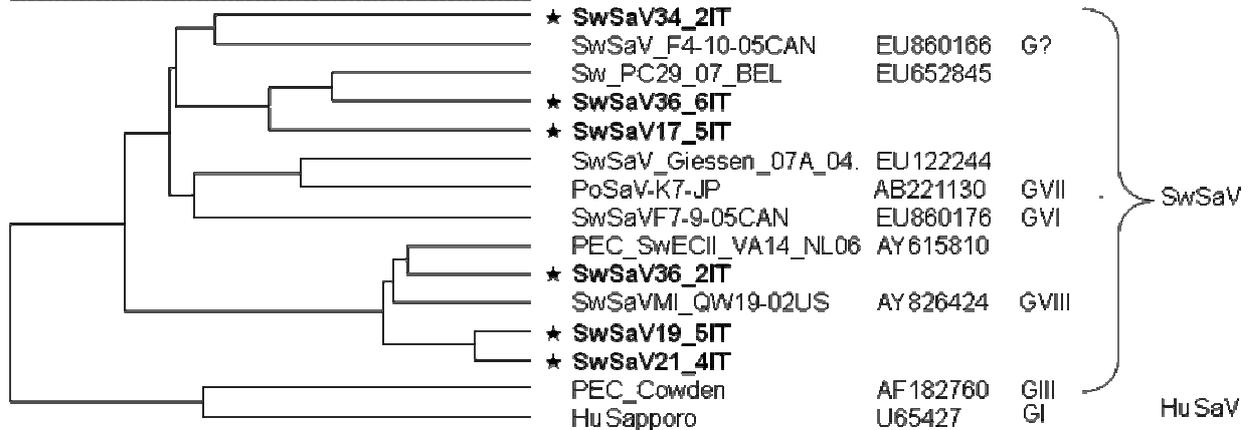
L'analisi di sequenza (vedi materiali e metodi 5.1.2) dei campioni positivi ottenuti (indicati nei dendrogrammi di fig.5.1 in grassetto con asterisco) ha evidenziato un'ampia variabilità di genogruppi di sapovirus circolanti negli allevamenti esaminati. Tre ceppi di sapovirus identificati appartenevano al genogruppo GVIII, mentre i restanti tre ceppi, SwSaV34\_2IT, swSaV36\_6IT e swSaV17\_5IT mostravano un'identità nucleotidica del 57,8% con ceppi di sapovirus suino descritti in Canada, a cui non è stato ancora attribuito un genogruppo definitivo. Nessun ceppo apparteneva al genogruppo prototipo suino, GIII, generalmente più comune.

E' stato identificato un solo campione di norovirus, denominato swNoV40\_1IT, il quale dall'analisi di sequenza è risultato appartenere al GII.11, genotipo identificato solo in campioni suini.

Pairwise (OG:100%,UG:0%) (FAST:2,10) Gapcost 0%

**SLV-Polymerase**

40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100



Pairwise (OG:0%,UG:0%) (FAST:2,10) Gapcost 0%

**NLV-Polymerase**

45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100



**Figura 5.1** Analisi filogenetica di sapovirus e norovirus suini, messi in evidenza nel corso dello studio, sulla base di 289 nt nella regione della RNA-dependent RNA polymerase. Il dendrogramma è costruito con il metodo UPGMA.

**5.1.4 DISCUSSIONE**

Gli RNA provenienti da 13 campioni fecali suini sono risultati positivi al test di RT-PCR, mostrando una banda di DNA delle dimensioni attese (≈319bp per norovirus e 331bp per PEC). Per confermare i risultati ottenuti e caratterizzare i ceppi coinvolti, sei campioni positivi sono stati sequenziati. L’analisi delle sequenze ottenute ha confermato che cinque ceppi appartenevano al genere Sapovirus, mostrando un’identità di sequenza nucleotidica tra il 79% e l’85% con altri ceppi suini descritti in Europa. Uno dei ceppi sequenziati è invece risultato appartenere al genere Norovirus, in particolare al tipo GII.11, che è un genotipo comune sinora riscontrato tra i soli ceppi

suini, sebbene appartenga allo stesso genogruppo (GII) dei ceppi umani di norovirus. Lo studio condotto, se pur preliminare, ha mostrato una prevalenza del 13% (tra NoV e SaV) in suini sani, indicando che questi virus stanno circolando in maniera endemica negli allevamenti suini italiani. L'assenza di sintomatologia in questi soggetti potrebbe essere correlata ad parziale immunità protettiva acquisita da precedenti contatti con il virus. Nel suino sembra più comune la presenza di sapovirus, in particolare in animali di pochi mesi di età, come già evidenziato in altri lavori (Barry *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). L'analisi di sequenza ha dimostrato che i ceppi di PEC e NoV individuati sono correlati e vicini geneticamente ai ceppi umani. Infatti, il genogruppo GVIII occupa una speciale posizione tra i sapovirus, essendo generalmente correlato ai sapovirus umani (specialmente quelli del genogruppo GV e GI) piuttosto che ad altri genogruppi (Martella *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2005). Il genogruppo GVIII potrebbe essere un crossing-point tra i sapovirus umano e suino, come mostrato dall'analisi delle sequenze. Quindi sebbene non dimostrata, la possibile origine zoonotica non può essere esclusa. Ulteriori studi condotti sono necessari per meglio caratterizzare filogeneticamente i ceppi identificati. Considerando i risultati di questo studio, la presenza di norovirus e sapovirus in allevamenti di suini lascia ipotizzare che questa specie possa rappresentare un potenziale serbatoio di questi virus. Anche se la malattia clinica associata a NoV e SaV nei suini è poco conosciuta, appare comunque opportuno caratterizzare questi agenti, possibilmente patogeni per l'uomo, in quanto presenti in animali destinati all'alimentazione umana. In particolare, la conoscenza del loro potenziale di diffusione e del loro contributo a eventi di ricombinazione è importante per avere una maggiore informazione sul ruolo del suino come potenziale serbatoio di sapovirus e norovirus a trasmissione zoonosica.

## **CAPITOLO 6: Norovirus bovino (BEC): possibile agente di zoonosi?**

La stretta relazione genetica tra i norovirus che infettano gli animali e quelli che infettano l'uomo ha sollevato la questione sul potenziale zoonotico di questi virus che, se fosse dimostrato con certezza, avrebbe conseguenze di vasta portata per l'epidemiologia e la sicurezza alimentare. L'ipotesi della trasmissione zoonotica è avvalorata anche dall'identificazione nell'uomo di anticorpi diretti contro norovirus animale e viceversa, ovvero identificazione di anticorpi diretti contro norovirus umani nel suino (Farkas *et al.*, 2005). I primi ceppi animali di norovirus vennero scoperti nel bovino (Scipioni *et al.*, 2008), e venne anche osservata una sieroprevalenza più elevata nei veterinari professionalmente esposti (Widdowson *et al.*, 2005). Tuttavia, negli anni la possibilità di trasmissione zoonotica dal bovino all'uomo è in gran parte svanita, non essendo mai stata riportata l'identificazione di ceppi bovini nell'uomo (Oliver *et al.*, 2003). Sebbene non si possa escludere che l'animale possa funzionare da serbatoio per l'insorgenza di nuove varianti virali, le distanze genetiche (Oliver *et al.*, 2003) e le differenze tra i recettori (Farkas *et al.*, 2005; Hutson *et al.*, 2003) osservate nei ceppi umani e animali non supportano l'ipotesi di permissività dell'uomo ai ceppi bovini. La recente identificazione di sequenze simili a GII.4 di NoV umano nei suini e bovini in Canada potrebbe tuttavia modificare la valutazione del possibile rischio zoonotico (Mattison *et al.*, 2007).

I ceppi di norovirus che infettano il bovino (BEC) vengono classificati tutti nel genogruppo III, distinto filogeneticamente dai genogruppi che includono i ceppi umani (Oliver *et al.*, 2006). L'infezione da BEC è stata descritta in molti paesi (Mauroy *et al.*, 2009; Yilmaz *et al.*, 2010; Kaplon *et al.*, 2011), in animali di diverse fasce di età (van der Poel *et al.*, 2003); i soggetti giovani sembrano tuttavia essere i più colpiti e in genere mostrano diarrea e sintomi più severi rispetto a quelli osservabili negli animali adulti. L'infezione è stata anche descritta in animali totalmente asintomatici (van der Poel *et al.*, 2000).

Nel presente capitolo sarà descritto uno studio relativo alla ricerca di BEC in bovini affetti da diarrea allevati nel Nord Italia. Nella seconda parte del capitolo, verrà riportato uno studio di sieroprevalenza di anticorpi anti-NoV in medici veterinari, realizzato utilizzando come antigene la proteina capsidica assemblata in VLP di ceppi di norovirus umano e bovino.

## 6.1 RICERCA DI NOROVIRUS IN BOVINI ALLEVATI NEL NORD ITALIA

### 6.1.1 INTRODUZIONE

I ceppi di norovirus bovino appartengono al genogruppo III (GIII) di norovirus, che comprende due genotipi. I virus geneticamente correlati ai ceppi Jena sono stati assegnati al genotipo 1 (GIII.1) e quelli geneticamente correlati a Newbury-2 sono stati assegnati al genotipo 2 (GIII.2) (Ando *et al.*, 2000). Sono state descritte differenze nella severità dei sintomi in relazione all'età degli animali colpiti, evidenziando un quadro clinico più grave in animali di 3 settimane di vita piuttosto che in neonati. Differenze erano anche relative al genotipo di BEC coinvolto, il genotipo GIII.2 risultando in genere meno virulento (Scipioni *et al.*, 2008). L'infezione da norovirus negli bovini può anche risultare asintomatica (van der Poel *et al.*, 2000; Mijovski *et al.*, 2010). Non esiste ad oggi una spiegazione sulle differenze osservate (Scipioni *et al.*, 2008).

Questo studio descrive l'identificazione di norovirus in bovini con diarrea acuta allevati in Italia,.

### 6.1.2 MATERIALI E METODI

**Campionamento.** I campioni sono stati raccolti da animali provenienti da allevamenti bovini da latte del Nord Italia (Lombardia ed Emilia-Romagna). Gli animali deceduti a seguito di gravi forme gastrointestinali sono stati sottoposti ad autopsia presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). In questa sede, sono stati raccolti i campioni di feci, che sono stati conservati a -80°C fino al momento delle analisi. I bovini analizzati avevano un'età che variava tra i 7 e i 20 giorni di vita.

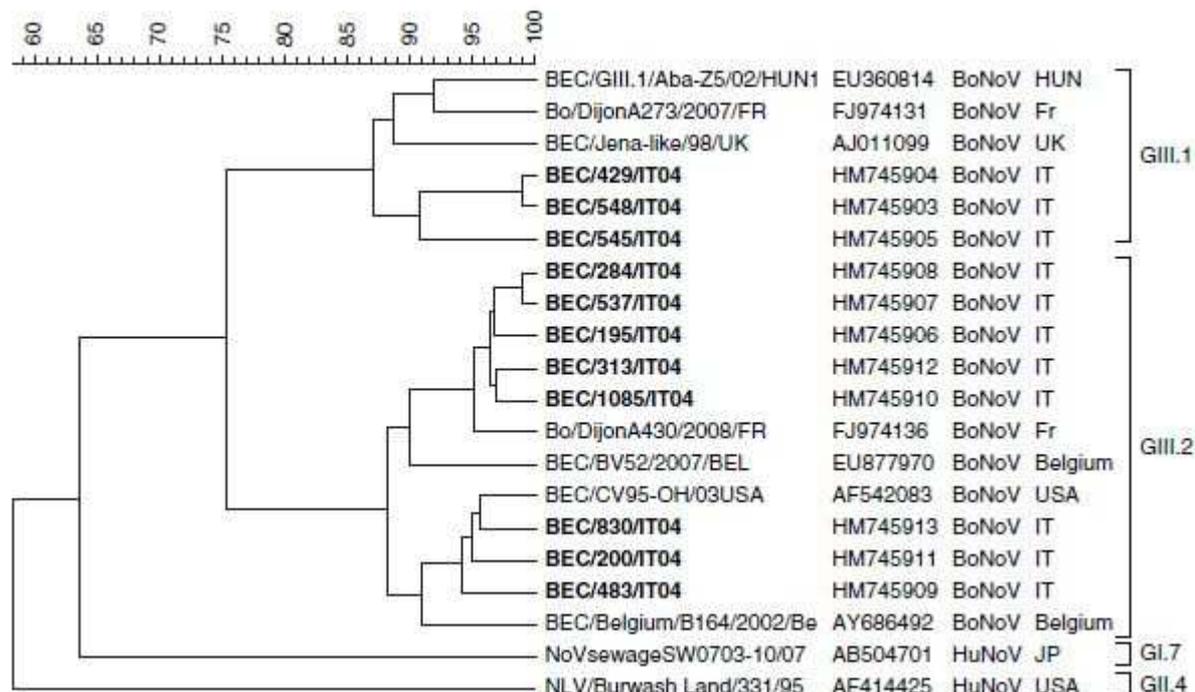
**Processazione dei campioni e RT-PCR.** L'RNA totale è stato estratto da 101 sospensioni fecali mediante il kit Qiaamp-RNeasy Mini Kit (QIAGEN). La ricerca del genoma di norovirus bovino è stata effettuata mediante una reazione di RT-PCR (Superscript III one-step, Invitrogen), utilizzando una coppia di primer che amplificano un frammento di 514 nt dell'ORF1 (Smiley *et al.*, 2003). Il programma di RT-PCR utilizzato è stato: retrotrascrizione per 45 minuti a 45 ° C, seguita da 40 cicli di PCR: 94° C per 30 secondi, 48° C per 40 secondi, 72° C per 1 minuto, e una fase finale di 10 minuti a 72° C.

**Analisi di sequenze.** Gli ampliconi di DNA, con la taglia attesa 514 nt, sono stati sottoposti ad analisi di sequenza (Macrogen), e le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle dei norovirus bovini disponibili in GenBank NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Analisi filogenetiche sono state effettuate con il software Bionumerics v6.0 (Applied Maths), e il dendrogramma è stato ottenuto utilizzando il metodo UPGMA.

### 6.1.3 RISULTATI

Tra il 2004 e il 2005, durante un'indagine per la presenza di rotavirus (Monini *et al.*, 2008), sono stati raccolti, nel Nord Italia, campioni di feci di bovino (tra 7 e 20 giorni di età) affetti da diarrea acuta. Centouno campioni positivi per rotavirus sono stati ulteriormente analizzati per la presenza di norovirus bovino. Ventuno di 101 campioni (20,8%) sono risultati positivi per norovirus bovino, indicando che negli animali era in atto una co-infezione con i due virus. La percentuale di positività per BEC (20,8%) osservata in questo studio è superiore a quella esaminata in una precedente indagine condotta in animali asintomatici in Italia (dati non riportati), e in altre indagini condotte in Europa (van der Poel *et al.*, 2003; Mauroy *et al.*, 2009; Reuter *et al.*, 2009; Mijovski *et al.*, 2010). Tuttavia, occorre considerare da un lato la ridotta numerosità campionaria e dall'altro che nello studio sono stati campionati solo un ristretto numero di bovini con diarrea positivi per rotavirus. La co-infezione con norovirus e rotavirus osservata, descritta più volte nei bovini (Mauroy *et al.*, 2009), non permette di stabilire quale dei due virus, norovirus o rotavirus, o entrambi, abbia realmente causato i sintomi. Non è stata identificata alcuna correlazione tra particolari genotipi G o P di rotavirus e norovirus, né è stato possibile distinguere diversi score di gravità dei segni clinici in animali infettati con entrambi i virus rispetto al solo rotavirus. Undici campioni positivi alla RT-PCR sono stati sequenziati e analizzati filogeneticamente, per confermare l'identità nucleotidica con altri Calicivirus Bovini Enterici (BEC) (HM745903-HM745913) (Fig. 6.1). Sono stati identificati entrambi i genotipi (GIII.1 e GIII.2). Tre ceppi italiani (BEC429/IT04, BEC548/IT04, BEC545/IT04) hanno mostrato una identità nucleotidica dell'87,1% rispetto al ceppo di riferimento di GIII.1 (AJ011099), e del 90,8 % con ceppi bovini di norovirus GIII.1 isolati di recente in Ungheria (EU360814) e in Francia (FJ974131). I restanti otto ceppi, appartenenti al genotipo GIII.2, hanno mostrato tra loro un'identità nucleotidica compresa tra l'88,3 e il 98,9%, e tra il 90 e il 95,2 % con altri ceppi GIII.2 isolati in Europa (Francia FJ974136; Belgio AY686492, EU877970; Ungheria EU360813.2). La maggior parte delle differenze nucleotidiche identificate, corrispondevano a mutazioni silenti nella proteina. L'identità tra i ceppi italiani appartenenti ai

genotipi GIII.1 e GIII.2 risultava del 91,8 % a livello amminoacidico e del 75,5% a livello nucleotidico.



**Figura 6.1:** Dendrogramma, ottenuto con il metodo UPGMA, basato su 466 bp della ORF1 di 11 ceppi di norovirus bovino, isolati in Italia nel corso del 2004 al 2005. I ceppi individuati in questo studio sono evidenziati in grassetto. Sono indicati in figura: il numero di accesso di GenBank, l'origine e il Paese di provenienza.

#### 6.1.4 DISCUSSIONE

Questo lavoro, che riporta la prima descrizione di norovirus bovino (BEC) in Italia, dimostra che il virus può essere presente in bovini giovani affetti da diarrea, almeno in forma di co-infezione con rotavirus. È interessante notare che la situazione descritta in Italia è molto simile a quella descritta di recente in Ungheria, dove negli allevamenti bovini risultavano presenti sia GIII.1 che GIII.2 (Reuter *et al.*, 2009). In altri studi condotti in Europa, in genere è risultato prevalere il genotipo GIII.2 (Mauroy *et al.*, 2009), che viene considerato predominante (Scipioni *et al.*, 2008). Al contrario, in Italia diversi ceppi di norovirus bovino circolano contemporaneamente. I risultati di sequenza non hanno evidenziato alcuna correlazione tra norovirus bovino e i ceppi umani di

norovirus circolanti in Italia. Questo sembra confermare la scarsa probabilità che i bovini possano rappresentare un serbatoio importante per la trasmissione zoonotica di norovirus, confermando le ipotesi riportate in precedenza (van der Poel *et al.*, 2003).

## **6.2 RICERCA DI ANTICORPI DIRETTI CONTRO NOROVIRUS BOVINO E UMANO IN SIERI DI VETERINARI ITALIANI**

### **6.2.1 INTRODUZIONE**

In uno studio di prevalenza condotto su sieri di veterinari che lavorano in Olanda, è stata studiata la possibilità che ceppi di origine animale di NoV nel paese potessero infettare significativamente anche l'uomo. I sieri sono stati analizzati per la reattività di IgG e IgA utilizzando proteina ricombinante del capsido di norovirus bovino (BEC), e di norovirus umani, in particolare di un ceppo Lordsdale (rLDV) di genotipo GII.4, e di un ceppo Norwalk virus (RNV) di genotipo GI.1. I valori di sieroprevalenza tra i veterinari sono stati confrontati con quelli ottenuti dall'esame di un campione di soggetti non professionalmente esposti al contatto con i bovini per determinare se i veterinari fossero maggiormente a rischio. La sieroprevalenza per BEC riscontrata tra veterinari olandese è risultata più elevata che nella popolazione in genere (van der Poel *et al.*, 2005).

Nel lavoro che verrà presentato, la presenza di anticorpi diretti contro norovirus umano e bovino è stata valutata nei sieri di 84 veterinari esposti in maniera non esclusiva al contatto professionale con i bovini, mediante un test ELISA basato su antigeni prodotti nei laboratori dell'ISS.

### **6.2.1 MATERIALI E METODI**

**Campioni.** Sono stati analizzati 84 sieri di veterinari italiani clinicamente sani, che lavorano prevalentemente ma non esclusivamente con suini. Il prelievo dei sieri è stato effettuato, su base volontaria, nel corso di un congresso svolto in Italia.

**VLP di HuNoV e di BEC.** Le VLP ottenute dalla proteina capsidica sono state precedentemente prodotte nei laboratori dell'ISS utilizzando il sistema di espressione baculovirus (Materiali e Metodi, capitolo 3.1.2), a partire da un ceppo bovino di GIII.1 (Zakhour *et al.*, 2010) e da un ceppo

umano di norovirus GII.4, identificati in Italia (capitolo 7 di questa tesi, materiali e metodi 7.2). Nel corso di questo studio, l'antigene è stato prodotto massivamente, verificandone prima dell'uso sperimentale il corretto assemblaggio in particelle simil-virali (VLP) mediante microscopia elettronica.

**ELISA per la ricerca di anticorpi specifici diretti contro norovirus.** Piastre ELISA (NUNC) sono state sensibilizzate con 50 µl di una sospensione di VLP del ceppo BEC o del ceppo umano, ad una diluizione di 1:500 in PBS, e incubate per 18 ore a 4°C. Per evitare il successivo legame non specifico degli anticorpi con la plastica non saturata dall'antigene, le piastrine sono state bloccate con PBS al 10% di FBS per 1 ora a 37°C. A ciascun pozzetto sono stati successivamente aggiunti 50 µl dei sieri umani alla diluizione 1:1000, o di un siero iperimmune di coniglio anti-NoV umano (fornito dal professor Svensson, Università di Göteborg, Gothenburg, Svezia), come controllo positivo. Dopo incubazione di 2 ore a 37°C e lavaggi con PBS 0,1% Tween 20, è stato aggiunto un anticorpo anti-IgG (H+L) umane, coniugato con fosfatasi alcalina (Pierce), diluito 1:2000 in PBS allo 0,5% di BSA. Dopo incubazione per 1 ora a 37°C, la reazione è stata evidenziata con p-nitrofenol fosfato (Sigma 104) in tampone dietanolammina 10mM, pH 10. Dopo 1 ora di incubazione a 37°C, la densità ottica è stata misurata mediante lettura spettrofotometrica a una lunghezza d'onda di 405 nm.

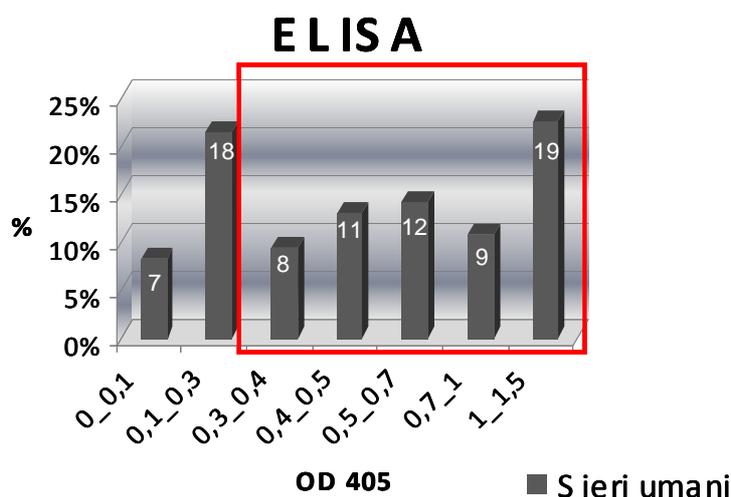
### 6.2.3 RISULTATI

#### **Riconoscimento di antigeni di NoV in sieri umani mediante ELISA**

La ricerca di anticorpi contro norovirus umano e bovino è stata condotta su 84 campioni di siero ottenuti da veterinari clinicamente sani. I sieri sono stati analizzati inizialmente in ELISA per determinarne l'efficienza di riconoscimento dell'antigene (VLP di norovirus umano e VLP di norovirus bovino) a diverse diluizioni d'uso. Dopo vari test, è stata scelta la diluizione di 1:1000, risultata ottimale. Nella Fig. 6.2, sono riportate le letture OD<sub>405</sub> ottenute per i singoli sieri contro le VLP di norovirus umano. Il 63% dei sieri mostrava un valore OD<sub>405</sub> superiore a 0,3 (range 0,3–1,5) considerato significativamente superiore al valore di cut-off.

Non risultavano differenze consistenti nei valori delle letture degli OD<sub>405</sub> tra i sieri dei diversi veterinari contro le VLP di HuNoV. La sieroprevalenza anticorpale contro norovirus umano è

complessivamente risultata del 63%, mentre una proporzione inferiore di sieri, circa 10,71% (9/84), risultava positiva contro le VLP di BEC. Gli esperimenti hanno messo in evidenza un certo grado di cross-reattività degli anticorpi presenti nei diversi sieri verso i due differenti virus, testimoniata da una tendenza a correlare tra i valori di assorbanza relativi ai due distinti test, anti-BEC e anti-HuNoV. Inaspettatamente, tuttavia, nessuna associazione è stata trovata tra sieropositività IgG e numero di anni di attività dei veterinari.



**Figura 7.2:** Valori di assorbanza (OD<sub>405</sub>) ottenuti con il test ELISA utilizzando gli 84 sieri umani e le VLP di HuNoV come antigene. I sieri con i diversi valori di OD<sub>405</sub> sono state raggruppati in base alla presenza di un segnale significativamente superiore rispetto al valore di cut-off. Nel riquadro sono mostrati i campioni confermati positivi, con valore OD<sub>405</sub> > 0,3. Sulle colonne dell'istogramma è riportato il numero di campioni corrispondenti a ciascun intervallo.

#### 6.2.4 DISCUSSIONE

In questo lavoro è stata valutata la sieroprevalenza di anticorpi diretti verso norovirus umano e bovino in un gruppo di veterinari clinicamente sani.

I risultati hanno mostrato una sieroprevalenza del 63% di Ig dirette verso norovirus umano GII.4; la prevalenza scendeva al 10,7% ricercando relativamente ad anticorpi anti BEC; tali valori concordano con quanto descritto in precedenti lavori (Honma *et al.*, 1998; Pelosi *et al.*, 1999; van der Poel *et al.*, 2000). La bassa prevalenza di anticorpi contro norovirus bovino nel siero dei veterinari esaminati suggerisce che questi ceppi non sono in grado di infettare l'uomo in modo efficace o che i ceppi

animali sono scarsamente trasmissibili all'interno della popolazione umana (van der Poel *et al.*, 2000). Va tuttavia ricordato che i risultati ottenuti non consentono di stabilire se, anche in Italia, l'esposizione professionale ai bovini costituisca un fattore di rischio, non essendo stato condotto un confronto con una popolazione di controllo non esposta. I risultati rivelano solamente una significativa presenza (> 10%) di anticorpi diretti contro BEC nel siero dei soggetti esaminati, confermando una possibile esposizione al virus. Numerosi studi di confronto tra norovirus umano e bovino hanno mostrato che tutti i ceppi di BEC appartengono al genogruppo GIII, distinto dai genogruppi a cui appartengono i ceppi umani (Smiley *et al.*, 2003). Tuttavia, i norovirus umani sono geneticamente molto eterogenei (Ando *et al.*, 2000), e la bassa identità di sequenza nucleotidica e amminoacidica riscontrata tra norovirus bovini e umani (Oliver *et al.*, 2003) è sostanzialmente paragonabile alle basse identità nucleotidiche presenti tra i diversi ceppi di norovirus umano.

### **6.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI RIPORTATI NEL CAPITOLO**

La dimostrazione della possibile trasmissione zoonosica di norovirus avrebbe diverse implicazioni per la comprensione dell'epidemiologia del virus, della sua trasmissione e sulla sicurezza alimentare.

Come già riportato, ceppi bovini di NoV non sono mai stati identificati nell'uomo, tuttavia non si può escludere la possibilità di arrangiamenti genomici, anche in considerazione del fatto che il 14% dei ceppi umani sono ricombinanti. Tali arrangiamenti potrebbero in teoria consentire a ceppi di norovirus bovino di adattarsi all'infezione nell'uomo, come ipotizzato per i ceppi di norovirus suino GII (Cheetham *et al.*, 2006). Attualmente, ci sono però ancora poche informazioni disponibili su norovirus bovino, e studi ulteriori di epidemiologia molecolare per norovirus bovino in Italia e in Europa, analizzando un numero maggiore di campioni e di sequenze genomiche, appaiono opportuni.

Per quanto riguarda lo studio di sieroprevalenza su medici veterinari, come presentato nel presente capitolo, un suo limite è rappresentato dalla mancanza di dati relativi ad una popolazione umana non esposta al contatto con bovini. Sebbene il numero di sieri esaminati sia limitato, i dati ottenuti confermano tuttavia una sieroprevalenza molto elevata e conseguentemente un'elevata esposizione dell'uomo a norovirus. Inoltre, i risultati indicano un rischio di esposizione professionale relativamente basso a norovirus bovino, considerando che anticorpi diretti contro il ceppo bovino

sono stati riscontrati solo nel 10.7% dei sieri analizzati. Va anche considerata la possibilità di una parziale cross-reattività tra anticorpi diretti verso NoV umano e l'antigene norovirus bovino impiegato nel test.

Attività future potranno completare lo studio di sieroprevalenza per norovirus sia di origine animale che umana, confrontando i rischi di esposizione. Sebbene l'approccio molecolare e l'analisi di sequenza abbiano ampliato le conoscenze su questo eterogeneo gruppo di virus, non sono ancora disponibili protocolli diagnostici armonizzati e che tengano conto della continua emersione di nuove varianti di ceppi virali (Verhoef *et al.*, 2008; Verhoef *et al.*, 2009).

# Capitolo 7. Produzione di un anticorpo monoclonale per esperimenti di immuno cattura

## 7.1 INTRODUZIONE

I norovirus (NoV) sono considerati a livello mondiale una delle cause principali di gastroenterite acute di origine virale nell'uomo (Koo *et al.*, 2010). Tuttavia, i dati relativi alla prevalenza dei NoV sono ancora scarsi e probabilmente sottostimati. La via di trasmissione di questi virus è oro-fecale, tramite contatto diretto con persone infette (Verhoef *et al.*, 2008), o attraverso il consumo di alimenti e acque contaminate. Non essendo ad oggi disponibili sistemi di crescita in colture cellulari o modelli animali, le conoscenze sulla replicazione, virulenza e immunologia dei NoV restano limitate. Lo sviluppo di adeguati strumenti diagnostici, in particolare la biologia molecolare, ha rappresentato un passo importante per il miglioramento della diagnosi di questi virus (Escobar-Herrera *et al.*, 2006). Sebbene l'approccio molecolare e l'analisi di sequenza abbiano ampliato le conoscenze su questo eterogeneo gruppo di virus, non sono ancora disponibili protocolli diagnostici che tengano conto della costante emersione di nuove varianti virali (Verhoef *et al.*, 2008; Verhoef *et al.*, 2009). Inoltre, l'alta infettività fa sì che siano sufficienti poche particelle virali per causare l'insorgenza dei sintomi (Glass *et al.*, 2009). Molte matrici, in particolare l'acqua, possono essere contaminate con quantità così basse di virus, tali da rendere molto complicata l'identificazione dell'agente eziologico se non dopo concentrazione del campione. Per l'analisi delle acque, in cui la concentrazione del virus è in genere molto bassa, devono essere analizzati grossi volumi, rendendo necessarie procedure di concentrazione, che possono però comportare anche la concentrazione degli eventuali inibitori presenti, influenzando la sensibilità dell'RT-PCR, con possibili risultati falsi negativi.

In alternativa ai comuni metodi di filtrazione, la separazione immunomagnetica (IMS), offre la possibilità di un arricchimento del virus nel campione, quale unica alternativa all'assenza di un sistema di replicazione *in vitro* per norovirus per la produzione di stock virali concentrati. L'IMS è basata sull'utilizzo di sfere magnetiche rivestite con la proteina G, a cui è legato l'anticorpo specifico. Questa metodica, è uno strumento utile per la separazione e l'isolamento del virus,

eliminando il problema della presenza di inibitori (Monceyron e Grinde 1994; Gilpatrick *et al.*, 2000; Myrmel *et al.*, 2000), e permettendo di catturare selettivamente e concentrare il virus.

Nel lavoro presentato in questo capitolo, è stata valutata la possibilità di utilizzare reattivi immunologici, un siero policlonale e un anticorpo monoclonale, prodotti nei laboratori dell'ISS, per la messa a punto di un protocollo di IMS. I reattivi utilizzati erano diretti contro la proteina del capsido di un ceppo Lordsdale (GII.4) di norovirus assemblata sotto forma di VLP. La scelta è stata diretta al genotipo GII.4, che è in assoluto il più frequente in Europa e nel mondo (Donaldson *et al.*, 2010).

L'esperimento di IMS è stato svolto utilizzando due diversi genotipi di norovirus, e l'avvenuta cattura del virus è stata valutata mediante esperimenti di RT-PCR convenzionale o real-time e mediante test ELISA.

## 7.2 MATERIALI E METODI

**Preparazione VLP di NoV.** Cellule di insetto Sf9, sono state infettate con il baculovirus BacHu/GGII.4/00/IT, precedentemente ottenuto nei laboratori dell'ISS e contenente la regione capsidica del ceppo di norovirus umano GII.4. Dopo 72 ore, osservato un effetto citopatico diffuso, i monostrati di Sf9 infettate sono stati raccolti e il lisato cellulare è stato trattato per purificarne le VLP, mediante ultracentrifugazione attraverso un cuscino di saccarosio al 30% (peso/vol), seguito da un gradiente di densità CsCl (1,362 g/cm<sup>3</sup>). Il corretto assemblaggio delle VLP di NoV purificate è stato visualizzato mediante microscopia elettronica.

**Produzione di anticorpi monoclonali anti-NoV.** Topi Balb/c sono stati immunizzati con 25 µg di VLP di HuNoV con adiuvante di Freundt, per via intraperitoneale. Un pannello di anticorpi monoclonali (MAb) è stato generato dalla fusione degli splenociti con cellule di mieloma murine Fox con procedure convenzionali (materiali e metodi 3.1.2). I MAb sono stati selezionati mediante ELISA utilizzando VLP di HuNoV come antigene.

**Produzione di sieri iperimmuni diretti contro un ceppo GII.4 di NoV.** Due conigli sono stati immunizzati con 100 µg di VLP di HuNoV in adiuvante completo di Freund (SIGMA), e tre iniezioni di richiamo di 70-100 µg di VLP di HuNoV con adiuvante incompleto, a intervalli di tre

settimane. Campioni di sangue sono stati raccolti prima dell'immunizzazione. Test di WB ed ELISA sono stati utilizzati per valutare il titolo anticorpale nei sieri.

**Campioni.** I campioni di feci utilizzati in questo studio, provenivano da soggetti affetti da AGE causata da norovirus, ed erano stati raccolti nel corso di focolai epidemici studiati nel laboratorio ISS (Boccia *et al.*, 2002; Mladenova *et al.*, 2008).

**Precipitazione immunomagnetica.** Proteina G coniugata a sfere magnetiche (IgG Dynabeads, Lifetechnologies) è stata incubata con un siero iperimmune anti-HuNoV-VLP di coniglio o con l'anticorpo monoclonale anti-HuNoV-VLP (1H2), seguendo il protocollo del produttore. Una volta rimosse le IgG non legate, le beads, contenenti anticorpi legati alla proteina G, sono state incubate con diluizioni seriali (1 ml) di estratto fecale contenente norovirus. Dopo 2 h a temperatura ambiente con rotazione costante, le sfere immunomagnetiche sono state raccolte per separazione magnetica e le particelle virali recuperate dalla proteina G mediante eluzione in 100 µl, seguendo il protocollo del produttore. Tutti gli esperimenti con le sfere immunomagnetiche sono stati eseguiti in triplicato, includendo sempre come controllo negativo una sospensione fecale negativa per norovirus e, come controllo positivo, le VLP di HuNoV.

**Estrazione di RNA.** L'RNA virale è stato estratto dalle diverse diluizioni dei campioni di sospensione fecale prima dell'IMS e dagli eluati raccolti dopo IMS, utilizzando QIAamp-RNeasy Mini Kit (QIAGEN). L'RNA totale è stato eluito in 100 µl di acqua.

**RT-PCR.** L'RNA virale è stato amplificato in una reazione di RT-PCR (SuperScript® One-Step RT-PCR System con Platinum® Taq DNA, Lifetechnologies) con la coppia di oligonucleotidi GIISKR-GIISKF (Kojima *et al.*, 2002), che amplificano un frammento dell'*ORF2* di HuNoV (338 bp).

**Real-time RT-PCR.** L'RNA estratto è stato analizzato in una reazione di real-time RT-PCR con sonda TaqMan, utilizzando il kit One-step RT-PCR master mix (Lifetechnologies) seguendo le indicazioni del produttore e il protocollo descritto da de Silva e coll. (2007) (tab. 7.1), utilizzando 0,25 µM di ogni primer, 0,1 µM probe HuNoV-P (marcata con FAM). La reazione è stata effettuata in un volume finale di 20 µl, utilizzando 5 µl di RNA. Il programma di amplificazione è stato: 15 min at 48°C, 2 min at 95°C, per 45 cicli di 15 sec a 95 C, 15 sec a 60°C e 60 sec.

GENOGRUPPO	PRIMER	SONDA	SEQUENZA	POLARITÀ
GI	QNIF4		5'- CGC TGG ATG CGN TTC CAT -3'	Forward
	NV1LCR		5'- CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC -3'	Reverse
		<i>NVGG1p</i>	5'-FAM- TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT-TAMRA-3'	
GII	QNIF2		5'- ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA -3'	Forward
	COG2R		5'- TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA -3'	Reverse
		<i>QNIFS</i>	5'- FAM- AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG -TAMRA-3'	

**Tabella 7.1** Primer e sonde utilizzate nel saggio di real-time PCR.

**ELISA.** Piastre per ELISA (NUNC) sono state sensibilizzate utilizzando come antigene 2,5 µl di virus raccolto dopo IMS o 2 µl HuNoV VLP 69 ng/µl come controllo positivo. Le piastre sono state incubate con l'anticorpo monoclonale prodotto contro le VLP di HuNoV (1H2) o con il siero iperimmune anti-VLP HuNoV prodotto in coniglio. Un anticorpo secondario, anti-topo o anti-coniglio, coniugato a fosfatasi alcalina anti-IgG (H+L) (SIGMA) è stato aggiunto alla diluizione 1:3000 in PBS contenente 2,5% latte, e incubato per 1h a 37°C. La reazione è stata evidenziata con p-nitrofenol fosfato (SIGMA) in tampone 10mM dietanolamina, pH 10.

**Analisi delle sequenze.** Le sequenze delle regioni nucleotidiche codificanti l'ORF2 di norovirus sono state allineate con quelle presenti nel database NCBI, e le analisi filogenetiche sono state effettuate con il software Bionumerics V. 6.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgio).

## 7.2 RISULTATI

### Produzione di reattivi immunologici contro le VLP del ceppo GII.4

Sono stati prodotti sieri iperimmuni di coniglio e anticorpi monoclonali murini (MAb) contro la proteina capsidica virale VP1 di un ceppo di norovirus umano, da impiegare per lo sviluppo di test diagnostici. Per ottenere i sieri iperimmuni, due conigli sono stati immunizzati con le VLP di HuNoV purificate, utilizzando adiuvante di Freundt. I sieri sono stati analizzati in esperimenti di Western blotting utilizzando l'antigene ricombinante purificato. I sieri iperimmuni riconoscevano una sola banda relativa alla proteina con la taglia attesa (50 kDa) (dati non mostrati), identica alla

proteina riconosciuta da un siero umano di controllo contenente anticorpi anti-HuNoV GII.4 (gentilmente fornito dal professor Svensson, Università di Göteborg, Gothenburg, Svezia).

Le VLP di HuNoV sono state anche utilizzate per lo sviluppo di MAb in topi immunizzati per via parenterale. I cloni di ibridoma ottenuti dalla fusione degli splenociti murini con cellule di mieloma, sono stati analizzati per la produzione di MAb specifici tramite saggio ELISA contro VLP di norovirus e le colture riscontrate positive sono state selezionate e subclonate. Le colture stabilizzate sono state successivamente caratterizzate in base a saggi ELISA, Western blotting e Immunoperossidasi (dati non mostrati).

### **Separazione immunomagnetica (IMS) di norovirus di genogruppo II da campioni di feci**

Gli esperimenti di IMS sono stati condotti con campioni di feci positivi per un ceppo NoV GII.4 (Lordsdale), dello stesso genotipo del ceppo virale utilizzato per produrre le VLP, identificato in un focolaio epidemico dieci anni più tardi (2010). I due ceppi, anche se appartenenti allo stesso genotipo, sono, infatti, due diverse varianti virali in base alla corrente classificazione dei norovirus. La tabella 7.2 riporta i risultati ottenuti mediante immuno-cattura del virus dalle sospensioni fecali (prima riga) o utilizzando le stesse sospensioni non sottoposte a IMS (seconda riga). I due metodi di concentrazione sembrano essere entrambi sensibili, ma alla diluizione di  $10^{-6}$  il virus veniva rilevato solo nell'esperimento di cattura mediante IMS, indicando una maggiore concentrazione virale di circa 10 volte.

Metodo	Diluente	Volume (ml)	Diluizioni delle sospensioni fecali <sup>b</sup>							
			$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
<b>Con IMS, sfere con PAb</b>	<b>Acqua</b>	<b>1</b>	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>Senza IMS</b>	<b>Acqua</b>	<b>1</b>	+	+	+	+	+	-	-	-

**Tabella 7.2** IMS. Diluizioni seriali in base 10 delle sospensioni fecali positive per norovirus GII.4.

<sup>a</sup> Virus è stato identificato da RT-PCR e Real-time PCR dopo IMS.

<sup>b</sup> + Positivo RT-PCR; -, negativo RT-PCT.

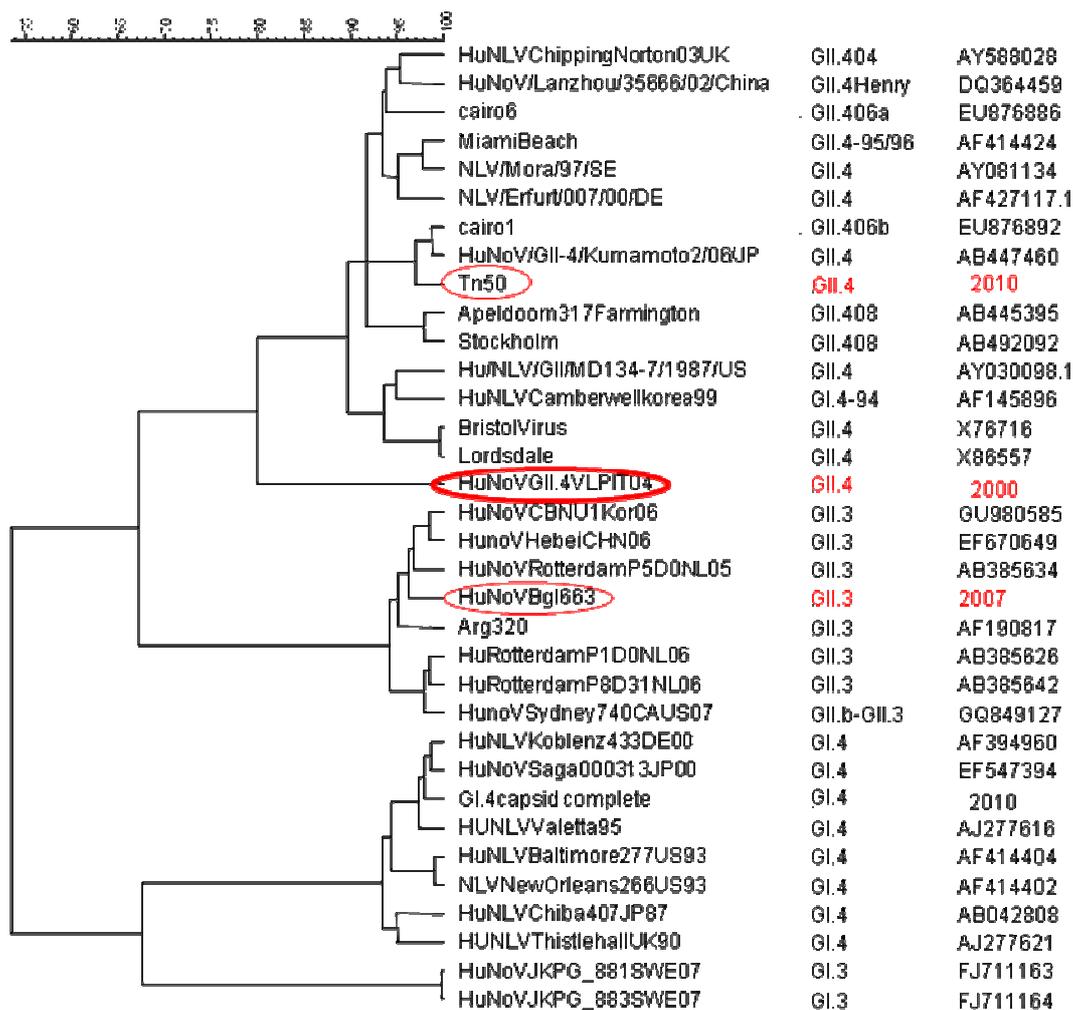
Per verificare se lo stesso esperimento di cattura potesse essere effettuato con un genotipo diverso rispetto al GII.4, l'esperimento di IMS è stato ripetuto utilizzando sospensioni fecali positive per il ceppo GII.3. La tabella 7.3 riporta i risultati ottenuti utilizzando siero iperimmune o anticorpo monoclonale diretti contro le VLP del ceppo GII.4. Gli anticorpi catturavano anche il ceppo eterologo GII.3, come confermato dai risultati positivi ottenuti in ELISA e in real-time PCR.

### **Analisi filogenetica delle sequenze capsidiche dei ceppi GII.4 e GII.3**

Le sequenze della regione capsidica ottenute dai ceppi utilizzati in questo studio sono state confrontate mediante analisi filogenetica. Come riportato nel dendrogramma (fig. 7.1), i due ceppi utilizzati (Lordsdale del 2000 e del 2010, GII.4) mostravano un'identità nucleotidica del 85% che raggiungeva l'89% a livello amminoacidico. L'identità tra i ceppi GII.4 e quelli GII.3 era invece del 65% a livello nucleotidico e del 70% a livello amminoacidico.

<b>Ceppo</b>	<b>Anno</b>	<b>Risultati qRT-PCR/RT-PCR</b>	<b>Risultati ELISA</b>
<b>GII.3</b>	<b>2007</b>	+	+
<b>GII.4</b>	<b>2010</b>	+	+

**Tabella 7.3** I campioni sono stati testati utilizzando proteina G incubata con anticorpi di siero iperimmune di coniglio antiHuNoV e con l'anticorpo monoclonale 1H2 diretto contro le VLP di GII.4 .



**Figura 7.1** Dendrogramma, costruito con il metodo UPGMA, in cui sono confrontate l'intera regione ORF2 (capsidica) dei ceppi utilizzati in questo studio (in rosso).

### 7.3 DISCUSSIONE

In questo capitolo è stata presentata la messa a punto di un metodo di separazione immunomagnetica (IMS) per la cattura di norovirus. Il metodo è basato sull'utilizzo di reattivi immunologici (mono e policlonale) prodotti contro le VLP di un ceppo di norovirus GII.4 del 2000. I risultati hanno dimostrato la capacità dei reattivi immunologici di catturare un ceppo *wild type* di GII.4 identificato nel 2010, con un'identità aminoacidica dell'89% con il ceppo GII.4 del 2000 utilizzato per produrre le VLP. Inoltre è risultato catturare con gli stessi reagenti particelle di un ceppo di norovirus GII.3, più distante filogeneticamente dal ceppo GII.4 2000, rispetto al quale

mostra un'identità aminoacidica del 70%. Il metodo, combinato con la real-time RT-PCR risulta essere più efficiente (di 10 volte) rispetto all'analisi del campione senza preventiva IMS. Per evidenziare l'avvenuta cattura del virus, oltre al metodo molecolare, è stato effettuato un test ELISA che permette di identificare la particella virale e non il genoma o porzioni di esso. Il test di IMS potrebbe rivelarsi un metodo utile per isolare e concentrare NoV da campioni con bassa carica virale, di particolare importanza in considerazione del fatto che non è ad oggi ancora disponibile un metodo di coltura cellulare per questi virus. Tuttavia, l'attuale limite per l'utilizzo dell'IMS nella diagnostica di NoV è rappresentato dall'elevata variabilità antigenica del virus stesso. I reattivi immunologici utilizzati nel nostro test, ottenuti immunizzando gli animali con VLP di un ceppo GII.4 identificato nel 2000 in Italia, riconoscono e catturano un'altra variante del ceppo GII.4, identificata di recente e riconoscono anche un genotipo distinto il GII.3, riconoscendo quindi epitopi comuni tra i ceppi GII.3 e GII.4. In esperimenti futuri, verrà valutata la capacità di legare altri genotipi di norovirus tra quelli maggiormente circolanti nell'uomo. E' importante sottolineare che esistono già in letteratura descrizioni di MAb che reagiscono con diversi genotipi di GI NoV e che reagiscono sia con GI che GII NoV (Shiota *et al.*, 2007). Questo suggerisce che una IMS / RT-PCR con ampia specificità per NoV può essere realizzata utilizzando reattivi immunologici ad ampio spettro, combinati con primer e sonde che consentano la rilevazione di più genotipi di NoV.

# Capitolo 8: Attivazione *ex-vivo* del sistema immunitario con VLP (virus like particle) di Norovirus umano GII.4.

## 8.1 INTRODUZIONE

I Norovirus sono considerati una delle principali cause di gastroenterite di origine non batterica a livello mondiale, rappresentando un rilevante problema per la sanità pubblica (Estes *et al.*, 2006; Bull *et al.*, 2012). In Europa, un recente rapporto della European Food Safety Authority (EFSA), ha riconosciuto il ruolo di questi virus quali importante causa di epidemie di gastroenterite acuta, la cui insorgenza può essere legata al consumo di alimenti contaminati, tra i quali frutti di bosco e ostriche (EFSA Panel on Biological Hazards, 2011).

Sulla base delle sequenze nucleotidiche, i NoV sono classificati in cinque genogruppi (GI, GII, GIII, GIV e il GV), tra cui i genogruppi I e II racchiudono la maggior parte dei genotipi che infettano l'uomo. Non tutti i genotipi sono ritrovati con la stessa frequenza, ma alcuni sono molto più comuni di altri. Sicuramente il genotipo GII.4, noto come ceppo Lordsdale, è il ceppo più frequente a livello mondiale. Ciò è probabilmente dovuto alla capacità di questo genotipo di mutare rapidamente, tanto che di anno in anno sono descritte nuove varianti virali, che grazie all'insorgenza di poche mutazioni possono presentare maggiore virulenza (Glass *et al.*, 2009; Donaldson *et al.*, 2011).

I Norovirus infettano individui di tutte le età e, probabilmente a causa della grande diversità dei ceppi, la risposta immunitaria non è duratura e non determina cross-protezione verso ceppi tra loro diversi; ciò causa la possibilità che gli adulti possono infettarsi più volte nel corso della vita (Roger *et al.*, 2009). Le informazioni sulla risposta immunitaria sono ridotte, non essendo disponibile un sistema di crescita *in vitro* per Norovirus umano. Per questo, la maggior parte delle informazioni su questi virus sono state acquisite utilizzando Virus-like particle (VLP) che vengono ottenute dall'espressione *in vitro*, attraverso il sistema baculovirus, della proteina del capsido virale (Glass *et al.*, 2009; Donaldson *et al.*, 2010). La proteina così espressa assembla a costituire una struttura VLP, indistinguibile dal virus *naïve*, sebbene sia priva al suo interno del materiale genetico. Le VLP, oltre che morfologicamente simili al virus *wild-type*, sono simili a questi anche dal punto di

vista antigenico, risultando utili anche per la messa a punto di test diagnostici, per la caratterizzazione del virus e per studi sulla risposta immunitaria (Estes *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2007). Le VLP in generale sono riconosciute dal sistema immunitario in modo non diverso dai virus infettanti (Noad *et al.* 2003) e sono considerate per un uso alternativo a vaccini vivi attenuati, o in assenza di vaccini altrimenti ottenibili, come ad esempio nel caso del vaccino commerciale per il papillomavirus (Wheeler *et al.*, 2008). Basse dosi di VLP di Norovirus somministrate ai topi stimolano la produzione di IgG e IgA (Guerrero *et al.*, 2001). Nell'uomo, è attualmente in fase II di sperimentazione clinica un vaccino ricombinante costituito da VLP di un ceppo umano GII.4 (Atmar *et al.*, 2011). Questa sperimentazione ha confermato che anche nell'uomo le VLP stimolano efficacemente risposte umorali con produzione di immunoglobuline di classe IgA e IgG specifiche (Tacket *et al.*, 2000; Atmar *et al.*, 2011). L'antigenicità delle VLP di Norovirus di origine umana (HuNoV) è stata valutata anche nel suino (Souza *et al.*, 2007a).

Nel luglio 2000, è stata descritta in Italia un'epidemia di gastroenterite, in cui è stato coinvolto un ceppo di Norovirus di GII.4 (Boccia *et al.*, 2002). Mediante il sistema del baculovirus, la proteina VP1 di questo ceppo GII.4 è stata espressa (Boccia *et al.*, 2002) producendone VLP. Nel presente studio, è stata valutata la risposta innata verso NoV dopo stimolazione *ex vivo* di cellule umane mononucleate del sangue periferico (PBMC) con le VLP prodotte GII.4. L'obiettivo è stato quello di studiare la risposta immunitaria di Norovirus utilizzando PBMC. I PBMC sono rappresentati principalmente da monociti, linfociti T e linfociti B, piccole quantità di cellule NK e cellule dendritiche di origine sia mieloide che plasmacitoide. Le cellule dendritiche sono fattori determinanti nelle malattie virali in quanto attivano la risposta immunitaria durante l'infezione virale e, in particolare, la risposta di linfociti T di tipo T helper (Steinman *et al.*, 2007). I risultati ottenuti hanno dimostrato la capacità di HuNoV VLP di indurre l'attivazione e la maturazione delle cellule dendritiche e dei monociti circolanti derivati da cinque donatori.

## 8.2 MATERIALI E METODI

**Produzione di VLP di HuNoV.** I metodi sono riportati nel capitolo 7, paragrafo 7.2.

**Immunizzazione di topi Balb/c.** Topi adulti Balb/c (12 settimane di età) sono stati immunizzati per via intraperitoneale a intervalli di 3 settimane con 25 µg di VLP di HuNoV purificate in presenza di adiuvante di Freund. Circa 12 giorni dopo l'ultimo booster, i campioni di siero sono stati prelevati dagli animali immunizzati e testati per la presenza di anticorpi anti-HuNoV utilizzando il test ELISA (vedi par. 3.1.2).

**Soggetti reclutati.** Cinque volontari sani (4 femmine e 1 maschio), con un'età media di 30 anni sono stati coinvolti in questo studio. Il sangue periferico è stato prelevato da ogni soggetto e trattato presso l'Istituto Nazionale Tumori "G. Pascale" di Napoli.

**Coltura cellulare.** Le PBMC sono state fatte replicare su terreno RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA) supplementato con 2 mM L-glutamina (Sigma), 10% siero fetale bovino (Life Technologies) e 2% di penicillina streptomina (5.000 UI/5 mg per ml, Biomedicals MP). Il terreno di coltura a lungo termine era costituito da RPMI 1640 integrato con 75 U/ml di interleuchina-2 ricombinante (rIL-2, R & D Systems).

**Preparazione PBMC.** PBMC umani sono stati isolati mediante centrifugazione in gradiente di densità con Ficoll-Hypaque e sono stati piastrati in sei pozzetti ad una concentrazione di circa  $10^7$  cellule/pozzetto. I PBMC isolati sono stati poi fatti replicare per 24 ore o per 6 giorni nel terreno RPMI 1640 integrato con rIL-2.

**Trattamento delle cellule.** PBMC sono stati trattati con VLP ricombinanti di NoV GII.4 (10 pg/ml). L'attività residua di lipopolisaccaride eventualmente presente nella preparazione di VLP è stata bloccata mediante preincubazione con 10 µg/ml di solfato di polimixina B (SIGMA). L'assenza di interferenza di attivazione dovuta al solfato di polimixina B nei risultati è stata verificata precedentemente (Buonaguro *et al.*, 2006). Come controllo positivo, le cellule sono state trattate con 8 mg/ml di lipopolisaccaride (LPS), mentre come controllo negativo è stato usato PBS. I PBMC sono stati raccolti dopo 24 h, o dopo 6 giorni per l'induzione a lungo termine. Le cellule raccolte sono state lavate con  $1 \times$  PBS senza calcio e magnesio e poi utilizzate per l'analisi fenotipica mediante citometria di flusso. I supernatanti cellulari sono stati raccolti per quantificare la produzione di citochine mediante ELISA.

**Citometria a flusso.** I PBMC sono stati incubati per 30 min a 4° C con anticorpi monoclonali umani specifici per CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CD123, CD11c e CD14 (BD Pharmingen, San Diego, CA), lavate ed analizzate con un citofluorimetro FACScalibur (BD Pharmingen). L'analisi dei dati è stata effettuata con il software WinMDI2.8.

**ELISA.** La descrizione dettagliata della metodica è riportata nel capitolo 3.1.2. In sintesi, le piastre per ELISA (NUNC) sono state incubate con 2µl di NoV GII.4 VLP (69 ng/µl), utilizzate come antigene in tampone PBS, per 18 ore a 4°C. Le piastre sono state poi incubate con i campioni di siero, in triplicato, a una diluizione 1:100; come controllo positivo è stato utilizzato un siero umano anti-NoV GII.4 (L. Svensson, Università di Linköping, Linköping, Svezia). Un anticorpo secondario anti-umano o anti-topo coniugato a fosfatasi alcalina è stato aggiunto alla diluizione di

1:3000. Dopo 1 h a 37°C, la reazione è stata evidenziata con p-nitrofenol fosfato (Sigma) in tampone 10mM dietanolamina, pH 10.

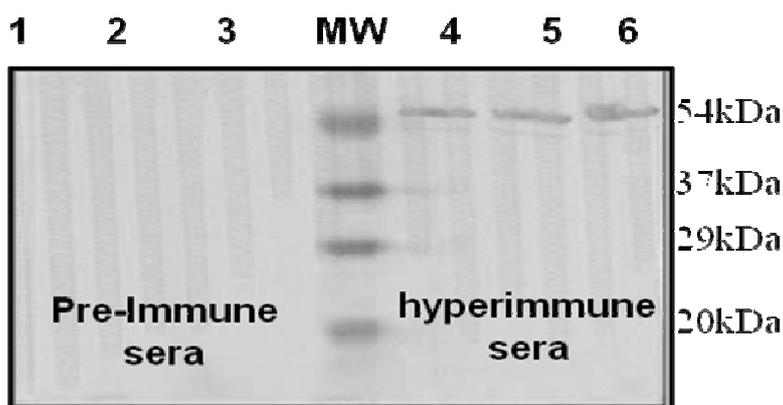
**Western blotting.** La descrizione dettagliata della metodica è riportata nel capitolo 3.1.2. In sintesi, 1 microgrammo di VLP sono state separate mediante SDS-PAGE e trasferite su membrana di nitrocellulosa. I sieri umani sono stati diluiti 1:100, e i sieri policlonali murino e umano, utilizzati come controllo positivo, sono stati diluiti 1:1000. L'anticorpo secondario coniugato a fosfatasi alcalina è stato aggiunto alla diluizione 1:3000. L'avvenuto legame dell'anticorpo è stato quindi rilevato mediante colorazione con NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium/bromo-cloro-indolilfosfato, Pierce).

### 8.3 RISULTATI

#### **Analisi sierologiche: test ELISA e Western blotting**

VLP di HuNoV sono state somministrate per via intraperitoneale in 3 topi Balb/c con adiuvante Freundt completo ed incompleto in tre booster. I campioni di siero sono stati raccolti da ciascun topo immunizzato dopo 14 giorni dalla terza somministrazione. Per saggiare la capacità dei sieri iperimmuni di riconoscere le VLP di NoV nella loro forma strutturata e valutare quindi l'immunogenicità delle VLP prodotte, sono stati eseguiti test ELISA e Western blotting. I risultati del test Western blotting sono riportati in figura 8.1; i tre sieri hanno generato una colorazione molto marcata di una proteina del peso molecolare atteso di 55 kDa, in corrispondenza delle VLP GII.4 (Figura 8.1, linee 5-7). Nessuna banda veniva riconosciuta utilizzando sieri murini pre-immunizzazione (fig. 8.1 linee 1-3). Tutti i sieri dei topi immunizzati hanno quindi riconosciuto le VLP in entrambi i test, ELISA e Western blotting, confermando che le VLP hanno indotto una risposta umorale, con un significativo incremento del titolo anticorpale anti-HuNoV nei sieri di topo.

I sieri prelevati dai 5 soggetti sani coinvolti in questo studio sono stati analizzati per la ricerca di anticorpi diretti contro Norovirus umano, mediante ELISA impiegando le VLP NoV GII.4 come antigene (vedi materiali e metodi, 8.2). Tutti i campioni di siero sono risultati positivi in ELISA, e tre di essi hanno riconosciuto le VLP anche in Western blotting (Tab. 8.1).



**Figura 8.1** Sieri iperimmuni di topo (linee 4, 5 e 6) analizzati mediante Western blotting usando le VLP ricombinanti di HuNoV. I sieri riconoscevano specificamente una singola banda proteica della dimensione attesa della proteina del capsido di NoV.

Soggetti	ELISA	Westernblotting
AP	Pos	Pos
EP	Pos	Neg
MLV	Pos	Neg
LG	Pos	Pos
PP	Pos	Pos

**Tabella 8.1** Immunoreattività delle VLP di HuNoV con cinque campioni di siero umano analizzati mediante test ELISA e Western blotting.

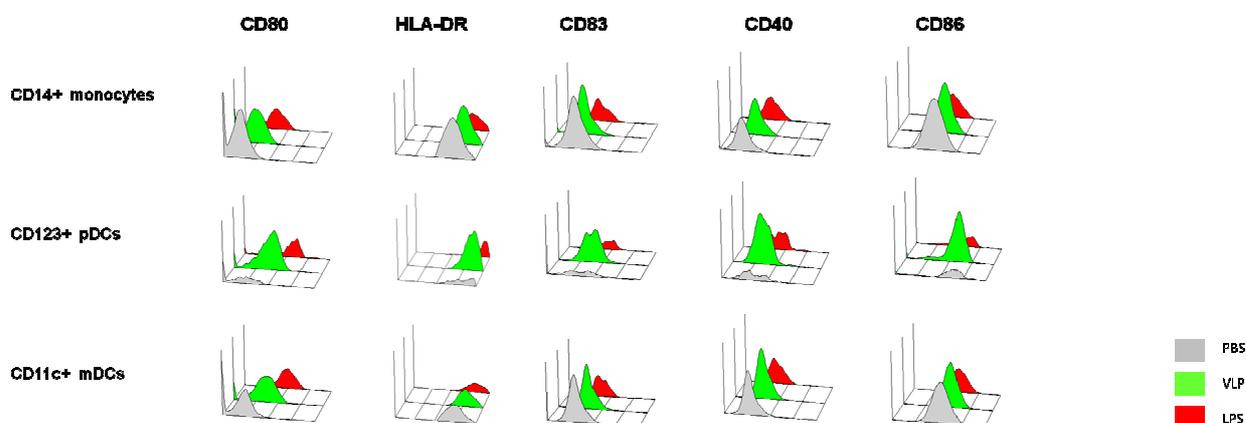
#### **Maturazione in PBMC indotta da VLP di NoV GII.4**

Le cellule mononucleari umane del sangue periferico (PBMC) ottenute dai 5 soggetti sono state isolate e incubate con 10 $\mu$ g/ml di VLP di NoV GII.4. Dopo stimolazione di 24 h, è stata valutata l'espressione dei marcatori di maturazione e di attivazione, quali CD80, HLA-DR, CD83, CD86 e CD40. I risultati hanno mostrato l'up-regolazione di tutti gli indicatori dei monociti CD14+, delle cellule dendritiche plasmacitoidi CD123+ (pDC) e delle cellule dendritiche mieloidi CD11c + (mDC) (Fig. 8.2). Anche se la stimolazione con le VLP di NoV ha indotto una aumentata espressione di marcatori di attivazione/maturazione in tutti i tipi di cellule, la risposta più evidente

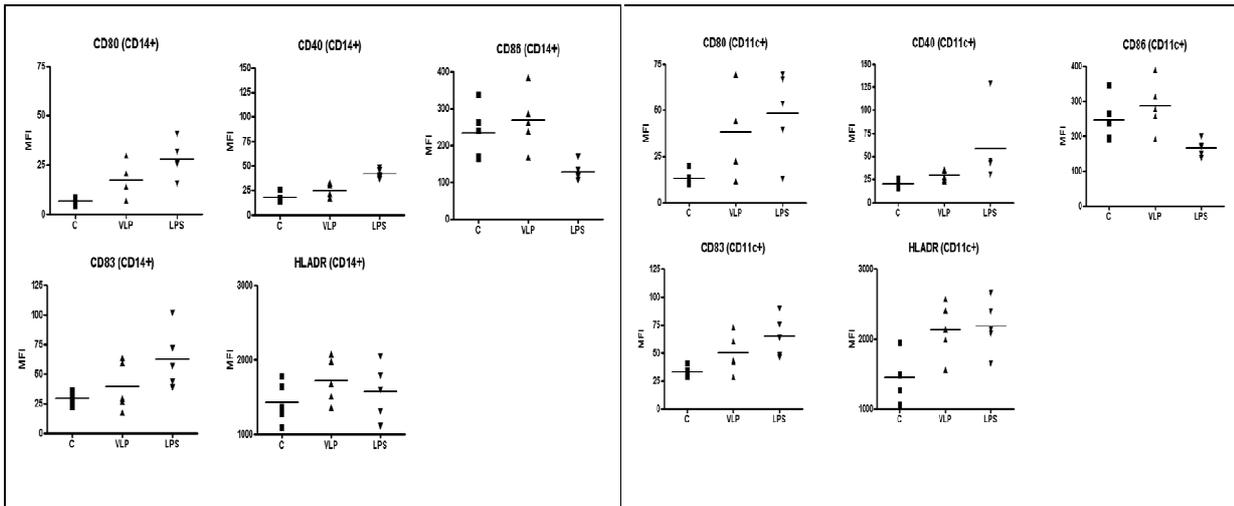
valutata in termini di indice medio di fluorescenza (MFI) è stata osservata nella popolazione CD11 + mDC (Fig.8.3).

### Produzione di citochine ex-vivo dopo stimolazione di PBMC con le VLP di HuNoV

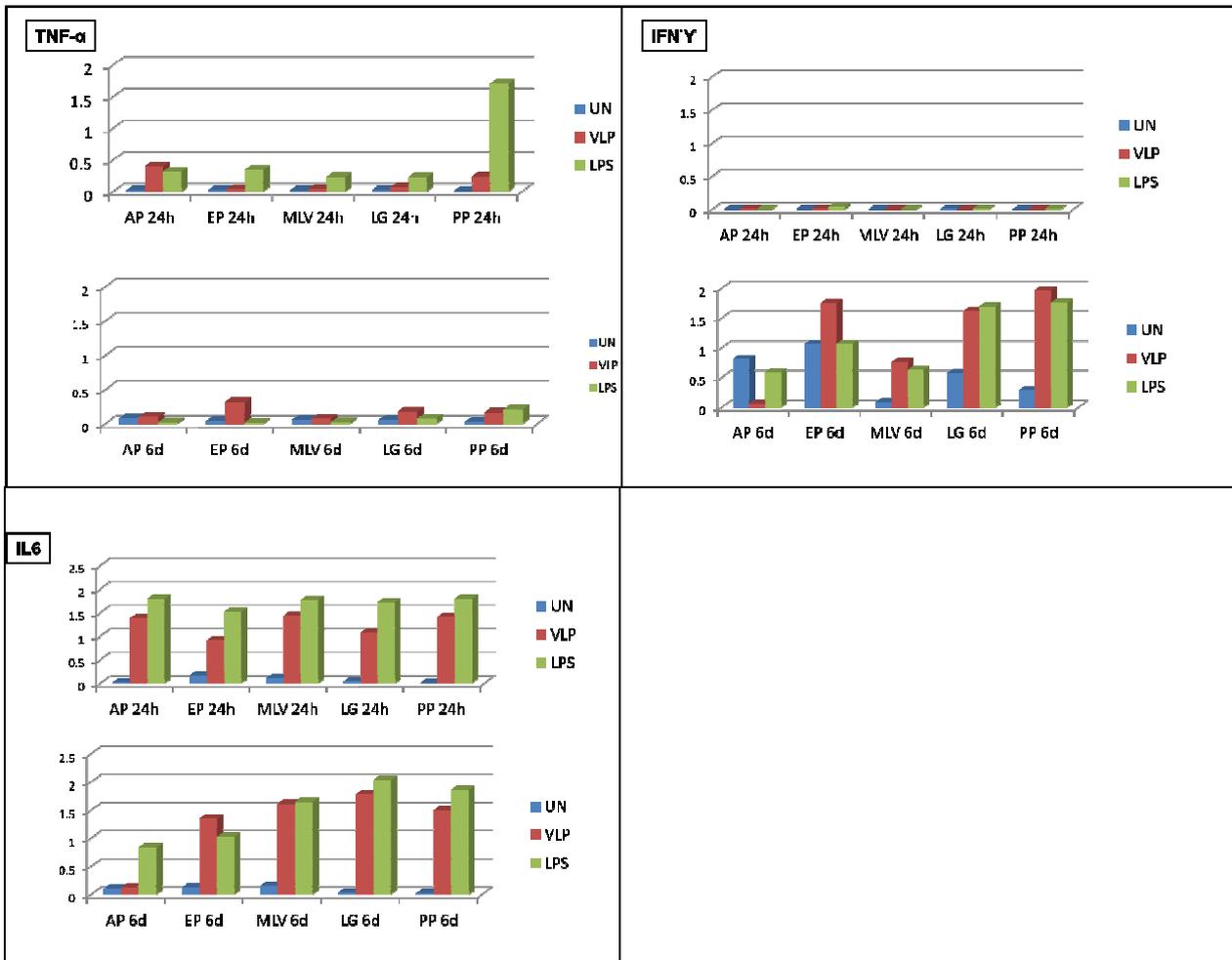
La maturazione dei PBMC è caratterizzata dalla produzione di citochine per implicate nell'attivazione dei linfociti T. E' stato valutato il livello di IFN- $\gamma$ , del fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ) e di IL-6 nel supernatante di coltura di PBMC umani dopo stimolazione con VLP di NoV GII.4 o con LPS. Le VLP inducevano la maturazione nei PBMC insieme alla produzione di citochine coinvolte nelle risposte Th1 e Th2. I livelli di interferone gamma (IFN- $\gamma$ ), di TNF- $\alpha$  e di IL-6 sono state valutate nel supernatante a distanza di 24 h e di 6 giorni dalla stimolazione delle colture di PBMC con VLP. Il trattamento delle cellule con VLP induceva un aumento della produzione di IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  nei PBMC di tutti i soggetti reclutati (Fig.8.4), e il livello medio basale di tutte le citochine mostrava differenze significative tra i soggetti.



**Figura 8.2** Analisi, utilizzando il citofluorimetro FACSclibur, dell'espressione di CD80, HLA-DR, CD83, CD40 e CD86; sono stati analizzati monociti CD14 +, CD123 + pDC , CD11c + MDC.



**Figura 8.3** L'espressione di maturazione di marker di attivazione e/o superficie, indotta da VLP di NoV GII.4 e LPS su PBMC provenienti da cinque soggetti sani, è indicato come Mean Fluorescence Index (MFI). CD14 + = monociti; CD11c + = mDC



**Figura 8.4** Analisi di citochine di tipo Th1 e Th2 indotte da VLP di NoV ed LPS in supernatanti di PBMC da cinque volontari. UN = non trattate.

## 8.4 DISCUSSIONE

Lo studio della risposta immunitaria di Norovirus né rilevante ai fini dello sviluppo di una possibile futura strategia di prevenzione, basata sull'utilizzo di vaccini.

Fino ad oggi, le conoscenze sulla risposta immunitaria che fa seguito all'infezione da Norovirus sono ridotte, principalmente a causa della mancanza di un sistema di coltura cellulare.

La maggior parte delle informazioni riguardanti la risposta immunitaria verso questi virus derivano dalle epidemie di Norovirus e da limitati studi *in vivo* nell'uomo. In assenza di virus replicanti *in vitro*, sono normalmente utilizzate VLP di Norovirus ottenute con il sistema ricombinante baculovirus, e che rispecchiano fedelmente morfologia e caratteri antigenici dei corrispondenti ceppi di virus nativo.

In questo studio, sono state utilizzate VLP ottenute presso i laboratori dell'ISS da un ceppo GII.4 di Norovirus umano, delle quali è stata descritta nei capitoli precedenti la capacità immunogenica in topi Balb/c e di cross-reagire con sieri di soggetti con anamnesi di infezione da NoV. In questo capitolo, è stata dimostrata la capacità delle stesse VLP di attivare la maturazione di cellule dendritiche e monociti derivati da cinque donatori, che presentavano anticorpi circolanti anti-Norovirus. Lo studio ha utilizzato i PBMC, per il ruolo chiave che questi per rivestono nei meccanismi di attivazione delle cellule presentanti l'antigene (APC) ai fini della risposta immunitaria attivata dall'antigene (Noad *et al.*, 2003). Poche informazioni sono disponibili in merito al ruolo delle cellule T nell'infezione da Norovirus. Recentemente, l'infezione sperimentale di un suino gnotobiotico con un ceppo umano GII.4 ha dimostrato l'induzione di risposte locali e sistemiche, con produzione sia di anticorpi anti-NoV GII.4 che di citochine, e la presenza di quest'ultime ha confermato che il ceppo GII.4 induce risposte di tipo Th1/Th2 (Souza *et al.*, 2007b). L'immunogenicità delle VLP di NoV, somministrate da sole o con adiuvante, è stata anche valutata in topi, i quali esibivano risposte immunitarie sistemiche e mucosali (intestinale e vaginale) (Guerrero *et al.*, 2001). Produzione di anticorpi circolanti e rilascio di interferone gamma sono stati anche osservati in volontari umani dopo somministrazione di VLP di NoV umano (Tacket *et al.*, 2003).

La presentazione di un antigene esogeno al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), in particolare all'MHC di classe I, stimola risposte CD8, generalmente attivate da antigeni sintetizzati dalla cellula stessa (via endogena), sia nel corso dell'infezione da naturale sia attraverso l'impiego di un vaccino a DNA (Buonaguro *et al.*, 2006). Tuttavia, gli antigeni dell'ambiente extracellulare possono anche essere presentati a molecole MHC di classe I e stimolare l'immunità delle cellule T CD8 (+), processo definito come "cross-presentazione" o "cross-priming" (Rock *et al.*, 2005, Heath *et al.*, 2003). Studi condotti negli ultimi anni su VLP, ne hanno dimostrato l'efficacia nello stimolare risposte CD4 e CTL, oltre a stimolare l'immunità di tipo umorale (Noad *et al.*, 2003, Moron *et al.*, 2003, Pinto *et al.*, 2003). In questo lavoro, è stato dimostrato che le VLP di un ceppo di NoV di genotipo GII.4 interagiscono con le cellule presentanti l'antigene (APC) e stimolano la secrezione di citochine, con la conseguente attivazione delle risposte Th-1 e Th-2, risultando in grado di indurre la maturazione dei PBMC prelevati dai 5 diversi volontari sani, con memoria immunologica di infezione da norovirus. Le VLP hanno indotto espressione di marcatori di attivazione e molecole co-stimolatorie nelle APC, specificamente monociti CD14 + e CD11 + DC mieloidi (mDC), in misura paragonabile al controllo positivo (trattamento con LPS). La risposta indotta riguardava l'espressione di marcatori di maturazione di superficie (CD80, CD83, CD86, CD40 e HLA-DR), nonché la produzione di citochine, come TNF- $\alpha$ , IL6 e IFN- $\gamma$ . In particolare, il livello di IL-6, sia nei soggetti a bassa ed alta sieropositività, risultava circa quattro volte più elevato che nel controllo negativo (PBS). E' noto che IL-6 promuove la differenziazione Th2 (Diehl *et al.*, 2002) e inibisce la produzione di IFN- $\gamma$  e la differenziazione in Th1 (Diehl *et al.*, 2000). I livelli di IL-6 negli individui studiati suggeriscono una polarizzazione di tipo Th2, come già riportato in precedenza (Buonaguro *et al.*, 2009). La risposta Th2 e il rilascio delle citochine (IL-6) indicano chiaramente un'induzione da parte delle VLP di NoV, mentre la bassa concentrazione di IFN- $\gamma$ , legata alla risposta di tipo Th1, suggerisce un persistente stato Th2. Tuttavia, la mancanza di produzione di TNF- $\alpha$  nei soggetti esaminati suggerisce infezione pregressa da NoV o ancora presente. Infatti, nessuna differenza significativa nella secrezione della citochina TNF- $\alpha$  (Th2) è stata osservata nei PBMC tra individui positivi per NoV, come precedentemente riportato per altre infezioni da Buonaguro e colleghi (2009). In conclusione, questo lavoro ha confermato che le VLP di NoV GII.4 sono in grado non solo di stimolare il sistema immunitario *in vivo* nei topi, ma stimolano anche il sistema immunitario in un sistema *ex-vivo* umano attivando risposte di tipo Th1 e Th2.

## Capitolo 9. Conclusioni

Già dagli anni '90 con lo sviluppo di allevamenti intensivi, e con la globalizzazione del commercio successivamente, l'aumento delle richieste produttive a livello mondiale è stato accompagnato da dall'accumulo di conoscenze e innovazioni tecniche importanti nella genetica, nell'alimentazione e nella sanità. In particolare, il miglioramento delle pratiche igienico-sanitarie e l'aumentata disponibilità di vaccini e farmaci hanno migliorato il controllo, la prevenzione e la terapia delle principali patologie infettive delle specie animali da reddito.

Al contempo, si è verificata l'insorgenza di "nuove" malattie infettive, causate da infezioni principalmente virali che oggi presentano un andamento endemico e potenzialità di trasmissione anche zoonotica.

L'esistenza di malattie in grado di essere naturalmente trasmesse dagli animali all'uomo è nota da secoli, e le zoonosi rappresentano oggi una questione prioritaria di salute pubblica con conseguenze sociali, economiche e sanitarie rilevanti. La necessità di un approccio complesso alle problematiche ad esse connesse, avente come obiettivo la tutela della salute umana e animale, richiede l'elaborazione di strategie flessibili, di vasta portata e capaci di intervenire nei diversi ambiti produttivi. Sul piano microbiologico, va inoltre tenuto in considerazione che gli agenti zoonotici, specialmente i virus, sono in continua evoluzione, anche in relazione ai cambiamenti continui nelle attività e stili di vita, dai viaggi in paesi a diversa endemia ai fenomeni di immigrazione, dalle abitudini alimentari ai commerci internazionali di alimenti e animali, ecc.

Le zoonosi virali sono causate da un gruppo eterogeneo di agenti trasmissibili. Nella maggior parte dei casi, l'uomo rappresenta un fondo cieco epidemiologico, incapace cioè di trasmettere l'infezione nell'ambito della propria specie. In altri casi, un progressivo adattamento di un virus alla specie umana può invece favorire il contagio interumano causando vere e proprie epidemie.

Gli alimenti possono essere contaminati da virus durante tutte le fasi della catena di produzione alimentare, e la trasmissione può avvenire per contatto con animali e/o prodotti contaminati o mediante il consumo di alimenti contaminati in origine o durante il processo produttivo (produzione primaria, o durante la lavorazione). I virus, contrariamente ad alcuni batteri responsabili di zoonosi alimentari, non si riproducono negli alimenti, ma possono persistere per lunghi periodi di tempo particelle conservando la propria infettività.

Anche alcuni virus umani, in particolare quelli responsabili di patologie gastroenteriche, possono contaminare gli alimenti attraverso l'inquinamento da acque reflue o dell'ambiente, o mediante la manipolazione dei prodotti alimentari, attraverso inadeguate pratiche di igiene degli operatori. Di

conseguenza, molti prodotti di origine animale o vegetale sostengono la trasmissione di infezioni virali per via alimentare.

Scopo generale della ricerca svolta durante il Dottorato di Ricerca in Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi è stato quello di ampliare le conoscenze sulla biologia, epidemiologia, e diagnosi di alcuni agenti emergenti di malattie a possibile trasmissione alimentare quali l'epatite acuta umana da virus dell'Epatite E (HEV) e le gastroenteriti acute (AGE) da calicivirus (Sapovirus e Norovirus). Inoltre, si è cercato di documentare e valutare la presenza di questi virus negli animali (suini e bovini), nelle varie fasi della trasformazione alimentare e, in taluni casi specifici, nell'ambiente. I dati, anche se preliminari, potranno essere utilizzati nella valutazione del rischio di zoonosi dovuto alla presenza di questi virus nell'ambiente e negli animali, e in alcuni prodotti di origine animale, considerando il possibile ruolo degli animali nella trasmissione zoonotica, in particolare per via alimentare.

La prima parte della tesi ha riguardato la produzione di antigeni virali attraverso l'espressione in sistemi ricombinanti (sistema ricombinante di baculovirus e il sistema Semliki Forest Virus Replicon) della proteina del capsido di un ceppo di HEV di origine suina. L'antigene espresso è stato utilizzato per la produzione di sieri policlonali e anticorpi monoclonali, impiegabili ai fini diagnostici e per la caratterizzazione virale (capitolo 3). Ciò ha permesso di realizzare uno studio di sieroprevalenza di anticorpi virus-specifici in suini domestici (sia in allevamento che al macello) e in cinghiali, impiegando tecniche quali ELISA, Western blotting e immunocitochimica. E' stato inoltre condotto uno studio diagnostico molecolare atto a valutare la presenza del genoma di HEV in campioni di feci, bile e fegato prelevati, prelevati da animali vivi e al macello. Sono stati inoltre analizzati i fattori di rischio di trasmissione di HEV nelle diverse fasi della filiera del suino.

I suini utilizzati in questo lavoro apparivano clinicamente sani, in linea con i dati presenti in letteratura, che confermando che l'infezione è normalmente asintomatica in questa specie animale (Clemente-Casares et al., 2003; Banks et al., 2004a; Zheng et al., 2006; Fernandez-Barredo et al., 2006).

I ceppi suini messi in evidenza nel corso dello studio risultavano caratterizzati da elevati gradi di identità nucleotidica, sia tra loro che con altri ceppi di origine suina e umana evidenziati in Europa negli ultimi anni. Questa osservazione conferma la capacità dei ceppi di HEV di diversa origine di formare clusters geografici, confermando indirettamente la possibilità di trasmissione di ceppi virali dal suino all'uomo e conseguentemente il potenziale zoonotico di HEV.

Nello studio di siero prevalenza anticorpale, è stata valutata la presenza di anticorpi contro HEV nei sieri dei suini impiegati per la precedente indagine. Come antigene è stata utilizzata la proteina capsidica codificata dall'ORF 2 di HEV, che è ritenuta la regione più importante ai fini della

risposta anticorpale (Panda et al., 2007; Aggarwal and Jameel, 2008). La valutazione della validità dei test ELISA e Western Blotting messi a punto nel corso del lavoro di tesi è stata realizzata esaminando sieri di suino e cinghiale provenienti dalla Sardegna e sieri di suino prelevati in un macello del Nord Italia (4.2, capitolo IV). Complessivamente, anche questi risultati hanno confermato una circolazione endemica di HEV negli allevamenti italiani, con elevati valori di prevalenza, in particolare negli animali adulti. L'elevata prevalenza di HEV nei suini italiani, in particolare quelli prossimi all'età di macellazione, può rappresentare un importante fattore di rischio per la trasmissione zoonosica di questo virus, con ripercussioni in termini di sanità pubblica. In particolare, i rischi per la salute umana potrebbero essere riconducibili a due ambiti distinti: a) contatto professionale con animali o carcasse e, b) esposizione accidentale al virus in ambito domestico.

Relativamente ai sapovirus, dalle scarse informazioni disponibili in letteratura si evince che, almeno apparentemente, le infezioni sostenute da questi virus sono poco diffuse, sia in Europa sia in altri continenti. Questo potrebbe essere ricondotto alla mancanza di un sistema di sorveglianza epidemiologica delle gastroenteriti virali, ma anche alle difficoltà di tipo diagnostico. Nonostante ciò, l'incidenza di patologie attribuibili ai sapovirus appare in aumento (Medici et al., 2006, Hansman et al., 2007). Le difficoltà diagnostiche derivano da alcuni aspetti intrinseci all'evoluzione genetica di questi virus ad RNA dalla bassa carica virale presente nei campioni clinici e ambientali destinati ai controlli di laboratorio. Un elemento di ulteriore preoccupazione è rappresentato dall'insorgenza di ceppi di sapovirus che appaiono dotati di notevole resistenza ambientale, e quindi più efficienti nel diffondersi attraverso la contaminazione alimentare e/o ambientale. Altro aspetto cruciale è la breve durata della patologia i cui sintomi sono molto lievi e scompaiono in pochi giorni, che fa sì che la maggior parte dei casi non venga diagnosticata e segnalata. Tutto questo determina una non appropriata valutazione epidemiologica delle infezioni da sapovirus nell'uomo, con la conseguente sottostima degli eventi epidemici che ne sono sostenuti.

Lo studio preliminare riportato in questa tesi, ha rilevato una prevalenza del 13% di calicivirus (tra NoV e SaV) nei suini clinicamente sani esaminati, indicando che questi virus stanno circolando endemicamente negli allevamenti italiani. I risultati indicano che nel suino è più comune la presenza di sapovirus, che appare in grado di infettare gli animali di pochi mesi di età, confermando quanto riportato anche da altri studi (Barry et al., 2008; Jeong et al., 2007; Martinez et al., 2006; Wang et al., 2006). Le analisi comparative di sequenza hanno dimostrato che i ceppi di PEC e NoV individuati sono correlati e geneticamente vicini ai ceppi umani. Quindi, sebbene non chiaramente dimostrata, la possibile trasmissione zoonotica di alcuni di questi patogeni virali non può altresì essere esclusa.

Nel complesso, i risultati dei lavori eseguiti hanno confermato la presenza di sapovirus sia in suini di allevamento sia in matrici ambientali; questa evidenza, associata all'elevato grado di omologia tra i ceppi di origine animale e i ceppi umani, indica un potenziale rischio di trasmissione zoonosica.

Nell'ultima parte della tesi sono stati oggetto di studio i norovirus (NoV) animali e umani. I NoV sono virus molto contagiosi e si diffondono facilmente sfruttando molteplici vie di trasmissione, che comprendono il contatto diretto persona-persona, l'aerosol, gli alimenti e le acque contaminate, (capitolo 2).

L'elevata diversità genetica e antigenica di questo gruppo di virus rappresenta l'ostacolo maggiore allo sviluppo di test diagnostici rapidi che possano essere adottati universalmente al fine di una diagnosi certa di infezione da NoV. La presenza di NoV nelle feci animali (bovini e suini), con o senza segni clinici di gastroenterite (capitoli 5 e 6), è un evento frequente, come già riportato in altri lavori (Ando et al., 2000; Van der Poel et al., 2000; Deng et al., 2003). Le analisi molecolari hanno dimostrato che i ceppi di origine animale e quelli di origine umana sono strettamente correlati. In particolare, i ceppi di norovirus suino (capitolo 5) sono inclusi nello stesso genogruppo (GII) di alcuni ceppi umani (Oliver et al., 2003; Sugieda et al., 1998; Wang et al., 2005). Per quanto riguarda il bovino, i risultati dallo studio riportato nel capitolo 6, non consentono di confermare l'ipotesi che questi animali possano essere un reale serbatoio di norovirus per l'uomo. In effetti, le distanze genetiche tra i virus (Oliver et al., 2003) e le differenze tra i recettori umani e animali (Farkas et al, 2005; Hutson et al., 2003) non supportano questa ipotesi. Inoltre, la mancanza di prove certe che ceppi identici siano identificati in entrambe le specie (uomo e bovina) non sostiene la possibilità di rischi effettivi di trasmissione zoonosica di calicivirus dal bovino (Oliver et al., 2003). L'esistenza di parziale cross-reattività tra epitopi di NoV umani e bovini (Batten et al, 2006; Oliver et al, 2006b) può invece spiegare il rilevamento di anticorpi contro ceppi di NoV animali negli esseri umani, come riportato nel capitolo 6.

Gli sforzi futuri saranno quelli di migliorare gli studi di sieroprevalenza anticorpale verso norovirus, per determinare investigare l'eventuale incidenza di sporadiche infezioni nell'uomo attribuibili a norovirus di origine bovina o suina. Un'altra necessità appare lo sviluppo di protocolli diagnostici armonizzati per i calicivirus di diversa origine, e che tengano conto della costante emersione di nuove varianti dei ceppi virali (Verhoef et al., 2008; Verhoef et al., 2009).

Per quanto riguarda i norovirus umani, l'obiettivo dei lavori presentati è stato quello di migliorare le conoscenze su questi virus sia in termini di evoluzione che di una loro possibile origine a seguito di trasmissione zoonotica.

Fino a non molti anni fa, la diagnosi di infezione da NoV era eseguita mediante l'osservazione delle particelle virali con la microscopia elettronica (EM), mentre oggi la reazione di retrotrascrizione e amplificazione polimerasica (RT-PCR) è a tutti gli effetti il test di routine per la diagnosi di infezione.

Data la difficoltà di disegnare *primers* ad ampio spettro, e la natura del genoma, di RNA a singola elica, suscettibile di grande evoluzione, la capacità di identificare i NoV con la RT-PCR differisce marcatamente da laboratorio a laboratorio. Per ovviare a questo problema, molti laboratori impiegano comunemente set multipli di *primers* specifici per differenti porzioni del genoma, ma questo causa inevitabilmente l'aumento dei costi e dei tempi diagnostici, specialmente se si considera la necessità di identificare il prodotto amplificato con sequenziamento nucleotidico.

Queste difficoltà hanno messo chiaramente in luce la necessità di sviluppare metodi diagnostici più semplici e rapidi, in grado di agevolare la diagnosi e lo studio sia dei casi sporadici che dei focolai epidemici di gastroenterite sostenuti da NoV.

Per molte infezioni virali, i test immunoenzimatici (ELISA) commerciali sono risultati una buona alternativa ai metodi molecolari per lo screening di campioni clinici, data la loro semplicità, rapidità e possibilità di essere adattati a studi su numeri di campioni elevati.

Nel caso di NoV, sono presenti in commercio da alcuni anni kit diagnostici ELISA che, a fronte di una specificità elevata, appaiono tuttavia solo parzialmente adeguati in termini di sensibilità. Questa scarsa efficienza è verosimilmente correlata alla variabilità antigenica e all'evoluzione dei norovirus, con l'insorgenza di nuovi genotipi o varianti virali. Lo studio riportato nell'ultima parte della tesi è stato condotto al fine di valutare la possibilità di sviluppare reagenti impiegabili in test diagnostici per la ricerca di NoV in campioni biologici, attraverso la produzione e la caratterizzazione di sieri iperimmuni e anticorpi monoclonali (MAb) contro la proteina capsidica virale VP1 di un ceppo GII.4 di norovirus isolato in Italia. Questo studio ha dimostrato che un MAb era in grado di legare varianti diverse del genotipo GII.4 di norovirus identificate negli ultimi anni, suggerendo l'esistenza di siti antigenici cross-reattivi. Questi risultati preliminari suggeriscono una possibile applicazione del MAb investigato ai fini della immuno-concentrazione di virus da campioni fecali, o da matrici alimentari e da campioni di acqua, dove in particolare i virus sono generalmente presenti in concentrazioni molto basse.

Nell'ultimo capitolo, sono stati riportati esperimenti *ex-vivo* sulla possibilità di utilizzare le VLP GII.4 per attivare il sistema immunitario umano. La maggior parte delle informazioni disponibili, riguardanti l'immunità nei confronti di norovirus, sono state raccolte durante lo studio di focolai epidemici e da studi *in vivo* nell'uomo, i quali hanno fornito gli unici strumenti disponibili per studiare la risposta immunitaria di Norovirus negli esseri umani. In questa assenza di sistemi *in*

*vitro* di coltivazione di norovirus, diversi strumenti molecolari sono stati sviluppati, come il sistema ricombinante baculovirus, che produce grandi quantità di proteina capsica di NoV e ne sostiene l'autoassemblaggio spontaneo in particelle simili a virus (VLP). Le VLP sono antigenicamente e morfologicamente indistinguibili dal virus nativo, e rappresentano uno strumento importante per lo studio delle interazioni ligando-virus e della risposta immunitaria, oltre ad essere potenzialmente utilizzabili come antigeni vaccinali. Le VLP investigate in questo studio sono risultate in grado di stimolare efficaci risposte immunitarie cellulari ed umorali. In particolare, le VLP di Nov GII.4 inducevano anche la maturazione e attivazione di PBMC umani, prelevati da 5 volontari (CAPITOLO 8).

La sicurezza degli alimenti e l'acqua sono considerati una priorità assoluta all'interno dell'UE, ma attualmente le linee guida disponibili non forniscono informazioni circa il monitoraggio e l'analisi del rischio legato alla possibile contaminazione con virus., né al riguardo della possibile origine zoonotica di alcuni agenti virali a trasmissione alimentare. Questa Tesi vuoto contribuisce informazioni sul ruolo dei Calicivirus e di HEV nella trasmissione zoonotica, e fornisce dati utili e strumenti diagnostici per una futura sorveglianza sulle gastroenteriti causate da questi virus.

In conclusione, la presenza di HEV, Norovirus e Sapovirus è stata riscontrata in animali vivi (suini e bovini) sia in campioni ambientali confermando la necessità di condurre studi e ricerche che possano meglio chiarire la biologia di questi virus, l'impatto dell'infezione negli allevamenti e nell'ambiente, i fattori di rischio ad essa correlati, e il ruolo degli animali come potenziale serbatoio d'infezione e le possibili implicazioni per la salute pubblica.

Tutte le ricerche riportate in questa Tesi rappresentano quindi il risultato di un unico filo conduttore attraverso il quale il virus dell'Epatite E e i calicivirus sono stati studiati con molteplici approcci di biologia molecolare, filogenesi, e infine di immunologia, con il risultato di un miglioramento delle conoscenze di questi virus.

# Ringraziamenti

Ringrazio prima di tutto il Dott. Franco Maria Ruggeri, per avermi guidato nei tre anni di attività di dottorato spronandomi a dare sempre il meglio e per i suoi consigli nella redazione della presente tesi.

Ringrazio il prof. Fabio Ostanello, che, nonostante gli ostacoli dovuti alla lontananza, mi ha aiutato nella stesura della tesi, in particolare per l'analisi statistica e l'analisi dei dati.

Ringrazio la Dott.ssa Ilaria Di Bartolo, per essermi stata vicina nei momenti cruciali dei miei esperimenti e della stesura della tesi, e per il suo fondamentale aiuto e conforto.

Ringrazio la Dott.ssa Marina Monini per il suo continuo sostegno e per i suoi preziosi suggerimenti durante questi anni.

Ringrazio per la disponibilità ed ospitalità durante la permanenza nei diversi stage che ho potuto fare durante il dottorato, e per le collaborazioni che hanno reso possibile la stesura di questa tesi:

- La Dott. ssa Michèle Bouloy, Unità di Genetica Molecolare di Bunyavirides, Istituto Pasteur Parigi;
- La Dott.ssa Nicole Pavio, ANSES-ENVA-INRA, Maisons-Alfort, Francia;
- La Dott.ssa Maria Capobianchi, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “Lazzaro Spallanzani” di Roma;
- Il Dott. Manuel Liciardi e la Dott.ssa Ginevra Orrù, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Dipartimento di Cagliari;
- Il Dott. Luigi Buonaguro Istituto Nazionale Tumori “Fond. G. Pascale” Napoli, U.O.C. di Biologia Molecolare e Oncogenesi Virale, diretta dal Dott. Franco Buonaguro.

Un ultimo, ma importante ringraziamento è per tutto il reparto di Zoonosi Virali del Dipartimento di Sanità Pubblica e Sicurezza Alimentare dell'Istituto Superiore di Sanità, un gruppo collaborativo dove tutti hanno messo a disposizione la loro esperienza e grazie ai loro preziosi consigli, il sostegno, la fiducia e la collaborazione, grazie alle quali ho potuto svolgere una proficua attività di ricerca.

## PUBBLICAZIONI

1. **Eleonora Ponterio, Ilaria Di Bartolo, Ginevra Orrù, Manuel Liciardi, Fabio Ostanello, Franco Maria Ruggeri.** Evaluation of methods for serological diagnosis of HEV infection in domestic and wild pigs. In fase di stesura.
2. **Eleonora Ponterio, Anna Carmen Petrizzo, Ilaria Di Bartolo, Franco Maria Buonaguro, Luigi Buonaguro, Franco Maria Ruggeri.** Pattern of activation induced by baculovirus-derived human norovirus virus-like-particles in circulating human dendritic cell. In fase di stesura.
3. **Di Bartolo Ilaria, Ponterio Eleonora, Castellini Laura, Ostanello Fabio, Ruggeri Franco Maria.** Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol.* 2011 May 5;149(3-4):330-8.
4. **Di Bartolo Ilaria, Ponterio Eleonora, Monini Marina, Ruggeri Franco Maria** A pilot survey of bovine Norovirus in Northern Italy. *Vet Rec.* 2011 Jul 16;169(3):73.

# Bibliografia

## *Bibliografia capitolo 1*

**Acharya, S. K. and S. K. Panda.** Hepatitis E virus: epidemiology, diagnosis, pathology and prevention. *Trop Gastroenterol.* 2006; **27**:63-8.

**Adlhoch C, Wolf A, Meisel H, Kaiser M, Ellerbrok H, Pauli G.** High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Vet Microbiol.* 2009; **139**:270-8.

**Adjei AA, Aviyase JT, Tettey Y, Adu-Gyamfi C, Mingle JA, Ayeh-Kumi PF, Adiku TK, Gyasi RK.** Hepatitis E virus infection among pig handlers in Accra, Ghana . *East Afr Med J.* 2009 **86**:359-63.

**Aggarwal, R., D. Kini, S. Sofat, S. R. Naik, and K. Krawczynski. 2000.** Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet.* **356**:1081-2.

**Aggarwal, R. and K. Krawczynski.** Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000; **15**:9-20.

**Aggarwal, R. and S. R. Naik.** Epidemiology of hepatitis E: Current status. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009.; **24**:1484-93.

**Ahmad T, Waheed Y, Tahir S, Safi SZ, Fatima K, Afzal MS, Farooqi ZU, Qadri I.** Frequency of HEV contamination in sewerage waters in Pakistan. *J Infect Dev Ctries.*; 2010; **4**:842-5.

**Arankalle, V. A., M. S. Chadha, S. D. Chitambar, A. M. Walimbe, L. P. Chobe, and S. S. Gandhe. 2001.** Changing epidemiology of hepatitis A and hepatitis E in urban and rural India (1982-98). *J Viral Hepat.* **8**:293-303.

**Arankalle, V. A., L. P. Chobe, M. V. Joshi, M. S. Chadha, B. Kundu, and A. M. Walimbe.** Human and swine hepatitis E viruses from Western India belong to different genotypes. *J Hepatol.* 2002. **36**:417-25.

**Arankalle, V. A., L. P. Chobe, and M. S. Chadha.** Type-IV Indian swine HEV infects rhesus monkeys. *J Viral Hepat.* 2006;**13**:742-5.

**Bajpai M, Gupta E.** Transfusion-transmitted hepatitis E: is screening warranted? *Indian J Med Microbiol.*; 2011; **29**:353-8.

**Banks, M., R. Bendall, S. Grierson, G. Heath, J. Mitchell, and H. Dalton.** Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* 2004a;**10**:953-5.

**Banks, M., G. S. Heath, S. S. Grierson, D. P. King, A. Gresham, R. Girones, F. Widen, and T. J. Harrison.** Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *Vet Rec.* 2004b. **154**:223-7.

**Banks, M., S. Grierson, H. J. Fellows, W. Stableforth, R. Bendall, and H. R. Dalton.** Transmission of hepatitis E virus. *Vet Rec.* 2007. **160**:202.

**Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Ali R, Dalton H.** A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol.* 2010; **82**:799-805.

**Boadella M, Casas M, Martín M, Vicente J, Segalés J, de la Fuente J, Gortázar C.** Increasing contact with hepatitis E virus in red deer, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2010;**16**:1994-6.

**Boccia, D., J. P. Guthmann, H. Klovstad, N. Hamid, M. Tatay, I. Ciglenecki, J. Y. Nizou, E. Nicand, and P. J. Guerin.** High mortality associated with an outbreak of hepatitis E among displaced persons in Darfur, Sudan. *Clin Infect Dis.* 2006; **42**: 1679-84.

**Borgen K, Herremans T, Duizer E, Vennema H, Rutjes S, Bosman A, de Roda Husman AM, Koopmans M.** Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; a case series 2004 - 2006. *BMC Infect Dis.* 2008; **8**:61.

**Boutrouille A, Bakkali-Kassimi L, Crucière C, Pavio N.** Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in French blood donors. *J Clin Microbiol.* 2007 Jun; **45**:2009-10.

**Bouquet J, Tessé S, Lunazzi A, Eloit M, Rose N, Nicand E, Pavio N.** Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008-2009. 2011 *Emerg Infect Dis.*; **17**:2018-25.

**Bouwknegt, M., S. A. Rutjes, C. B. Reusken, N. Stockhofe-Zurwieden, K. Frankena, M. C. de Jong, A. M. de Roda Husman, and W. H. van der Poel. 2009.** The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res.* **4**:5:7.

**Brost S, Wenzel JJ, Ganten TM, Filser M, Flechtenmacher C, Boehm S, Astani A, Jilg W, Zeier M, Schnitzler P.** Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E virus infection in Southwest Germany. *J Clin Virol.* 2010; **47**:89-92.

**Buti, M., P. Clemente-Casares, R. Jardi, M. Formiga-Cruz, M. Schaper, A. Valdes, F. Rodriguez-Frias, R. Esteban, and R. Girones.** Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J Hepatol.* 2004. **41**: 126-31.

**Cacciola I, Messineo F, Cacopardo B, Di Marco V, Galli C, Squadrito G, Musolino C, Saitta C, Pollicino T, Raimondo G.** Hepatitis E virus infection as a cause of acute hepatitis in Southern Italy. *Dig Liver Dis.* 2011; **43**:996-1000.

**Cacopardo, B., R. Russo, W. Preiser, F. Benanti, G. Brancati, and A. Nunnari.** Acute hepatitis E in Catania (eastern Sicily) 1980-1994. The role of hepatitis E virus. *Infection.* 1997. **25**:313-6.

**Caprioli, A., F. Martelli, F. Ostanello, L Di Bartolo, F. M. Ruggeri, L. Del Chiaro, and F. Tolari.** Detection of hepatitis E virus in Italian pig herds. *Vet Res.* 2007. **161**:422-3.

**Chandra, V., S. Taneja, M. Kalia, and S. Jameel.** Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci.* 2008 **33**: 451-464.

**Choi, C. and C. Chae.** Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. *J Hepatol.* 2003;**38**:827-32.

**Clemente-Casares, P., S. Pina, M. Buti, R. Jardí, M. Martín, S. Bofill-Mas, and R. Girones..** Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis.* 2003; **9**:448-54.

**Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, Heyries L, Raoult D, Gerolami R.** Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis.* 2010; **202**:825-34.

**Corwin, A. L., H. B. Khiem, E. T. Clayson, K. S. Pham, T. T. Vo, T. Y. Vu, T. T. Cao, D. Vaughn, J. Merven, T. L. Richie, M. P. Putri, J. He, R. Graham, F. S. Wignall, and K. C. Hyams..** A waterborne outbreak of hepatitis E virus transmission in southwestern Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; **54**:559-62.

**Dalton, H. R., H. J. Fellows, E. J. Gane, P. Wong, S. Gerred, B. Schroeder, M. C. Croxson, and O. Garkavenko..** Hepatitis E in New Zealand. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007a; **22**: 1236-40.

**Dalton HR, Bendall RP, Rashid M, Ellis V, Ali R, Ramnarace R, Stableforth W, Headdon W, Abbott R, McLaughlin C, Froment E, Hall KJ, Michell NP, Thatcher P, Henley WE.** Host risk factors and autochthonous hepatitis E infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*; 2011; **23**:1200-5.

**Dalton, H. R., P. H. Thurairajah, H. J. Fellows, H. S. Hussaini, J. Mitchell, R. Bendall, M. Banks, S. Ijaz, C. G. Teo, and D. F. Levine..** Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J Viral Hepat.* 2007b; **14**:304-9.

**Dalton, H. R., R. Bendall, S. Ijaz, and M. Banks.** Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis.* 2008; **8**:698-709.

**de Deus N, Casas M, Peralta B, Nofrarias M, Pina S, Martín M, Segalés J.** Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol.* 2008; **132**:19-28.

**de Deus, N., B. Peralta, S. Pina, A. Allepuz, E. Mateu, D. Vidal, F. Ruiz-Fons, M. Martín, C. Gortazar, and J. Segales.** Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet Microbiol.* 2007; **129**:163-70.

**de Deus N, Peralta B, Pina S, Allepuz A, Mateu E, Vidal D, Ruiz-Fons F, Martín M, Gortázar C, Segalés J.** Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet Microbiol.*; 2008; **129**:163-70.

**Dell'Amico MC, Cavallo A, Gonzales JL, Bonelli SI, Valda Y, Pieri A, Segund H, Ibañez R, Mantella A, Bartalesi F, Tolari F, Bartoloni A.** Hepatitis E virus genotype 3 in humans and Swine, Bolivia. *Emerg Infect Dis.* 2011; **17**:1488-90.

**Di Bartolo I, F. Martelli, N. Inglese, M. Pourshaban, A. Caprioli, F. Ostanello, F.M. Ruggeri.** Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet Microb.* 2008.**132**:47-55.

**Di Bartolo I, Ponterio E, Castellini L, Ostanello F, Ruggeri FM.** Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol.* 2011;**149**:330-8.

**Drobeniuc, J., M. O. Favorov, C. N. Shapiro, B. P. Bell, E. E. Mast, A. Dadu, D. Culver, P. Iarovoi, B. H. Robertson, and H. S. Margolis.** Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis.* 2001.**184**:1594-7.

**Emerson, S. D. and R. H. Purcell.** Hepatitis E virus. *Rev Med Virol.* 2003.**13**:145-54.

**Emerson, S.U., H. Nguyen, J. Graff, D.A. Stefany, A. Brockington and R.H. Purcell.** In vitro replication of Hepatitis E virus (HEV) genomes and of HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J Virol.* 2004; **78**: 4838-46.

**Emerson, S. D., V. A. Arankalle, and R. H. Purcell.** Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis.* 2005; **192**:930-3.

**Erker, J. C., S. M. Desai, G. G. Schlauder, G. J. Dawson, and I. K. Mushahwar. 1999.** A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J Gen Virol.* 80 (Pt 3):681-90.

**Fauquet C.M., M. M. A. M. J. D. V. B. L. A.** Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. 2005 853-857..

**Favorov, M. O., M. Y. Kosoy, S. A. Tsarev, J. E. Childs, and H. S. Margolis.** Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J Infect Dis.* 2000; **181**:449-55.

**Feagins, A. R., T. Opriessnig, D. K. Guenette, P. G. Halbur, and X. J. Meng.** Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol.* 2007; **88**:912-7.

**Feagins, A. R., T. Opriessnig, D. K. Guenette, P. G. Halbur, and X. J. Meng.** Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol.* 2008; **123** : 32-37.

**Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian, R. H. Purcell, H. J. Alter, and P. V. Holland.** Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med.* 1975; **292**:767-70.

**Fernandez-Barredo, S., C. Galiana, A. Garcia, M. T. Gomez-Munoz, S. Vega, M. A. Rodriguez-Iglesias, and M. T. Perez-Gracia.** Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs. *Can J Vet Res.* 2007; **71**:236-40.

**Fogeda, M. Fogeda, A. Avellon, C.G. Cilla, and J.M. Echevarria.** Imported and Autochthonous Hepatitis E Virus Strains in Spain. *J Med Virol.* 2009; **81**:1743–1749.

**Goens, S. D. and M. L. Perdue.** Hepatitis E viruses in humans and animals. *Anim Health Res Rev.* 2004; **5**:145-56.

**Guerrero-Latorre L, Carratala A, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Hundesa A, Girones R.** Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in Eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources. *J Water Health*; 2011; **9**:515-24.

**Ha, S. K. and C. Chae.** Immunohistochemistry for the detection of swine hepatitis E virus in the liver. *J Viral Hepat.* 2004; **11**:263-7.

**Haagsman A, Reuter G, Duizer E, Nagy G, Herremans T, Koopmans M, Szücs G.** Seroepidemiology of hepatitis E virus in patients with non-A, non-B, non-C hepatitis in Hungary. *J Med Virol.* 2007; **79**:927-30.

**Halbur, P. G., C. Kasorndorkbua, C. Gilbert, D. Guenette, M. B. Potters, R. H. Purcell, S. U. Emerson, T. E. Toth, and X. J. Meng.** Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol.* 2001; **39**:918-23.

**Haqshenas, G., F. F. Huang, M. Fenaux, D. K. Guenette, F. W. Pierson, C. T. Larsen, H. L. Shivaprasad, T. E. Toth, and X. J. Meng.** The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J Gen Virol.* 2002; **83**:2201-9.

**Haqshenas, G., H. L. Shivaprasad, P. R. Woolcock, D. H. Read, and X. J. Meng.** 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. **82**:2449-62.

**He J., B. L. Innis, M. P. Shrestha, E. T. Clayson, R. M. Scott, K. J. Linthicum, G. G. Musser, S. C. Gigliotti, L. N. Binn, R. A. Kuschner, and D. W. Vaughn.** Evidence that rodents are a reservoir of hepatitis E virus for humans in Nepal. *J Clin Microbiol.* 2006; **44**:1208.

**Herremans, M., E. Duizer, E. Jusic, and M. P. Koopmans.** Detection of hepatitis E virus-specific immunoglobulin a in patients infected with hepatitis E virus genotype 1 or 3. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; **14**:276-80.

**Hsieh, S. Y., X. J. Meng, Y. H. Wu, S. T. Liu, A. W. Tam, D. Y. Lin, and Y. F. Liaw.** Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol.* 1999; **37**:3828-34.

**Huang, F. F., G. Haqshenas, D. K. Guenette, P. G. Halbur, S. K. Schommer, F. W. Pierson, T. E. Toth, and X. J. Meng.** 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 Microbiol.* 2002; **40**: 1326-32.

**Huang, F. F., Z. F. Sun, S. U. Emerson, R. H. Purcell, H. L. Shivaprasad, F. W. Pierson, T. E. Toth, and X. J. Meng.** Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol.* 2004; **85**:1609-18.

**Ijaz, S., E. Arnold, M. Banks, R. P. Bendall, M. E. Cramp, R. Cunningham, H. R. Dalton, T. J. Harrison, S. F. Hill, L. Macfarlane, R. E. Meigh, S. Shafi, M. J. Sheppard, J. Smithson, M. P. Wilson, and C. G. Teo.** Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis.* 2005; **192**: 1166-72.

**Ippagunta, S. K., S. Naik, B. Sharma, and R. Aggarwal.** Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. *J Med Virol.* 2007; **79**:1827-31.

**Jameel, S.** Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert Rev Mol Med.* 1999;**1**-16.

**Jary, C.** Hepatitis E and meat carcasses. *Br J Gen Pract.* 2005; **55**:557-8.

**Johne R, Plenge-Bönig A, Hess M, Ulrich RG, Reetz J, Schielke A.** Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol.* 2010; **91**:750-8.

**Jung, K., B. Kang, D. S. Song, and C. Chae.** Prevalence and genotyping of hepatitis E virus in swine population in Korea between 1995 and 2004: a retrospective study. *Vet J.* 2007; **173**:683-7.

**Kaci S, Nöckler K, Johne R.** Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. *Vet Microbiol*; 2008;**128**:380-5.

**Kamel AH, Ali MA, El-Nady HG, Deraz A, Aho S, Pothier P, Belliot G.** Presence of enteric hepatitis viruses in the sewage and population of Greater Cairo. *Clin Microbiol Infect.*; 2011; **17**:1182-5.

**Kasomdorkbua, C., D. K. Guenette, F. F. Huang, P. J. Thomas, X. J. Meng, and P. G. Halbur.** Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**:5047-52.

**Kaufmann A, Kenfak-Foguena A, André C, Canellini G, Bürgisser P, Moradpour D, Darling KE, Cavassini M.** Hepatitis E virus seroprevalence among blood donors in southwest Switzerland. 2011. *PLoS One.*; **6**:e21150.

**Khameneh ZR, Sepehrvand N, Hatami S, Afshari AT.** The seroprevalence of Helicobacter pylori infection in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2011; **43**:3720-2.

**Khuroo MS, Kamili S, Khuroo MS.** Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J Viral Hepat.* 2009 Jul; **16**:519-23.

**Khuroo MS, Rustgi VK, Dawson GJ, Mushahwar IK, Yattoo GN, Kamili S, Khan BA.** Spectrum of hepatitis E virus infection in India. *J Med Virol.* 1994; **43**:281-6.

**Kokkinos PA, Ziros PG, Mpalasopoulou A, Galanis A, Vantarakis A.** Molecular detection of multiple viral targets in untreated urban sewage from Greece. *Viol J.*; 2011; **8**:195.

**Koonin, E. V., A. E. Gorbalenya, M. A. Purdy, M. N. Rozanov, G. R. Reyes, and D. W. Bradley.** Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; **89**:8259-63.

**Krüttgen A, Scheithauer S, Häusler M, Kleines M.** First report of an autochthonous hepatitis E virus genotype 3 infection in a 5 month old female child in Germany. *J Clin Virol.* 2011; **50**:175-6.

**Kuniholm MH, Purcell RH, McQuillan GM, Engle RE, Wasley A, Nelson KE.** Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J Infect Dis.* 2009; **200**:48-56.

**Kuno, A.,K. Ido, N. Isoda, Y. Satoh, K. Ono, S. Satoh, H. Inamori, K. Sugano, N. Kanai, T. Nishizawa, and H. Okamoto.** Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus. *Hepatol Res.* 2003; **26**:237-242.

**Labrique AB, Zaman K, Hossain Z, Saha P, Yunus M, Hossain A, Ticehurst JR, Nelson KE.** Epidemiology and risk factors of incident hepatitis E virus infections in rural Bangladesh. *Am J Epidemiol.* 2010; **172**:952-61.

**La Fauci V, Sindoni D, Grillo OC, Calimeri S, Lo Giudice D, Squeri R.** Hepatitis E virus (HEV) in sewage from treatment plants of Messina University Hospital and of Messina City Council. *J Prev Med Hyg;* 2010; **51**:28-30.

**La Rosa G, Muscillo M, Vennarucci VS, Garbuglia AR, La Scala P, Capobianchi MR.** Hepatitis E virus in Italy: molecular analysis of travel-related and autochthonous cases. *J Gen Virol.* 2011; **92**:1617-26.

**La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Vennarucci VS, Muscillo M.** Molecular detection of hepatitis E virus in sewage samples.; 2010. **76**:5870-3.

**Leblanc D, Poitras E, Gagné MJ, Ward P, Houde A.** Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. 2010. **139**:206-9.

**Lewis, H., D. Morgan, S. Ijaz, and E. Boxall.** Indigenous hepatitis E virus infection in England and Wales. *BMJ.* 2006; **332**:1509-10.

**Lewis, H. C., S. Boisson, S. Ijaz, K. Hewitt, S. L. Ngui, E. Boxall, C. G. Teo, and D. Morgan.** Hepatitis E in England and Wales. *Emerg Infect Dis.* 2008; **14**:165-7.

**Lewis HC, Wichmann O, Duizer E.** Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol Infect.* 2010;**138**:145-66.

**Li F, Loke P, Healy A, Lightowlers MW, Gauci CG, Purcell DF, Anderson DA.** The effect of antigen targeting sequences on antibody responses to hepatitis E virus DNA vaccines in rats and sheep. *Vaccine.* 2006; **24**:1367-77.

**Li, R. C., S. X. Ge, Y. P. Li, Y. J. Zheng, Y. Nong, Q. S. Guo, J. Zhang, M. H. Ng, and N. S. Xia.** Seroprevalence of hepatitis E virus infection, rural southern People's Republic of China. *Emerg Infect Dis.* 2006a.; **12**:1682-8.

**Li, X., S. Kamili, and K. Krawczynski.** Quantitative detection of hepatitis E virus RNA and dynamics of viral replication in experimental infection. *J Viral Hepat.* 2006b; **13**:835-9.

**Li, T. C., T. Miyamura, and N. Takeda..** Short report: detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; **76**:170-172.

**Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y, Wang JC, Engvall H, Hammar L, Xing L, Cheng RH.** Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol.* 2005; **79**:12999-3006.

**Li W, Shu X, Pu Y, Bi J, Yang G, Yin G.** Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in Yunnan Province, China. *Arch Virol.* 2011;**156**:1989-95.

**Lu, L., C. Li, and C. H. Hagedorn.** Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol.* 2006.**16**:5-36.

**Lu L, Drobeniuc J, Kobylnikov N, Usmanov RK, Robertson BH, Favorov MO, Margolis HS.** Complete sequence of a Kyrgyzstan swine hepatitis E virus (HEV) isolated from a piglet thought to be experimentally infected with human HEV. *J Med Virol.* 2004;**74**:556-62.

**Maneerat Y, Clayson ET, Myint KS, Young GD, Innis BL.** Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J Med Virol.* 1996; **48**:121-8.

**Mansuy JM, Abravanel F, Miedouge M, Mengelle C, Merviel C, Dubois M, Kamar N, Rostaing L, Alric L, Moreau J, Peron JM, Izopet J.** Acute hepatitis E in south-west France over a 5-year period. *J Clin Virol.* 2009; **44** :74-7.

**Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Sauné K, Miédouge M, Ellis V, Rech H, Destruel F, Kamar N, Dalton HR, Izopet J.** Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France.. *Emerg Infect Dis.*; 2011; **17**:2309-12.

**Mansuy JM, Legrand-Abravanel F, Calot JP, Peron JM, Alric L, Agudo S, Rech H, Destruel F, Izopet J.** High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in blood donors from South West France. *J Med Virol.* 2008; **80**:289-93.

**Martelli F, Caprioli A, Zengarini M, Marata A, Fiegna C, Di Bartolo I, Ruggeri FM, Delogu M, Ostanello F.** Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet Microbiol.*; 2008; **126**:74-81.

**Masuda, J., K. Yano, Y. Tamada, Y. Takii, M. Ito, K. Omagari, and S. Kohno.** Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, *Japan. Hepatol Res.* 2005; **31**: 178-83.

**Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, Takahashi K, Shindo M, Kato M, Sato S, Kato T, Nishimori H, Tsuji K, Maguchi H, Yoshida J, Maekubo H, Mishiro S, Ikeda H.** A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion*; 2008; **48**:1368-75.

**Matsuda, H., K. Okada, K. Takahashi, and S. Mishiro.** Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis.* 2003; **188**:944.

**Meng XJ.** Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2003; **278**:185-216.

**Meng XJ.** Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol.* 2010;**140**:256-65.

**Meng, X. J., P. G. Halbur, J. S. Haynes, T. S. Tsareva, J. D. Bruna, R. L. Royer, R. H. Purcell, and S. U. Emerson.** Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol.* 1998a ; **143**:1405-15.

**Meng, X. J., P. G. Halbur, M. S. Shapiro, S. Govindarajan, J. D. Bruna, I. K. Mushahwar, R. H. Purcell, and S. U. Emerson.** Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol.* 1998b ; **72**:9714-21.

**Meng, X. J., R. H. Purcell, P. G. Halbur, J. R. Lehman, D. M. Webb, T. S. Tsareva, J. S. Haynes, B. J. Thacker, and S. U. Emerson.** A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:9860-5.

**Meng, X. J., B. Wiseman, F. Elvinger, D. K. Guenette, T. E. Toth, R. E. Engle, S. U. Emerson, and R. H. Purcell.** 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**: 117-22.

**Meng, X. J.** Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol.* 2009

**Motte A, Roquelaure B, Galambrun C, Bernard F, Zandotti C, Colson P.** Hepatitis E in three immunocompromized children in southeastern France. *J Clin Virol.*; 2012; **53**:162-6.

**Nanda SK, Panda SK, Durgapal H, Jameel S.** Detection of the negative strand of hepatitis E virus RNA in the livers of experimentally infected rhesus monkeys: evidence for viral replication. *J Med Virol.* 1994; **42**:237-40.

**Nakamura, M., K. Takahashi, K. Taira, M. Taira, A. Ohno, H. Sakugawa, M. Arai, and S. Mishiro.** Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res.* 2006; **34**:137-40.

**Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT.** Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int.* 2008; **28**:1190-9.

**Nelson KE, Kmush B, Labrique AB.** The epidemiology of hepatitis E virus infections in developed countries and among immunocompromised patients. *Expert Rev Anti Infect Ther.*; 2011; **9**:1133-48.

**Ning, H., S. Yu, Y. Zhu, S. Dong, R. Yu, S. Shen, Z. Niu, and Z. Li.** Genotype 3 hepatitis E has been widespread in pig farms of Shanghai suburbs. *Vet Microbiol.* 2008; **126**:257-263.

**Nishizawa, T., M. Takahashi, H. Mizuo, H. Miyajima, Y. Gotanda, and H. Okamoto.** Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99 % identity over the entire genome. *J Gen Virol.* 2003; **84**:1245-51.

**Norder, H., L. Sundqvist, L. Magnusson, S. Østergaard Breum, M. Löfdahl, L. E. Larsen, C. K. Hjulsager, L. Magnius, B. E. Böttiger, F. Widén.** Endemic hepatitis E in two Nordic countries. *Eurosurveillance.* 2009; Vol 14.

**Okamoto H.** Efficient cell culture systems for hepatitis E virus strains in feces and circulating blood. *Rev Med Virol.* 2011; **21**:18-31.

**Okamoto H.** Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 2007; **127**:216-28.

**Okamoto, H.** Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 2007; **127**: 216-218.

**Orrù, G., G. Masia, G. Orru, L. Romano, V. Piras, and R. C. Coppola.** Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *J Virol Methods.* 2004; **118**:77-82.

**Panda, S. K., D. Thakral, and S. Rehman.** Hepatitis E virus. *Rev Med Virol.* 2007; **17**:151-80.

**Peron, J. M., M. Danjoux, N. Kamar, R. Missouri, H. Poirson, J. P. Vinel, J. M. Mansuy, C. Bureau, J. Izopet, P. Brousset, and J. Selves.** Liver histology in patients with sporadic acute hepatitis E: a study of 11 patients from South- West France. *Virchows Arch.* 2007; **450**:405-10.

**Pfefferle S, Frickmann H, Gabriel M, Schmitz N, Günther S, Schmidt-Chanasit J.** Fatal course of an autochthonous hepatitis E virus infection in a patient with leukemia in Germany. 2011 *Infection*. [Epub ahead of print]

**Preiss, J. C., A. Plentz, E. Engeimann, T. Schneider, W. Jilg, M. Zeitz, and R. Duchmann.** Autochthonous hepatitis E virus infection in Germany with sequence similarities to other European isolates. *Infection*. 2006; **34**: 173-5.

**Purcell RH, Emerson SU.** Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J*. 2001; **42**:161-77.

**Purcell RH, Engle RE, Rood MP, Kabrane-Lazizi Y, Nguyen HT, Govindarajan S, St Claire M, Emerson SU.** Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011; **17**:2216-22.

**Renou, C., J. F. Cadranel, M. Boulière, P. Halfon, D. Ouzan, H. Rifflet, P. Carencio, A. Harafa, Bertrand JJ, A. Boutrouille, P. Muller, J. Igual, A. Decoppet, M. Eloit, and N. Pavio.**

Possible zoonotic transmission of Hepatitis E from pet pig to its owner. *Emerging Infectious Diseases*. 2007; **13**:1094-1096.

**Renou, C., X. Moreau, A. Pariente, J. F. Cadranel, E. Meringe, T. Morin, X. Causse, J. L. Payen, J. Izopet, E. Nicand, M. Boulière, G. Penaranda, J. Hardwigsen, R. Gerolami, J. M. Peron, and N. Pavio.** A national survey of acute hepatitis E in France. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008; **27**:1086-1093.

**Reuter, G., D. Fodor, P. Forgach, A. Katai, and G. Szucs.** Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J Clin Virol*. 2009; **44**:277-281.

**Reyes, G. R.** Hepatitis E Virus (HEV): molecular biology and emerging epidemiology. *Prog Liver Dis*. 1993; **11**:203-13.

**Reyes, G. R., M. A. Purdy, J. P. Kim, K. C. Luk, L. M. Young, K. E. Fry, and D. W. Bradley.** Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1990; **247**:1335-9.

**Romanò L, Paladini S, Tagliacarne C, Canuti M, Bianchi S, Zanetti AR.** Hepatitis E in Italy: a long-term prospective study. *J Hepatol*. 2011; **54**:34-40.

**Ropp SL, Tam AW, Beames B, Purdy M, Frey TK.** Expression of the hepatitis E virus ORF1. *Arch Virol*. 2000; **145** :1321-37.

**Rose N, Boutrouille A, Fablet C, Madec F, Eloit M, Pavio N.** The use of Bayesian methods for evaluating the performance of a virus-like particles-based ELISA for serology of hepatitis E virus infection in swine. *J Virol Methods*. 2010; **163**:329-35

**Rutjes SA, Lodder-Verschoor F, Lodder WJ, van der Giessen J, Reesink H, Bouwknegt M, de Roda Husman AM.** Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands. *J Virol Methods*; 2010;**168**:197-206.

**Saad, M. D., H. A. Hussein, M. M. Bashandy, H. H. Kamel, K. C. Earhart, D. J. Fryauff, M. Younan, and A. H. Mohamed.** Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. *Infect Genet Evol*. 2007; **7**:368-73.

**Schielke A, Sachs K, Lierz M, Appel B, Jansen A, Johne R.** Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Virol J*.; 2009; **6**:58.

**Schlauder, G. G., S. M. Desai, A. R. Zanetti, N. C. Tassopoulos, and I. K. Mushahwar.** Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol*. 1999; **57**:243-51.

**Schlauder, G. G. and I. K. Mushahwar..** Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol*. 2001; **65**:282-92.

**Seminati, C., E. Mateu, B. Peralta, N. de Deus, and M. Martin.** Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J.* 2008; **175**: 130-2.

**Shidrawi RG, Skidmore SJ, Coleman JC, Dayton R, Murray-Lyon IM.** Hepatitis E--an important cause of imported non-A, non-B hepatitis among migrant workers in Qatar. *J Med Virol.* 1994; **43**:412-4.

**Shukla, P., U. K. Chauhan, S. Naik, D. Anderson, and R. Aggarwal.** Hepatitis E virus infection among animals in northern India: an unlikely source of human disease. *J Viral Hepat.* 2007; **14**:310-7.

**Sun ZF, Larsen CT, Huang FF, Billam P, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ.** Generation and infectivity titration of an infectious stock of avian hepatitis E virus (HEV) in chickens and cross-species infection of turkeys with avian HEV. *J Clin Microbiol.*; 2004; **42**:2658-62.

**Suwannakarn K, Tongmee C, Theamboonlers A, Komolmit P, Poovorawan Y.** Swine as the possible source of hepatitis E virus transmission to humans in Thailand. *Arch Virol*; 2010; **155**:1697-9.

**Tahan, V., O. Ozdogan, and N. Tozun.** Epidemiology of viral hepatitis in the Mediterranean basin. *Rocz Akad Med Bialymst.* 2003; **48**:11-7.

**Takahashi, K., N. Kitajima, N. Abe, and S. Mishiro.** Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology.* 2004; **330**:501-5.

**Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR.** Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology.* 1991; **185**:120-31.

**Tamada, Y., K. Yano, H. Yatsushashi, O. Inoue, F. Mawatari, and H. Ishibashi.** Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol.* 2004; **40**:869-70.

**Tanaka, Y., K. Takahashi, E. Orito, Y. Karino, J. H. Kang, K. Suzuki, A. Matsui, A. Hori, H. Matsuda, H. Sakugawa, Y. Asahina, T. Kitamura, M. Mizokami, and S. Mishiro.** Molecular tracing of Japan-indigenous hepatitis E viruses. *J Gen Virol.* 2006; **87**:949-54.

**Tanaka, T., M. Takahashi, E. Kusano, and H. Okamoto.** Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol.* 2007; **88**:903-11.

**Taniguchi M, Kim SR, Mishiro S, Takahashi K, Shin MH, Yun H, Park MS, Li ZM, Kim MK, Fang J, Hayashi Y.** Epidemiology of hepatitis E in Northeastern China, South Korea and Japan. *J Infect.* 2009; **58**:232-7.

**Tei, S., N. Kitajima, K. Takahashi, and S. Mishiro.** Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet.* 2003; **362**:371-3.

**Tei, S., N. Kitajima, S. Ohara, Y. Inoue, M. Miki, T. Yamatani, H. Yamabe, S. Mishiro, and Y. Kinoshita.** Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol.* 2004; **74**:67-70.

**Teo, C. G.** Hepatitis E indigenous to economically developed countries: to what extent a zoonosis? *Curr Opin Infect Dis.* 2006; **19**:460-6.

**Teshale EH, Grytdal SP, Howard C, Barry V, Kamili S, Drobeniuc J, Hill VR, Okware S, Hu DJ, Holmberg SD.** Evidence of person-to-person transmission of hepatitis E virus during a large outbreak in Northern Uganda. *Clin Infect Dis.* 2010; **50**:1006-10.

**Usmanov RK, Balaian MS, Dvořnikova OV, Alymbaeva DB, Zamiatina NA, Kazachkov IuA, Belov VI.** An experimental infection in lambs by the hepatitis E virus. *Vopr Virusol.* 1994; **39**:165-8.

**van der Poel, W. H., F. Verschoor, R. van der Heide, M. I. Herrera, A. Vivo, M. Kooreman, and A. M. de Roda Husman.** Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2001; **7**:970-6.

**Vivek R, Kang G.** Hepatitis E virus infections in swine and swine handlers in Vellore, Southern India. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; **84**:647-9.

**Vitral CL, Pinto MA, Lewis-Ximenez LL, Khudyakov YE, dos Santos DR, Gaspar AM.** Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; **100**:117-22.

**Vulcano A, Angelucci M, Candelori E, Martini V, Patti AM, Mancini C, Santi AL, Calvani A, Casagni L, Lamberti A.** HEV prevalence in the general population and among workers at zoonotic risk in Latium Region. *Ann Ig.*; 2007; **19**:181-6.

**Wang, L. and H. Zhuang.** Hepatitis E: an overview and recent advances in vaccine research. *World J Gastroenterol.* 2004; **10**:2157-62.

**Wang, W. K., S. R. Lin, C. M. Lee, C. C. King, and S. C. Chang.** Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies. *J Virol.* 2002; **76**:4662-5.

**Williams, T. P., C. Kasomdorkbua, P. G. Halbur, G. Haqshenas, D. K. Guenette, T. E. Toth, and X. J. Meng.** Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol.* 2001; **39**:3040-6.

**Withers, M. R., M. T. Correa, M. Morrow, M. E. Stebbins, J. Seriwatana, W. D. Webster, M. B. Boak, and D. W. Vaughn.** Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; **66**:384-8.

**Yazaki, Y., H. Mizuo, M. Takahashi, T. Nishizawa, N. Sasaki, Y. Gotanda, and H. Okamoto.** Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol.* 2003; **84**:2351-7.

**Yu, C., C. Zimmerman, R. Stone, R. E. Engle, W. Elkins, G. A. Nardone, S. U. Emerson, and R. H. Purcell.** Using improved technology for filter paper-based blood collection to survey wild Sika deer for antibodies to hepatitis E virus. *J Virol Methods.* 2007; **142**:143-50.

**Zanetti, A. R., G. G. Schlauder, L. Romano, E. Tanzi, P. Fabris, G. J. Dawson, and I. K. Mushahwar.** Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol.* 1999; **57**:356-60.

**Zhao C, Ma Z, Harrison TJ, Feng R, Zhang C, Qiao Z, Fan J, Ma H, Li M, Song A, Wang Y.** A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J Med Virol.* 2009; **81**:1371-9.

**Zheng, Y., S. Ge, J. Zhang, Q. Guo, M. H. Ng, F. Wang, N. Xia, and Q. Jiang.** Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. *J Infect Dis.* 2006; **193**:1643-9.

## *Bibliografia capitolo 2*

**Agus S.G., Dolin R., Wyatt R.G., Tousimis A.J., Northrup R.S.** Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology: histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *Ann Intern Med* 1973; **79**: 18-25.

**Anderson AD, Garrett VD, Sobel J, Monroe SS, Fankhauser RL, Schwab KJ, Bresee JS, Mead PS, Higgins C, Campana J, Glass RI; Outbreak Investigation Team.** Multistate outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis associated with a common caterer. *Am J Epidemiol.* 2001; **154**:1013-9.

**Ando T., Noel J.S., Fankhauser R.L.** Genetic classification of “Norwalk-like viruses”. *J Infect Dis* 2000; **181**: 336-48.

**Atmar R.L., Estes M.K.** Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**: 15–37.

**Atmar R.L., Metcalf T., Neil F., Estes M.,** Detection of enteric viruses in oysters by using PCR. *Appl Environ Microbiol* 2001; **59**: 631-635.

**Baert L, Uyttendaele M, Debevere J.** Evaluation of viral extraction methods on a broad range of Ready-To-Eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection. *Int J Food Microbiol.* 2008; **123**:101-8.

**Belliot G., Noel J.S., Li J-F, Seto Y., Humphrey CD, Ando T, Glass RI, Monroe SS,** Characterization of capsid protein genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of “Norwalk-like viruses”. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 4288-95.

**Belliot G., Sosnovtsev S.V., Mitra T., Hammer C., Garfield M., Green K.Y.,** In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol* 2003; **77**: 10957-10974.

**Black D.N., Burroughs J.N., Harris T.J.R., Brown F.,** The structure and replication of calicivirus RNA. *Nature* 1978; **274**: 614-615.

**Boccia D., Tozzi A.E., Cotter B., Rizzo C., Russo T., Buttinelli G., Caprioli A., Marziano M.L., Ruggeri F.M.,** A suspected waterborne outbreak of Norwalk Virus gastroenteritis in a tourist resort in the South of Italy. *Emerging Infect Dis* 2002; **8**: 563-8.

**Boxman IL, Tilburg JJ, te Loeke NA, Vennema H, de Boer E, Koopmans M.** An efficient and rapid method for recovery of norovirus from food associated with outbreaks of gastroenteritis. *J Food Prot.* 2007;**70**:504-8.

**Brehm M.A., Pinto A.K., Daniels K.A., Schneck J.P., Welsh R.M., Selin L.K.,** T cell immunodominance and maintenance of memory regulated by unexpectedly cross-reactive pathogens. *Nat Immunol* 2002; **3**: 627-34.

**Brugha R., Vipond I.B., Evans M.R., Sandifer Q.D., Roberts R.J., Salmon R.L., Caul E.O., Mukerjee A.K.,** A community outbreak of food-borne small round-structured virus gastroenteritis caused by a contaminated water supply. *Epidemiol Infect* 1999; **122**: 145-54.

**Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, et al.** Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis* 2005; **11**: 1079–1085.

**Burroughs, J. N., Brown F.,** Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *J Gen Virol* 1978; **41**: 443-446.

**Caceres V.M., Kim D.K., Bresee J.S., Horan J., Noel J.S., Ando T., Steed C.J., Weems J.J., Monroe S.S., Gibson J.J.,** A viral gastroenteritis outbreak associated with person-to-person spread among hospital staff. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; **19**: 162–7.

**Cannon R.O., Poliner J.R., Hirschhorn R.B., Rodeheaver D.C., Silverman P.R., Brown E.A., Talbot G.H., Stine S.E., Monroe S.S., Dennis D.T.,** A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with consumption of commercial ice. *J Infect Dis* 1991; **164**: 860–3.

**Carter M.J., Milton I.D., Meanger J., Bennett M., Gaskell R.M., Turner P.C**The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus, *Virology* 1992; **190**: 443-448.

**Caul E.O.**, Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet* 1994; **343**: 1240–2.

**Chadwick P.R., Beards G., Brown D., Caul E.O., Cheesbrough J., Clarke I., Curry A., O'Brien S., Quigley K., Sellwood J., Westmoreland D.**, Management of hospital outbreaks of gastro-enteritis due to small roundstructured viruses. *J Hosp Infect* 2000; **45**: 1–10.

**Cheesbrough J.S., Barkess-Jones L., Brown D.W.**, Possible prolonged environmental survival of small round structured viruses. *J Hosp Infect* 1997; **35**: 325–6.

**Chiba S., Sakuma Y., Kogasaka R., Akihara M., Horino K., Nakao T., Fukui S.** An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol* 1979; **4**: 249-54.

**Clarke I.N., Lambden P.R.**, Organization and expression of calicivirus genes. *J Inf Dis* 2000; **181**: 309-316.

**Craun GF, Calderon RL, Craun MF.** Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int J Environ Health Res.* 2005; **15**:243-62.

**Daniels N.A., Bergmire-Sweat D.A., Schwab K.J., Hendricks K.A., Reddy S., Rowe S.M., Fankhauser R.L., Monroe S.S., Atmar R.L., Glass R.I., Mead P.**, A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *J Infect Dis* 2000; **181**: 1467–70.

**Dastjerdi A.M., Green J., Gallimore C.I., Brown D.W., Bridger J.C.** The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology* 1999; **254**: 1–5.

**Daughenbaugh K., Fraser C.S., Hershey J.W., Hardy M.E.** The genome linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J* 2003; **22**: 2852-2859.

**de Wit M.A., Koopmans M.P., Kortbeek L.M., van Leeuwen N.J., Bartelds A.I., van Duynhoven Y.T.** Gastroenteritis in sentinel general practices, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2001a; **7**: 82–91.

**de Wit M.A., Koopmans M.P., Kortbeek L.M., Wannet W.J., Vinjé J., van Leusden F., Bartelds A.I., van Duynhoven Y.T.** Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001b; **154**: 666–74.

**Dedman D., Laurichesse H., Caul E.O., Wall P.G.** Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales, 1990–1995. *Epidemiol Infect* 1998; **121**: 139–49.

**DeLeon R., Matsui S.M., Baric R.S., Herrmann J.E., Blacklow N.R., Greenberg H.B., Sobsey M.D.** Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 3151–7.

**Di Bartolo I, Monini M, Losio MN, Pavoni E, Lavazza A, Ruggeri FM.** Molecular characterization of noroviruses and rotaviruses involved in a large outbreak of gastroenteritis in Northern Italy. *Appl Environ Microbiol.* 2011;**77**:5545-8.

**Dolin R., Blacklow N.R., DuPont H., Formal S., Buscho R.F., Kasel J.A., Chames R.P., Hornick R., Chanock R.M.** Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Inf Dis* 1971; **123**: 307-312.

**Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS.** Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2011; **8**:231-41

**Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS.** Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev.* 2008; **225**:190-211.

**Doyle A, Barataud D, Gallay A, Thiolet JM, Le Guyaguer S, Kohli E, Vaillant V.** Norovirus foodborne outbreaks associated with the consumption of oysters from the Etang de Thau, France, December 2002. *Euro Surveill.* 2004; **9**:24-6.

**Duizer E., Schwab K.J., Neill F.H., Atmar R.L., Koopmans M.P.G., Esets M.** Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* 2004; **85**: 79-87.

**Emerging infectious diseases** 2002 [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov); Vol.8 n°6

**Estes MK, Ball JM, Guerrero RA, Opekun AR, Gilger MA, Pacheco SS, Graham DY.** Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis.* 2000

**Evans H.S., Madden P., Douglas C., Adak G.K., O'Brien S.J., Djuretic T., Wall P.G., Stanwell-Smith R.** General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales: 1995 and 1996. *Commun Dis Public Health* 1998; **1**: 165–71.

**Farkas T, Nakajima S, Sugieda M, Deng X, Zhong W, Jiang X** Seroprevalence of noroviruses in swine. *J Clin Microbiol.* 2005;**43**:657-61.

**Foley B., O'Mahony J., Morgan S.M., Hill C., Morgan J.G.** Detection of sporadic cases of Norwalk-like virus (NLV) and astrovirus infection in a single Irish hospital from 1996 to 1998. *J Clin Virol* 2000; **17**: 109–17.

**Glass P.J., White L.J., Ball J.M., Leparac-Goffart I., Hardy M.E., Estes M.K** Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 2000 a; **74**: 6581-6591.

**Glass RI, Parashar UD, Estes MK.** Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2009; **361**:1776-85.

**Green, FR, Greenwell P, Dikson L, Griffiths B, Noades J, Swallow DM** Expression of the ABH, Lewis, and related antigens on the glycoproteins of the human jejunal brush border. *Subcell. Biochem* 1988; **12**: 119–153.

**Gregg D.A., House C., Meyer R., Berninger M.** Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. *Rev Sci Tech* 1991; **10**: 435-451.

**Gutiérrez-Escolano AL, Velázquez FR, Escobar-Herrera J, López Saucedo C, Torres**

**J, Estrada-García T.** Human caliciviruses detected in Mexican children admitted to hospital during 1998-2000, with severe acute gastroenteritis not due to other enteropathogens. *J Med Virol*. 2010; **82**:632-7.

**Hale A., Mattick K., Lewis D., Estes M., Jiang X., Green J., Eglin R., Brown D.** Distinct epidemiological patterns of Norwalk-like virus infection. *J Med Virol* 2000; **62**: 99–103.

**Hansman GS, Matsubara N, Oka T, et al.** Deletion analysis of the sapovirus VP1 gene for the assembly of virus-like particles. *Arch Virol* 2005; **150**: 2529–2538.

**Hansman GS, Natori K, Oka T, et al.** Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol* 2005; **150**: 21–36.

**Hansman GS, Natori K, Ushijima H, et al.** Characterization of polyclonal antibodies raised against sapovirus genogroup five virus-like particles. *Arch Virol* 2005; **150**: 1433–1437.

**Hansman GS, Oka T, Sakon N, Takeda N** Antigenic diversity of human sapoviruses. *Emerg Infect Dis* 2007; **13**:1519–1525

**Hansman GS, Takeda N, Oka T, Oseto M, Hedlund KO, Katayama K.** Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerg Infect Dis*. 2005; **11**:1916-20.

**Hardy M.E., Estes M.K.** Completion of the Norwalk virus genome sequence. *Virus Genes* 1996; **12**: 287-290.

**Hardy M.E.** Norwalk and “Norwalk-like viruses” in epidemic gastroenteritis. *Clin Lab Med* 1999; **19**: 675-690.

**Hardy M.E.** Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* 2005; **253**: 1-8.

**Hedberg C.W., Osterholm M.T.** Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev* 1993; **6**: 199–210.

**Hedlund K.O., Rubilar-Abreu E., Svensson L.** Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994–1998. *J Infect Dis* 2000; **181**: 275–80.

**Hershey J.W.B., Merrick W.C.** The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis, p. 33-88, Translational Control of Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 2000.

**Hoebe CJ, Vennema H, Husman AM, van Duynhoven YT.** Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. *J Infect Dis* 2004; **189**: 699–705.

**Hsu CC, Wobus CE, Steffen EK, Riley LK, Livingston RS.** Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;**12**:1145-51.

**Huelsenbeck J.P., Ronquist F., Nielsen R., Bollback J.P.** Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 2001; **294**: 2310-2314.

**Ike AC, Hartelt K, Oehme RM, Brockmann SO.** Detection and characterization of sapoviruses in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany. *J Clin Virol.* 2008;**43**:37-41.

**Iturriza-Gómara M, Elliot AJ, Dockery C, Fleming DM, Gray JJ.** Structured surveillance of infectious intestinal disease in pre-school children in the community: 'The Nappy Study'. *Epidemiol Infect.* 2009;**137**:922-31.

**Jiang X., Wang M., Graham D.Y., Estes M.K.** Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992; **66**:6527-6532.

**Jiang X., Wang M., Wang K., Estes M.K.** Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 1993; **195**: 51–61.

**Jiang X., Zhong W.M., Farkas T., Huang P.W., Wilton N., Barret E., Fulton D., Morrow R., Matson D.O.** Baculovirus expression and antigenic characterization of the capsid proteins of three Norwalk-like viruses. *Arch Virol* 2002; **147**: 119-30.

**Johnsen CK, Midgley S, Böttiger B.** Genetic diversity of sapovirus infections in Danish children 2005-2007. *J Clin Virol.* 2009; **46**:265-9.

**Johnson P.C., Mathewson J.J., DuPont H.L., Greenberg H.B.** Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis* 1990; **161**: 18-21.

**Kapikian A.Z., Wyatt R.G., Dolin R., Thornhill T.S., Kalica A.R., Chanock R.M.** Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; **10**: 1075-81.

**Kappus KD, Marks JS, Holman RC, Bryant JK, Barker C, Gary GW, Greenberg HB** An outbreak of Norwalk gastroenteritis associated with swimming in a pool and secondary person-to-person transmission. *J Epidemiol.* 1982; **116**:834-9.

**Karst S.M., Wobus C.E., Lay M., Davidson J., Virgin H.W.** STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 2003; **299**:1575-1578.

**Katayama K., Shirato-Horikoshi H., Kojima S., Kageyama T., Oka T., Hoshino F., Fukushi S., Shinohara M., Uchida K., Suzuki Y., Gojobori T., Takeda N** Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like Viruses. *Virology* 2002; **299**: 225-239.

**Katpally U, Smith TJ.** The caliciviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010; **343**:23-41.

**Keswick B.H., Satterwhite T.K., Johnson P.C., DuPont H.L., Secor S.L., Bitsura J.A., Gary G.W., Hoff J.C.** Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol* 1985; **50**: 261-4.

**Kilgore P.E., Belay E.D., Hamlin DM., Noel J.S., Humphrey C.D., Gary H.E., Ando T., Monroe S.S., Kludt P.E., Rosenthal D.S., Freeman J., Glass R.I.** A university outbreak of gastroenteritis due to a small round-structured virus. Application of molecular diagnostics to identify the etiologic agent and patterns of transmission. *J Infect Dis* 1996; **173**: 787-93.

**Kingsley DH, Meade GK, Richards GP.** Detection of both hepatitis A virus and Norwalk-like virus in imported clams associated with food-borne illness. *Appl Environ Microbiol.* 2002; **68**:3914-8.

**Koopmans M., Duizer E.** Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* 2004; 90: 23-41.

**Koopmans M., Vinjé J., de Wit M., Leenen I., vander Poel W., van Duynhoven Y.** Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *J Infect Dis* 2000; **181**: 262–9.

**Koopmans M, Vinjé J, Duizer E, de Wit M, van Duynhoven Y.** Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *Novartis Found Symp.* 2001; **238**:197-214;

**Kukkula M., Mannula L., Silvennoinen E., von Bonsdorff C.H.** Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses, *J Infect Dis* 1999; **180**: 1771-6.

**Kuo HW, Schmid D, Schwarz K, Pichler AM, Klein H, König C, de Martin A, Allerberger F.** A non-foodborne norovirus outbreak among school children during a skiing holiday, Austria, 2007. *Wien Klin Wochenschr.* 2009; **121**:120-4.

**Lambden P.R., Caul E.O., Ashley C.R., Clarke I.N.** Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 1993; **259**: 516-9.

**Lederer I, Schmid D, Pichler AM, Dapra R, Kraler P, Blassnig A, Luckner-Hornischer A, Berghold C, Allerberger F.** Outbreak of norovirus infections associated with consuming food from a catering company, Austria, September 2005. *Euro Surveill.* 2005;**10**.

**Lees D.** Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol* 2000; **59**: 81–116.

**Le Guyader FS, Bon F, DeMedici D, Parnaudeau S, Bertone A, Crudeli S, Doyle A, Zidane M, Suffredini E, Kohli E, Maddalo F, Monini M, Gallay A, Pommepuy M, Pothier P, Ruggeri FM.** Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J Clin Microbiol.* 2006

**Li L, Pesavento PA, Shan T, Leutenegger CM, Wang C, Delwart E.** Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses. *J Gen Virol.* 2011 **92**:2534-41.

**Lindesmith L., Moe C., Marionneau S., Ruvoen N., Jiang X., Lindblad L, Stewart P., LePendu J., Baric R.** Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature Med* 2003; **9**: 548-553.

**Lopman B.A., Brown D.W., Koopmans M.** Human caliciviruses in Europe. *J Clinical Virol* 2002; **24**: 137–160.

**Lopman B., Vennema H., Kohli E., Pothier P., Sanchez A., Negredo A., Buesa J., Schreier E., Reacher M., Brown D., Gray J., Iturriza M., Gallimore C., Bottiger B., Hedlund K.O., Torven M., von Bonsdorff C.H., Maunula L., Poljsak-Prijatelj M., Zimsek J., Reuter G., Szucs G., Meleg B., Svennson L., van Duinhoven Y., Koopmans M.** Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 2004; **363**: 682-8.

**Lorrot M, Bon F, El Hajje MJ, Aho S, Wolfer M, Giraudon H, Kaplon J, Marc E, Raymond J, Lebon P, Pothier P, Gendrel D.** Epidemiology and clinical features of gastroenteritis in hospitalised children: prospective survey during a 2-year period in a Parisian hospital, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **30**:361-8

**Madeley C.R.** Comparison of the features of astroviruses and caliciviruses seen in samples of feces by electron microscopy. *J Infect Dis* 1979; **139**: 519-23.

**Madore H.P., Treanor J.J., Buja R., Dolin R.** Antigenic relatedness among the Norwalk-like agents by serum antibody rises. *J Med Virol* 1990; **32**: 96-101.

**Martella Vito, Marco Campolo, Eleonora Lorusso, Paolo Cavicchio, Michele Camero Anna L. Bellacicco, Nicola Decaro, Gabriella Elia, Grazia Greco, Marialaura Corrente, Costantina Desario, Serenella Arista, Krisztian Banyai, Marion Koopmans and Canio Buonavoglia.** Norovirus in Captive Lion Cub (Panthera leo). *Emerging Infectious Diseases* 2007, vol.13 n° 7

**Mattison K, Grudeski E, Auk B, Charest H, Drews SJ, Fritzinger A, Gregoricus N, Hayward S, Houde A, Lee BE, Pang XL, Wong J, Booth TF, Vinjé J** Multicenter comparison of two norovirus ORF2-based genotyping protocols. *J Clin Microbiol.* 2009; **47**:3927-32.

**Maunula L., Piiparinen H., von Bonsdorff C.H.** Confirmation of Norwalk-like virus amplicons after RT-PCR by microplate hybridisation and direct sequencing. *J Virol Methods* 1999; **83**: 125–34.

**Maunula L, Roivainen M, Keränen M, Mäkela S, Söderberg K, Summa M, von Bonsdorff CH, Lappalainen M, Korhonen T, Kuusi M, Niskanen T.** Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Euro Surveill.* 2009; **14**.

**Mayoral C.J., Mateo R.A., Pons S.M., Herrera C.I., Gutierrez A.G., Vivo A., Garcia F.M., Herrera G.D., Martinez N.F.** Outbreak of gastroenteritis at a home for the aged in Albacete. *Rev Esp Salud Publica* 2000; **74**: 561572.

**McFadden N, Bailey D, Carrara G, Benson A, Chaudhry Y, Shortland A, Heeney J, Yarovinsky F, Simmonds P, Macdonald A, Goodfellow I.** Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS Pathog.* 2011; **7**:e1002413.

**Medici MC, Martinelli M, Abelli LA, Ruggeri FM, Di Bartolo I, Arcangeletti MC, Pinardi F, De Conto F, Izzì G, Bernasconi S, Chezzi C, Dettori G.** Molecular epidemiology of norovirus infections in sporadic cases of viral gastroenteritis among children in Northern Italy. *J Med Virol.* 2006; **78**:1486-92.

**Mijovski JZ, Poljsak-Prijatelj M, Steyer A, Barlic-Maganja D, Koren S.** Detection and molecular characterisation of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. *Infect Genet Evol.* 2010; **10**:413-20.

**Mladenova Z, Korsun N, Geonova T, Di Bartolo I, Fiore L, Ruggeri F.M.** Norovirus Study Group. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses detected in outbreak and sporadic cases of acute gastroenteritis in Bulgaria. *J Med Virol.* 2008; **80**:2161-8

**Mongkolsapaya J., Dejnirattisai W., Xu X.N., Vasanawathana S., Tangthawornchaikul N., Chairunsri A., Sawasdivorn S., Daungchinda T., Dong T., Rowland-Jones S., Yenchitsomanus P.T., McMichael A., Malasit P., Screaton G.** Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 2002; **9**: 921-7.

**Monto A.S., Koopman J.S.** The Tecumseh Study, XI, Occurrence of acute enteric illness in the community. *Am J Epidemiol* 1980; **112**: 323–33.

**Moser O, Lück S, Dilloo D, Eis-Hübinger AM, Simon A.** Sapovirus as a gastrointestinal pathogen in febrile pediatric patients with cancer. *J Med Virol.* 2011 **83**:2233-6

**Mounts A.W., Ando T., Koopmans M., Bresee J.S., Noel J., Glass R.I.** Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000; **181**: 284–7.

**Nayak MK, Balasubramanian G, Sahoo GC, Bhattacharya R, Vinje J, Kobayashi N, Sarkar MC, Bhattacharya MK, Krishnan T.** Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus from Kolkata, India. *Virology.* 2008; **377**:117-23.

**Neill J.D., Mengeling W.L.** Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res* 1988; **11**: 59-72.

**Nowak P, Topping JR, Bellamy K, Fotheringham V, Gray JJ, Golding JP, Wiseman G,**

**Knight AI.** Virolysis of feline calicivirus and human GII.4 norovirus following chlorine exposure under standardized light soil disinfection conditions. *J Food Prot.* 2011; **74**:2113-8.

**Oliver S.L., Dastjerdi A.M., Wong S., El-Attar L., Gallimore C., Brown D.W.G., Green J., Bridger J.C.** Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to human. *J Virol* 2003; **77**: 2789-98.

**Pang X.L., Honma S., Nakata S., Vesikari T.** Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis* 2000; **181**: 288-94.

**Parashar U.D., Dow L., Fankhauser R.L., Humphrey C.D., Miller J., Ando T., Williams K.S., Eddy C.R., Noel J.S., Ingram T., Bresee J.S., Monroe S.S., Glass R.I.** An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiol Infect* 1998; **121**: 615–21.

**Patterson W., Haswell P., Fryers P.T., Green J.** Outbreak of small round structured virus gastroenteritis arose after kitchen assistant vomited. *Commun Dis Rep CDR Rev* 1997; **7**: 101–3.

**Prasad B.V., Rothnagel R., Jiang X., Estes M.K.** Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol* 1994; **68**: 5117-5125.

**Prasad B.V., Hardy M.E., Dokland T., Bella J., Rossmann M.G., Estes M.K.** X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 1999; **286**: 287–290.

Pringle C.R., Virus taxonomy – San Diego 1998. *Arch Virol* 1998; **143**: 1449-59.

**Räsänen S, Lappalainen S, Kaikkonen S, Hämäläinen M, Salminen M, Vesikari T.** Mixed viral infections causing acute gastroenteritis in children in a waterborne outbreak. *Epidemiol Infect.* 2010; **138**:1227-34.

**Reuter G, Zimsek-Mijovski J, Poljsak-Prijatelj M, Di Bartolo I, Ruggeri FM, Kantala T, Maunula L, Kiss I, Kecskeméti S, Halaihel N, Buesa J, Johnsen C, Hjulsager CK, Larsen LE, Koopmans M, Böttiger B.** Incidence, diversity, and molecular epidemiology of sapoviruses in swine across Europe. *J Clin Microbiol.* 2010; **48**:363-8.

**Rimoldi SG, Stefani F, Pagani C, Chenal LL, Zanchetta N, Di Bartolo I, Lombardi A, Ruggeri FM, Di Lillo D, Zuccotti GV, Gismondo MR.** Epidemiological and clinical characteristics of pediatric gastroenteritis associated with new viral agents. *Arch Virol.* 2011; **156**:1583-9.

**Sakon N, Yamazaki K, Yoda T, Kanki M, Otake T, Tsukamoto T.** A norovirus outbreak of gastroenteritis linked to packed lunches. *Jpn J Infect Dis.* 2005; **58**:253.

**Sano D, Pérez-Sautu U, Guix S, Pintó RM, Miura T, Okabe S, Bosch A.** Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain. *Appl Environ Microbiol.* 2011; **77**:1111-4.

**Scipioni A, Mauroy A, Vinjé J, Thiry E.** Animal noroviruses. *Vet J.* 2008; **178**:32-45.

**Schreiber D.S., Blacklow N.R., Trier J.S.** The small intestinal lesion introduced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Inf Dis* 1974; **129**: 705-708.

**Schreier E., Doring F., Kunkel U.** Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Arch Virol* 2000; **145**: 443–53.

**Seah E.L., Gunsekere I.C., Marshall J.A., Wright P.J.** Variation in ORF3 of genogroup 2 Norwalk-like virus. *Arch Virol* 1999; **144**: 1007-1014.

**Shen JC, Lin JF, Gao J, Yao WT, Wen D, Liu GT, Han JK, Ma HL, Zhang LJ, ZhuBP.** A norovirus-borne outbreak caused by contaminated bottled spring water in a school, Zhejiang province. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2011; 32:800-3.

**Shigemoto N, Fukuda S, Tanizawa Y, Kuwayama M, Ohara S, Seno M.** Detection of norovirus, sapovirus, and human astrovirus in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol*. 2011; **55**:369-72.

**Shin GA, Sobsey MD.** Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Res*. 2008; **42**:4562-8.

**Shiota T, Okame M, Takanashi S, Khamrin P, Takagi M, Satou K, Masuoka Y, Yagyu F, Shimizu Y, Kohno H, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H.** Characterization of a broadly reactive monoclonal antibody against norovirus genogroups I and II: recognition of a novel conformational epitope. *J Virol*. 2007; **81**:12298-306.

**Smiley J.R., Hoet A.E., Traven M., Tsunemitsu H., Saif L.J.** Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses, *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 3089-99.

**Smith A.W., Akers T.G., Madin S.H., Vedros N.A.** San Miguel sea lion virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus, *Nature* 1973; **244**: 108-109.

**Smith A.W., Skilling D.E., Cherry N., Mead J.H., Matson D.O.** Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements. *Emerg Infect Dis* 1998; **4**: 13-20.

**Sosnovtsev S.V., Belliot G., Chang K.O., Onwudiwe O., Green K.Y.** Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol* 2005; **79**: 4012-4024.

**Stals A, Baert L, Jasson V, Van Coillie E, Uyttendaele M.** Screening of fruit products for norovirus and the difficulty of interpreting positive PCR results. *J Food Prot.* 2011;**74**:425-31.

**Stefano J.E.** Purified lupus antigen L<sub>a</sub> recognizes an oligouridylylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* 1984; **36**: 145-154.

**Stolle A., Sperner B.**

Viral infections transmitted by food of animal origin: the present situation in the European Union, *Arch Virol Suppl* 1997; **13**: 219–28.

**Studdert M.J.** Caliciviruses. *Arch Virol* 1978; **58**: 157-191.

**Sugieda M., Nagaoka H., Kakishima Y., Ohshita T., Nakamura S., Nakajima S.** Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* 1998; **143**: 1215–21.

**Tacket C.O., Sztein M.B., Losonsky G.A., Wasserman S.S., Estes M.K.** Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol* 2003; **108**: 241-247.

**Tamura M., Natori K., Kobayashi M., Miyamura T., Takeda N.** Interaction of recombinant norwalk virus particles with the 105-kilodalton cellular binding protein, a candidate receptor molecule for virus attachment. *J Virol* 2000; **74**: 11589-11597.

**Tompkins D.S., Hudson M.J., Smith H.R., Eglin R.P., Wheeler J.G., Brett M.M., Owen R.J., Brazier J.S., Cumberland P., King V., Cook P.E.** A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls. *Commun Dis Public Health* 1999; **2**: 108-13.

**Traore O., Belliot G., Mollat C., Piloquet H., Chamoux C., Laveran H., Monroe S.S., Billaudel S.** RT-PCR identification and typing of astroviruses and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections. *J Clin Virol* 2000; **17**: 151–8.

**Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Miura T, Sano D, Omura T.** Detection of Sapovirus in oysters. *Microbiol Immunol.* 2010 **54**:483-6.

**van Der Poel W.H., Vinjé J., van Der Heide R., Herrera M.I., Vivo A., Koopmans M.P.** Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis* 2000; **6**: 36–41.

**Verhoef L, Kouyos RD, Vennema H, Kroneman A, Siebenga J, van Pelt W, Koopmans M;** Foodborne Viruses in Europe Network. An integrated approach to identifying international foodborne norovirus outbreaks. *Emerg Infect Dis.* 2011; **412-8**.

**Vinjé J., Green J., Lewis D.C., Gallimore C.I., Brown D.W., Koopmans M.P.** Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Arch Virol* 2000 a; **145**: 223-41.

**Vinjé J., Koopmans M.P.** Simultaneous detection and genotyping of “Norwalk-like viruses” by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol* 2000 b; **38**: 2595–601.

**Werber D, Lausević D, Mugosa B, Vratnica Z, Ivanović-Nikolić L, Zizić L, Alexandre-Bird A, Fiore L, Ruggeri FM, Di Bartolo I, Battistone A, Gassilloud B, Perelle S, Nitzan Kaluski D, Kivi M, Andraghetti R, Pollock KG.** Massive outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of municipal drinking water in a European capital city. *Epidemiol Infect.* 2009; **137**:1713-20.

**Wheeler J.G., Sethi D., Cowden J.M., Wall P.G., Rodrigues L.C., Tompkins D.S., Hudson M.J., Roderick P.J.** Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. *The Infectious Intestinal Disease Study Executive, Br Med J* 1999; **318**: 1046–50.

**Widdowson M-A., Monrose S.S.** Glass R.I., Are Noroviruses emerging?. *Emerg Inf Dis* 2005; 11: 735-737.

**Widerlite L., Trier J.S., Blacklow N.R., Schreiber, D.S.** Structure of the gastric mucosa in acute infectious nonbacterial gastroenteritis, *Gastroenterology* 1975; **68**: 425-430.

**Wise AG, Monroe SS, Hanson LE, Grooms DL, Sockett D, Maes RK.** Molecular characterization of noroviruses detected in diarrheic stools of Michigan and Wisconsin dairy calves: circulation of two distinct subgroups. *Virus Res.* 2004; **100**:165-77.

**Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo R, Oseto M, Doi M, Miyamoto T, Ueda T, Kondo H, Tanaka T, Wakita T, Katayama K, Takeda N, Oka T.** Molecular characterization of Sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall. *J Med Virol.* 2010; **82**:909.

**Zahorsky J.,** Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr* 1929; **46**: 391–5.

## *Bibliografia capitolo 3*

**Aggarwal, R. and S. Jameel.** 2008. Hepatitis E vaccine. *Hepatol Int.* **2**:308–315.

**Aggarwal R.** Hepatitis E: Historical, contemporary and future perspectives. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; **26**:72-82.

**Banks M, Bendall R, Grierson S, Heath G, Mitchell J, Dalton H:** Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* 2004, **10**: 953-955.

**Berglund P, Sjöberg M, Garoff H, Atkins GJ, Sheahan BJ, Liljeström P.** Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology (N Y).* 1993;**11**:916-20.

**Boadella M, Casas M, Martín M, Vicente J, Segalés J, de la Fuente J, Gortázar C.** Increasing contact with hepatitis E virus in red deer, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2010; **16**:1994-6.

**Caprioli A, Martelli F, Ostanello F, Di Bartolo I, Ruggeri F, Del Chiaro L, Tolari F.** Detection of hepatitis E virus (HEV) in Italian pig herds. *Veterinary Record* 2007, **161**:422-423

**Choi, C. and C. Chae.** Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. *J Hepatol.* 2003. **38**:827-32.

**de Deus, N., Seminati, C., Pina, S., Mateu, E., Martí n, M., Segalé s, J.,** Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and feces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet. Microbiol.* 2007; **119**, 105–114.

**Di Bartolo I, Martelli F, Inglese N, Pourshaban M, Caprioli A, Ostanello F, Ruggeri FM.** Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet Microbiol.* 2008, **132**:47-55.

**Di Bartolo I, Ponterio E, Castellini L, Ostanello F, Ruggeri FM.** Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol.* 2011, **149**:330-338.

**Emerson, S. D. and R. H. Purcell.** Hepatitis E virus. *Rev Med Virol.* 2003**13**:145-54.

**Engle, R. E., C. Yu, S. D. Emerson, X. J. Meng, and R. H. Purcell.** Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2002.**40**:4576-80.

**Haqshenas, G., H. L. Shivaprasad, P. R. Woolcock, D. H. Read, and X. J. Meng.** 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.**82**:2449-62.

**Hu WP, Lu Y, Precioso NA, Chen HY, Howard T, Anderson D, Guan M.** Double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis E virus-specific antibodies in human or swine sera. *Clin Vaccine Immunol.* 2008,**15**:1151-1157.

**Huang, F.F., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Schommer, S.K., Pierson, F.W., Toth, T.E., Meng, X.J.,** 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. Microbiol.* 2002; **40**:1326–1332.

**Huang, F. F., Z. F. Sun, S. U. Emerson, R. H. Purcell, H. L. Shivaprasad, F. W. Pierson, T. E. Toth, and X. J. Meng.** Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol.* 2004.**85**:1609-18.

**Jiménez de Oya N, de Blas I, Blázquez AB, Martín-Acebes MA, Halaihel N, Gironés O, Saiz JC, Escribano-Romero E.** Widespread distribution of hepatitis E virus in Spanish pig herds. *BMC Res Notes.* 2011, **4**:412.

**Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR.** A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods*. 2006;**131**:65-71.

**Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsumi M, Razak MA, Uchida T, Takeda N, Miyamura T.** Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol*. 1997;**71**:7207-13.

**Liljeström P, Garoff H.** A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (N Y)*. 1991; 9:1356-61.

**Lundstrom K, Mills A, Allet E, Cezkowski K, Agudo G, Chollet A, Liljeström P.** High-level expression of G protein-coupled receptors with the aid of the Semliki Forest virus expression system. *J Recept Signal Transduct Res*. 1995; **15**:23-32.

**Lundström K, Mills A, Buell G, Allet E, Adami N, Liljeström P.** High-level expression of the human neurokinin-1 receptor in mammalian cell lines using the Semliki Forest virus expression system. *Eur J Biochem*. 1994; **224**:917-21.

**Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., Haynes, J.S., Thacker, B.J., Emerson, S.U.,** A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997; **94**, 9860–9865.

**Meng, X.J., Wiseman, B., Elvinger, F., Guenette, D.K., Toth, T.E., Engle, R.E., Emerson, S.U., Purcell, R.H.,** 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.

**Mushahwar IK.** Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol*. 2008, **80**:646-658.

**Noad R, Roy P.** Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol*. 2003; 11:438-44. Review.

**Panda SK, Thakral D, Rehman S.** Hepatitis E virus. *Rev Med Virol*. 2007, **17**:151-180. Review.

**Rose N, Boutrouille A, Fablet C, Madec F, Eloit M, Pavio N.** The use of Bayesian methods for evaluating the performance of a virus-like particles-based ELISA for serology of hepatitis E virus infection in swine. *J Virol Methods*. 2010, **163**:329-335.

**Tam, A. W., M. M. Smith, M. E. Guerra, C. C. Huang, D. W. Bradley, K. E. Fry, and G. R. Reyes.** Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*. 1991; **185**:120-31.

**Wibawa, I. D., D. H. Muljono, Mulyanto, I. G. Suryadarma, F. Tsuda, M. Takahashi, T. Nishizawa, and H. Okamoto.** 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; **73**:38-44

## *Bibliografia capitolo 4*

**Aggarwal R.** Hepatitis E: does it cause chronic hepatitis? *Hepatology*. 2008;**48**:1328-30.

**Aggarwal R, Kini D, Sofat S, Naik SR, Krawczynski K.** Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet*. 2000; **356**:1081-2.

**Arankalle, V.A., Lole, K.S., Deshmukh, T.M., Chobe, L.P., Ganghe, S.S.** Evaluation of human (genotype 1) and swine (genotype 4)-ORF2- based ELISAs for anti-HEV IgM and IgG detection in an endemic country and search for type 4 human HEV infections. *J. Viral Hepatitis* 2007. **14**, 435–445.

**Banks M, Bendall R, Grierson S, Heath G, Mitchell J, Dalton H.** Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. 2004, **10**: 953-955.

**Bouwknegt, M., Lodder-Verschoor, F., van der Poel, W.H., Rutjes, S.A., de Roda Husman, A.M.** Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. *J. Food Prot.* 2007. **70**, 2889–2895.

**Bouwknegt, M., Rutjes, S.A., Reusken, C.B., Stockhofe-Zurwieden, N., Frankena, K., de Jong, M.C., de Roda Husman, A.M., Poel, W.H.** The course of hepatitis E virus infection in pigs after contactinfection and intravenous inoculation. *BMC Vet. Res.* 2009;**4**, 5–7.

**Branscum AJ, Gardner IA, Johnson WO.** Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Prev Vet Med.* 2005, **68**:145-163.

**Breum, S.O., Hjulsager, C.K., de Deus, N., Segale's, J., Larsen, L.E.,** Hepatitis E virus is highly prevalent in the Danish pig population. *Vet. Microbiol.* 2010; **146**, 144–149.

**Buti, M., Clemente-Cesares, P., Jardi, R., Formiga-Cruz, M., Schaper, M., Valdes, A., Rodriguez-Frias, F., Esteban, R., Girones, R.** Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J. Hepatol.* 2004. **41**, 126–131.

**Caprioli, A., Martelli, F., Ostanello, F., Di Bartolo, I., Ruggeri, F.M., Del Chiaro, L., Tolari, F.** Detection of hepatitis E virus in Italian pig herds. *Vet. Rec.* 2007. **161**, 422–423.

**Chang Y, Wang L, Geng J, Zhu Y, Fu H, Ren F, Li L, Wang X, Zhuang H.** Zoonotic risk of hepatitis E virus (HEV): A study of HEV infection in animals and humans in suburbs of Beijing. *Hepatol Res.* 2009; **39**:1153-8.

**Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardi R, MartIn M, Bofill-Mas S, Girones R.** Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis.* 2003; **9**:448-54.

**Colson, P., Borentain, P., Queyriaux, B., Kaba, M., Moal, V., Gallian, P., Heyries, L., Raoult, D., Gerolami, R.** Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect. Dis.* 2010; **202**, 825–834.

**Dalton, H.R., Bendall, R., Ijaz, S., Banks, M.** Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect. Dis.* 2008; **8**, 698–709.

**Dalton HR, Stableforth W, Thuraijah P, Hazeldine S, Remnarace R, Usama W, Farrington L, Hamad N, Sieberhagen C, Ellis V, Mitchell J, Hussaini SH, Banks M, Ijaz S, Bendall RP.** Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008, **20**:784-790.

**Dalton, H.R., Thuraijah, P.H., Fellows, H.J., Hussaini, H.S., Mitchell, J., Bendall, R., Banks, M., Ijaz, S., Teo, C.G., Levine, D.F.** Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J. Viral Hepatitis* 2007; **14**, 304–309.

**Daniel HD, Warier A, Abraham P, Sridharan G.** Age-wise exposure rates to hepatitis e virus in a southern Indian patient population without liver disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; **71**:675-8.

**de Deus N., Seminati, C., Pina S., Mateu, E., Martn M., Segale´ s, J.,** Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and feces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet. Microbiol.* 2007; **119**, 105–114.

**de Deus, N., Casas, M., Peralta, B., Nofrari´as, M., Pina, S., Marti´n, M., Segale´ s, J.,** Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet. Microbiol.* 2008; **132**, 19–28.

**Di Bartolo, I., Martelli, F., Inglese, N., Pourshaban, M., Caprioli, A., Ostanello, F., Ruggeri, F.M.** Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet. Microbiol.* 2008; **132**, 47–55.

**Di Bartolo I, Ponterio E, Castellini L, Ostanello F, Ruggeri FM.** Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol.* 2011, **149**:330-338.

**Di Martino, B., Di Profio, F., Martella, V., Di Felice, E., Di Francesco, C.E., Ceci, C., Marsilio, F..** Detection of hepatitis E virus in slaughtered pigs in Italy. *Arch. Virol.* 2010; **155**, 103–106.

**Emerson, S.U., Purcell, R.H..** Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 2003; **13**, 145–154.

**Engle RE, Yu C, Emerson SU, Meng XJ, Purcell RH.** Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2002, **40**:4576-80.

**Erker, J.C., Desai, S.M., Mushahwar, I.K..** Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. *J. Virol. Methods* 1999; **81**, 109–113.

**Feagins, A.R., Opriessnig, T., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Meng, X.J..** Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J. Gen. Virol.* 2007; **88**, 912–917.

**Fernandez-Barredo, S., Galiana, C., Garcia, A., Vega, S., Gomez, M.T., Perez- Gracia, M.T..** Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcriptionpolymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2006; **18**, 462–465.

**Halbur, P.G., Kasorndorkbua, C., Gilbert, C., Guenette, D., Potters, M.B., Purcell, R.H., Emerson, S.U., Toth, T.E., Meng, X.J..** Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J. Clin. Microbiol.* 2001; **39**, 918–923.

**Herremans M, Duizer E, Jusic E, Koopmans MP.** Detection of hepatitis E virus-specific immunoglobulin a in patients infected with hepatitis E virus genotype 1 or 3. *Clin Vaccine Immunol.* 2007, **14**:276-280.

**Ijaz S, Vyse AJ, Morgan D, Pebody RG, Tedder RS, Brown D.** Indigenous hepatitis E virus infection in England: more common than it seems. *J Clin Virol.* 2009, **44**:272-276.

**Jiménez de Oya N, de Blas I, Blázquez AB, Martín-Acebes MA, Halaihel N, Gironés O, Saiz JC, Escibano-Romero E.** Widespread distribution of hepatitis E virus in Spanish pig herds. *BMC Res Notes.* 2011, **4**:412.

**Joseph L, Gyorkos TW, Coupal L.** Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am J Epidemiol.* 1995, **141**:263-272.

**Kanai, Y., Tsujikawa, M., Yunoki, M., Nishiyama, S., Ikuta, K., Hagiwara, K..** Long-term shedding of hepatitis E virus in the feces of pigs infected naturally, born to sows with and without maternal antibodies. *J. Med. Virol.* 2010; **82**, 69–76.

**La Rosa G, Muscillo M, Vennarucci VS, Garbuglia AR, La Scala P, Capobianchi MR.** Hepatitis E virus in Italy: molecular analysis of travel-related and autochthonous cases. *J Gen Virol.* 2011; **92**:1617-26.

**Leblanc, D., Ward, P., Gagne, M.J., Poitras, E., Muller, P., Trottier, Y.L., Simard, C., Houde, A...** Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *Int. J. Food Microbiol.* 2007; **117**, 160–166.

**Li, T.C., Chijiwa, K., Sera, N., Ishibashi, T., Etoh, Y., Shinohara, Y., Kurata, Y., Ishida, M., Sakamoto, S., Takeda, N., Miyamura, T.** Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; **11**, 1958–1960.

**Lu, L., Li, C., Hagedorn, C.H.** Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* 2006; **16**, 5–36.

**Mansuy, J.M., Peron, J.M., Abravanel, F., Poirson, H., Dubois, M., Miedouge, M., Vischi, F., Alric, L., Vinel, J.P., Izopet, J.** Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J. Med. Virol.* 2004; **74**, 419–424.

**Martelli, F., Caprioli, A., Zengarini, M., Marata, A., Fiegna, C., Di Bartolo, I., Ruggeri, F.M., Delogu, M., Ostanello, F.** Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet. Microbiol.* 2008; **126**, 74–81.

**Martelli, F., Toma, S., Di Bartolo, I., Caprioli, A., Ruggeri, F.M., Lelli, D., Bonci, M., Ostanello, F.** Detection of Hepatitis E Virus (HEV) in Italian pigs displaying different pathological lesions. *Res. Vet. Sci.* 2010; **88**, 492–496.

**Martín M, Segalés J, Huang FF, Guenette DK, Mateu E, de Deus N, Meng XJ.** Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs. *Vet Microbiol.* 2007; **122**:16-24.

**Masia G, Orrù G, Liciardi M, Desogus G, Coppola RC, Murru V, Argiolas M, Orrù G.** Evidence of hepatitis E virus (HEV) infection in human and pigs in Sardinia, Italy. *J Prev Med Hyg.* 2009, **50**:227-231.

**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**:857-61.

**Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K., Mishiro, S.** Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* 2003; **188**, 944.

**McCreary, C., Martelli, F., Grierson, S., Ostanello, F., Nevel, A., Banks, M.** Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 2008; **163**, 261–265.

**Meng XJ.** Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2003, **278**:185-216.

**Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., Haynes, J.S., Thacker, B.J., Emerson, S.U.** A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997; **94**, 9860–9865.

**Mushawar, I.K.** Hepatitis E virus: Molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology and prevention. *J. Med. Virol.* 2008; **80**, 646–658.

**Norder, H., Sundqvist, L., Magnusson, L., Ostergaard Breum, S., Lo'fdahl, M., Larsen, L.E., Hjulsager, C.K., Magnius, L., Bottiger, B.E., Widen, F.** Endemic hepatitis E in two Nordic countries. *Euro Surveill.* 2009; **14**, 14.

**Panda, S.K., Thakral, D., Rehman, S.** Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 2007; **17**, 151–180.

**Peralta, B., Mateua, E., Casasa, M., de Deusa, N., Martin, M., Pina, S.** Genetic characterization of the complete coding regions of genotype 3 hepatitis E virus isolated from Spanish swine herds. *Virus Res.* 2009; **139**, 111–116.

**Preiss JC, Plentz A, Engelmann E, Schneider T, Jilg W, Zeitz M, Duchmann R.** Autochthonous hepatitis E virus infection in Germany with sequence similarities to other European isolates. *Infection.* 2006, **34**:173-175.

**Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2001. Hepatitis E virus. In: Knipe, D., Howley, P., Griffin, D., Lamb, R., Martin, M., Roizman, B. (Eds.), Fields Virology. 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 3051–3061.**

**Rose, N., Boutrouille, A., Fablet, C., Madec, F., Eloit, M., Pavio, N..** The use of Bayesian methods for evaluating the performance of a viruslike particles-based ELISA for serology of hepatitis E virus infection in swine. *J. Virol. Methods* 2010; **163**, 329–335.

**Rutjes SA, Lodder-Verschoor F, Lodder WJ, van der Giessen J, Reesink H, Bouwknegt M, de Roda Husman AM.** Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands. *J Virol Methods.* 2010, **168**:197-206.

**Rutjes, S.A., Lodder, W.J., Lodder-Verschoor, F., van den Berg, H.H., Vennema, H., Duizer, E., Koopmans, M., de Roda Husman, A.M..** Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; **15**, 381–387.

**Seminati, C., Mateu, E., Peralta, B., de Deus, N., Martin, M..** Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet. J.* 2008; **175**, 130–132.

**Tei S, Kitajima N, Ohara S, Inoue Y, Miki M, Yamatani T, Yamabe H, Mishiro S, Kinoshita Y.** Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol.* 2004, **74**:67-70.

**Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., Mishiro, S..** Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; **362**, 371–373.

**van der Poel WH, Verschoor F, van der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Kooreman M, de Roda Husman AM.** Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2001, **7**:970-976.

**Vasickova, P., Psikal, I., Widen, F., Smitalova, R., Bendova, J., Pavlik, I., Kralik, P..** Detection and genetic characterization of Hepatitis E virus in Czech pig production herds. *Res. Vet. Sci.* 2009; **87**, 143–148.

**Widdowson MA, Jaspers WJ, van der Poel WH, Verschoor F, de Roda Husman AM, Winter HL, Zaaijer HL, Koopmans M.** Cluster of cases of acute hepatitis associated with hepatitis E virus infection acquired in the Netherlands. *Clin Infect Dis.* 2003, **36**:29-33.

**Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y., Okamoto, H.** Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J. Gen. Virol.* 2003; **84**, 2351–2357.

**Zanetti, A.R., Schlauder, G.G., Romano, L., Tanzi, E., Fabris, P., Dawson, G.J., Mushahwar, I.K.** Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J. Med. Virol.* 1999; **57**, 356–360.

**Zheng Y, Ge S, Zhang J, Guo Q, Ng MH, Wang F, Xia N, Jiang Q.** Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. *J Infect Dis.* 2006; **193**:1643-9.

## *Bibliografia capitolo 5*

**Barry, A. F., A. F. Alfieri, and A. A. Alfieri.** High genetic diversity in RdRp gene of Brazilian porcine sapovirus strains. *Vet. Microbiol.* 2008; **131**:185–191.

**Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS.** Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev.* 2008; **225**:190-211. Review.

**Flynn, W. T., L. J. Saif, and P. D. Moorhead.** Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* 1988; **49**:819–825.

**Glass RI, Parashar UD, Estes MK.** Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2009; **361**:1776-85.

**Green, K. Y., R. M. Chanock, and A. Z. Kapikian.** Human caliciviruses, 2001. p. 841–874. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.

**Guo, M. J., K. O. Hayes, A. Cho, V. Parwani, L. M. Lucas, and L. J. Saif.** Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type Cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. *J. Virol.* 2001; **75**:9239–9251

**Hansman, G. S., K. Katayama, N. Maneekarn, S. Peerakome, P. Khamrin, S. Tonusin, S. Okitsu, O. Nishio, N. Takeda, and H. Ushijima.** Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *Journal of clinical microbiology* 2004.**42**:1305-1307.

**Hansman GS, Takeda N, Oka T, Oseto M, Hedlund KO, Katayama K.** Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerg Infect Dis.* 2005;**11**:1916-20.

**Ike AC, Hartelt K, Oehme RM, Brockmann SO.** Detection and characterization of sapoviruses in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany. *J Clin Virol.* 2008; **43**:37-41.

**Jeong, C., S. I. Park, S. H. Park, H. H. Kim, S. J. Park, J. H. Jeong, H. E. Choy, L. J. Saif, S. K. Kim, M. I. Kang, B. H. Hyun, and K. O. Cho.** Genetic diversity of porcine sapoviruses. *Vet. Microbiol.* 2007.**122**:246–257.

**Jiang, X., P. W. Huang, W. M. Zhong, T. Farkas, D. W. Cubitt, and D. O. Matson.** Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 1999.**83**:145–154.

**Koopmans M, Vinjé J, Duizer E, de Wit M, van Duijnhoven Y.** Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *Novartis Found Symp.* 2001; **238**:197-214;

**Martella, V., E. Lorusso, K. Banyai, N. Decaro, M. Corrente, G. Elia, A. Cavalli, A. Radogna, V. Costantini, L. J. Saif, A. Lavazza, L. Di Trani, and C. Buonavoglia.** Identification of a porcine calicivirus related genetically to human sapoviruses. *Journal of clinical microbiology* 2008; **46**:1907-1913.

**Martinez, M. A., A. C. Alcalá, G. Carruyo, L. Botero, F. Liprandi, and J. E. Ludert.** Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. *Vet. Microbiol.* 2006**116**:77–84.

**Mattison K, Shukla A, Cook A, Pollari F, Friendship R, Kelton D, Bidawid S, Farber JM.** Human noroviruses in swine and cattle. *Emerg Infect Dis.* 2007; **13**:1184-8.

**Saif, L. J., E. H. Bohl, K. W. Theil, R. F. Cross, and J. A. House.** Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J. Clin. Microbiol.* 1980; **12**:105–111.

**Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S.** Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol.*1998; **143**:1215-21.

**Svraka, S., H. Vennema, B. van der Veer, K. O. Hedlund, M. Thorhagen, J. Siebenga, E. Duizer, and M. Koopmans.** Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe. *Journal of clinical microbiology* 2010; **48**:2191-2198.

**van Der Poel WH, Vinjé J, van Der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MP.** Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis.* 2000; **6**:36-41.

**Vinje', J., H. Deijl, R. van der Heide, D. C. Lewis, K.-O. Hedlund, L. Svensson, and M. P. G. Koopmans.** Molecular detection and epidemiology of "Sapporo-like viruses." *J. Clin. Microbiol.* 2000; **38**:530–536.

**Wang, Q.-H., M. G. Han, S. Cheetham, M. Souza, J. A. Funk, and L. J. Saif.** Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; **12**:1874–1881.

**Wang, Q.-H., M. G. Han, J. A. Funk, G. Bowman, D. A. Janies, and L. J. Saif.** Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2005; **43**:5963–5972

**Wang, Q.-H., M. Souza, J. A. Funk, W. Zhang, and L. J. Saif.** Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. *J. Clin. Microbiol.* 2006; **44**:2057–2062

## *Bibliografia capitolo 6*

**Ando T., Noel J. S. and Fankhauser R. L.** Genetic classification of Norwalk-like viruses. *Journal of Infectious Diseases* 2000; **181**, S336-S348

**Cheetham, S., Souza, M., Meulia, T., Grimes, S., Han, M. G. e Saif, L. J.** Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *Journal of Virology* 2006; **80**, 10372-10381

**Farkas T, Nakajima S, Sugieda M, Deng X, Zhong W, Jiang X.** Seroprevalence of noroviruses in swine. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:657-61.

**Hutson AM, Atmar RL, Marcus DM, Estes MK.** Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens. *J Virol.* 2003; **77**:405-15.

**Kaplon J, Guenau E, Asdrubal P, Pothier P, Ambert-Balay K.** Possible novel nebovirus genotype in cattle, France. *Emerg Infect Dis.* 2011;**17**:1120-3.

**Mattison K, Shukla A, Cook A, Pollari F, Friendship R, Kelton D, Bidawid S, Farber JM.** Human noroviruses in swine and cattle. *Emerg Infect Dis.* 2007; **13**:1184-8.

**Mauroy A., Scipioni A., Mathijs E., Saegerman C., Mast J., Bridger, J. C., Ziant D., Thys C. and Thiry E.** Epidemiological study of bovine norovirus infection by RT-PCR and a VLP-based antibody ELISA. *Veterinary Microbiology* 2009; **137**, 243-251

**Mayo M. A.** Names of viruses and virus species - an editorial note. *Archives of Virology* 2002; **147**, 1463-1464

**Mijovski J. Z., Poljsakprijatelj M., Steyer A., Barlicmaganja D. and Koren S.** Detection and molecular characterization of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. *Infection, Genetics and Evolution* 2010; **10**, 413-420

**Monini M., Cappuccini F., Battista P., Falcone E., Lavazza A. and Ruggeri F. M.** Molecular characterization of bovine rotavirus strains circulating in northern Italy, 2003-2005. *Veterinary Microbiology* 2008; **129**, 384-389

**Oliver SL, Dastjerdi AM, Wong S, El-Attar L, Gallimore C, Brown DW, Green J, Bridger JC.** Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol.* 2003; **77**:2789-98.

**Oliver S. L., Asobayire E., Dastjerdi A. M. and Bridger J. C.** Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology* 2006; **350**, 240-250

**Pelosi E, Lambden PR, Caul EO, Liu B, Dingle K, Deng Y, Clarke IN.** The seroepidemiology of genogroup 1 and genogroup 2 Norwalk-like viruses in Italy. *J Med Virol.* 1999; **58**:93-9.

**Reuter G., Pankovics P. and Egyed L.** Detection of genotype 1 and 2 bovine noroviruses in Hungary. *Veterinary Record* 2009; **165**, 537-538

**Scipioni A., Mauroy A., Vinjé J. and Thiry E.** Animal noroviruses. *Veterinary Journal* 2008; **178**, 32-45

**Smiley J. R., Hoet A. E., Trávén M., Tsunemitsu H. and Saif L. J.** Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; **41**, 3089-3099

**van der Poel W. H., van der Heide R., Verschoor F., Gelderblom H., Vinjé J. and Koopmans M. P.** Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands. *Veterinary Microbiology* 2003; **92**, 297-309

**van Der Poel WH, Vinjé J, van Der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MP.** Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis.* 2000; **6**:36-41.

**Vildevall M, Grahn A, Oliver SL, Bridger JC, Charpilienne A, Poncet D, Larson G, Svensson L.** Human antibody responses to bovine (Newbury-2) norovirus (GIII.2) and association to histo-blood group antigens. *J Med Virol.* 2010; **82**:1241-6.

**Verhoef L, Boxman IL, Duizer E, Rutjes SA, Vennema H, Friesema IH, de Roda Husman AM, Koopmans M.** Multiple exposures during a norovirus outbreak on a river-cruise sailing through Europe, 2006. *Euro Surveill.* 2008;13.

**Verhoef LP, Kroneman A, van Duynhoven Y, Boshuizen H, van Pelt W, Koopmans M;**

Foodborne Viruses in Europe Network. Selection tool for foodborne norovirus outbreaks. *Emerg Infect Dis.* 2009; **15**:31-8.

**Widdowson MA, Rockx B, Schepp R, van der Poel WH, Vinje J, van Duynhoven YT, Koopmans MP.** Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *J Med Virol.* 2005; **76**:119-28.

**Yilmaz H, Turan N, Altan E, Bostan K, Yilmaz A, Helps CR, Cho KO.** First report on the phylogeny of bovine norovirus in Turkey. *Arch Virol.* 2011; **156**:143-7.

**Zakhour M, Maalouf H, Di Bartolo I, Haugarreau L, Le Guyader FS, Ruvoën-Clouet N, Le Saux JC, Ruggeri FM, Pommepuy M, Le Pendu J.** Bovine norovirus: carbohydrate ligand, environmental contamination, and potential cross-species transmission via oysters. *Appl Environ Microbiol.* 2010; **76**:6404-11.

## *Bibliografia capitolo 7*

**Ando T, Jin Q, Gentsch JR, Monroe SS, Noel JS, Dowell SF, Cicirello HG, Kohn MA, Glass RI.** Epidemiologic applications of novel molecular methods to detect and differentiate small round structured viruses (Norwalk-like viruses). *J Med Virol.* 1995;**47**:145-52.

**Boccia D, Tozzi AE, Cotter B, Rizzo C, Russo T, Buttinelli G, Caprioli A, Marziano ML, Ruggeri FM.** Waterborne outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2002; **8**:563-8.

**da Silva AK, Le Saux JC, Parnaudeau S, Pommepuy M, Elimelech M, Le Guyader FS.** Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl Environ Microbiol.* 2007;**73**:7891-7.

**Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS.** Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2010; **8**:231-41

**Escobar-Herrera J, Cancio C, Guzmán GI, Villegas-Sepulveda N, Estrada-García T, García-Lozano H, Gómez-Santiago F, Gutiérrez-Escolano AL.** Construction of an internal RT-PCR standard control for the detection of human caliciviruses in stool. *J Virol Methods.* 2006 ;**137**:334-8.

**Gilpatrick SG, Schwab KJ, Estes MK, Atmar RL.** Development of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay for the detection of Norwalk virus. *J Virol Methods.* 2000; **90**:69-78.

**Glass RI, Parashar UD, Estes MK.** Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2009 ; **361**:1776-85. Review.

**Green SM, Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN.** Capsid diversity in small round-structured viruses: molecular characterization of an antigenically distinct human enteric calicivirus. *Virus Res.* **1995**; 37:271-83.

**Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Hale AD, Crawford SE, Ciarlet M, Green J, Gallimore C, Brown DW, Jiang X, Estes MK.** Expression and self-assembly of Grimsby virus: antigenic distinction from Norwalk and Mexico viruses. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;**6**:142-5.

**Koo HL, Ajami N, Atmar RL, DuPont HL.** Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discov Med.* 2010;**10**:61-70.

**Mladenova Z, Korsun N, Geonova T, Di Bartolo I, Fiore L, Ruggeri FM; Norovirus Study Group.** Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses detected in outbreak and sporadic cases of acute gastroenteritis in Bulgaria. *J Med Virol.*

2008;**80**:2161-8.

**Myrnel M, Rimstad E, Wasteson Y.** Immunomagnetic separation of a Norwalk-like virus (genogroup I) in artificially contaminated environmental water samples. *Int J Food Microbiol.* 2000;**62**:17-26.

**Shiota T, Okame M, Takanashi S, Khamrin P, Takagi M, Satou K, Masuoka Y, Yagyu F, Shimizu Y, Kohno H, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H.** Characterization of a broadly reactive monoclonal antibody against norovirus genogroups I and II: recognition of a novel conformational epitope. *J Virol.* 2007;**81**:12298-306.

**Takeda N, Katayama K.** Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods.* 2002;**100**:107-14.

**Verhoef L, Boxman IL, Duizer E, Rutjes SA, Vennema H, Friesema IH, de Roda Husman AM, Koopmans M.** Multiple exposures during a norovirus outbreak on a river-cruise sailing through Europe, 2006. *Euro Surveill.* 2008;**13**.

**Verhoef LP, Kroneman A, van Duynhoven Y, Boshuizen H, van Pelt W, Koopmans M;** Foodborne Viruses in Europe Network. Selection tool for foodborne Norovirus outbreaks. *Emerg Infect Dis.* 2009; **15**:31-8.

## *Bibliografia capitolo 8*

**Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, Al-Ibrahim MS, Chen WH, Ferreira J, Estes MK, Graham DY, Opekun AR, Richardson C, Mendelman PM.** Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness. *N Engl J Med.* 2011; **365**:2178-87.

**Boccia D, Tozzi AE, Cotter B, Rizzo C, Russo T, Buttinelli G, Caprioli A, Marziano ML, Ruggeri FM.** Waterborne outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2002; **8**:563-8.

**Bull RA, Eden JS, Luciani F, McElroy K, Rawlinson WD, White PA.** Contribution of intra- and interhost dynamics to norovirus evolution. *J Virol.* 2012; **86**:3219-29.

**Buonaguro L, Tornesello ML, Gallo RC, Marincola FM, Lewis GK, Buonaguro FM.** Th2 polarization in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects, as activated by HIV virus-like particles. *J Virol.* 2009; **83**:304-13.

**Buonaguro L, Tornesello ML, Tagliamonte M, Gallo RC, Wang LX, Kamin-Lewis R, Abdelwahab S, Lewis GK, Buonaguro FM.** Baculovirus-derived human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-cell responses. *J Virol.* 2006; **80**(18):9134-43.

**Diehl, S., J. Anguita, A. Hoffmeyer, T. Zapton, J. N. Ihle, E. Fikrig, and M. Rincon.** Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity* 2000; **13**:805–815.

**Diehl, S., C. W. Chow, L. Weiss, A. Palmetshofer, T. Twardzik, L. Rounds, E. Serfling, R. J. Davis, J. Anguita, and M. Rincon.** Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation. *J. Exp. Med.* 2002; **196**:39–49.

**Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS.** Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2010; **8**:231-41

**EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** Scientific Opinion on An update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA Journal* 2011; **29**:2190

**Estes MK, Ball JM, Guerrero RA, Opekun AR, Gilger MA, Pacheco SS, Graham DY.** Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis.* 2000; **181**:S367-73.

**Estes MK, Prasad BV, Atmar RL.** Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr Opin Infect Dis.* 2006; **19**:467-74. Review.

**Glass RI, Parashar UD, Estes MK.** Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2009 ; **361**:1776-85. Review.

**Gray JJ, Kohli E, Ruggeri FM, Vennema H, Sánchez-Fauquier A, Schreier E, Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Giraudon H, Pothier P, Di Bartolo I, Inglese N, de Bruin E, van der Veer B, Moreno S, Montero V, de Llano MC, Höhne M, Diedrich SM.** European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; **14**:1349-55.

**Guerrero RA, Ball JM, Krater SS, Pacheco SE, Clements JD, Estes MK.** Recombinant Norwalk virus-like particles administered intranasally to mice induce systemic and mucosal (fecal and vaginal) immune responses. *J Virol.* 2001; **75**:9713-22.

**Heath, W. R., and F. R. Carbone.** Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 2001; **1**:126–134.

**Noad R, Roy P.** Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 2003; **11**:438-44. Review.

**Pinto, L. A., J. Edwards, P. E. Castle, C. D. Harro, D. R. Lowy, J. T. Schiller, D. Wallace, W. Kopp, J. W. Adelsberger, M. W. Baseler, J. A. Berzofsky, and A. Hildesheim.** Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles 28. *J. Infect. Dis.* 2003; **188**:327–338.

**Rock KL, Shen L.** Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev.* 2005; **207**:166-83. Review.

**Souza M, Cheetham SM, Azevedo MS, Costantini V, Saif LJ.** Cytokine and antibody responses in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus genogroup II.4 (HS66 strain). *J Virol.* 2007b; **81**: 9183-92.

**Souza M, Costantini V, Azevedo MS, Saif LJ.** A human norovirus-like particle vaccine adjuvanted with ISCOM or mLT induces cytokine and antibody responses and protection to the homologous GII.4 human norovirus in a gnotobiotic pig disease model. *Vaccine*. 2007a; 25:8448-59.

**Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ.** Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis*. 2000; 182:302-5.

**Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Estes MK.** Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol*. 2003; 108:241-7.

**Steinman, R. M., and J. Banchereau.** Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007; 449:419–426.

**Wheeler CM, Bautista OM, Tomassini JE, Nelson M, Sattler CA, Barr E;** Protocol 11 study Investigators. Safety and immunogenicity of co-administered quadrivalent human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) and hepatitis B (HBV) vaccines. *Vaccine*. 2008; 26:686-96.



