

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

EPIDEMIOLOGIA E CONTROLLO DELLE ZONOSI

Ciclo XX

Settore scientifico disciplinare di afferenza: VET 05

**L'EPATITE E NEI SUIDI: EPIDEMIOLOGIA, DIAGNOSI E
FILOGENESI**

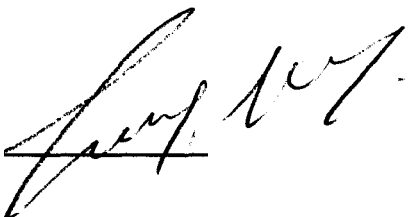
Presentata da: Dott.ssa FRANCESCA MARTELLI

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Luigi Morganti

Dott. Fabio Ostanello



Esame finale anno 2008

INDICE

INTRODUZIONE	1
PARTE GENERALE	6
CAPITOLO 1: EZIOLOGIA	7
1.1 CENNI STORICI	7
1.2 CARATTERISTICHE GENERALI	10
1.3 STRUTTURA GENOMICA	11
1.3.1 ORF1 e proteine codificate	13
1.3.2 ORF2 e proteine codificate	14
1.3.3 ORF3 e proteine codificate	14
1.4 GENOTIPI VIRALI	15
1.5 VARIABILITA' GENETICA E QUASISPECIE	18
1.6 INQUADRAMENTO TASSONOMICO	21
CAPITOLO 2: EPIDEMIOLOGIA	23
2.1 EPIDEMIOLOGIA NELL'UOMO	23
2.1.1 Caratteristiche dell'infezione nei Paesi in via di sviluppo	25
..... 2.1.1.2 Fattori di rischio correlati all'infezione.....	27
2.1.2 Caratteristiche dell'infezione nei Paesi industrializzati	28

2.1.2.1 Modalità di acquisizione dell'infezione nei Paesi industrializzati.....	32
2.1.2.2 Fattori di rischio correlati all'infezione nei Paesi industrializzati.....	33
2.2 EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE NELLE SPECIE ANIMALI RECETTIVE ALL'INFEZIONE	35
2.2.1 <i>HEV nel suino</i>	37
2.2.2 <i>HEV nel cinghiale</i>	40
2.2.3 <i>HEV nei topi</i>	41
2.2.4 <i>HEV nelle altre specie recettive</i>	42
2.2.5 <i>Avian HEV</i>	43
2.3 DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA DEI DIVERS GENOTIPI DI HEV	44
CAPITOLO 3: HEV COME ZONOSI	46
3.1 POSSIBILITA' DI INFEZIONE INTERSPECIFICA	46
3.2 OMOLOGIA TRA CEPPI UMANI E ANIMALI CIRCOLANTI SULLO STESSO TERRITORIO	47
3.3 TRASMISSIONE ALIMENTARE	49
3.4 SIEROPREVALENZE PIU' ELEVATE IN ANIMALI A CONTATTO CON ANIMALI INFETTI E TRASMISSIONE DIRETTA	53
CAPITOLO 4: PATOGENESI E SINTOMATOLOGIA	57

4.1 LA MALATTIA NELL’UOMO	58
4.1.1 Patogenesi	58
4.1.2 Caratteristiche cliniche	59
4.2 LA MALATTIA NEL SUINO	63
4.1.3 <i>Patogenesi</i>	63
4.1.2 <i>Caratteristiche cliniche</i>	73
CAPITOLO 5: TECNICHE DIAGNOSTICHE	75
5.1 TECNICHE DI DIAGNOSI DIRETTA DELL’INFEZIONE ...75	
5.1.1 Microscopia elettronica	75
5.1.2 Polymerase chain reaction (PCR)	75
5.1.2.1 PCR qualitativa	76
5.1.2.2 PCR quantitativa	77
5.1.3 Coltivazione in colture cellulari	80
5.1.4 Tecniche istopatologiche	80
5.2 TECNICHE DI DIAGNOSI DIRETTA DELL’INFEZIONE .81	
CAPITOLO 6: PROFILASSI	84
6.1: PROFILASSI DIRETTA	84
6.1.1 Profilasi diretta nelle aree iperendemiche	84
6.1.2 Profilassi diretta nelle aree non iperendemiche	85

6.2 PROFILASSI INDIRETTA.....	87
6.2.1 <i>Espressione in cellule procariote.....</i>	87
6.2.2 <i>Espressione in cellule d'insetto.....</i>	88
6.2.3 <i>Espressione in lieviti ed altre cellule.....</i>	88
6.2.4 <i>Vaccini a subunità.....</i>	88
6.2.5 <i>HEV ricombinante in Virus Like Particles (VLPs).....</i>	89
INTRODUZIONE ALLA SEZIONE SPERIMENTALE... 	90
CAPITOLO 7: INDAGINE SULLA PREVALENZA D'INFEZIONE IN ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA.....	92
7.1 MATERIALI E METODI.....	92
7.1.1 <i>Campionamento.....</i>	92
7.1.2 <i>Trattamento dei campioni di feci.....</i>	93
7.1.3 <i>Estrazione dell'RNA e RT-NESTED-PCR.....</i>	94
7.1.4 <i>Sequenziamento ed analisi filogenetica.....</i>	96
7.1.5 <i>Analisi statistica.....</i>	97
7.2 RISULTATI.....	97
7.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI.....	108

CAPITOLO 8: STUDIO LONGITUDINALE DI PREVALENZA DI HEV IN ALLEVAMENTO: DAI RIPRODUTTORI AL MACELLO.....111

8.1 MATERIALI E METODI.....111

8.1.1 Raccolta dei campioni.....111

8.1.2 Preparazione dei campioni.....112

8.1.3 Estrazione dell'RNA, RT-NESTED PCR.....113

8.2 RISULTATI.....115

8.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI.....119

CAPITOLO 9: EPIDEMIOLOGIA E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) IDENTIFICATI IN SUINI ITALIANI CON DIVERSI QUADRI PATOLOGICI.....121

9.1 MATERIALI E METODI.....121

9.1.1 Animali.....121

9.1.2 Prelievo e trattamento dei campioni.....122

9.1.3 Estrazione dell'RNA.....123

9.1.4 PCR e NESTED PCR.....124

9.1.5 Elettroforesi.....126

9.1.6 Purificazione.....127

9.1.7 Sequenziamento ed analisi filogenetica.....128

9.1.8 Analisi statistica.....128

9.2 RISULTATI.....130

9.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI	143
CAPITOLO 10: IDENTIFICAZIONE DI HEV IN UNA POPOLAZIONE DI CINGHIALI SOTTOPOSTA A CONTROLLO DEMOGRAFICO	147
10.1 MATERIALI E METODI	147
10.1.1 <i>Popolazione di cinghiali</i>	147
10.1.2 <i>Raccolta dei campioni</i>	148
10.1.3 <i>Estrazione dell'RNA e NESTED RT-PCR</i>	149
10.1.4 <i>Sequenziamento ed analisi filogenetica</i>	150
10.1.5 <i>Analisi statistica</i>	151
10.2 RISULTATI	151
10.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI	158
CAPITOLO 11: ESCREZIONE FECALE DI HEV A DIFFERENTI STADI DI PRODUZIONE E NEI LAGONI DI STOCCAGGIO IN UK	162
11.1 MATERIALI E METODI	162
11.1.1 <i>Campionamento delle feci</i>	162
11.1.2 <i>Risospensione delle feci</i>	163
11.1.3 <i>Estrazione dell'RNA e Housekeeping RT-PCR</i>	163
11.1.4 <i>RT-NESTED-PCR</i>	165
11.1.5 <i>Sequenziamento ed analisi filogenetica</i>	167
11.1.6 <i>Analisi statistica</i>	168

11.2 RISULTATI	168
11.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI	173
CONCLUSIONI	176
BIBLIOGRAFIA	180

INTRODUZIONE

A partire dagli anni '90, l'allevamento intensivo del suino è andato incontro a consistenti modificazioni, soprattutto per far fronte all'aumento delle richieste produttive verificatosi a livello mondiale.

La globalizzazione del commercio e il conseguente aumento di scambi di animali e prodotti di origine animale, i progressi nella genetica, nell'alimentazione, nel management e nella sanità, hanno dato un contributo significativo a questo sviluppo.

In particolare, il miglioramento delle pratiche igienico sanitarie ha consentito la possibilità di ottenere allevamenti “*high health*”, cioè esenti da alcune delle più comuni malattie respiratorie ed enteriche del suino. E' inoltre notevolmente aumentata la disponibilità di vaccini e farmaci utilizzabili per il controllo, prevenzione e terapia delle principali patologie della specie suina.

Tutti questi importanti cambiamenti hanno però favorito l'insorgenza o l'evoluzione di alcune malattie infettive, in particolare alcune infezioni virali. A fronte di una diminuzione delle “classiche” malattie caratterizzate da alta virulenza e da forme cliniche ben evidenti (Afta, Peste suina classica, Peste suina africana), si è assistito alla comparsa di “nuove” patologie caratterizzate da multifattorialità, andamento endemico, bassa risposta immunitaria, ampia variabilità di segni clinici, stretta dipendenza dai fattori ambientali e di management, buona capacità di trasmissione, capacità di adattarsi e sopravvivere ai cambiamenti apportati alle pratiche di allevamento.

Tra gli agenti responsabili di queste infezioni emergenti si possono annoverare i virus responsabili della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV) e della sindrome multisistemica del deperimento post-svezzamento del suino (PMWS) e delle altre malattie (PDNS, PNP, PRDC) associate all'infezione da porcine circo virus 2 (PCV2).

Oltre a queste patologie emergenti, negli ultimi anni sono stati evidenziati nel suino altri virus responsabili di infezioni spesso asintomatiche. L'importanza di queste segnalazioni va considerata alla luce di alcune considerazioni: a) il ruolo patogenetico di questi virus, le modalità di trasmissione e l'epidemiologia sono spesso poco note; b) l'attuale apatogenicità non esclude la possibilità di una loro futura evoluzione in grado di causare forme cliniche di malattia, in analogia con quanto è accaduto per il PCV2; c) alcuni di questi virus (come il virus dell'epatite E) sono molto simili ai virus responsabili di patologia nell'uomo.

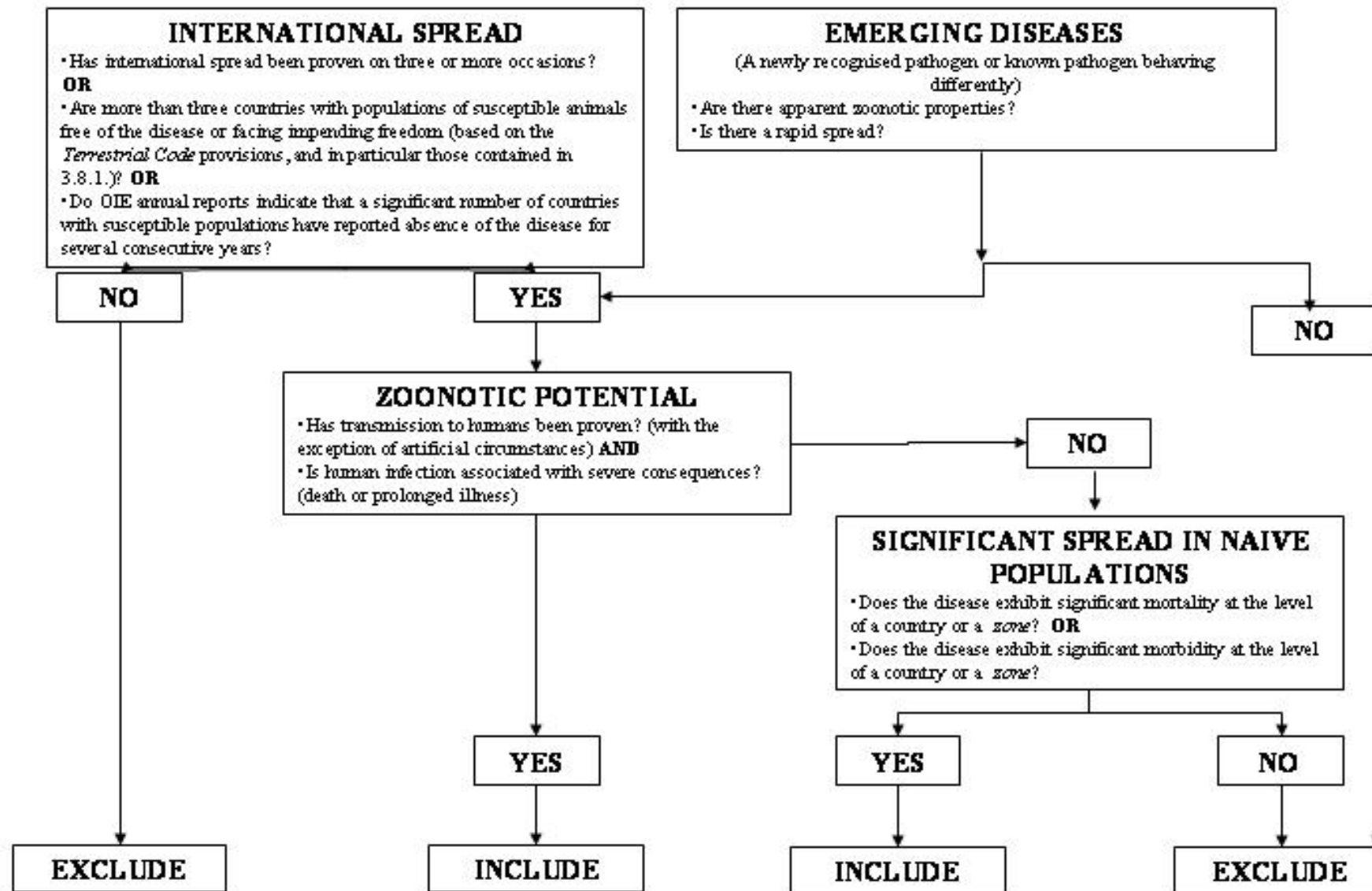
Il lavoro sperimentale condotto durante questo Dottorato di Ricerca in Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi è stato focalizzato sull'approfondimento degli aspetti epidemiologici e patogenetici dell'infezione da virus dell'Epatite E, responsabile di casi di malattia clinica nell'uomo segnalati con sempre maggiore frequenza anche in Europa. Ne sono state per questo analizzate la diffusione in allevamento, l'eventuale correlazione con patologie cliniche del suino, la presenza in prodotti di origine suina destinati al consumo umano, la correlazione filogenetica con ceppi circolanti nel suino e nell'uomo nell'ambito dello stesso territorio geografico.

Le informazioni acquisite hanno contribuito a chiarire il quadro della diffusione dell'infezione da virus dell'epatite E soprattutto in ambito nazionale e a dare indicazioni sul rischio sanitario effettivamente connesso alla presenza di questa infezione nei nostri allevamenti.

Altro fattore che deve essere preso in considerazione in relazione alla necessità di aumentare le conoscenze relative alla presenza e diffusione dell'infezione da HEV sono i nuovi criteri di inclusione nelle liste delle malattie denunciabili stabilite dall'OIE (World Organization for Animal Health) con il Terrestrial Animal Health Code.

Tali criteri infatti fanno riferimento a malattie che devono soddisfare una serie di requisiti per essere considerate suscettibili di interesse a livello internazionale (**Figura 1**).

Figura 1: Albero delle decisioni per l'inclusione di una malattia nella lista dell'OIE (articolo 2.1.1.2 del TAHSC)



In particolare si fa riferimento a :

- Diffusione internazionale provata
- Emergenza della patologia
- Potenziale zoonotico
- Diffusione significativa in popolazioni indenni

Alla luce di queste considerazioni appare evidente come, almeno potenzialmente, l'infezione da HEV soddisfi la maggior parte di tali criteri. Alcuni aspetti epidemiologici, patogenetici oltre che il reale potenziale di trasmissibilità all'uomo mediante contatto diretto ed indiretto non sono ancora del tutto chiariti. Appare comunque indispensabile approfondire le conoscenze fino ad oggi acquisite in modo da permettere una reale e circostanziata analisi dei rischi, sia in termini di impatto sulla possibilità di commercializzazione di animali vivi e di prodotti di origine animale, sia in termini di sanità pubblica per quanto attiene agli eventuali aspetti zoonosici.

PARTE GENERALE

CAPITOLO 1: EZIOLOGIA

1.1 CENNI STORICI

L'epatite E è una patologia virale con caratteristiche cliniche e morfologiche di epatite acuta non soggetta a cronicizzazione, prevalentemente trasmessa per via orofecale.

L'epatite E viene classificata all'interno del gruppo delle cosiddette epatiti trasmissibili per via gastroenterica di tipo non-A, non-B (enterically transmitted non-A, non-B hepatitis, *ET-NANBH*). Con questo acronimo venivano indicate tutte le epatiti dell'uomo, generalmente a carattere epidemico, per cui non era possibile identificare un'eziologia virale da virus dell'Epatite A o dell'Epatite B (Reyes et al., 1990).

La prima identificazione del virus dell'Epatite E, avvenuta tramite l'utilizzo del microscopio elettronico, è da fare risalire alla metà degli anni '70 (Feinstone et al., 1975), quando il virus fu identificato come possibile causa delle ET-NANBH, e temporaneamente classificato nella famiglia *Picornaviridae*, come il virus dell'Epatite A tipo 2 (Panda et al., 2007). La conferma che l'agente eziologico delle ET-NANBH era un virus a RNA, anch'esso responsabile di grandi focolai epidemici, è avvenuta nel 1980 grazie allo studio di campioni di siero provenienti da persone infettatesi durante una vasta epidemia di epatite, scoppiata a Dehli e successivamente diffusasi in India e Kashmir negli anni 1955-56 (Vishwanathan, 1957). I campioni in questione erano risultati privi dei markers sierologici di epatite acuta di tipo A e B, ma era stato possibile identificare al loro interno un agente virale a RNA, riconosciuto in seguito come virus dell'epatite E (Wong et al., 1980). Lo stesso pattern epidemiologico, distinto da quello osservato in corso di infezione da epatite A, era stato identificato in numerosi altri focolai di epatite verificatesi in Asia e nel subcontinente indiano (Panda et al., 2007). La conferma della correlazione tra la presenza del virus dell'epatite E e lo sviluppo di malattia clinica si è avuto nel 1983 (Balayan et al., 1983) grazie ad uno studio condotto da su un volontario che

aveva sviluppato un'epatite acuta dopo l'ingestione di un estratto di feci proveniente da un paziente infetto da epatite non-A, non-B. Il virus, identificato tramite tecniche di immuno-elettro-microscopia dal siero del paziente, è stato successivamente utilizzato per l'infezione sperimentale di macachi, avvenuta con successo (Balayan et al., 1983).

La mancanza di casi registrati fino al 1955 e la rarità della malattia nei Paesi sviluppati, aveva fatto inizialmente pensare all'epatite E come ad una patologia emergente; tuttavia, il verificarsi di numerose epidemie di epatite acuta di origine gastroenterica con caratteristiche cliniche e andamento epidemiologico analoghi a quelli dell'epatite E, si era già verificato in Europa e Stati Uniti tra il 18° e il 19° secolo (Balayan et al., 1983) e ciò aveva fatto avanzare l'ipotesi che l'infezione sia sempre stata diffusa su scala mondiale.

L'RNA del virus dell'Epatite E è stato clonato per la prima volta nel 1990 (Reyes et al., 1990), a partire da un campione di siero umano infetto. Aveva dimensioni di 7,6 Kb, e differiva da tutti quelli fino a quel momento identificati. Il sequenziamento dell'intero genoma virale del primo ceppo identificato, denominato Burma strain, è avvenuto l'anno successivo, quando è stata proposta una iniziale classificazione di HEV in un nuovo genere della famiglia Caliciviridae (Tam et al., 1991).

In seguito alla scoperta del virus, le prime segnalazioni riguardavano aree geografiche a clima tropicale o sub-tropicale con condizioni igienico-sanitarie scadenti: Sud-est asiatico, Medio Oriente, parte dell'Africa e dell'America centro-meridionale. In queste aree l'infezione si manifesta con caratteristiche epidemiche ed è trasmessa per via oro-fecale attraverso acqua o alimenti contaminati (Aggarwal e Krawczynski, 2000).

Fino a pochi anni fa i Paesi industrializzati erano considerati indenni dall'infezione da HEV perché i pochi casi di malattia segnalati riguardavano persone di ritorno da viaggi nelle zone endemiche. Recentemente in USA, Canada, Giappone ed Europa, inclusa l'Italia, sono stati segnalati casi sporadici di malattia autoctoni, cioè in persone senza un'anamnesi di viaggi all'estero (Clemente-Casares et al., 2003; Dalton et

al., 2007b; Emerson and Purcell, 2003; Grieco et al., 2001; Zanetti et al., 1999) e studi sierologico-epidemiologici hanno rilevato elevati valori di prevalenza di anticorpi anti-HEV, talvolta superiori al 20%, nella popolazione sana di molti paesi un tempo considerati indenni (Aggarwal e Krawczynski, 2000).

In campo veterinario, fin dai primi anni '90, anticorpi anti-HEV erano stati rilevati in numerose specie animali: scimmie, suini, roditori, polli, cani, gatti, bovini e ovi-caprini, sia in Paesi in via di sviluppo che industrializzati, facendo supporre che queste specie potessero essere infettate da virus HEV-like (Banks et al., 2004a; Emerson e Purcell, 2003; Hirano et al., 2003b; Meng et al., 2002). In quel periodo si fece strada l'idea che esistessero serbatoi animali d'infezione per l'uomo e fu ipotizzato che alcuni casi sporadici di malattia riportati in letteratura potessero essere di origine zoonosica (Meng et al., 2002).

Nel 1997 fu identificato per la prima volta il virus dell'epatite E nel suino (*Swine, Hepatitis E Virus, Swine HEV*) (Meng et al., 1997). Questo virus fu geneticamente e filogeneticamente correlato a 2 ceppi umani isolati negli USA da pazienti colpiti da epatite E e senza anamnesi di viaggi all'estero (Meng et al., 1997). Da allora, ceppi di HEV suini sono stati isolati praticamente in tutto il mondo ed è stata osservata una spiccata omologia nucleotidica tra questi ed i ceppi umani provenienti dalle stesse regioni geografiche (Banks et al., 2004a; Buti et al., 2004; Caprioli et al., 2007; Goens e Perdue, 2004; Peron et al., 2006; Zheng et al., 2006).

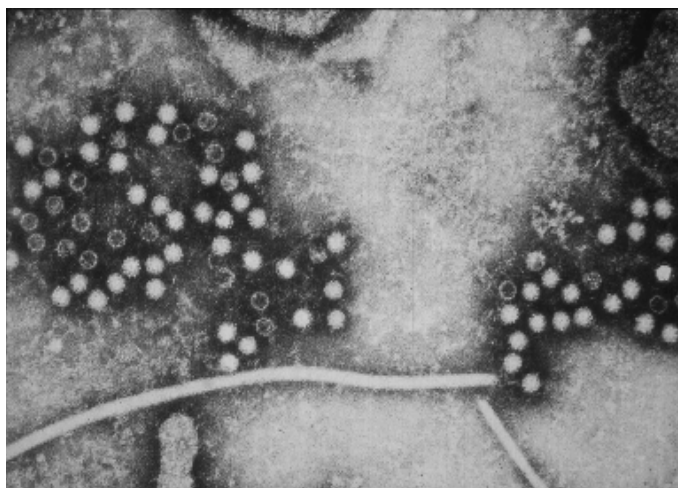
Infezioni sperimentali hanno inoltre dimostrato la possibilità di trasmissione interspecifica di ceppi umani al suino e di ceppi suini a primati non umani (Banks et al., 2004a; Halbur et al., 2001; Meng et al., 2002; Williams et al., 2001) ed alcuni studi hanno riportato di un'elevata prevalenza anticorpale anti-HEV in soggetti professionalmente esposti al contatto con suini (Drobeniuc et al., 2001; Meng et al., 2002; Siochu et al., 2004; 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). Oggi la malattia è considerata una zoonosi emergente.

1.2 CARATTERISTICHE GENERALI

Il virus dell'epatite E ha dimensioni di 27-34 nm, presenta simmetria icosaedrica e non è provvisto di envelope (Fauquet et al., 2005) (vedi **Figura 1.1**). La variabilità nelle dimensioni della particella virale identificata nei diversi laboratori, può essere dovuta alle diverse modalità di conservazione dei campioni e alla sensibilità del virus al congelamento e scongelamento (Panda et al., 2007). Il genoma è costituito da un RNA a singolo filamento positivo, con una coda poly(A) all'estremità 3' (Fauquet et al., 2005). I virioni sono costituiti da una proteina maggiore del capsido di dimensioni di 72kDa, e da una piccola proteina (1.5 kDa) la cui funzione rimane tuttora sconosciuta (Fauquet et al., 2005).

Figura 1.1: Immagine di microscopia elettronica di HEV



Come i *Calicivirus*, le particelle di HEV sono degradate in seguito a centrifugazione ad alta velocità su gradiente di saccarosio (Panda et al., 2007). Il virus dell'Epatite E è certamente in grado di tollerare cambi di pH da alcalino ad acido, perché sopravvive all'acidità gastrica, ma non sembra tollerare elevate concentrazioni di sali (Panda et al., 2007). Per quanto riguarda la resistenza del virus al calore, esistono solo due studi a riguardo (Emerson et al., 2005; Feagins et al., 2008).

Durante il primo studio (Emerson et al., 2005), è stata comparata la resistenza al calore di diversi ceppi di HEV, tramite incubazione a diverse temperature del virus e successiva coltivazione in linee cellulari. Il primo ceppo testato (*Akluj strain*, appartenente al genotipo 1 e proveniente da un paziente indiano affetto da epatite virale) si inattivava completamente a 56°C. Il secondo ceppo (*Sar55 strain*, appartenente al genotipo 1 proveniente da un paziente pakistano), si era dimostrato più stabile a 56°C, ma veniva inattivato per più dell'80% a 60°C. Il terzo ceppo (*Mex14 strain*, appartenente al genotipo 2 e proveniente da un'infezione sperimentale su macachi), era inattivato per il 50% a 56°C, e per il 96% a 60°C.

Nel secondo studio (Feagins et al., 2008) gli Autori hanno valutato la possibilità di inattivare il virus contenuto in fegati suini mediante il calore. Sono state utilizzate tre diverse combinazioni di temperatura e tempo: 56°C per 1 ora, 191°C per 5 minuti (temperatura al cuore 71°C) e 100°C per 5 minuti. Tramite successive infezioni sperimentali, è stato dimostrato che solo i fegati incubati a 56°C contenevano virus ancora infettante.

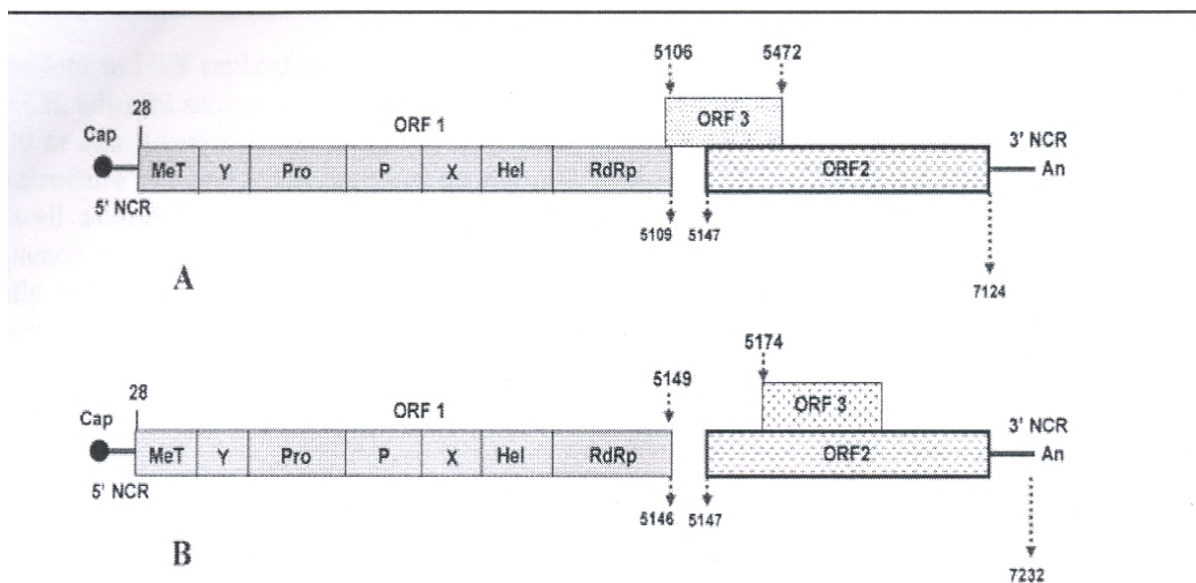
Per quanto riguarda la coltivazione in vitro di HEV, la crescita è stata dimostrata in poche linee cellulari per lo più di derivazione epatica (Tam et al., 1996; Tanaka et al., 2007). Per una più dettagliata descrizione a proposito, si veda il capitolo 5 "Tecniche diagnostiche".

1.3 STRUTTURA GENOMICA

HEV è un virus a RNA a singolo filamento e ad orientamento positivo, di dimensioni di circa 7,3 kb (Fauquet C.M., 2005; 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, 2008). La regione codificante è costituita da tre *Open Reading Frames* (ORF), chiamati ORF1, ORF2 e ORF3 (Tam et al., 1991) (vedi **Figura 1.2**).

Figura 1.2: Rappresentazione schematica del genoma di HEV (da Panda et al., 2007)



1.3.1 ORF1 e proteine codificate

Il primo Open Reading Frame è anche il più lungo (5079 nucleotidi); inizia all'estremità 5' del genoma, dopo i circa 25 nucleotidi della prima UTR, e termina al nucleotide numero 5109. L'intera regione ORF1 codifica per una poliproteina di 1693 amminoacidi, costituita solo da proteine non strutturali, ed in particolare da una metiltransferasi, una cisteina proteasi papaina-simile, una elicasi e una RNA polimerasi RNA dipendente (Aggarwal e Krawczynski, 2000; Koonin et al., 1992; Krawczynski, 1993; Magden et al., 2001).

A) *METILTRANSFERASI*: E' compresa tra gli amminoacidi 60 e 240 della poliproteina. E' simile alle metiltransferasi di altri virus, come l'alphavirus e il tabacco mosaic virus, indicando una evoluzione comune di questi virus animali e delle piante, anche se distanti tra loro (Panda et al., 2007).

B) *CISTEINA PROTEASI PAPAINA SIMILE*: E' compresa tra gli amminoacidi 440 e 610, ed è stato ipotizzato possa essere coinvolta nel processamento della poliproteina codificata dall'ORF1 al fine di ottenere le altre proteine non strutturali. Questo processo è comune anche ad altri virus come gli alphavirus e i rubella virus (Panda et al., 2007).

C) *ELICASI*: E' compresa tra gli amminoacidi 960 e 1204 della poliproteina, e ha la funzione di svolgere le molecole di RNA, DNA o i duplex RNA-DNA durante i processi di replicazione, riparazione e trascrizione del genoma (Panda et al., 2007).

D) *RNA POLIMERASI RNA DIPENDENTE*: Si trova nell'estremità terminale della poliproteina, compresa tra gli amminoacidi 1500 e 1700. Presenta alcuni epitopi altamente immunoreattivi (Panda et al., 2007).

1.3.2 ORF2 e proteine codificate

La regione genomica ORF2 inizia al nucleotide numero 5147 e termina al numero 7127. Questa regione di 1980 nucleotidi codifica per una proteina strutturale che va dai 599 ai 660 amminoacidi (Okamoto, 2008). All'estremità 5' della regione ORF2 si trova una regione di circa 300-450 nucleotidi che è la più conservata tra i diversi ceppi identificati di HEV, e che è stata recentemente utilizzata come riferimento per una classificazione in sottotipi dei diversi genotipi di HEV (Lu et al., 2006).

La proteina sintetizzata dalla regione ORF2 (pORF2) è una glicoproteina strutturale del peso di 88 KDa, caratterizzata dalla presenza di amminoglicani e da una regione ricca di arginina e lisina all'estremità N-terminale che costituisce il sito di aggancio al reticolo endoplasmatico. Inizialmente sintetizzata come precursore, viene successivamente processata tramite clivaggio in una proteina matura e glicosilata in tre siti (fenomeno frequente nelle proteine dell'envelope ma raro per una proteina capsidica). Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che la proteina è espressa sia a livello intracellulare sia sulla superficie cellulare (Fauquet et al., 2005; Krawczynski, 1993; Panda et al., 2007; Panda et al., 2007). La proteina codificata dalla regione ORF2 è la proteina strutturale del capsido, ed è responsabile della risposta anticorpale (Aggarwal e Krawczynski, 2000; Fauquet et al., 2005; Panda et al., 2007). Nonostante esistano notevoli differenze genomiche tra i vari ceppi di HEV, a tutt'oggi viene riconosciuto un singolo sierotipo (Okamoto, 2008).

1.3.3 ORF3 e le proteine codificate

La regione ORF3 è di lunghezza di 369-372 basi, e si sovrappone alla regione ORF2 per 331 nucleotidi (Okamoto, 2008; Panda et al., 2007). Codifica per una piccola fosfoproteina immunogenica di lunghezza massima di 123 amminoacidi, di funzione ancora non chiarita, ma che

sembra interagire con la proteina codificata dalla proteina ORF2 (Okamoto, 2008). La fosfoproteina presenta due domini idrofobici all'interno della sua molecola (alfa eliche transmembrana) con i quali sembra in grado, infatti, di legarsi al citoscheletro delle cellule epatiche. Inoltre tale proteina crea un complesso con la proteina capsidica pORF2 fungendo da sito di ancoraggio per l'assemblamento del virione (Panda et al., 2007).

1.4 GENOTIPI VIRALI

Anche se finora è stato identificato un solo sierotipo (Emerson e Purcell, 2003), una notevole diversità genomica viene osservata tra i diversi ceppi identificati di Hepatitis E virus (Okamoto, 2008). Sono stati proposti vari schemi per la classificazione del virus (Schlauder e Mushahwar, 2001) (Erker et al., 1999; Schlauder et al., 1999; Schlauder et al., 1999) ma finora lo schema più accettato prevede la classificazione dei diversi isolati di HEV in 4 maggiori genotipi (Lu et al., 2006; Schlauder e Mushahwar, 2001). Mentre i ceppi del genotipo 1 e 2 sono stati isolati solo dall'uomo (tranne che nel caso del ceppo duino cambogiano identificato da Caron et al. 2006, e appartenente al genotipo 1), quelli del genotipo 3 e 4 sono stati identificati sia nell'uomo sia in diverse specie animali, tra cui il suino, il cinghiale, il cervo e la mangosta (Goens e Perdue, 2004; Meng et al., 1997; Okamoto, 2008; Panda et al., 2007).

Il genotipo 1 fu identificato e sequenziato per la prima volta nel 1991 (Tam et al., 1991), a partire da un campione proveniente dal Myanmar (formalmente Burma). Questo ceppo di riferimento presenta più dell'88,2% di identità nucleotidica con ceppi isolati in altri paesi dell'Asia (compresi Cina, India, Nepal e Pakistan) e dell'Africa (compresi Chad e Marocco), che vengono per questo fatti rientrare nel genotipo 1 (Okamoto, 2008).

Nel 1992 è stato sequenziato un isolato virale proveniente da un focolaio verificatosi in Messico nel 1986, che si presentava nettamente distinto dal Burma strain, e per questo è stato classificato in un secondo genotipo

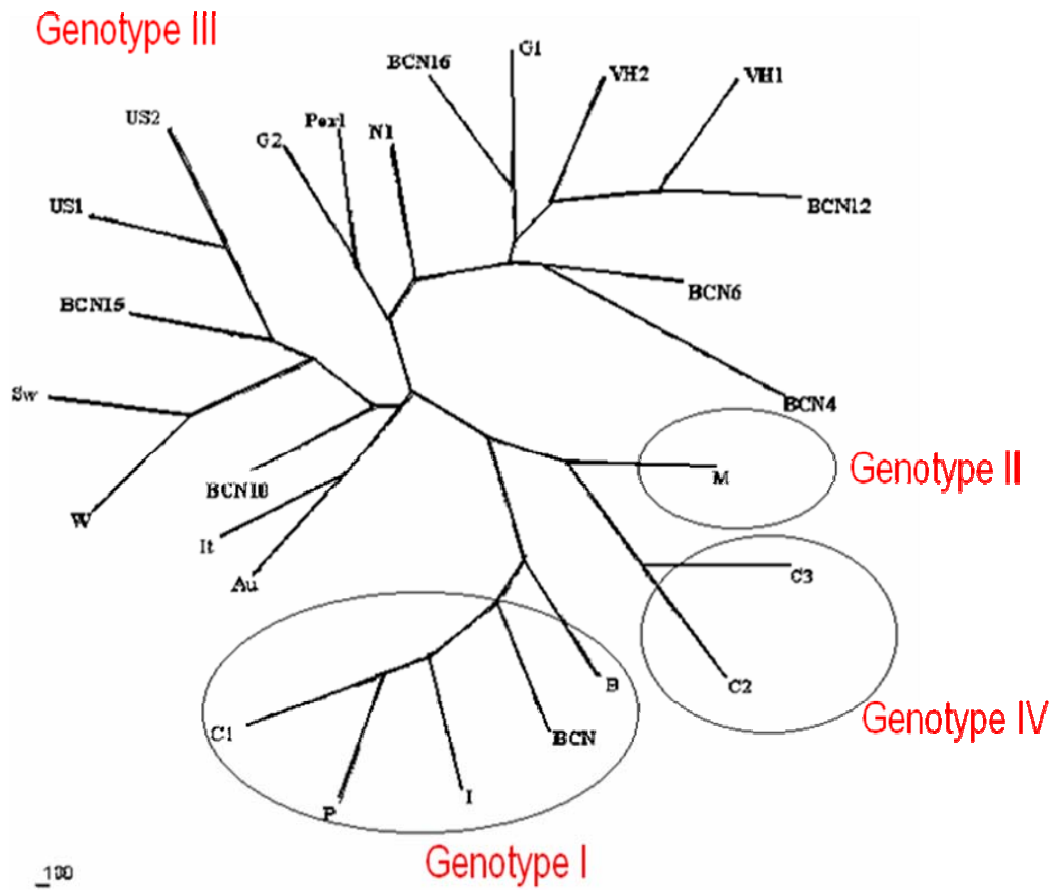
(Huang et al., 1992). Contrariamente al genotipo 1, che è diffuso in molte aree geografiche, il genotipo 2 è stato identificato in uno scarso numero di regioni (Lu et al., 2006).

Nel 1997, è stato riportato un caso di epatite E negli Stati Uniti, da un paziente che non aveva un'anamnesi di viaggi all'estero; questo ceppo autoctono è stato sequenziato, ed è andato a costituire il prototipo di un terzo genotipo (Kwo et al., 1997). Successivamente è stato dimostrato che questo genotipo è distribuito in tutto il mondo (Banks et al., 2004a; Peron et al., 2006; Pina et al., 2000; Takahashi et al., 2003).

Il genotipo 4 è stato identificato nel 1999 in Cina, e differiva dai ceppi appartenenti al genotipo 1 circolanti sullo stesso territorio (Wang et al., 1999). Isolati appartenenti a questo genotipo sono stati identificati non solo in Cina, ma anche in Giappone e a Taiwan (Takahashi et al., 2003; Takahashi et al., 2002).

Recentemente è stata ipotizzata un'ulteriore suddivisione dei 4 genotipi in sottotipi, basandosi sulle sequenze dei 300-450 nucleotidi terminali della regione genomica dell'ORF2. Secondo questo studio, il genotipo 1 si può suddividere in 5 sottotipi, il genotipo 2 in 2 sottotipi, il 3 in 10 sottotipi, e il 4 in 7 (Lu et al., 2006) (vedi **Figura 1.3**).

Figura 1.3: Albero filogenetico indicante la distanza dei 4 genotipi



1.5 VARIABILITA' GENETICA E QUASISPECIE

Comparando le sequenze nucleotidiche di 75 ceppi appartenenti a diversi genotipi (cioè tutte le sequenze genomiche complete di HEV disponibili in GenBank in data Gennaio 2007) è stato dimostrato che le differenze nella struttura aminoacidica della codificata dalla regione genomica ORF2 erano solo pari al 6,5-11,7% tra tutti gli isolati (Okamoto, 2008). Questa scarsa differenza nella struttura aminoacidica della proteina strutturale del capsido è correlata alla bassa diversità antigenica che giustifica la presenza di un solo sierotipo di HEV (Okamoto, 2008). Nonostante questa scarsa differenza aminoacidica, elevati gradi di differenza nucleotidica sono stati riscontrati nelle diverse regioni del genoma (Okamoto, 2008). La base molecolare di questa elevata differenza nucleotidica potrebbe essere un elevato tasso di errore dell'enzima virale RNA polimerasi RNA dipendente in assenza di meccanismi di proofreading (Okamoto, 2008). L'elevato grado di differenza nucleotidica tra i diversi isolati è una caratteristica abbastanza comune nei virus a RNA: la frequenza di mutazioni di diversi virus a RNA si aggira intorno a $10^{-4}/10^{-5}$ sostituzioni per base per ciclo di amplificazione (Domingo et al., 1996). Questa variabilità estrema permette ai virus a RNA di adattarsi più facilmente all'ambiente e di evolversi rapidamente nel passaggio tra un ospite e il successivo (Schneider and Roossinck, 2001). Durante i focolai di malattia sostenuti da alcuni virus a RNA è possibile osservare un fenomeno, detto quasispecie, per cui non viene rispettato il principio "un focolaio, un ceppo", ma è possibile identificare sequenze nucleotidiche diverse nello stesso focolaio (Domingo et al., 1996; Okamoto, 2008; Schneider and Roossinck, 2001). La struttura delle quasispecie descrive un equilibrio tra diverse varianti in una popolazione virale in attiva replicazione, sottoposta a pressione immunitaria selettiva (Grandadam et al., 2004). Quasispecie sono state prevalentemente identificate in corso di infezioni persistenti da virus a RNA, come il virus HIV umano tipo 1 (Wolinsky et al., 1996), o il virus dell'epatite C (Farci et al., 2000). Meno comunemente quasispecie sono

state identificate in corso di infezioni da virus a RNA acute e autolimitanti come nel caso del dengue virus (Wang et al., 2002), o del virus dell'epatite A (Sanchez et al., 2003). Il virus dell'epatite E rientra a fare parte di quest'ultima limitata schiera di virus, come dimostrato per la prima volta da (Grandadam et al., 2004). Durante questo studio infatti, gli Autori hanno valutato le differenze nucleotidiche sia intra-paziente che inter-paziente di ceppi identificati in campioni di siero prelevati in corso di un focolaio di epatite E in Algeria negli anni 1986-1987 (Grandadam et al., 2004). I focolai di epatite E sono prevalentemente di origine oro-fecale da assunzione di acqua da fonti contaminate, e meno frequentemente causati da trasmissione interumana; questo tipo di trasmissione giustifica uno schema del tipo "un outbreak, un ceppo" (Arankalle et al., 2001). Il focolaio considerato nel lavoro di Grandadam (2004) era causato dalla contaminazione delle fonti d'acqua dovuta a violente piogge, e doveva quindi presumibilmente seguire lo schema precedentemente menzionato. E' stato dimostrato invece che gli isolati inter-paziente ottenuti durante quel particolare focolaio presentavano una marcata eterogeneità e venivano separati in tre sottogruppi (Grandadam et al., 2004). In uno studio successivo (Okamoto, 2008) sono stati investigati i cambiamenti nelle sequenze nucleotidiche di diversi isolati provenienti dalla stessa area geografica (Valle di Kathmandu, Nepal) ma raccolti a distanza di anni (1997, 1999, 2000, 2002). Tutti gli isolati appartenevano al genotipo 1 e sono stati suddivisi in genotipo 1a (ulteriormente suddiviso poi in 5 cluster) e 1c (che potevano anche dare infezioni miste). E' stato osservato che durante il periodo di tempo di 5 anni preso in esame la prevalenza dei diversi sottotipi e clusters si è modificata in maniera significativa, ma che il profilo aminoacidico della proteina del capsido risultante dalla trascrizione di quella regione rimaneva invariato (Okamoto, 2008).

I livelli di differenza genetica non sono gli stessi tra i diversi genotipi (Okamoto, 2008): i genotipi 1 e 2 comprendono ceppi virali più conservati tra loro, mentre i genotipi 3 e 4 hanno un range di variabilità genetica più ampio (Lu et al., 2006). Comparando 75 sequenze complete di HEV è stato

dimostrato (Okamoto, 2008) che la differenza inter-genotipica tra i 4 diversi genotipi è del 23,6-27,7%. La differenza intra-genotipica è massimo del 11,8% per il genotipo 1, mentre per i genotipi 3 e 4 arriva rispettivamente al 19,3% e al 17%. Per quanto riguarda il genotipo 2, era disponibile on line una sola sequenza completa (Mexican strain Mex-14, (Huang et al., 1992), ma è stato possibile comparare sequenze parziali di ceppi africani, sempre appartenenti al genotipo 2. Si è potuto così evidenziare che le sequenze segregano in almeno due subgenotipi (messicano e africano): i ceppi africani differiscono tra loro al massimo del 10,3%, mentre comparati al ceppo messicano hanno una differenza massima del 16,8% (Okamoto, 2008). Esiste quindi una differenza nucleotidica intra-genotipica superiore nel genotipo 3 piuttosto che nel genotipo 4 (Okamoto, 2008). Questo dato supporta la classificazione in sottotipi ipotizzata da (Lu et al., 2006) per cui il genotipo 3 viene suddiviso in 10 sottotipi, mentre il genotipo 4 in 7 sottotipi.

Per giustificare la relativa conservazione dei ceppi che segregano nel genotipo 1 e 2 è stato ipotizzato (Lu et al., 2006; Panda et al., 2007) che finora sono stati per lo più identificati nell'uomo. A questo proposito c'è comunque da sottolineare che la presenza del genotipo 1 in campioni di origine suina è stata riportata in un recente lavoro (Caron et al., 2006). Si è supposto invece che, essendo gli isolati dei genotipi 3 e 4 provenienti sia da campioni di origine umana che animale, abbiano sviluppato una maggiore differenza nucleotidica a causa di una circolazione a lungo termine sia in specie diverse che in regioni geografiche anche molto distanti tra loro (Lu et al., 2006). Anche la segregazione geografica sembra infatti un parametro molto significativo per la distribuzione dei genotipi di HEV (Clemente-Casares et al., 2003; Okamoto, 2008; Panda et al., 2007), in quanto ceppi circolanti sullo stesso territorio sono simili, sia nell'uomo che negli animali (Banks et al., 2004a; Clemente-Casares et al., 2003; Peron et al., 2006; Zheng et al., 2006).

Esistono comunque degli studi condotti in India (Arankalle et al., 2002; Arankalle et al., 2003) che sono in contrasto con i dati provenienti dal resto

del mondo che testimoniano la circolazione di ceppi virali molto simili nell'uomo e negli animali di una stessa area geografica (Banks et al., 2004a; Clemente-Casares et al., 2003; Peron et al., 2006; Zheng et al., 2006). Nel primo studio (Arankalle et al., 2002) è stato dimostrato che tutti i ceppi identificati in India nell'uomo nella finestra temporale 1976-2001 appartenevano al genotipo 1, mentre ceppi suini identificati nel 2000 appartenevano al genotipo 4. Nel secondo studio (Arankalle et al., 2003) è stata presa in considerazione una più vasta popolazione suina dell'India del Sud, con campioni raccolti nei precedenti 16 anni, e tutte le sequenze identificate appartenevano al genotipo 4. Per gli Autori, questa discrepanza dimostra una separata circolazione del virus dell'HEV nella popolazione umana e suina (Arankalle et al., 2003).

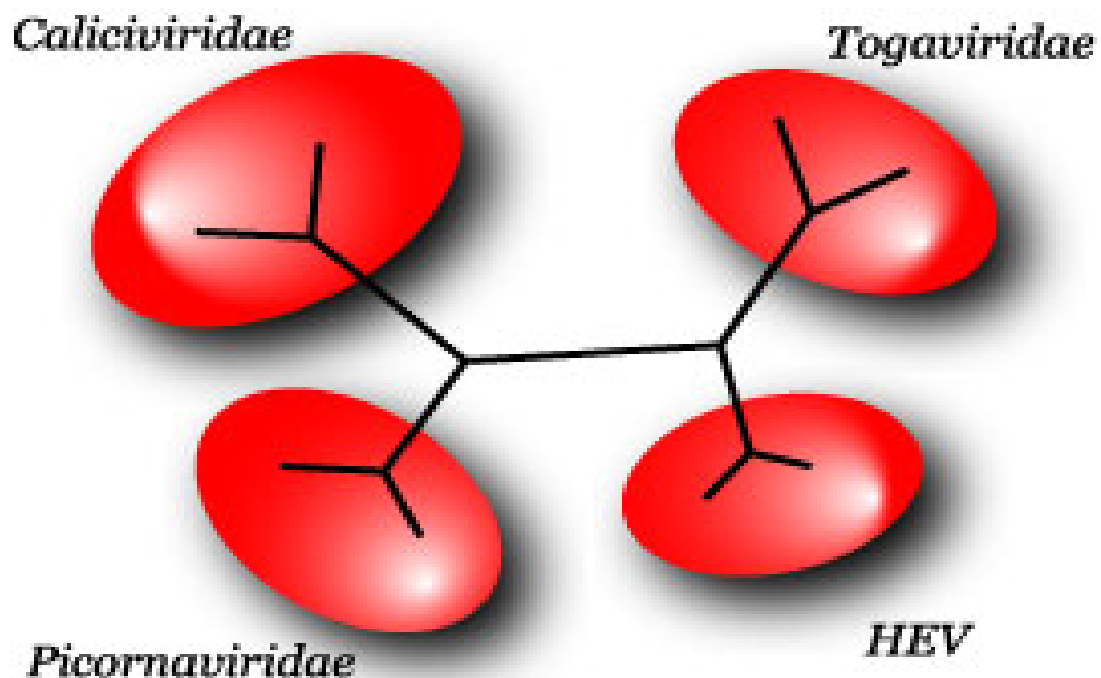
1.6 INQUADRAMENTO TASSONOMICO

Dopo la prima identificazione del virus tramite il microscopio elettronico, avvenuta nel 1983, fu suggerito di inserire il virus nella famiglia *Picornaviridae*, come il virus dell'epatite A di tipo 2 (Balayan et al., 1983). In uno studio successivo (Koonin et al., 1992) HEV era stato poi accostato al genere *Rubella virus* della famiglia *Togaviridae*, sulla base delle analogie negli enzimi replicativi codificati. A seguito del clonaggio e sequenziamento completo del primo ceppo di HEV (Burma strain) per l'organizzazione genomica e le caratteristiche morfologiche, HEV fu inserito provvisoriamente in un genere separato della famiglia *Caliciviridae* (Tam et al., 1991). Questa classificazione era stata ipotizzata a seguito dell'analisi della regione genomica codificante la proteina capsidica, che portava alla suddivisione della famiglia *Caliciviridae* in 5 principali cluster: Calicivirus umani Norwalk-like e Sapporo-like, virus dell'epatite E, esantema vescicolare da calicivirus swine-like e lapine (Berke e Matson, 2000). Considerando invece le regioni genomiche codificanti per l'elicasi e la polimerasi, più conservate rispetto a quella precedentemente presa in

considerazione, solo quattro gruppi sono stati inclusi con relativa sicurezza nella famiglia delle *Caliciviridae*, mentre i ceppi di epatite E sono stati esclusi dalla famiglia (Berke e Matson, 2000)

Questa conclusione è stata ulteriormente convalidata dall'inserimento, nello studio comparativo, delle altre due famiglie virali inizialmente prese in considerazione per la filogenesi di HEV, le *Togaviridae* e le *Picornaviridae*. Lo studio filogenetico della regione polimerasica ha portato alla conclusione che la distanza esistente tra le famiglie *Caliciviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae* e HEV è la stessa (Berke e Matson, 2000) (**Figura 1.4**). Come conseguenza di ciò, il virus dell'epatite E è l'unico membro di un genere separato di incerta classificazione denominato *Hepesvirus* (da Hepatitis E virus) (Fauquet, 2005).

Figura 1.4: Distanza del genere Hepeviridae dalle altre famiglie (Fauquet et al., 2005)



CAPITOLO 2: EPIDEMIOLOGIA

2.1 EPIDEMIOLOGIA NELL'UOMO

Si possono riconoscere due distinti pattern epidemiologici di infezione da HEV nell'uomo:

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

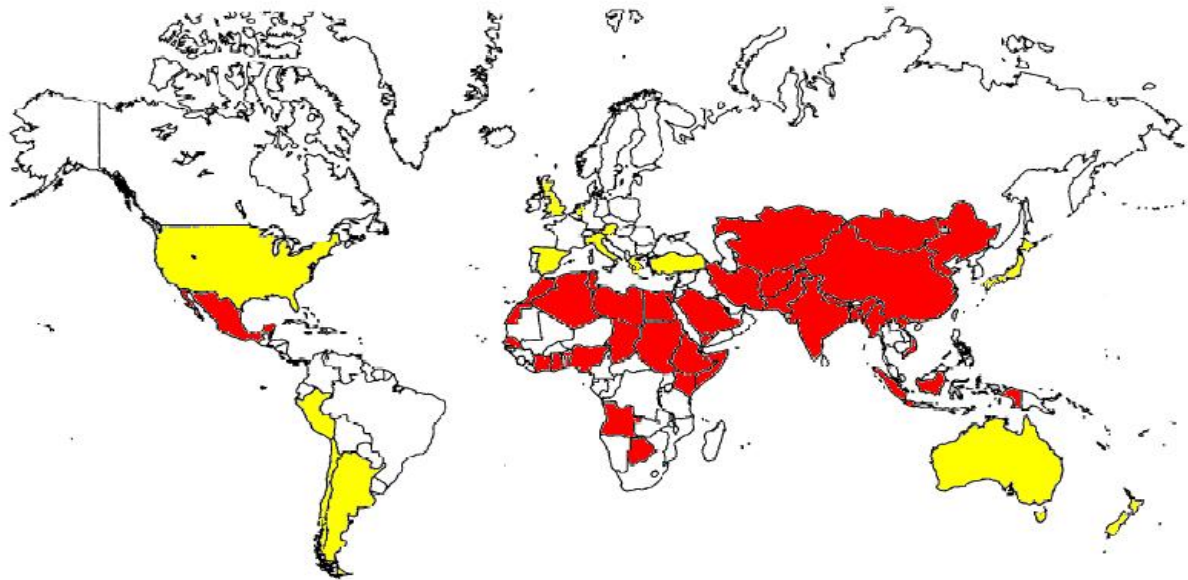
Nei Paesi in via di sviluppo l'infezione viene considerata endemica e si manifesta con focolai epidemici di vasta portata generalmente conseguenti alla contaminazione delle fonti d'acqua (Panda et al., 2007; Teo, 2006).

Nei Paesi industrializzati, invece, dove gli standard igienico-sanitari sono più elevati, l'infezione si manifesta sporadicamente, generalmente correlata a viaggi nelle aree endemiche, ma anche autoctona, probabilmente di natura zoonotica (Acharya and Panda, 2006; Aggarwal et al., 2000; Buti et al., 2004; Clemente-Casares et al., 2003; Emerson and Purcell, 2003; Lewis et al., 2006; Panda et al., 2007; Teo, 2006).

Nella maggior parte delle aree endemiche la sieroprevalenza è di circa il 5% nei bambini sotto 10 anni e tende ad aumentare con valori che raggiungono il 10-40% negli adulti sopra i 25 anni (Aggarwal et al., 2000; Emerson and Purcell, 2003). Diversi studi sieroepidemiologici hanno inoltre rilevato una notevole prevalenza anticorpale anti-HEV (5-20%) nella popolazione sana di molti Paesi industrializzati, facendo pensare ad un'elevata diffusione dell'infezione, seppur in genere a livello subclinico (Aggarwal et al., 2000; Clemente-Casares et al., 2003; Emerson and Purcell, 2003; Ijaz et al., 2005; Li et al., 2006a).

Nella **Figura 2.1** vengono evidenziate le aree endemiche e non endemiche per la presenza del virus dell'epatite E:

Figura 2.1: Aree endemiche e non per HEV



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

2.1.1 Caratteristiche dell'infezione nei Paesi in via di sviluppo

Il virus dell'epatite E è ampiamente diffuso nei paesi tropicali e subtropicali in via di sviluppo: gran parte dell'Asia, Nord Africa, Medio Oriente ed America centro-meridionale, dove l'infezione si manifesta in modo epidemico (Aggarwal et al., 2000; Emerson and Purcell, 2003; Meng et al., 2002). Il tasso di letalità correlato all'infezione da HEV si aggira nei focolai epidemici intorno allo 0,2-4%, anche se raggiunge picchi del 20% in donne in gravidanza, specialmente nel primo trimestre (Khuroo et al., 1981).

2.1.1.1 VIE DI TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO

La principale via di trasmissione dell'infezione è quella orofecale, in particolare legata alla contaminazione delle acque: nei Paesi in via di sviluppo, infatti, l'infezione è endemica e si manifesta con caratteristici focolai epidemici in concomitanza di forti piogge e inondazioni, quando le fonti d'acqua sono più a rischio di contaminazione (Balayan, 1997; Emerson and Purcell, 2003; Ippagunta et al., 2007; Panda et al., 2007; Vishwanathan, 1957). Quando si verificano questi violenti fenomeni naturali, infatti, sono due le condizioni che possono portare alla contaminazione delle fonti d'acqua (Teo, 2006). L'acqua potabile può venire contaminata da feci infette a seguito del collasso della rete fognaria, come avvenuto nei campi profughi in Chad e Sudan (Boccia et al., 2006; Teo, 2006). Outbreaks si possono anche verificare senza che le reti idriche siano contaminate, ma in presenza di condizioni igienico- sanitarie scarse, come nel caso delle epidemie provocate dalla contaminazione delle acque dei fiumi in Vietnam (Corwin et al., 1996) e a Java, Indonesia (Sedyaningsih-Mamahit et al., 2002). Tra un outbreak e l'altro si possono verificare casi sporadici di epatite E, che la maggior parte delle volte si

risolvono spontaneamente (Teo, 2006); in India il 30-60% dei casi sporadici di epatite è causato da HEV (Panda et al., 2007). Va anche sottolineato che in alcune regioni HEV-iperendemiche la forma clinica si manifesta raramente, suggerendo differenze nella suscettibilità degli ospiti e nella virulenza dei diversi ceppi (Meky et al., 2006).

Per quanto riguarda le altre vie di trasmissione dell'infezione, a differenza di altri virus che si trasmettono per via oro-fecale sono rari i casi di trasmissione interumana, anche tra soggetti conviventi. Infatti, anche quando si riscontrano casi all'interno della stessa famiglia, ciò sembra dovuto all'esposizione collettiva a una fonte d'infezione comune piuttosto che al contagio interpersonale (Aggarwal e Naik, 1994). Il tasso d'attacco secondario all'interno dei nuclei familiari resta inferiore al 5%, contrariamente a quanto avviene nei casi di epatite A, altra malattia a trasmissione oro-fecale, dove può raggiungere anche il 50%. Questo potrebbe dipendere da differenze nella dose infettante, nella quantità di virus escreto con le feci, nella capacità del virus di persistere nell'ambiente (Aggarwal et al., 2000; Emerson e Purcell, 2003).

Come possibile via di trasmissione è stata investigata anche la via parenterale tramite trasfusioni, ma sembra che la probabilità che questa modalità si verifichi siano molto basse (Panda et al., 2007). Non essendo stati segnalati casi di portatori cronici del virus, ed essendo molto rari i casi di viremia protratta (1-4 mesi), le fonti di contagio tramite la via parenterale sono costituite dai soggetti con infezione acuta (Panda et al., 2007). Sono stati riportati casi di outbreak intraospedalieri dovuti alla presenza di personale alle prime fasi di infezione da virus dell'epatite E (Robson et al., 1992).

Altra via di trasmissione considerata è quella verticale: è stato dimostrato che il 50% delle donne che si infettano durante il terzo trimestre di gravidanza trasmettono l'infezione al feto (Singh et al., 2003).

La via trasmissione sessuale non è stata dimostrata direttamente, ma uno studio italiano (Montella et al., 1994), ha dimostrato che il 20% degli

uomini omosessuali presenta anticorpi anti-HEV, comparato al solo 3% di color che fanno uso di droghe per via endovenosa.

2.1.1.2 FATTORI DI RISCHIO CORRELATI ALL'INFEZIONE

Se l'età rappresenti un fattore di rischio per l'infezione è un aspetto ancora da chiarire dato che (Khuroo et al., 1995) sull'andamento demografico dell'infezione da HEV in letteratura tutt'oggi esistono dati incompleti e contrastanti (Emerson e Purcell, 2007; Teo, 2006). Le epidemie colpiscono fasce molto ampie di popolazione e possono essere prolungate nel tempo con tassi di attacco che vanno dall'1% al 15%, e con i giovani adulti più colpiti dei bambini (Aggarwal e Krawczynski, 2000). Anche se i giovani adulti sono la categoria che manifesta tassi di attacco dei sintomi clinici più elevati, nelle regioni iperendemiche, i tassi d'attacco di infezione più elevati si osservano negli adulti (Okamoto et al., 2003; Sainokami et al., 2004), che però presentano sintomi clinici ridotti. Essendo l'epatite E un'infezione con trasmissione oro-fecale, ci si aspetterebbe di osservare pattern di infezione simili ad altri virus con le stesse caratteristiche, come il virus dell'epatite A (HAV) (Emerson e Purcell, 2007). Invece, in Paesi come l'India in cui entrambi i virus sono endemici, il virus dell'epatite A infetta i bambini intorno ai 5 anni di età, mentre la maggior parte dei bambini e almeno la metà degli adulti sono sieronegativi per anticorpi anti-HEV (Arankalle et al., 2002). In Egitto, altro Paese in cui entrambi i virus sono endemici, la sieroconversione anti-HEV avviene più precocemente che in India e una fetta più ampia della popolazione è interessata (Fix et al., 2000). Le ragioni per cui le sieroprevalenze distribuite per classi d'età variano anche tra Paesi con le stesse condizioni igienico sanitarie rimangono ancora da chiarire (Emerson e Purcell, 2007). L'incidenza dell'infezione da HEV, secondo quanto riportato da alcuni Autori, è inferiore nei bambini rispetto agli adulti: nella maggior parte delle aree endemiche la siero prevalenza è di circa il 5% e tende ad aumentare con

valori che raggiungono il 10-40% negli adulti sopra i 25 anni (Aggarwal et al., 2000; Emerson e Purcell, 2003). Questo comportamento potrebbe essere la conseguenza di continue esposizioni al virus nei soggetti più giovani, che permettono lo sviluppo di un'immunità attiva più efficace e la tendenza a sviluppare la malattia in forma subclinica o asintomatica. In altri studi (Aggarwal et al., 1997; Arora et al., 1999) è stata riportata una maggiore suscettibilità dei bambini rispetto agli adulti all'infezione da HEV.

Altri fattori di rischio sembrano essere anche le condizioni e gli stili di vita: studi condotti in Malesia hanno evidenziato una sostanziale differenza nella presenza di anticorpi anti-HEV in donatori di sangue sani provenienti da un contesto urbano (2,5%) e in persone provenienti da zone rurali (45-50%) (Seow et al., 1999). Anche in India le epidemie hanno mostrato un tasso d'attacco 4-8 volte superiore tra le persone con più elevato stato socio-economico; infatti la popolazione che vive in scadenti condizioni igienico-sanitarie sviluppa probabilmente l'immunità come risultato di continue esposizioni a bassi titoli virali (Teo, 2006; Vadya et al., 2006; Vadya et al., 2007). Altro fattore di rischio sembra essere rappresentato dal sesso: i maschi sono in genere più colpiti delle femmine; tuttavia le epidemie sono caratterizzate da elevati tassi d'attacco e mortalità nelle donne in gravidanza (Khuroo et al., 1981; Vishwanathan, 1957).

2.1.2 Caratteristiche dell'infezione nei Paesi industrializzati

In USA, Giappone ed Europa sono segnalati sempre più spesso casi sporadici di malattia in soggetti che non risultano aver viaggiato all'estero in zone a rischio (Banks et al., 2004a; Buti et al., 2004; Clemente-Casares et al., 2003; Dalton et al., 2007b; Herremans et al., 2007; Ijaz et al., 2005; Meng et al., 1997; Panda et al., 2007; Tahan et al., 2003; Teo, 2006; Zanetti et al., 1999). I ceppi isolati in tali episodi sono risultati geneticamente differenti rispetto a quelli isolati nei Paesi in via di sviluppo, facendo

supporre che questi casi di malattia siano ascrivibili a virus endemici sul territorio e non ad infezioni contratte durante il soggiorno in Paesi a rischio (Acharya e Panda, 2006; Banks et al., 2007; Emerson and Purcell, 2003; Hsieh et al., 1999; Nishizawa et al., 2003; Zanetti et al., 1999). Numerosi studi sieroepidemiologici hanno inoltre rilevato una notevole prevalenza anticorpale anti-HEV (5-20%) nella popolazione sana di molti Paesi industrializzati, facendo ipotizzare un'elevata diffusione dell'infezione, seppur in genere a livello subclinico (Banks et al., 2004a; Meng et al., 2002; Pei and Yoo, 2002; Schlauder et al., 1999; Takahashi et al., 2003; Zanetti e Dawson, 1994).

In Italia, il virus dell'epatite E sembra essere responsabile di circa il 10% delle epatiti virali non-A, non-B, non-C (Zanetti e Dawson, 1994). La maggior parte dei casi di malattia sono stati registrati in viaggiatori provenienti da aree in via di sviluppo considerate tradizionalmente endemiche. Tuttavia, nel 1999, una nuova variante di HEV è stata identificata nelle feci di un paziente che non aveva viaggiato né era venuto a contatto con individui di ritorno da tali zone (Zanetti et al., 1999). Questo stipite si è rivelato geneticamente diverso dai virus isolati in altri Paesi, mostrando una relativa analogia nucleotidica solo con i ceppi americani del genotipo 3 (Schlauder et al., 1999; Zanetti et al., 1999) ed è stato quindi considerato originario del territorio italiano.

Dal punto di vista sierologico, la presenza di anticorpi anti-HEV è stata rilevata in diverse regioni nel nostro paese (Cacopardo et al., 1997; Fabrizi et al., 1997; Grieco et al., 2001; Pavia et al., 1998; Romano et al., 1999; Stroffolini et al., 1996; Zanetti et al., 1999), con prevalenze che oscillano tra l'1% ed il 5%. I valori di sieropositività più elevati sono stati riscontrati tra gli emodializzati, tossicodipendenti e persone positive ad altri marcatori di epatiti virali post-transfusionali. Inoltre è stato evidenziato un gradiente di sieropositività che va da Nord a Sud (Zanetti e Dawson, 1994). La maggiore prevalenza nel Sud del Paese è probabilmente ascrivibile alla maggiore vicinanza di paesi in cui la malattia è considerata da molti anni endemica e all'elevato flusso migratorio da tali zone. Alcuni Autori

ritengono che anche la pratica assai diffusa al Sud di consumare molluschi crudi possa essere un fattore di rischio aggiuntivo (Cacopardo et al., 1997).

La **Figura 2.2** è estratta da un rapporto dell'Istituto Superiore di Sanità (<http://www.iss.it/seie/publ/cont.php?id=46&lang=1&tipo=3>) del 2004, e descrive la distribuzione dei diversi tipi di epatite virale nel nostro Paese. L'epatite E rientra nel gruppo delle epatiti non-A, non-delta, che rappresentano, come si evince dalla figura, solo una piccola porzione del totale.

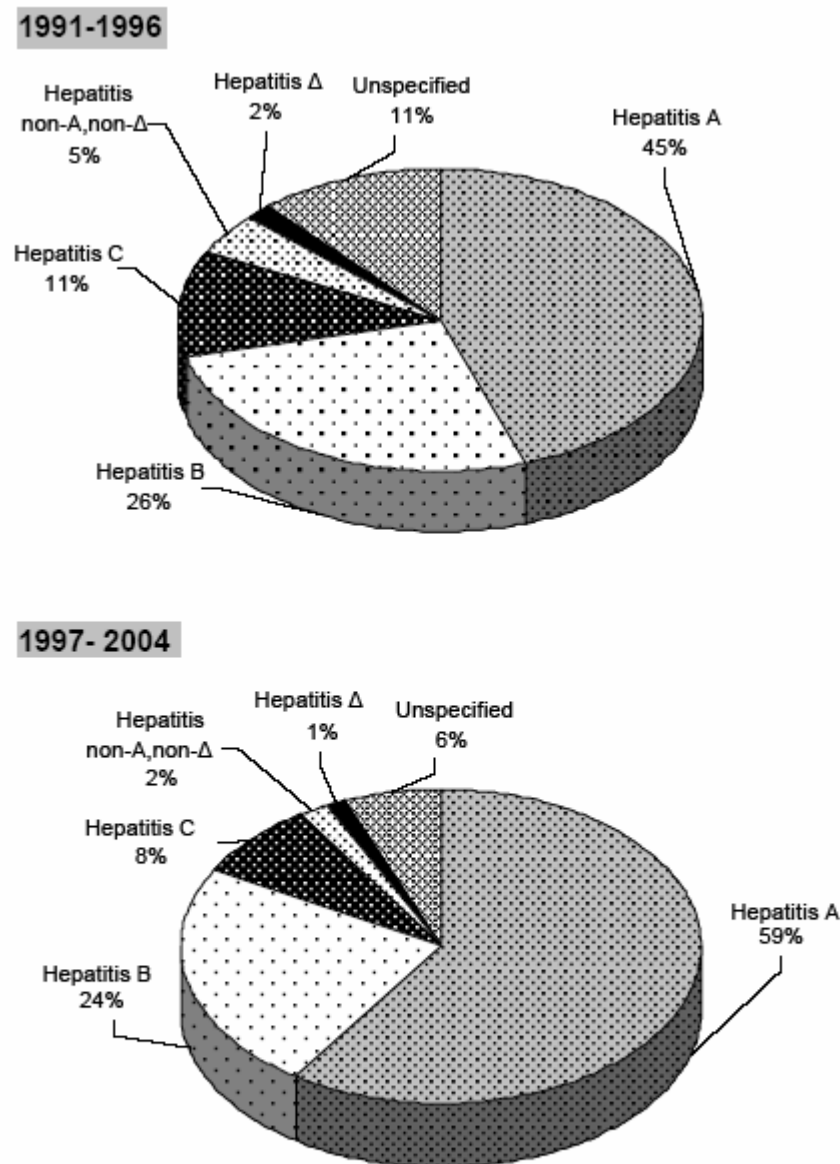


Figura 2.2 Distribution of notified cases by hepatitis type
SEIEVA 1991-1996 and SEIEVA 1997-2004

2.1.2.1 MODALITA' DI ACQUISIZIONE DELL'INFEZIONE NEI PAESI INDUSTRIALIZZATI

Come precedentemente menzionato, l'epatite E si manifesta solo sporadicamente nei Paesi industrializzati, cioè i casi di malattia sono isolati e generalmente coinvolgono un solo individuo (Clemente-Casares et al., 2003; Emerson and Purcell, 2003). Casi autoctoni di epatite E sono stati segnalati nei seguenti Paesi industrializzati:

- UK (Banks et al., 2004a; Dalton et al., 2007b; Ijaz et al., 2005);
- Olanda (Herremans et al., 2007; van der Poel et al., 2001);
- Spagna (Perez-Gracia et al., 2007; Pina et al., 2000);
- Germania (Preiss et al., 2006);
- Francia (Mansuy et al., 2004; Renou et al., 2007);
- Italia (Grieco et al., 2001; Zanetti et al., 1999);
- Austria (Worm et al., 1998);
- Grecia (Tassopoulos et al., 1994);
- Giappone (Takahashi et al., 2004; Tamada et al., 2004; Tei et al., 2003);
- USA (Feagins et al., 2007; Kwo et al., 1997; Meng et al., 1997);
- Canada (Leblanc et al., 2007).

La maggior parte dei casi riportati coinvolgono persone di ritorno da viaggi nelle cosiddette aree iper-endemiche, e la maggior parte degli studi disponibili in letteratura descrivono casi isolati e in piccolo numero (Banks et al., 2004a; Buti et al., 2004; Clemente-Casares et al., 2003; Dalton et al., 2007b; Herremans et al., 2007; Ijaz et al., 2005; Meng et al., 1997; Panda et al., 2007; Tahan et al., 2003; Teo, 2006; Zanetti et al., 1999).

Esistono però 3 studi (Fodor et al., 2005; Ijaz et al., 2005; Mansuy et al., 2004) che analizzano una più ampia scala di casi in tre diversi Paesi europei. Nello studio condotto in Inghilterra e nel Galles (Ijaz et al., 2005) è stata preso in esame un gruppo di pazienti positivi sierologicamente per HEV: di questi, solo il 17% non aveva viaggiato nelle aree iperendemiche.

Nello studio condotto in Francia (Mansuy et al., 2004), sono stati presi in esame pazienti con epatiti di origine sconosciuta (senza anamnesi di viaggi all'estero). Di questi il 10,7% era positivo per anticorpi anti-HEV e il 3,9% presentava risultati dubbi. Di entrambe queste categorie di pazienti è stato ricercato il virus nel siero tramite Real-time PCR e il 25,4 % è risultato positivo alla ricerca diretta del virus (Mansuy et al., 2004). Nello studio condotto in Ungheria (Fodor et al., 2005) sono stati testati sieri negativi per i marker di epatite A, B e C e in un numero significativo è stata dimostrata la presenza di marker sierologici di HEV.

Per giustificare le frazioni di positività sierologiche e virologiche cosiddette autoctone, sono state avanzate diverse ipotesi, tutte correlate alla presenza di un serbatoio animale presente sul territorio (Banks et al., 2004a; Buti et al., 2004; Renou et al., 2007; Dalton et al., 2007b; Meng et al., 1997; Perez-Gracia et al., 2007; Preiss et al., 2006). Le modalità di acquisizione dell'infezione comprendono la via alimentare (Tei et al., 2003), il contatto con animali infetti (Meng et al., 2002; Renou et al., 2007), l'esposizione ai reflui di allevamenti suinicoli infetti tramite la rete fognaria (Clemente-Casares et al., 2003; Pina et al., 2000; Pina et al., 1998), come verrà ampiamente descritto nel capitolo 3 "HEV come zoonosi".

Eccezione alla sporadicità dell'infezione sono i focolai di origine alimentare che sono stati riportati in Giappone (Masuda et al., 2005; Matsuda et al., 2003; Takahashi et al., 2004; Tei et al., 2004; Tei et al., 2003). In questi casi infatti l'infezione non è isolata ma si manifesta in forma di outbreaks in piccola scala, collegati all'assunzione dello stesso alimento contaminato (Teo, 2006).

2.1.2.2 FATTORI DI RISCHIO CORRELATI ALL'INFEZIONE NEI PAESI INDUSTRIALIZZATI

Rappresentano fattori di rischio tutte le condizioni associate al contatto con animali serbatoio, come sarà ampiamente discusso nel capitolo 3 "HEV

come zoonosi”. Tra questi menzioniamo l’esposizione professionale a suini infetti, o in allevamento o al macello (Clemente-Casares et al., 2003; Drobeniuc et al., 2001; Meng et al., 2002; Perez-Gracia et al., 2007), il contatto domestico con suini (Renou et al., 2007), l’assunzione di carne e organi infetti crudi o poco cotti (Masuda et al., 2005; Matsuda et al., 2003; Tei et al., 2003).

Se esistano delle predisposizioni di sesso ed età non è ancora chiaro; i dati disponibili in letteratura sono riassunti nella **Tabella 2.1** sottostante:

PAESE	NUMERO (% DI MASCHI)	ETA’ MEDIA (Range)
UK	29 (62)	65 (44-82)
UNGHERIA	27 (55)	61 (17-78)
FRANCIA	21(67)	48 (17-81)
SPAGNA	18(72)	57 (39-80)
OLANDA	8(73)	56 (20-84)
AUSTRIA, GERMANIA, ITALIA, GRECIA	5(66)	51 (33-65)
USA	5(80)	60 (43-69)

Tabella 2.1: Caratteristiche di sesso ed età dei pazienti europei e statunitensi con epatite E senza anamnesi di ritorno da viaggi in aree iperendemiche, modificata da (Teo, 2006).

In uno studio condotto da (Ijaz et al., 2005) sono state comparate le caratteristiche demografiche di due gruppi di pazienti (tutti provenienti da Inghilterra e Galles), entrambi composti da pazienti sierologicamente positivi all'infezione da HEV, ma distinti dall'aver (gruppo T, travel) o meno (gruppo NT, non travel) in anamnesi viaggi in aree iperendemiche. Sono stati comparati diversi fattori di rischio tra i due gruppi e sono state rilevate delle differenze statisticamente significative. La maggior parte dei pazienti del gruppo T erano di etnia asiatica, mentre quelli del gruppo erano tutti caucasici (Ijaz et al., 2005). Età avanzata e residenza in aree costiere o comunque vicino ad estuari erano fattori di rischio significativi per l'acquisizione di forme di epatite autoctone (Ijaz et al., 2005). Anche il sesso maschile sembra essere più predisposto all'infezione, dato che il numero di maschi nel gruppo NT si è rivelato di gran lunga superiore a quello delle donne (Ijaz et al., 2005). Inoltre viene riportata in questo lavoro l'acquisizione dell'infezione da parte di due persone che avevano l'abitudine di consumare molluschi, concordemente a quanto riportato in letteratura (Cacopardo et al., 1997).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE DA HEV NELLE SPECIE ANIMALI RECETTIVE ALL'INFEZIONE

Molte specie animali si sono rivelate recettive all'infezione, o 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 documentata in topi, polli, cani, vacche, pecore, capre, scimmie, mangoste, cavie, suini, cinghiali, cervi, gatti, cavalli, uccelli, bufali (Arankalle et al., 2001; de Deus et al., 2007a; Favorov et al., 2000; Goens e Perdue, 2004; Haqshenas et al., 2001; He et al., 2006; Kuno et al., 2003; Meng et al., 1997; Michitaka et al., 2007; Nakamura et al., 2006; Saad et al., 2007; Shukla et al., 2007; Vitral et al., 2005; Yu et al., 2007). In particolare, diverse specie animali sono state

testate in India, dove l'infezione da HEV nell'uomo è endemica (Arankalle et al., 2001). La sieropositività variava dal 54,6 al 74,4% nei suini, dal 2,1 al 21,5% nei topi, e anticorpi sono stati ritrovati anche nei bovini (4,4-6,9%) e nel 22,7% dei cani, mentre nessuna delle 250 capre testate era positiva (Arankalle et al., 2001). In uno studio successivo, tuttavia, (Shukla et al., 2007), i sieri di 86 capre (100%) si sono dimostrati positivi per la ricerca di anticorpi anti-HEV, come quelli dei bufali, pecore, topi e suini testati. In un analogo studio condotto in Cina (Wang et al., 2002) è stata confermata la presenza di anticorpi nei suini (79%), nei bovini (6%), ma non nelle capre. In Brasile (Vital et al., 2005), IgG anti-HEV sono stati identificate in bovini (1,4%), cani (7%), polli (20%), suini (24,3%) e topi (50%).

RNA di HEV è stato documentato in un numero ridotto di specie, rispetto a quelle in cui è stata documentata la presenza di anticorpi. Il primo ceppo virale animale è stato identificato nel suino - *swHEV* - (Meng et al., 1997), ma successivamente HEV è stato identificato in altre specie ed in particolare in cervi (Tei et al., 2003), cinghiali (Nishizawa et al., 2005), mangoste (Nakamura et al., 2006), cavalli (Saad et al., 2007). Era stata documentata la presenza di RNA di HEV anche nei topi in Nepal (He et al., 2006), ma successivamente questo dato è stato smentito dagli stessi Autori, che hanno denunciato che si trattava di una cross-contaminazione di laboratorio. Recentemente (Zhang et al., 2007) è stata dimostrata la presenza di HEV RNA in un elevato numero di specie selvatiche ospitate in una riserva zoo-like in Cina. Tra questi rientrano anche orsi e leopardi, in cui l'infezione non era stata precedentemente documentata (Zhang et al., 2007). HEV è stato identificato anche negli uccelli (Haqshenas et al., 2001), ma i ceppi identificati differiscono normalmente molto da quelli dei mammiferi, quindi l'*avianHEV* è stato classificato separatamente. Nell'articolo sopraccitato (Zhang et al., 2007), però, viene riportata la prima identificazione di un ceppo di HEV dei mammiferi nelle feci di uccelli.

Verranno prese in considerazione separatamente le diverse specie animali, per approfondire i dati epidemiologici disponibili in letteratura.

2.2.1 HEV nel suino

Il primo ceppo di HEV suino è stato identificato nel 1997 negli Stati Uniti (Meng et al., 1997). Il virus si è rivelato simile ma distinto dai ceppi circolanti nell'uomo nello stesso territorio: il gene ORF2 aveva il 79-80% di identità a livello nucleotidico e il 90-92% a livello aminoacidico con la stessa regione dei ceppi umani (Meng et al., 1997). Dal momento della sua scoperta, SwineHEV è stato identificato in suini provenienti da tutto il mondo (Banks et al., 2004a; Caprioli et al., 2007; Dalton et al., 2007a; Jung et al., 2007; Ning et al., 2008; Nishizawa et al., 2003; Preiss et al., 2006; Schlauder et al., 1999; Seminati et al., 2008; van der Poel et al., 2001; Zheng et al., 2006), e si è sempre rivelato molto simile ai ceppi circolanti nell'uomo, tranne che in India, dove i ceppi circolanti nelle due specie sembrano essere distinti (Arankalle et al., 2002; Shukla et al., 2007). Attualmente esistono numerosi studi che descrivono l'epidemiologia del virus dell'epatite E in suini allevati in diverse regioni del mondo, e di seguito verranno descritti nel dettaglio.

In Canada (Yoo et al., 2001) è stato condotto uno studio sia di sieroprevalenza che di caratterizzazione molecolare di ceppi suini. Il 59,4% dei sieri analizzati è risultato positivo alla ricerca di anticorpi anti-HEV, e un ceppo virale è stato identificato nelle feci di un suinetto (Yoo et al., 2001). In uno studio condotto successivamente (Leblanc et al., 2007), è stata investigata la presenza di virus in diverse classi d'età su un gruppo di 51 suini allevati in uno stabulario che simulava la distribuzione in allevamento dall'età di 2 mesi fino a quella di macellazione (intorno ai 6 mesi). All'età di 2 settimane, swHEV è stato rinvenuto nelle feci dell'11,8% dei soggetti, ma non nel siero. A 8 settimane il 52,9% delle feci erano positive, e anche un singolo siero. A 18 settimane le feci dell'86%

dei soggetti erano positive, come anche il 47,1 % dei sieri. All'età di macellazione l'RNA di HEV era presente nel siero dell'11,8% dei soggetti, e nelle feci del 41,2% (Leblanc et al., 2007).

Negli Stati Uniti (Huang et al., 2002) il virus dell'epatite E è stato identificato nel 35% dei suini testati e nel 54% degli allevamenti campionati.

Riguardo alla prevalenza di HEV nei suini in Sud America in letteratura si possono trovare due studi (Munne et al., 2006; Vitral et al., 2005). Nel primo la prevalenza di anticorpi anti-HEV nei suini era del 24,3%(Vitral et al., 2005), mentre nel secondo (Munne et al., 2006) la sieroprevalenza tra varie regioni dell'Argentina variava dal 4% al 58%. In questo ultimo studio sono stati anche testati dei campioni dei feci per la ricerca diretta del virus, e 48 su 54 sono risultati positivi (Munne et al., 2006).

In Olanda (van der Poel et al., 2001) l'RNA di HEV è stato identificato nel 22% dei pool di feci ottenuti da 115 diversi allevamenti nel territorio. Con lo stesso metodo di campionamento nel 2005 sono stati raccolti nuovi 97 pool fecali di allevamenti olandesi (Rutjes et al., 2007). Il 55% dei campioni testati era positivo per la ricerca di RNA di HEV, probabilmente non per un'aumentata prevalenza negli allevamenti nel corso dei sei anni trascorsi dal primo campionamento, ma per l'utilizzo di un protocollo diagnostico più sensibile (Rutjes et al., 2007).

In UK (Banks et al., 2004a) sono stati testati due allevamenti per la presenza del virus e 256 sieri provenienti dal territorio nazionale per la presenza di anticorpi. Nel primo allevamento sono stati testati campioni di feci di suinetti di 12 settimane, rivelando una prevalenza del 22,5%. Nel secondo allevamento sono stati testati due animali di 15 settimane, entrambi positivi nelle feci, e 11 campioni di siero di cui 8 positivi. Cinque dei 10 campioni di tessuti testati erano inoltre positivi (Banks et al., 2004a).

In Spagna la presenza di HEV nella popolazione suina è stata ampiamente dimostrata (Buti et al., 2004; de Deus et al., 2007b; De Silva et al., 2008; Fernandez-Barredo et al., 2007; Fernandez-Barredo et al., 2006; Pina et al., 2000). In particolare due studi sono interessanti per quanto riguarda la

prevalenza dell'infezione nel suino (Fernandez-Barredo et al., 2006; Seminati et al., 2008). Nel primo sono stati presi in considerazione i diversi stadi di produzione dei suini in allevamento, per identificare l'eventuale presenza di un'età a maggiore rischio di infezione (Fernandez-Barredo et al., 2006). La prevalenza complessiva dell'infezione era del 23,4%, e la fase più a rischio è risultata essere quella del primo mese di ingrasso (60% di positivi sui testati) e del magronaggio (41,7% di positività) (Fernandez-Barredo et al., 2006). Dato interessante è stato il rinvenimento di positività anche relativamente elevate (21,9%) nelle scrofette; si tratta infatti della prima testimonianza dell'infezione da HEV nei riproduttori (Fernandez-Barredo et al., 2006). Nel secondo studio (Seminati et al., 2008) è stata presa in considerazione la sieroprevalenza in 41 allevamenti dislocati sul territorio spagnolo. Quaranta degli allevamenti testati erano positivi per la presenza di IgG anti-HEV (97,6%), e la classe di età con una più elevata positività anticorpale era quella delle scrofe anziane (60,8%), seguita da quella dei suinetti di 3-6 settimane (36,2%) (Seminati et al., 2008).

In Italia esiste un solo studio pubblicato sulla presenza di HEV nel suino (Caprioli et al., 2007), dove 2 ceppi virali sono stati identificati da suini di 4,5 e 2,5 mesi (5,9% dei campioni testati).

In Cina sono stati presi in considerazione 2 distretti ad intensa produzione suinicola, e il 9,6% dei suini testati eliminava con le feci il virus (Zheng et al., 2006).

In India vari studi testimoniano la presenza di HEV nella popolazione suina (Arankalle et al., 2001; Arankalle et al., 2006; Arankalle et al., 2002; Shukla et al., 2007). Le prevalenze anticorpali si sono rivelate molto alte (96,5%) (Shukla et al., 2007). Ceppi di HEV sono stati rinvenuti nelle feci di diverse regioni (Arankalle et al., 2006; Arankalle et al., 2002; Arankalle et al., 2003).

Anche in Giappone la presenza di HEV nel suino è stata dimostrata (Nakai et al., 2006), ed in particolare con picchi di prevalenza (75-100%) in suini di 1-3 mesi di età. Una piccola percentuale di animali (7%) eliminava virus

all'età di macellazione (5-6 mesi) in tutti gli allevamenti testati (Nakai et al., 2006).

2.2.2 HEV nel cinghiale

Studi sulla circolazione di HEV in popolazioni di cinghiali sono stati condotti in Australia (Chandler et al., 1999), Giappone (Li et al., 2005a; Masuda et al., 2005; Matsuda et al., 2003; Nishizawa et al., 2005; Sonoda et al., 2004; Takahashi et al., 2004; Yazaki et al., 2003; Michitaka et al., 2007), Spagna (de Deus et al., 2007a), Germania (Kaci et al., 2008) e Italia (Martelli et al., 2008).

Per quanto riguarda lo studio australiano (Chandler et al., 1999) è stata rilevata una sieroprevalenza del 25% in una popolazione di “wild hogs”, che non sono veri e propri cinghiali, ma maiali che vivono allo stato brado.

Più copiosi sono invece i dati provenienti dal Giappone, anche se per la maggior parte sono costituiti da report di focolai di trasmissione di epatite all'uomo dopo l'ingestione di carne o organi crudi o poco cotti di cinghiale (Li et al., 2005a; Masuda et al., 2005; Matsuda et al., 2003; Yazaki et al., 2003). Veri e propri studi epidemiologici su popolazioni di cinghiali sono invece i lavori di (Sonoda et al., 2004) e di (Michitaka et al., 2007). Nel primo lavoro sono stati campionati cinghiali provenienti da diverse regioni del Giappone ed è stata dimostrata una sieroprevalenza del 9%, unita all'identificazione di un ceppo presumibilmente autoctono di HEV (Sonoda et al., 2004). Nel secondo studio (Michitaka et al., 2007) è stata dimostrata una sieroprevalenza del 25,5% nei cinghiali selvatici e del 71,4% di quelli allevati, mentre solo il 3,1 % del totale era virologicamente positivo.

In un recente studio condotto in Spagna (de Deus et al., 2007a) è stata dimostrata una siero positività del 42,7% e una prevalenza del virus del 19,6% in campioni di cinghiale provenienti da aree diverse. Interessante è anche il fatto che è stata riscontrata una prevalenza significativamente maggiore dell'RNA virale in campioni provenienti da animali in età

giovanile (41,2%) piuttosto che in quelli di animali sub-adulti (10,5%) (de Deus et al., 2007a).

Anche in Germania è stato condotto uno studio (Kaci et al., 2008) su campioni di siero di cinghiale raccolti negli anni 1995-1996. Il virus è stato rinvenuto nel 5,3% dei campioni; questa ridotta prevalenza dell'infezione rispetto allo studio spagnolo potrebbe essere dovuta alla lunga conservazione dei campioni tedeschi.

Per quanto riguarda i dati pubblicati sulla prevalenza di HEV nei cinghiali in Italia (Martelli et al., 2008), si rimanda alla parte sperimentale di questa tesi.

2.2.3 HEV nei topi

Anticorpi specifici anti-HEV sono stati rinvenuti in popolazioni murine di tutto il mondo (Favorov et al., 2000; He et al., 2006; Hirano et al., 2003a; Smith et al., 2002). Solo un lavoro testimoniava il rinvenimento di RNA virale di HEV in campioni di topo (He et al., 2006), ma successivamente gli stessi Autori hanno smentito il dato essendosi resi conto che si trattava di una contaminazione dei campioni con un ceppo circolante in laboratorio (He et al., 2006). Per quanto riguarda i dati di sieroprevalenza riportati nello studio e non smentiti, il 12% dei topi catturati in aree iperendemiche per HEV nell'uomo erano positivi (He et al., 2006). In altre regioni, dove HEV nell'uomo non è iperendemico, la sieroprevalenza nei topi si è rivelata notevolmente più alta, come nel caso nelle zone urbane del Maryland (USA), dove il 78-91% degli animali testati era positivo (Favorov et al., 2000). L'alta sieroprevalenza riportata nei topi di aree geografiche non iperendemiche per l'infezione da HEV nell'uomo e l'impossibilità di amplificare l'RNA virale da questi campioni potrebbe indicare la circolazione nei topi di ceppi geneticamente molto diversi da quelli umani (Goens e Perdue, 2004).

2.2.4 HEV nelle altre specie recettive

Evidenze della presenza di HEV sono state testimoniate e approfondite almeno in altre 4 specie animali: mangoste (Nakamura et al., 2006; Li et al., 2006b), cavalli (Saad et al., 2007), gatti (Kuno et al., 2003) e cervi (Sonoda et al., 2004; Yu et al., 2007).

Un gruppo di 100 mangoste sono state esaminate in Giappone per la presenza di anticorpi e per la ricerca diretta del virus dell'epatite E (Nakamura et al., 2006). Il 21% degli animali campionati era sierologicamente positivo, e in un animale è stato possibile rinvenire l'RNA del virus dell'epatite (Nakamura et al., 2006).

Per quanto riguarda i cavalli, un recente studio (Saad et al., 2007) ha investigato sia la siero prevalenza che la prevalenza virologica in 200 campioni di siero di cavalli adibiti al traino di carri (e quindi in particolare contatto con l'uomo) in Egitto, dove l'infezione è considerata iperendemica nell'uomo (Fix et al., 2000). La sieropositività era del 13%, e il 4% degli animali erano viremici (Saad et al., 2007).

In un caso di epatite E di origine autoctona in Giappone la fonte di infezione più probabile è stata individuata nel gatto domestico appartenente al paziente, in quanto l'animale aveva un alto titolo anticorpale anti-HEV (Kuno et al., 2003). Questo dato è stato poi supportato da un successivo studio di sieroprevalenza in gatti domestici giapponesi, che ha dimostrato che 44 su 135 animali esaminati erano positivi per la presenza di anticorpi anti-HEV (Okamoto et al., 2004).

Per quanto riguarda i cervi, i dati presenti in letteratura sono soprattutto legati a piccoli focolai di trasmissione alimentare all'uomo a seguito di ingestione di carne cruda o poco cotta (Masuda et al., 2005; Matsuda et al., 2003; Takahashi et al., 2004; Tamada et al., 2004; Tei et al., 2003). Due lavori sono stati condotti però anche sull'epidemiologia dell'infezione in diverse popolazioni di cervi (Sonoda et al., 2004; Yu et al., 2007). Nel primo studio (Sonoda et al., 2004) circa 120 cervi sono stati testati per la presenza di anticorpi anti HEV nel siero e per la ricerca del virus in

campioni di fegato. Tutti i fegati erano negativi, e solo il 2% dei sieri era positivo (Sonoda et al., 2004). Nello studio successivo (Yu et al., 2007) sono state investigate popolazioni di cervo *Sika* importate dal Giappone negli stati americani del Maryland e della Virginia ricercando anticorpi anti-HEV, ma nessuno dei campioni è risultato positivo.

2.2.5 Avian HEV

Il primo ceppo di epatite E aviaria fu identificato nel 2001 negli Stati Uniti (Haqshenas et al., 2001) da polli con la sindrome di epatomegalia splenomegalia (HS syndrome). Questa malattia clinica del pollame era una malattia emergente in Nord America, ma fino al 2001 l'agente eziologico non era stato individuato (Meng, 2003). Nel 2001 fu identificato un virus da campioni di bile di polli affetti da HS che, sequenziato, ha rivelato avere la struttura genomica e la sequenza nucleotidica simili a quelli dell'HEV umano (Haqshenas et al., 2001). Il genoma dell'*avian HEV* è più corto di quello dei mammiferi di circa 600 paia di basi, avendo una lunghezza complessiva di 6,6 Kb (Haqshenas et al., 2001). Anche se l'identità nucleotidica tra i ceppi di epatite E aviari e umani è solo del 50% circa, parti dei domini funzionali della regione ORF1 della elicasi e della metiltransferasi sono relativamente conservati, supportando la conclusione che anche l'HEV aviario sia un membro della famiglia *Hepeviridae* (Berke and Matson, 2000). In un recente studio (Zhang et al., 2007), sono stati testati campioni di diversi animali, sia con primers disegnati per la ricerca di ceppi aviari di HEV, che con primers per individuare i ceppi dei mammiferi. Nessun campione è risultato positivo per la ricerca di ceppi aviari, ma due campioni provenienti da uccelli si sono rivelati positivi per la ricerca di ceppi dei mammiferi (Zhang et al., 2007). I ceppi identificati avevano il 98% di omologia nucleotidica con quelli isolati dai mammiferi dello stesso sito, e gli Autori suggerivano per questo una possibile

trasmissione di HEV dai mammiferi agli uccelli, che sarebbero quindi recettivi all'infezione da HEV mammario (Zheng et al., 2006).

2.3 DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA DEI DIVERSI GENOTIPI DI HEV

Il genotipo 1 può essere suddiviso in 5 sottotipi, che presentano diversi pattern di distribuzione geografica (Lu et al., 2006). I virus appartenenti a questo genotipo sono stati responsabili di focolai in India negli ultimi 20 anni (Arankalle et al., 1999), e negli ultimi 15 anni la loro circolazione è stata dimostrata anche in Nepal (Shrestha et al., 2003).

Il sottotipo 1a è stato anche isolato in epidemie nel Burma (Tam et al., 1991), ma anche in Pakistan (van Cuyck-Gandre et al., 2000), Giappone (Takahashi et al., 2002) e Spagna (Pina et al., 2000). Gli isolati spagnoli e giapponesi potrebbero essere casi di importazione (Lu et al., 2006).

Il sottotipo 1b è prevalentemente riscontrato in Cina, dove è stato responsabile di focolai epidemici durante gli anni 1986-1988 (Aye et al., 1992).

Il sottotipo 1c è stato probabilmente introdotto dalla Cina all'India e Pakistan, dove si manifesta in focolai che precedono la stagione delle piogge (Shrestha et al., 2003).

I sottotipi 1d e 1e sono stati identificati solo in Africa, il primo solo nel nord, mentre il secondo si distribuisce in tutto il continente (van Cuyck-Gandre et al., 2000).

Il genotipo 2 è stato identificato solo in poche aree, e per la prima volta in Messico (Huang et al., 1992).

Il genotipo 3a è stato identificato principalmente negli USA, in Giappone, ma anche in Corea e in Olanda. Sembra che ci siano due gruppi all'interno di questo sottotipo, uno indigeno degli Stati Uniti e l'altro del Giappone, e che da qui questi si siano diffusi (Lu et al., 2006).

I sottotipi 3h e 3i sono stati identificati in Paesi anche molto distanti tra loro: Argentina, Austria, Italia e Nuova Zelanda (Garkavenko et al., 2001; Schlauder et al., 1999; Schlauder e Mushahwar, 2001).

Diversamente dal genotipo 3, anche se presenta lo stesso grado di variabilità, il genotipo 4 è stato rinvenuto solo in paesi asiatici (Lu et al., 2006). Le sequenze provenienti dalla Cina sono state classificate in 3 sottotipi, mentre le sequenze provenienti da Giappone ed India sono state raccolte ciascuna in un diverso sottotipo (Lu et al., 2006).

Particolare è il caso del Giappone: sul suo territorio circolano ceppi appartenenti al genotipo 3 e al 4, e sono entrambi responsabili di casi di trasmissione all'uomo (Lu et al., 2006). A questo proposito esiste uno studio in bibliografia (Tanaka et al., 2006), in cui viene dimostrato che i ceppi sia del genotipo 3 che del 4 circolanti in Giappone formano dei clusters isolati e distinti rispetto a quelli circolanti in altri Paesi. In particolare, utilizzando la tecnica del molecular tracing, viene avanzata l'ipotesi che il progenitore di questi ceppi sia stato introdotto nel Paese agli inizi del 1900, quando numerosi tipi di suini di razza Yorkshire vennero introdotti dagli UK in Giappone (Tanaka et al., 2006).

CAPITOLO 3: HEV COME ZOONOSI

L'ipotesi che alcune specie animali possano rappresentare un serbatoio di infezione per l'uomo si è fatta sempre più fondata dopo il riscontro di positività virologiche e sierologiche specifiche per HEV in alcune specie animali.

Inoltre l'esistenza di un serbatoio animale di HEV consente di giustificare i casi cosiddetti autoctoni di infezione (Lu et al., 2006). A corollario di questa ipotesi, esistono numerose prove del potenziale zoonosico del virus HEV, che verranno di seguito schematizzate.

3.1 POSSIBILITA' DI INFEZIONE INTERSPECIFICA

Il primo tentativo di infezione interspecifica con ceppi di HEV è da fare risalire al 1990 (Baylan et al., 1990) quando in Russia un suino fu infettato con un ceppo asiatico di HEV isolato da un paziente affetto dalla forma clinica della malattia. Gli Autori però non sequenziarono il ceppo identificato nel suino dopo l'infezione, rendendo impossibile stabilire se quello rinvenuto fosse il ceppo utilizzato per l'inoculo o se l'animale fosse già precedentemente infetto con un ceppo suino (Baylan et al., 1990). Nel 1998 (Meng et al., 1998a) alcuni Autori avevano tentato di infettare suini SPF con due ceppi di HEV di origine umana, uno appartenente al genotipo 1 (Sar-55) e uno al genotipo 2 (Mex-14). Anche in questo caso l'infezione non ebbe successo, probabilmente per la lontananza genetica di questi ceppi da quelli che normalmente infettano il suino (solo 75% di omologia nucleotidica), che potrebbe avere esitato in una differenza di suscettibilità tra le due specie (Meng et al., 1998b).

Quando l'infezione è stata condotta invece con un ceppo appartenente al genotipo 3 e quindi più simile a quelli naturalmente circolanti nella popolazione suina (US-2), l'infezione ha avuto successo ed è stata confermata dalla messa in evidenza nell'animale di una sequenza

nucleotidica identica a quella del ceppo di inoculo (Meng et al., 1998b). Per provare la trasmissibilità di ceppi suini all'uomo, preliminarmente è stata dimostrata la trasmissibilità di ceppi umani a primati non umani, utilizzati come modello sperimentale per l'uomo (Erker et al., 1999b). È stato dimostrato quindi che le scimmie potevano essere infettate con ceppi umani appartenenti al genotipo 1, 2, 3 (Erker et al., 1999b). Successivamente è stata dimostrata anche la possibilità di trasmissione di ceppi suini ai primati non umani (Pina et al., 1998). In particolare, un ceppo di probabile origine suina rinvenuto nella rete fognaria in prossimità di un macello, è stato in grado di infettare primati non umani (Pina et al., 1998).

Tramite queste sperimentazioni è stato quindi possibile dimostrare che HEV, ed in particolare i ceppi appartenenti a genotipo 3, possono essere trasmessi dall'uomo al suino e viceversa, dando così la prima conferma all'ipotesi che gli animali, e specialmente il suino, giochino un ruolo importante nella trasmissione nell'infezione da HEV, soprattutto nei casi cosiddetti autoctoni di infezione (Panda et al., 2006).

3.2 OMOLOGIA TRA CEPPI UMANI E ANIMALI CIRCOLANTI SULLO STESSO TERRITORIO

Ceppi di HEV identificati nell'uomo tendono a presentare elevate omologie nucleotidiche se circolanti nello stesso territorio, cioè tendono a formare dei clusters geografici (Okamoto, 2008) (vedi **Figura 3.1**). I ceppi appartenenti ai genotipi 1 e 2 hanno tra loro minori differenze nucleotidiche rispetto a quelli appartenenti al genotipo 3 e 4 e questo sembra essere dovuto alla contemporanea circolazione di questi ultimi due sia negli animali che nell'uomo (Lu et al., 2006). Mentre i primi due genotipi (1 e 2) hanno una trasmissione di tipo oro fecale, negli altri due genotipi (3 e 4) le vie di trasmissione si differenziano, essendo implicate diverse specie animali; sembra quindi che a simili pattern di trasmissione corrispondono gli stessi gradi di divergenza genetica (Lu et al., 2006).

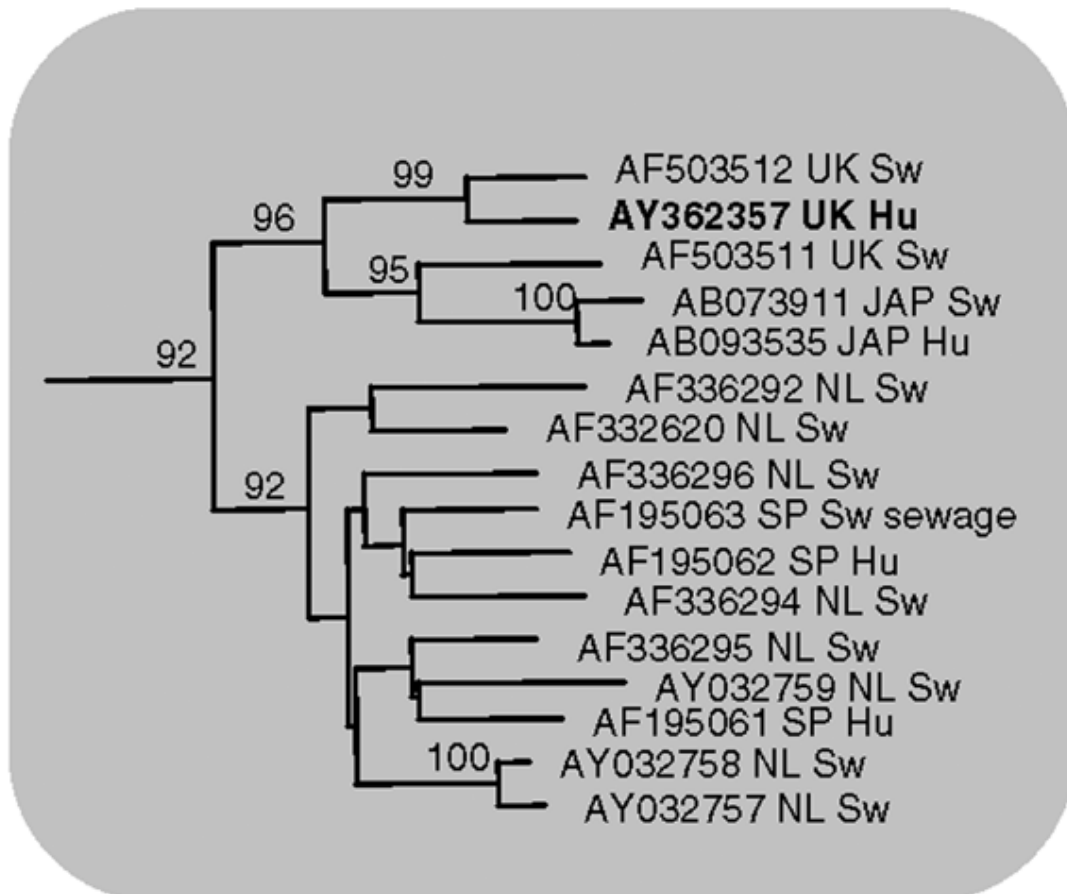
A dimostrazione della trasmissibilità di ceppi animali all'uomo stanno le numerose evidenze che ceppi animali e umani circolanti sullo stesso territorio manifestano gradi di omologia nucleotidica molto elevati, soprattutto se comparati quelli circolanti su altri territori (Huang et al., 2002; Inoue et al., 2006a). Sin dalla scoperta del primo ceppo animale di HEV negli USA, si era notato come questo presentasse elevate omologie nucleotidiche con i ceppi umani statunitensi (Meng et al., 1997). Successivamente questa osservazione è stata confermata a Taiwan (Hsich et al., 1999) e in Giappone (Okamoto et al., 2001). Nel 2001 poi (van der Poel et al., 2001), i primi ceppi suini europei sono stati identificati in Olanda, e si sono dimostrati geneticamente vicini a ceppi di europei di HEV di origine umana. Nel 2002 è stato condotto uno studio su larga scala su suini provenienti da diverse regioni geografiche degli Stati Uniti (Huang et al., 2002), che ha evidenziato come i ceppi suini presentassero tra loro un'identità nucleotidica dell'88-100% e, se comparati con il prototipo umano di HEV, del 89-98%. Nel 2004 nel Regno Unito (Banks et al., 2004a) sequenze di HEV sono state identificate in suini, comparate con un ceppo di HEV identificato da un caso umano autoctono di epatite E in UK, si collocavano vicine nell'albero filogenetico.

In Spagna, nel 2006 (de Deus et al. 2007b), in un'indagine condotta in suini presentanti diverse patologie, sono stati identificati ceppi con un'identità nucleotidica variabile tra 85,7% e 100% tra loro, e che avevano un'identità dell'85,1-97,6% con due ceppi spagnoli di origine umana.

In Italia (Caprioli et al., 2007), ceppi suini hanno rivelato una stretta omologia nucleotidica con ceppi identificati nell'uomo in Spagna.

Tutti questi dati presenti in bibliografia sostengono l'ipotesi che vi sia una trasmissione interspecifica di ceppi di virus dell'epatite E appartenenti al genotipo 3 e 4 dagli animali, ed in particolare il suino, all'uomo, e che quindi sussistano delle vie di trasmissione di tipo zoonotico.

Figura 3.1: Vicinanza tra ceppi umani e suini circolanti sullo stesso territorio (da Banks et al., 2004a).



3.3 TRASMISSIONE ALIMENTARE

Indagini effettuate in Giappone hanno rivelato che alla base di una parte considerevole dei casi di infezione umana da HEV che si sono verificati, vi è verosimilmente la trasmissione alimentare (Tei et al., 2003; Lu et al.,

2006). In particolare, alcuni pazienti hanno manifestato una sintomatologia acuta, successivamente attribuita ad epatite E, dopo aver consumato carne cruda di cervo *Sika*; successivamente le indagini biomolecolari condotte sulla carne sospettata hanno rilevato, in quest'ultima, la presenza di sequenze virali aventi elevate percentuali di omologia con quelle rinvenute nelle persone che l'avevano mangiata (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 *Sika* implicata nel focolaio umano ed ancora conservata nel congelatore dei pazienti (Tei et al., 2003). In aggiunta a ciò, uno studio successivo ha messo in evidenza, sempre in Giappone, che consumatori di selvaggina cruda presentano valori di sieroprevalenza più elevate rispetto a gruppi di controllo (Teo, 2006). Episodi di malattia si sono verificati anche dopo il consumo di carne di cinghiale alla griglia o bollita (Tamada et al., 2003) e, più frequentemente, di fegato crudo di cinghiale (Matsuda et al., 2003). Anche in queste occasioni, le sequenze virali identificate nel siero dei pazienti infetti avevano presentato elevate percentuali di omologia con quelle presenti nella carne che avevano mangiato prima dell'inizio dei sintomi (Tamada et al., 2003).

Anche il consumo di fegato di suino è stato implicato nella trasmissione dell'infezione dopo che una serie di casi di epatite E si erano verificati in persone che avevano mangiato del fegato di maiale grigliato non completamente cotto (Yazaki et al., 2003). In seguito a questi fatti sono state effettuate delle indagini anche in alcune macellerie giapponesi e l'1,9% dei fegati in vendita analizzati è risultato positivo alla ricerca del virus (Yazaki et al., 2003). In un recente studio condotto negli USA (Feagins et al., 2007) l'11% dei fegati esposti per la vendita in un supermercato era positivo per la presenza di HEV. Omogeneati di questi fegati sono stati successivamente somministrati a suini SPF, che si sono infettati con i ceppi identificati negli organi, a dimostrazione del fatto che HEV non solo era presente, ma anche infettante (Feagins et al., 2007). Sottoposti a diverse tipologie di cottura, è stato inoltre dimostrato che

fegati riscaldati a 56°C per 1 ora contenevano ancora materiale infettante (Feagins et al., 2008). A temperature di 191°C (temperatura interna 71°C) per 5 minuti o in acqua bollente per 5 minuti il virus sembra invece inattivarsi, dal momento che i suini inoculati con tale materiale non si sono infettati (Feagins et al., 2008).

Recentemente, anche in Olanda è stato riportato un caso di possibile trasmissione alimentare di HEV collegato all'assunzione di carne di suino poco cotta, anche se risultati definitivi non sono stati prodotti dagli Autori (Melenhorst et al., 2007; Bouwknecht et al., 2007).

Nel sud-est dell'Ungheria sono stati condotti studi che hanno messo in evidenza una maggiore incidenza di casi di HEV in persone con l'abitudine di ingerire salsicce di suino preparate in casa, ma non è stata riportata l'evidenziazione diretta del virus nei prodotti carnei (Fodor et al., 2005; Reuter et al., 2006).

Anche in Texas si è tentato di collegare un caso di epatite autoctona umana al consumo di carne poco cotta, ma indagini condotte sulla carne avanzata hanno prodotto risultati negativi (Amon et al., 2006).

Nel suino è stato dimostrato che HEV replica soprattutto nel fegato e nel tratto intestinale (Ha et al., 2004); l'indagine svolta su fegati di maiale venduti in alcune macellerie di Hokkaido ha rilevato, in questi, la presenza di elevate cariche virali (Yazaki et al., 2003). Il muscolo invece non sembra essere una sede elettiva della replicazione del virus, anche se è comunque possibile che possa pervenire in queste sedi durante la viremia (Teo, 2006). Per quanto riguarda le specie selvatiche non ci sono ancora notizie certe di quale sia la dinamica replicativa del virus, anche se l'elevata carica virale rilevata nel muscolo delle specie testate (10^5 copie per grammo) fa pensare ad una possibile replicazione del virus anche a questo livello (Tei et al., 2003).

Sembra che anche l'ingestione di molluschi filtratori crudi rappresenti un fattore di rischio per l'acquisizione dell'infezione, come dimostrato dalle più elevate siero prevalenze riscontrate in persone con questa abitudine

alimentare (Cacopardo et al., 1997), o che semplicemente vivevano in zone costiere (Ijaz et al., 2005).

Nella **Tabella 3.1** sottostante (adattata da Tei et al., 2006) vengono schematizzati gli alimenti fino ad adesso coinvolti in casi di trasmissione alimentare, e i riscontri virologici ottenuti da ciascun tipo di alimento.

Tabella 3.1: Alimenti coinvolti nei casi di trasmissione alimentare

ALIMENTO	PROVE DELLA PRESENZA DI HEV
CARNE di CERVO	<ul style="list-style-type: none"> – Correlazione cronologica tra il consumo dell'alimento e la manifestazione della patologia clinica – Sequenze parziali di HEV identiche nel siero del paziente e nell'alimento sospetto
FEGATO di CINGHIALE	<ul style="list-style-type: none"> – Correlazione cronologica tra il consumo dell'alimento e la manifestazione della patologia clinica
CARNE di CINGHIALE	<ul style="list-style-type: none"> – Correlazione cronologica tra il consumo dell'alimento e la manifestazione della patologia clinica – Sequenze parziali di HEV identiche nel siero del paziente e nell'alimento sospetto
FEGATO di SUINI	<ul style="list-style-type: none"> – Correlazione cronologica tra il consumo dell'alimento e la manifestazione della patologia clinica
MOLLUSCHI	<ul style="list-style-type: none"> – Consumo abituale (evidenze di tipo circostanziale, non evidenziazione diretta del virus)

3.4 SIEROPREVALENZE PIU' ELEVATE IN INDIVIDUI A CONTATTO CON ANIMALI INFETTI E TRAMMISSIONE DIRETTA

Un ulteriore supporto all'ipotesi che vede il suino quale probabile serbatoio d'infezione per l'uomo è venuto da studi sieroepidemiologici (Drobeniuc et al., 2001; Withers et al., 2002; Meng et al., 2002) condotti in USA, Taiwan, Moldova e Grecia, 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 (vedi tabella 2).

Nel suino la principale via di trasmissione dell'infezione è quella oro-fecale (Halbur et al., 2001); la viremia, durante la quale il virus replica a livello epatico, intestinale, e nei linfonodi (Williams et al., 2001; Choi et al., 2003), dura circa due settimane, tuttavia HEV può essere ritrovato, in quantità rilevanti, nelle feci anche fino a 3-4 settimane post infezione (Halbur et al., 2001).

Va anche aggiunto che HEV è in grado di sopravvivere e di mantenere integra la sua capacità infettante anche nell'ambiente e soprattutto nei liquami stoccati in prossimità degli allevamenti suinicoli (Kasordorkbua et al., 2005). Verosimilmente ne deriva che il continuo contatto con suini, con loro escrementi e anche con l'ambiente in cui essi vivono, potrebbe aumentare in modo significativo la probabilità, da parte dell'uomo di contrarre l'infezione (Withers et al., 2002; Teo, 2006). Quest'eventualità è stata spesso sostenuta da studi di sieroprevalenza condotti in categorie lavorative considerate potenzialmente "a rischio" di infezione: negli Stati Uniti sono state rilevate sieroprevalenze più elevate nei veterinari (Meng et al., 2002) e negli allevatori di suini (Withers et al., 2002) rispetto ai donatori di sangue o alla popolazione di controllo. Analogamente in Moldova, dove non sono mai stati registrati casi autoctoni di malattia nell'uomo, i tassi anticorpali per HEV negli allevatori di suini, erano di due

volte superiori rispetto alla popolazione che non aveva mai avuto contatti con questi animali (Drobeniuc et al., 2001) (vedi **Tabella 3.2**).

Tra gli altri fattori di rischio correlati al contatto con i suini sembra esserci anche l'esposizione alle carcasse di maiali infetti durante la macellazione e la lavorazione delle carni: casi di epatite E sono stati infatti diagnosticati in un macellaio inglese (Jary et al., 2005) e in un operatore di un macello spagnolo (Mateos et al., 2005). Anche recentemente in Spagna è stata testimoniata l'infezione con un ceppo di HEV suino in un macellatore (Fernandez-Barredo et al., 2007).

Tabella 3.2: sieroprevalenze riscontrate nella popolazione a contatto e non a contatto con suini (Withers et al., 2002).

PAESE	Professionisti a contatto con suini	Popolazione di controllo
TAIWAN	26,7%	8%
MOLDOVA	51,1%	24,5%
USA	10,9%	2,5%
USA	26%	18%
GRECIA	40%	15,7%
SPAGNA	6%	4%

Recentemente (Renou et al., 2007) è stato riportato un caso di possibile trasmissione di HEV da un maialino vietnamita da compagnia ad un paziente francese. Otto settimane dopo il primo contatto con l'animale (e quindi compatibile con il periodo di incubazione del virus) il paziente è stato ricoverato per un'epatite virale acuta, essere diagnosticata in seguito di tipo E. Non essendoci in anamnesi viaggi all'estero, consumo di carne contaminata o comportamenti a rischio (come l'aver bevuto acqua non

potabile o il contatto con altri animali), si è ipotizzato che il virus potesse provenire dal maialino da compagnia (Renou et al., 2007). Analisi biomolecolari effettuate sul siero dell'animale hanno dimostrato la presenza di sequenze virali che, comparate con quelle ottenute dal paziente, mostravano un grado di omologia del 90-94% (Renou et al., 2007). Esistevano quindi delle differenze nelle due sequenze nucleotidiche, compatibili con la possibilità che si trattasse di quasispecie diverse dello stesso ceppo virale. In Giappone, in alcuni casi di trasmissione di HEV per via alimentare è stato evidenziato un grado di omologia del 100% tra le sequenze identificate nelle carni e quelle identificate nei pazienti. Gli Autori (Renou et al., 2007) giustificano il differente grado di omologia nucleotidica identificato nel paziente francese e nel suo maialino da compagnia con la possibilità che a causare trasmissione zoonotica sia stata una quasispecie con un potenziale zoonotico superiore a quella identificata settimane dopo nel siero dell'animale (Renou et al., 2007).

Nel mantenimento dell'infezione va anche considerato il ruolo dell'ambiente: è stato dimostrato che HEV, come altri virus enterici, è in grado di trasmettersi e di sopravvivere nei liquami e nelle acque di scarico (Clemente Casares et al., 2003; Kasordorkbua et al., 2005). Potenziali fonti d'infezione comprendono quindi anche il contatto con liquami e acque contaminati, il consumo di cibi contaminati da queste o di molluschi allevati o raccolti in acque potenzialmente infette (Cacopardo et al., 1997; Ijaz et al., 2005). Dopo l'isolamento di sequenze virali di HEV da scarichi provenienti dalla rete fognaria urbana, da allevamenti suinicoli e dai macelli (Pina et al., 1998; Pina et al., 2000; Clemente-Cesares et al., 2003), si è consolidata l'ipotesi che l'eliminazione virale con le feci, da parte di animali infetti, possa contribuire alla diffusione del virus nell'ambiente. Durante uno studio condotto sugli scarichi urbani fognari a Barcellona è stato identificato un ceppo virale strettamente correlato a ceppi suini di HEV circolanti nel medesimo territorio (Pina et al., 2000); il ceppo isolato è stato in grado di infettare sperimentalmente primati non umani dopo inoculazione endovenosa (Pina et al., 1998). Questa evidenza però non

porta necessariamente alla conclusione che l'HEV di origine fognaria sia responsabile della contaminazione delle acque potabili municipali (Teo et al., 2006). Studi condotti in America (Kasordorkbua et al., 2005) hanno dimostrato che in allevamenti suinicoli era possibile isolare il virus dai vasconi di raccolta dei liquami, ma non nell'acqua di abbeverata né negli altri depositi d'acqua presenti in allevamento. Questi dati fanno ipotizzare una limitata stabilità del virus nel terreno, con conseguente scarsa diffusibilità nelle falde acquifere, o quantomeno una diluizione della carica virale tale da renderne molto improbabile la trasmissibilità con le acque (Kasordorkbua et al., 2005). Per quanto riguarda la contaminazione degli impianti fognari urbani con HEV proveniente da allevamenti suinicoli, non è possibile dimostrare che le sequenze virali identificate (Pina et al., 2000) provenissero effettivamente da suini, anche se simili a ceppi identificati in questa specie (Teo et al., 2006). Non è infatti ancora stato chiarito il ruolo epidemiologico di altre specie animali, come ad esempio i ratti, che sono più in contatto con quel determinato ambiente, e sono risultati positivi per anticorpi anti-HEV in tutto il mondo (Teo et al., 2006).

CAPITOLO 4: PATOGENESI E SINTOMATOLOGIA

Per quanto riguarda la strategia di replicazione del virus, il modello che è stato proposto si basa su quello di altri virus a RNA a singolo filamento positivo ben caratterizzati (Reyes, 1993). Le cellule in cui avviene la replicazione virale sono prevalentemente gli epatociti, ma anche altri siti di replicazione extraepatica sono stati identificati, come il piccolo intestino, la milza, i linfonodi e i monociti (Williams et al., 2001). Una volta penetrato in una cellula permissiva, l'ORF1 viene tradotto nella poliproteina, e grazie all'enzima RNA polimerasi RNA dipendente, probabilmente sfruttando gli enzimi della cellula ospite, l'RNA viene trascritto in un filamento ad orientamento negativo (Panda et al., 2007). Questo filamento negativo rappresenta la forma replicativa del virus e serve come stampo per la sintesi di altri filamenti di RNA positivo. Come avviene per gli alphavirus, in questo RNA intermedio si trova una sequenza che agisce come promoter subgenomico per la trascrizione di una proteina strutturale (o più di una) (Panda et al., 2007). Queste a loro volta vanno a circondare il genoma virale per la costituzione dei nuovi virioni infettanti. Nonostante queste conoscenze, le esatte modalità di questa strategia replicativa devono essere ulteriormente chiarite. I filamenti di RNA negativo si ritrovano solo negli epatociti e negli altri siti primari di replicazione, mentre nella bile e nel siero si ritrovano solo filamenti positivi di RNA (Nanda et al., 1994). Recentemente (Reheman et al., 2007) è stato dimostrato che il virus si localizza primariamente nel reticolo endoplasmatico della cellula ospite, che probabilmente è anche il sito primario di replicazione (vedi **Figura 4.1**).

HEV raggiunge il fegato non sono ancora stati chiariti. Una volta nel fegato, il virus replica nel citoplasma degli epatociti, si accumula nella bile ed è quindi escreto attraverso le feci. La viremia inizia quando il virus è già rilevabile nel fegato (Aggarwall et al., 2000). Ad oggi non si conoscono siti extraepatici di replicazione e non è quindi noto se il virus che si trova nelle feci sia interamente di provenienza epatica o se vi sia replicazione anche nel tratto intestinale. La viremia e l'escrezione nelle feci sono rilevate prima delle alterazioni epatiche che normalmente appaiono simultaneamente alla risposta immunitaria e sono caratterizzate dall'innalzamento delle transaminasi (Aggarwall et al., 2000). Il virus può essere ritrovato nelle feci a partire da una settimana prima dell'inizio dei sintomi e fino a 2 settimane dopo la fine della malattia. L'RNA virale è generalmente presente nel siero dei pazienti per 2 settimane dall'inizio della malattia, ma in alcuni casi, è stato osservato fino a 16 settimane dopo (Aggarwall et al., 2000). Il meccanismo per cui si produce il danno epatico non è ancora stato chiarito, ma è probabile che la componente immunomediata sia più rilevante del danno diretto operato dal virus, che non è considerato citopatico. Questa ipotesi è supportata dal fatto che gli infiltrati linfocitari in corso di malattia sono costituiti da linfociti citotossici o suppressor (Aggarwall et al., 2000). Le IgM appaiono durante le prime fasi della malattia e scompaiono nel giro di 4-5 mesi. Nel corso di focolai epidemici, IgM sono state rilevate in oltre il 90% dei campioni di siero ottenuti da una settimana a 2 mesi dall'inizio della malattia. Le IgG compaiono poco dopo le IgM e il loro titolo aumenta durante la fase acuta e la convalescenza, rimanendo alto per 1-4 anni. La durata della persistenza delle IgG non è stata ancora determinata, ma anticorpi anti-HEV sono stati rilevati anche 14 anni post-infezione (Aggarwall et al., 2000; Emerson e Purcell 2003).

4.1.2 Caratteristiche cliniche

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 (cosiddetta *fase preitterica*) che dura pochi giorni in cui si manifestano sintomi simil-influenzali quali febbre, tremori, anoressia, nausea, vomito, dolori addominali, diarrea, dolori articolari, astenia ed un temporaneo rash cutaneo. Questi sintomi sono seguiti dopo pochi giorni da ittero con inscurimento delle urine e feci ipocoliche. Con la comparsa dell'ittero (*fase itterica*) la febbre e gli altri sintomi prodromici tendono a regredire fino 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 si autolimita e ha una durata compresa tra 1 e 4 settimane, i valori ematochimici tornano gradualmente alla normalità (Aggarwall et al., 2000).

L'epatite E è una patologia a carattere acuto che non tende mai alla cronicizzazione e alla cirrosi. In alcuni pazienti si può tuttavia avere una forma "prolungata" con colestasi, persistenza dell'ittero e intenso prurito. In questi casi le analisi di laboratorio mostrano un marcato innalzamento della fosfatasi alcalina ed un persistere della bilirubinemia, anche dopo che i valori di transaminasi sono tornati nella norma. La prognosi è comunque favorevole e la malattia e l'ittero tendono a risolversi spontaneamente nel giro di 2-6 mesi (Aggarwall et al., 2000; Emerson e Purcell 2003).

Una piccola proporzione di pazienti può però sviluppare insufficienza epatica fulminante o subacuta con esito a volte infausto.

Molti pazienti, d'altro canto, presentano solo sintomi simil influenzali e in questi casi il coinvolgimento epatico è riconoscibile solo con le indagini di laboratorio (Aggarwall et al., 2000).

Durante gli episodi epidemici è stata riscontrata una letalità variabile tra lo 0,07% e il 2%, quindi leggermente superiore a quella dell'epatite A. Le donne in gravidanza, in particolare nel 2° e 3° trimestre, sviluppano una malattia più severa con prognosi riservata e valori di letalità tra il 15% e il 25%. Le possibilità che si manifestino aborti, nascite premature e mortalità neonatale sono elevate. Le ragioni per cui il danno epatico risulta particolarmente grave nelle donne in gravidanza sono sconosciute

(Aggarwall et al., 2000). Tali ragioni non sembrano comunque ascrivibili alle scarse condizioni di salute che si riscontrano nei Paesi in via di sviluppo in quanto, anche nei Paesi industrializzati, la letalità in questa fascia di popolazione risulta egualmente elevata. E' stata avanzata l'ipotesi (Jameel et al., 1999) che la letalità particolarmente elevata nelle donne in gravidanza possa essere dovuta alla particolare suscettibilità di questa categoria all'effetto endotossina mediato. Sembra infatti 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 ed 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, 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 un'infezione sperimentale condotta su primati non umani si sono osservati fenomeni di necrosi acuta tubulare a livello renale, accompagnati da emorragie focali, suggerendo che HEV replichi a livello renale. In scimmie gravide, comunque, non è stato osservato nessun aumento di mortalità (Panda et al., 2006). Quando si è cercato di identificare i possibili fattori di rischio connessi allo sviluppo della malattia in gravidanza, l'unico elemento individuato è stato che le donne con un elevato livello di istruzione sembrano essere meno soggette all'acquisizione della patologia (Oncu et al., 2006).

L'infezione da HEV può anche essere del tutto asintomatica; la frequenza di queste forme non è nota, ma probabilmente supera ampiamente i casi con ittero. Nelle aree endemiche, un'elevata percentuale degli individui sieropositivi non presenta, infatti, anamnesi di epatite (Aggarwall et al., 2000; Emerson e Purcell 2003).

Dal punto di vista patologico, la forma più comune è un'epatite colestatica caratterizzata istologicamente da stasi biliare canalicolare e alterazione "pseudoghiandolare" delle cellule del parenchima con lievi alterazioni

degenerative degli epatociti. In altri casi, invece, le lesioni sono simili a quelle associate ad altre forme di epatite virale acuta con alterazioni regressive disseminate degli epatociti (apoptosi, degenerazione acidofila e palloniforme di singole cellule, steatosi, necrosi locale), accentuata colestasi con o senza proliferazione di dotti biliari, ipertrofia delle cellule del Kupffer con accumulo di bile, infiammazione portale con infiltrazione di neutrofili, macrofagi e linfociti (Aggarwall et al., 2000; Emerson e Purcell 2003).

Dal punto di vista anatomopatologico, le caratteristiche istologiche dell'epatite E possono, in alcuni casi, differire da quelle delle altre epatiti virali. Circa la metà dei pazienti affetti mostra una forma di epatite colestatica, caratterizzata da stasi biliare e alterazione "pseudoghiandolare" delle cellule del parenchima con lievi alterazioni degenerative degli epatociti (Peron et al., 2007). In altri casi, invece, le alterazioni istologiche sono simili a quelle associate ad altre forme di epatiti virali con alterazioni regressive disseminate degli epatociti: apoptosi, degenerazione acidofila e palloniforme di singole cellule, steatosi, necrosi focale o confluyente, accentuata colestasi con o senza proliferazione di dotti biliari, ipertrofia delle cellule di Kupffer e accumulo di bile. In tutte le forme invece, l'essudato infiammatorio infiltra maggiormente gli spazi portali ed è composto principalmente da linfociti, macrofagi e scarsi polimorfonucleati (Aggarwal et al., 2000; Emerson et al., 2003) che interessano soprattutto le forme colestatiche (Peron et al., 2007). Durante le forme fulminanti le lesioni epatiche sono molto gravi, gran parte degli epatociti sono colpiti da necrosi massiva, fino al collasso del parenchima epatico.

Alcuni Autori (Teo et al., 2007) hanno distinto sia clinicamente che epidemiologicamente le due forme di Epatite E che si manifestano o nei Paesi in via di sviluppo con importanti focolai epidemici, o sporadicamente nei Paesi industrializzati. Di particolare interesse è la constatazione che i casi clinici di epatite fulminante si presentano con maggior frequenza nelle donne in gravidanza nel primo caso, mentre nel secondo ad essere maggiormente colpiti sono uomini in età avanzata (Lewis et al., 2008).

Sembra che fattori predisponenti lo sviluppo di un'insufficienza epatica fulminante nei paesi industrializzati siano la presenza di patologie epatiche pregresse e l'eccessivo consumo di alcool (Teo et al., 2007).

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

4.2 LA MALATTIA NEL SUINO

4.2.1 Patogenesi

Analogamente a quanto accade nell'uomo, si ritiene che la via principale di trasmissione sia quella oro-fecale; non ci sono evidenze di trasmissione verticale del virus (Meng et al., 1998a; Meng et al., 1998b). Sperimentalmente, è stato dimostrato la trasmissione dell'infezione da animali inoculati ad animali non infettati ma tenuti a contatto con quelli inoculati, confermando la contagiosità del virus (Kasorndorkbua et al., 2004; Meng et al., 1998a; Meng et al., 1998b). L'infezione sperimentale per via oro-fecale è possibile, ma è difficile da riprodurre e richiede in genere esposizioni ripetute al virus; per questo motivo viene generalmente utilizzata la via endovenosa (Kasorndorkbua et al., 2004; Meng et al., 1998a).

Nella **Tabella 4.1** sono schematizzate alcune informazioni relative a diverse infezioni sperimentali condotte nel suino, con particolare riferimento al tipo di inoculo infettante utilizzato e ad i siti in cui il virus è stato rinvenuto.

Tabella 4.1: Rappresentazione schematica dei dati ottenuti in corso delle diverse infezioni sperimentali.

	INOCULO	DURATA	VIREMIA	ESCREZ FECALE	POSITIVITA' ORGANI	ISTOLO GIA
MENG et al 1998a	Siero infetto ev	10 sett.	Da quarta a sesta sett. p.i.	Da seconda a nona sett. p.i.	-	-
MENG et al 1998b	feci	16 sett.	-	Da prima a quarta sett.p.i.	-	1-4 sett. Degenera zione epatocell ulare
HALBUR et al. 2001	Sosp. Fecale ev	8 sett.	-	Da 7 gg p.i.	Tra 4 e 14 gg p.i. fegato	Necrosi epatocell. Picco a 20 gg p.i.
WILLIAMS et al. 2001	Sosp. Fecale ev	8 sett.	-	-	Tra 3 e 27 gg p.i. in vari organi	-
KASORNDORKBU A et al 2001	O sospens. Fecale o omogeneato tissutale o ev o orale		-	3-20 gg p.i.	3-20 gg p.i. in fegato	-
KASORNDORKBU A et al 2003	Sosp. Fecale ev	7 sett.	-	-	-	Epatite linfoistio citaria
KASORNDORKBU A et al 2004	ev, orofecale	-	-	-	-	-
KASORNDORKBU A et al 2005	Ev o orofecale sosp fecale	8 sett.	-	14-49 gg p.i.	-	-

FEAGINS et al., 2007	Omogeneati di fegato	8 sett.	Prima- ottava sett p.i	Prima- ottava sett p.i	-	-
-------------------------	-------------------------	---------	------------------------------	------------------------------	---	---

In analogia a quanto riportato per l'uomo, non è ancora chiaro in che modo HEV, una volta penetrato nel suino, raggiunga il fegato né quali siano i siti iniziali di replicazione. In animali infettati sperimentalmente per via endovenosa è possibile rilevare, tramite polymerase chain reaction (PCR) o ibridazione *in-situ*, RNA virale in numerosi tessuti extraepatici, anche in assenza di viremia, fino a 20-27 giorni post-infezione (p.i.). La forma replicativa del virus, a filamento negativo, oltre che nel fegato si ritrova soprattutto nel tratto intestinale e nei linfonodi (Choi et al., 2003; Williams et al., 2001). Nella **Tabella 4.2** (adattata da Williams et al., 2001), sono riassunti i diversi organi in cui è stato possibile rinvenire HEV in corso di infezione sperimentale, sia effettuata con un ceppo di origine suina che con uno di origine umana.

Tabella 4.2. Positività per la ricerca di HEV in organi e tessuti in suini inoculati sia con un ceppo suino che umano di HEV (adattata da Williams et al., 2001)- I linfonodi erano un pool di linfonodi mesenterici, tracheobronchiali ed epatici.

Tipologia di tessuto	Numero di suini positivi (2 per ogni giorno p.i.) in quel tessuto per la ricerca di HEV					
	3	7	14	20	27	55
Suini inoculati con swHEV						
Siero	0	2	2	0	0	0
Fegato	1	2	2	2	1	0
Linfonodi ^a	1	2	1	2	1	0
Colon	0	2	2	1	2	0
Piccolo intestino	0	2	2	2	0	0
Stomaco	0	2	2	0	0	0
Milza	0	2	1	1	0	0
Pancreas	0	0	0	0	0	0
Rene	0	0	0	0	1	0
Tonsille	0	0	0	0	1	0

Ghiandole salivari	0	0	0	0	1	0
Polmone	0	1	1	0	0	0
Cuore	0	0	0	0	0	0
Muscolo	0	0	0	0	0	0
Suini inoculati con Human	HEV					
Siero	0	2	2	1	0	0
Fegato	2	2	2	2	2	0
Linfonodi	2	2	2	2	2	0
Colon	2	1	1	1	1	0
Piccolo intestino	2	2	0	0	0	0
Stomaco	2	2	1	1	1	0
Milza	1	2	2	1	2	0
Pancreas	1	0	0	1	0	0
Rene	1	1	0	0	0	0
Tonsille	1	0	1	1	1	0
Ghiandole salivari	0	1	1	0	0	0
Polmone	1	0	1	0	0	0
Cuore	1	2	0	0	0	0

Muscolo	1	2	1	0	0	0
---------	---	---	---	---	---	---

Recentemente (de Deus et al., 2007) HEV è stato ricercato in organi e tessuti di suini affetti da diverse condizioni patologiche, ed è stato dimostrato che la bile è il campione più frequentemente positivo (76,9% degli animali esaminati erano positivi), seguita dai linfonodi mesenterici, fegato, feci e siero. La maggiore presenza del virus nella bile e nei linfonodi mesenterici sarebbe giustificata secondo gli Autori dal fatto che il fegato e i linfonodi sarebbero i siti principali di replicazione del virus (de Deus et al., 2007).

La viremia ha una durata di circa 2 settimane mentre nelle feci è possibile ritrovare il virus fino a 3-4 settimane. La sierconversione avviene 2-3 settimane p.i. (Meng et al., 1998a; Meng et al., 1998b; Williams et al., 2001; Halbur et al., 2001). I tessuti in cui HEV replicherebbe prima e più a lungo (da 3 a 27 giorni p.i.) sono fegato, intestino tenue, colon e linfonodi (Williams et al., 2001; Halbour et al., 2001). Queste osservazioni ed il fatto che in corso d'infezione sperimentale l'RNA virale sia riscontrabile nelle feci prima che nella bile ed in quantità circa 10 volte maggiore rispetto a quest'ultima, hanno fatto ipotizzare che, una volta penetrato per via oro-fecale e prima di indurre viremia, il virus replichi nell'intestino (Meng et al., 1998a; Meng et al., 1998b). Le indagini virologiche effettuate sul siero e/o sulle feci di animali in allevamento hanno dimostrato che RNA di HEV è rilevabile principalmente in animali di 2-5 mesi d'età, mentre in genere animali sotto i 2 mesi e sopra i 6-8 mesi di vita sono negativi (Banks et al., 2004a; Choi et al., 2003; Pina et al., 2000; Clemente Casares et al., 2003). In seguito a queste rilevazioni e poiché si ritiene che l'immunità materna duri circa 2 mesi, si ipotizza che l'infezione naturale avvenga a circa 2-3 mesi d'età (Halbour et al., 2001; Kasorndorkbua et al., 2003).

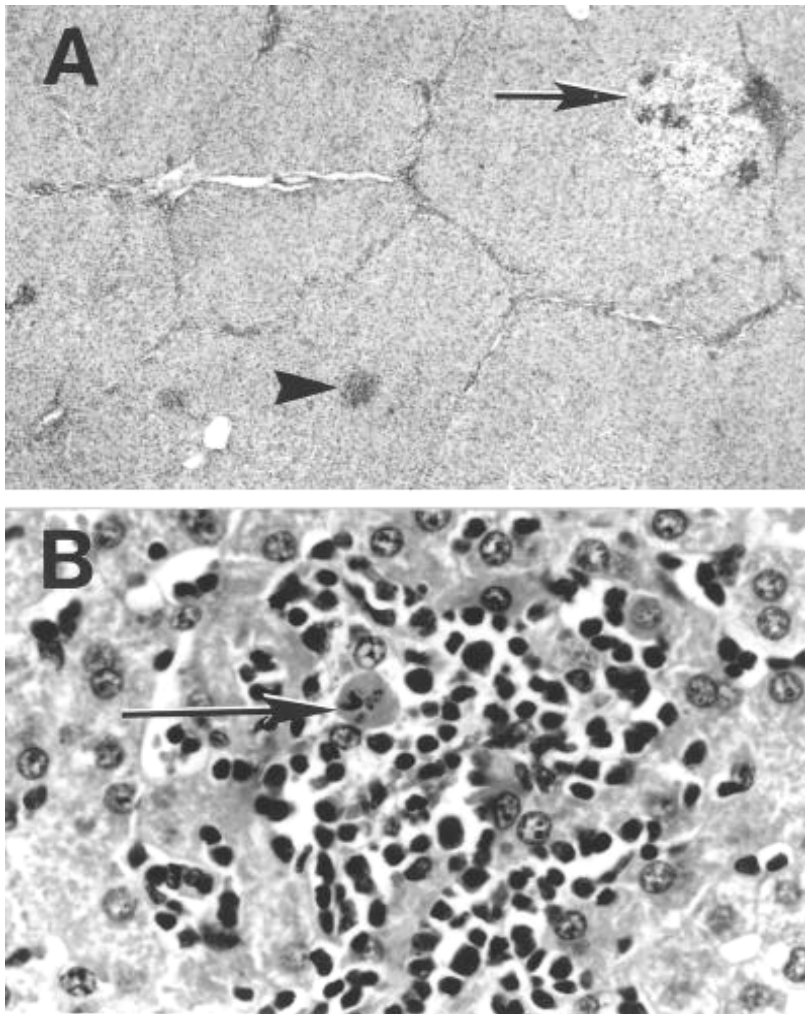
All'infezione segue la viremia, che dura circa 1-2 settimane e quindi l'escrezione del virus attraverso le feci per circa 3-4 settimane (3-5 mesi d'età), con successiva sierconversione ed eliminazione del virus ad opera del sistema immunitario (Halbour et al., 2001; Meng et al., 1998a; Meng et al., 1998b). L'infezione sarebbe quindi di breve durata e si autoestinguerrebbe nel giro di poche settimane (Halbour et al., 2001; Meng et al., 1998a). Va tuttavia chiarito che in recenti lavori (Fernandez-Barredo et al., 2007) il virus è stato rinvenuto anche in animali vicini all'età di macellazione (circa 6 mesi in Spagna, dove lo studio è stato condotto), e nei riproduttori (animali con età superiore agli 8 mesi). Negli USA (Feagins et al., 2007) il virus è stato rinvenuto nel fegato di animali macellati, 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, anche perché fino ad adesso è stata accertata la presenza di un solo sierotipo di HEV, ma questi dati potrebbero mettere in discussione tale acquisizione (Fernandez-Barredo et al., 2007). Si potrebbe infatti trattare di infezioni acquisite più tardi nel corso della vita dell'animale, causate da ceppi verso cui la precedente immunità non è proteggente (Fernandez-Barredo et al., 2007). Dal punto di vista sierologico, l'immunità passiva materna decresce a partire da 3-4 settimane e si estingue a 8-9 settimane di vita. E' raro tuttavia trovare animali sieropositivi sotto 1-2 mesi d'età, questo probabilmente a causa della sensibilità non adeguata dei test sierologici (Meng et al., 1997). Dopo l'infezione gli animali sviluppano anticorpi nei confronti del virus montando prima una risposta anticorpale in cui prevalgono le IgM, seguite dopo una settimana circa da un innalzamento delle IgG. A questo punto le IgM decrescono rapidamente nel giro di 1-2 settimane mentre le IgG incrementano costantemente per diverse settimane. La sierconversione avviene in seguito alla fase viremica intorno ai 3-4 mesi di vita (picco anticorpale a 4 mesi) e gli animali restano altamente positivi fino a 5-6 mesi di vita, quando le IgG cominciano lentamente a decrescere (Meng et al., 1997; Williams et al., 2001; Huang et al., 2001).

Nell'uomo il virus è in grado di provocare lesioni anatomopatologiche severe, caratterizzate da marcate lesioni necrotico infiammatorie, aggregati di cellule infiammatorie, colangiti, e anche pattern pseudo ghiandolare nei casi più gravi (Peron et al., 2007). Le lesioni anatomopatologiche nel suino, invece, sono rilevabili nel fegato solo a livello istologico: si caratterizzano per la presenza di infiltrati linfoplasmocitari multifocali sinusoidali e periportali e di aree focali a distribuzione irregolare di vacuolizzazione e necrosi epatocellulare (Meng et al., 1997), come visibile in **Figura 4.2**.

Figura 4.2: Lesioni istopatologiche in fegati di suino (da Meng et al., 1997)

A: epatite linfoplasmocitaria multifocale (x10)

B: foci di necrosi epatocellulare e infiammazione linfoplasmocitaria (x400).



Recentemente sono stati condotti due studi sulle lesioni epatiche rilevabili in suini affetti da infezione da HEV (de Deus et al., 2007b; Lee et al., 2007). Nel primo studio (de Deus et al., 2007b) il 57,7 % dei suini risultati positivi per HEV presentavano lesioni, esclusivamente microscopiche, di epatite. I suini risultati negativi per la ricerca del virus HEV presentavano lesioni di epatite solo nel 16,3 % dei casi (tale differenza è risultata statisticamente significativa). Le lesioni epatiche erano caratterizzate da una infiltrazione di entità variabile di mononucleati, infiltrati infiammatori principalmente localizzati nello spazio periportale oppure distribuiti variamente nel parenchima epatico (de Deus et al., 2007b). Nel secondo studio l'RNA di HEV è stato rinvenuto nel 55% dei fegati con lesioni epatiche, sempre microscopiche, caratterizzate da infiltrazioni focali di linfociti, plasmacellule e macrofagi nei sinusoidi epatici, e in qualche caso da infiltrazioni a livello portale (Lee et al., 2007).

4.2.2 Caratteristiche cliniche

Il virus non sembra essere particolarmente patogeno per il suino domestico, mentre non esistono informazioni relative ai cinghiali. Lo studio della malattia in animali naturalmente infetti o inoculati sperimentalmente ha dimostrato che HEV provoca di regola infezioni subcliniche con segni di epatite rilevabile solo a livello istologico (Meng et al., 1998b; Halbour et al., 2001; Williams et al., 2001; Meng et al., 2002); questa si caratterizza per la presenza di modesti infiltrati linfoplasmocitari multifocali sinusoidali e periportali e di limitate aree focali a distribuzione irregolare di vacuolizzazione e necrosi epatocellulare (Meng et al., 1998b; Halbour et al., 2001; Williams et al., 2001; Meng et al., 2002).

In alcuni casi è stata rilevata un'enterite linfoplasmocitaria ed una nefrite interstiziale multifocale linfoplasmocitaria.

Dal punto di vista macroscopico, in animali infettati sperimentalmente è stato talvolta rilevato un ingrossamento dei linfonodi mesenterici ed epatici

(Halbour et al., 2001). Da rilevare che ceppi umani inoculati sperimentalmente nel suino sembrano, in genere, provocare infezioni più severe dal punto di vista delle alterazioni istologiche rispetto a quelle ottenute con i ceppi suini. Alcuni Autori (Meng et al., 1998b; Meng et al., 2002), hanno ipotizzato che il virus nel suino possa avere un comportamento analogo a quello dell'epatite A nell'uomo il quale è patogeno solo nei soggetti adulti e non nei giovani. Secondo questa ipotesi, nella maggior parte dei casi la malattia non si manifesterebbe in modo clinicamente evidente in quanto la maggioranza dei suini adulti sarebbe protetta dall'infezione per aver incontrato il virus in uno stadio giovanile di vita, sviluppando così un'immunità attiva proteggente (Meng et al., 1998b). In uno studio recente, tuttavia, 12 scrofe sieronegative sono state inoculate per via endovenosa con un ceppo di HEV suino e durante il periodo della sperimentazione, non sono stati rilevati segni clinici di malattia né nelle madri né nei relativi feti. Una leggera epatite linfocitaria è stata osservata in 4 delle 12 scrofe, mentre non è stato registrato alcun effetto sulla vitalità, taglia, peso alla nascita e incremento ponderale giornaliero della prole (Kasorndorkbua et al., 2003). Alcuni Autori ritengono che HEV, di per sé scarsamente patogeno, possa però agire in sinergia con altri agenti virali come ad esempio il circovirus suino tipo 2 (PCV2), determinando così malattia (de Deus et al., 2007b; Martin et al., 2007). Indagini a tale proposito sono state condotte in due studi: nel primo (de Deus et al., 2007b), non è stato possibile identificare nessuna correlazione statistica tra la presenza del virus HEV e lesioni anatomopatologiche riconducibili ad infezione da PCV2, mentre nel secondo è stato possibile identificare una correlazione statistica (Martin et al., 2007). Se i due virus possano agire in sinergia o essere l'uno predisponente la presenza dell'altro resta comunque ancora da chiarire (Martin et al., 2007).

CAPITOLO 5: TECNICHE DIAGNOSTICHE

Sono disponibili numerose tecniche per la diagnosi, sia diretta che indiretta dell'infezione da virus dell'Epatite E. Queste tecniche differiscono tra loro in termini di sensibilità e specificità, rendendo difficile identificare un optimum diagnostico, soprattutto nel caso del suino in cui non sono disponibili dati clinici di supporto.

Le differenti tecniche saranno descritte ed elencate di seguito.

1.1 TECNICHE DI DIAGNOSI DIRETTA DELL'INFEZIONE

5.1.1 Microscopia elettronica

Questa tecnica ha permesso l'identificazione delle particelle virali di HEV in corso di epatiti trasmissibili non-A, non-B, non-C alla metà degli anni '70 (Feinstone et al., 1975). Il virus è riconoscibile per le sue dimensioni variabili tra 27 e 34 nm e per l'assenza di envelope. Per l'osservazione al microscopio, le particelle virali possono essere fatte precipitare mediante l'utilizzo di anticorpi specifici (Panda et al., 2007). Questa tecnica non viene praticamente utilizzata a fini diagnostici perché, nonostante sia molto specifica, richiede un elevato titolo virale nel campione di partenza, e può essere inficiata dalla degradazione del virus, particolarmente frequente soprattutto in campioni di feci (Panda et al., 2007).

5.1.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

La reazione di PCR è sicuramente la più utilizzata nella diagnosi diretta di HEV. Si utilizzano protocolli sia qualitativi che quantitativi.

5.1.2.1 PCR QUALITATIVA

Il primo clonaggio dell'intero genoma virale è stato ottenuto nel 1991 (Tam et al., 1991). Da allora svariate coppie di primers sono state disegnate per amplificare porzioni più o meno vaste del genoma.

I campioni di partenza possono essere di diversa natura: dalla persona ammalata o dall'animale vivo si prelevano generalmente siero e feci, mentre alla necropsia i tessuti maggiormente positivi e quindi più frequentemente prelevati sono rappresentati da bile, fegato, tratti di intestino e linfonodi mesenterici (Panda et al., 2007; de Deus et al., 2007b). Una volta effettuato il prelievo, i campioni vengono processati rapidamente oppure subito congelati a -80°C , essendo l'RNA virale particolarmente degradabile. Essendo un virus a RNA, le reazioni di amplificazione sono sempre precedute da una fase di retro trascrizione dell'RNA in cDNA. Anche questa fase è particolarmente delicata, in quanto anche il cDNA è facilmente degradabile e in campioni in cui la carica virale era bassa in partenza, si possono ottenere risultati di falsa negatività.

Per quanto riguarda la reazione di amplificazione, si possono utilizzare primers (sequenze oligonucleotidiche consenso) disegnati basandosi su diverse regioni del genoma, ma quelle più conservate tra i diversi ceppi e quindi più utilizzate nei protocolli diagnostici sono l'elicasi, la polimerasi e la parte terminale dell'ORF2 (Panda et al., 2007). I primers utilizzati nei protocolli di RT-PCR variano in relazione alla zona geografica e se sono volti alla diagnostica nell'uomo o negli animali. Esistono dei lavori mirati all'identificazione di primers universalmente validi (Erker et al., 1999a; Inoue et al., 2006b), proprio per evitare il rischio di non identificare come positivo un campione solo perché infetto da un ceppo appartenente ad un genotipo differente.

Generalmente i protocolli diagnostici presenti in letteratura prevedono l'utilizzo di protocolli di *nested PCR* per aumentare la sensibilità della tecnica. Questo particolare tipo di PCR prevede infatti l'utilizzo di primers interni alla regione amplificata in una seconda reazione di PCR. Nella

maggior parte dei casi, infatti, i prodotti della prima amplificazione non sono quantitativamente sufficienti per essere visualizzati in una corsa elettroforetica ma, se amplificati una seconda volta, sono chiaramente visibili. Ad una sensibilità notevolmente aumentata si contrappone però lo svantaggio di poter facilmente dare luogo a cross contaminazioni. Maneggiando un prodotto già amplificato è infatti molto frequente poter cross contaminare diversi campioni, quindi severe misure di controllo sono necessarie.

Una volta effettuata la reazione di amplificazione si effettua la corsa elettroforetica, generalmente su un gel di agarosio a contatto con Bromuro di Etidio per visualizzare la banda dell'altezza attesa. Generalmente i protocolli che utilizzano primers universali amplificano regioni molto corte del genoma virale (150-200 nucleotidi), su cui è difficile effettuare degli studi di natura filogenetica.

5.1.2.2 PCR QUANTITATIVA

Questo tipo di PCR consente l'amplificazione di segmenti specifici di genoma virale accompagnata da una contemporanea quantificazione del numero di copie ottenute in base alla correlazione con una curva standard precostituita (Kubista et al., 2006). Questo è possibile grazie all'utilizzo di particolari *dyes* in grado di emettere fluorescenza quando si legano al DNA amplificato, e che permettono una quantificazione direttamente proporzionale al grado di fluorescenza rilevato (Kubista et al., 2006). Il termine *real time* deriva dal fatto che i risultati si ottengono in tempo reale, cioè mentre la PCR è ancora in atto, il software connesso allo strumento è in grado di leggere la fluorescenza disegnando le curve di amplificazione. Non è quindi necessaria la corsa elettroforetica successiva all'amplificazione e in più, rispetto alla PCR tradizionale si possono avere dati quantitativi molto accurati (Kubista et al., 2006). Esistono diversi protocolli di real-time PCR, distinti in base al tipo di molecola che emette

fluorescenza: le più utilizzate sono la tecnologia Taqman e la Syber green. Sono distinte sostanzialmente dalla presenza o meno di una sonda specifica per il frammento amplificato. Nel caso del Syber green, il *dye* emette fluorescenza in presenza di qualsiasi DNA a doppia elica, quindi la sua specificità è inferiore. Dopo la separazione (melt) dei filamenti di DNA presenti come template nella reazione, le doppie eliche sono rappresentate dall'appaiamento delle singole eliche del DNA template con i primers, e quindi la fluorescenza viene emessa e aumenta proporzionalmente all'aumentare di questi prodotti (Kubista et al., 2006). La tecnica Syber green presenta però il grande svantaggio di essere poco specifica, in quanto può emettere fluorescenza anche in caso di formazione di dimeri di primers. Il modo per distinguere i prodotti specifici da quelli aspecifici consente nella valutazione della temperatura di melting, che sarà più bassa nel caso dei dimeri formati dai primers e quindi aspecifici (Kubista et al., 2006).

La tecnologia Taqman è invece più specifica, in quanto si serve dell'ausilio di una sonda specifica marcata con un *dye*, che viene definita *probe*. La sonda viene inglobata nel processo di amplificazione mediato dai primers e, una volta incorporata, libera il *dye* presente alla sua estremità terminale, che solo a questo punto emette fluorescenza. Maggiore è la quantità di molecole fluorescenti nel campione, maggiore è il numero di copie di DNA sintetizzato nel processo di amplificazione (Kubista et al., 2006).

Per l'esatta quantificazione delle copie di DNA prodotte in una reazione real time è comunque necessario costruire una curva standard (campioni diluiti in base 10 contenenti un numero di copie noto), a cui il software possa fare riferimento. Di solito si usa un plasmide contenente la porzione di genoma che verrà amplificata dai primers specifici, in modo da avere un numero di copie molto elevato nella curva standard, e difficilmente avere campioni che superino quella quantità (in tal caso sarebbero al di fuori della curva e quindi non quantificabili). Nel caso di virus a RNA, si effettua prima una reazione di retro trascrizione, utilizzando poi il cDNA come template, altrimenti si possono utilizzare dei kit cosiddetti one-tube in cui

la reazione di retro trascrizione e amplificazione avviene nello stesso passaggio, coesistendo nella mix di reazione sia l'enzima retrotrascrittasi che la DNA polimerasi.

Per quanto riguarda la diagnostica quantitativa di HEV, esistono diversi protocolli pubblicati in letteratura (Orrù et al., 2004; Li et al., 2006c; Enouf et al., 2006; Ahn et al., 2006; Jothikumar et al., 2006; Zhao et al., 2007; Gyarmati et al., 2007). Tra questi, utilizzano tutti la tecnologia Taqman tranne in due casi (Orrù et al., 2004; Li et al., 2006c), in cui viene utilizzata la tecnologia Syber green. Alcuni protocolli sono stati studiati per la diagnostica nell'uomo (Orrù et al., 2004; Li et al., 2006c; Enouf et al., 2006), altri sono stati ottimizzati sia in base a genotipi umani sia suini (Ahn et al., 2006; Zhao et al., 2007), altri principalmente in base a genotipi suini (Jothikumar et al., 2006; Gyarmati et al., 2007), anche se vengono comunque consigliati per la diagnostica umana. In generale, i protocolli real time sono più sensibili rispetto a quelli di PCR convenzionale, anche se nel caso della nested-PCR la differenza si riduce di molto. A questo proposito, quando comparati utilizzandoli sugli stessi campioni, è stato dimostrato che con il protocollo real time il 30,5 % dei testati era positivo, mentre con la nested-PCR solo nel 20% dei campioni era possibile visualizzare una banda a seguito di corsa elettroforetica (Zhao et al., 2007). E' interessante comunque notare che il grado di concordanza tra le positività dei campioni era dell'80%, cioè era possibile identificare campioni positivi in real time PCR e negativi in nested-PCR, ma anche viceversa (Zhao et al., 2007).

Per quanto riguarda i due protocolli ottimizzati appositamente per l'HEV suino, uno utilizza primers e sonda disegnati sulla regione genomica ORF2 (Gyarmati et al., 2007), mentre l'altro ha primers che amplificano la regione genomica ORF3 (Jothikumar et al., 2006). Nel primo caso gli Autori utilizzano un protocollo due step, preceduto quindi da una reazione separata di retro trascrizione (Gyarmati et al., 2007), mentre nel secondo si utilizza un protocollo one-tube (Jothikumar et al., 2006).

5.1.3 Coltivazione in colture cellulari

Il primo esperimento di coltivazione di HEV su linee cellulari è da fare risalire al 1996 (Tam et al., 1996). Epatociti provenienti da scimmie sperimentalmente infettate con HEV (Burma strain, prototipo del genotipo 1) furono isolati dai fegati e messi in coltura (Tam et al., 1996). Successivamente fu possibile identificare la forma sia replicativa che non replicativa del virus dalle cellule e dal terreno di coltura utilizzato, dimostrando che il virus si manteneva vivo e replicava anche nel sistema in vitro (Tam et al., 1996). Recentemente (Tanaka et al., 2006), è stato condotto uno studio estensivo di coltivazione virale su 21 linee cellulari di derivazione epatica, sia umana, che di scimmia che suina. Il virus è stato lasciato a contatto con ciascuna coltura cellulare per un'ora; passato questo tempo l'inoculum contenente il virus è stato rimosso, e le linee cellulari sono state incubate a 37°C o a 35°C. Sia gli inoculi che le colture cellulari che i terreni di coltura sono stati testati per la presenza del virus tramite un protocollo di PCR qualitativa (Mizuo et al., 2002), che quantitativa (Jothikumar et al., 2006). Una sola linea cellulare è stata in grado di supportare efficacemente la replicazione del virus, quella costituita dalle PLC/PRF/5, cellule di epatocarcinoma umano, con rese ottimali a temperatura di incubazione di 35,5°C. Sono state effettuate prove utilizzando virus sia a differenti titoli, sia esposto a diverse temperature (95°C per 10 minuti, 95°C per 1 minuto, 70°C per 10 minuti, 56°C per 30 minuti, 25°C per 30 minuti). Per quanto riguarda in particolare le prove di stabilità termica, solo il virus incubato a temperatura ambiente o a 56°C per 30 minuti era ancora in grado di infettare le linee cellulari. Gli Autori (Tanaka et al., 2007) hanno dimostrato così che è possibile sviluppare un sistema colturale adeguato anche per HEV, anche se rimane un virus difficile da coltivare con rese accettabili.

5.1.4 Tecniche istopatologiche

Il virus può essere evidenziato direttamente all'interno dei tessuti tramite l'ibridazione in situ o l'immunoistochimica.

Nel primo caso è stato dimostrato che è possibile identificare segmenti di genoma virale di HEV in tessuti sia fissati in formalina che paraffinati (Choi et al., 2003). In particolare, il segnale più forte di positività è stato messo in evidenza negli epatociti e nei dotti biliari, ma segnali di positività sono stati identificati anche nel piccolo e nel grosso intestino, nei linfonodi, nella milza, nelle tonsille e nei reni (Choi et al., 2003). E' stata così dimostrata la replicazione del virus in diversi tessuti, e gli Autori enfatizzano l'importanza di questa tecnica che permette la diagnosi senza alterare la morfologia dei tessuti (Choi et al., 2003). In un lavoro successivo (Choi et al., 2004) sono state comparate le tecniche di RT-nested-PCR a partire da tessuti fissati in formalina o paraffinati, con quella di ibridazione in situ sugli stessi campioni. Il grado di concordanza delle due tecniche si è rivelato del 100%, indicando la possibilità di diagnosi diretta (supportata da contemporaneo ritrovamento del virus nel citoplasma delle cellule tramite ibridazione in situ), anche in campioni paraffinati archiviati, con possibilità quindi di effettuare studi di prevalenza di tipo retrospettivo (Choi et al., 2004).

Per quanto riguarda l'immunoistochimica è stato pubblicato un lavoro (Ha et al., 2004) in cui in 30 suini naturalmente infetti è stato possibile identificare il virus. Nel citoplasma degli epatociti è stato infatti possibile rilevare un segnale di positività specifica per swHEV chiaramente distinguibile dal background (Ha et al., 2004).

5.2 TECNICHE DI DIAGNOSI INDIRETTA DELL'INFEZIONE

La diagnosi sierologica viene effettuata generalmente con test *ELISA* o, meno comunemente, con il *Western blot*. 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 superiore sensibilità e specificità. ORF2 esprime inoltre epitopi che possono indurre anticorpi neutralizzanti e che sono maggiormente conservati all'interno dei differenti ceppi (90,5%) rispetto a quelli di ORF3 (73,5%) (Wibawa et al., 2004). Fino ad oggi, ORF2 o sue porzioni sono stati espressi con successo in diversi sistemi ricombinanti quali cellule procariote, 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; la determinazione delle IgM anti-HEV è utile per la diagnosi di infezione acuta dal momento che le IgM si ritrovano nelle prime due settimane dall'inizio della sierconversione, mentre la presenza di IgG indica un'infezione non necessariamente recente. Numerosi studi effettuati in Paesi industrializzati riportano valori di prevalenza anticorpale che vanno dall'1% al 20% circa. Alcuni di questi valori appaiono elevati se comparati con la prevalenza clinica della malattia. Non è ancora del tutto chiaro perciò se l'elevata sieropositività in aree non endemiche sia dovuta ad infezioni subcliniche o anitteriche, cross-reattività sierologica con altri agenti, falsi positivi ai test sierologici, infezione subclinica con HEV suino o altri virus HEV simili o ad una combinazione di questi fattori (Krawczyński et al., 2000; Emerson et al., 2003). Purtroppo, i test sierologici attualmente utilizzati sono spesso diversi tra loro e presentano differenti sensibilità e specificità, rendendo difficile l'interpretazione e la comparazione dei risultati riportati nei diversi studi. Per quanto riguarda la diagnosi indiretta, bisogna ricordare che i virus suini sono geneticamente ed antigenicamente correlati a quelli umani ed aviari ed in letteratura è ampiamente riportato come molti epitopi, in particolare di ORF2, crossreagiscano tra le varie specie ed i vari ceppi (Meng et al., 1997; Haqshenas et al., 2002; Engle et al., 2002; Choi et al., 2003; Huang et al., 2004; Wibawa et al., 2004). Tuttavia, anche se sono stati allestiti kit commerciali ELISA che usano, come antigeni, proteine ricombinanti create appositamente per l'individuazione degli anticorpi anti-HEV nel siero

suino, sono comunemente utilizzati anche antigeni derivanti da ceppi umani, cambiando poi semplicemente l'anti-anticorpo marcato di rivelazione (Meng et al., 1997). Questo fatto indica che gli epitopi comuni dei ceppi umani vengono riconosciuti anche dalle igG specifiche anti-swHEV; inoltre negli studi di prevalenza è stata evidenziata una percentuale del 97% di concordanza nei risultati ottenuti con gli antigeni umani e suini di HEV (Meng et al., 2002) ad indicare l'esistenza di epitopi crossspecifici presenti nei diversi ceppi, umani ed animali.

CAPITOLO 6: PROFILASSI

La profilassi mirata alla prevenzione dell'epatite E nell'uomo può consistere nell'applicazione di regole igieniche generali volte al controllo dei fattori di rischio, o all'utilizzo dei vaccini (Panda et al., 2007). Nel suino, essendo la patologia apparentemente asintomatica, misure profilattiche hanno senso solo nella misura in cui possano ridurre il pericolo di esposizione e di trasmissione dell'infezione all'uomo. Essendo comunque il virus molto diffuso negli allevamenti suini e di provata trasmissibilità all'uomo, è necessario pianificare il controllo e il contenimento dell'infezione anche in questa specie animale.

6.1 PROFILASSI DIRETTA

Le misure di profilassi diretta cambiano in relazione all'andamento epidemiologico dell'infezione, a seconda quindi che sia epidemico o sporadico.

6.1.1 Profilassi diretta nelle aree iperendemiche

I focolai epidemici si sviluppano nelle zone dove l'infezione è iperendemica, e sono sempre legati a contaminazione delle acque potabili, essendo la trasmissione interumana molto rara (Teo et al., 2007). La prima misura di profilassi diretta in queste aree è quindi rappresentata dal miglioramento delle condizioni igieniche di base, dal controllo di routine delle acque potabili e dall'utilizzo di impianti fognari resistenti (Panda et al., 2007). Quello delle fogne è un problema cruciale, soprattutto nelle aree soggette a condizioni meteorologiche molto variabili; una delle più frequenti forme di contaminazione delle acque potabili è infatti il collasso della rete fognaria con promiscuità delle acque potabili con quelle di

scarico (Clemente Casares et al., 2003). Una efficace misura preventiva è comunque sempre rappresentata dall'educazione sanitaria, soprattutto per quanto riguarda l'utilizzo per la preparazione dei cibi e delle bevande di acque di provenienza non nota, o comunque non bollite preventivamente (Labrique et al., 1999).

Qualora un focolaio epidemico si verifichi, per evitarne la diffusione è indispensabile prestare attenzione allo smaltimento delle feci contaminate (Labrique et al., 1999). Per evitare infatti lo sviluppo di casi secondari, soprattutto negli ospedali, le feci di pazienti infetti devono essere trattate con misure sanitarie molto rigide (Labrique et al., 1999). Se la clorazione delle acque potabili in condizioni normali può essere sufficiente per evitare che siano contaminate con HEV, non lo è senza dubbio in corso di focolai epidemici di vasta portata, quindi tutta l'acqua consumata deve essere importata o bollita preventivamente (Labrique et al., 1999).

6.1.2 Profilassi diretta nelle aree non iperendemiche

Nei Paesi Industrializzati, dove le misure igienico sanitarie sono buone, la malattia si presenta generalmente con casi sporadici o con focolai di origine alimentare coinvolgenti un numero di individui molto ridotto (Teo et al., 2007). Le misure profilattiche dirette differiscono da quelle vigenti nelle aree iperendemiche, anche se in caso di pazienti infetti, le misure di gestione delle feci infette devono essere altrettanto rigorose (Labrique et al., 1997).

I fattori di rischio finora identificati in queste aree sono rappresentati dall'ingestione di carne infetta o di molluschi contaminati (Tei et al., 2003, Cacopardo et al., 1997), dal contatto con animali infetti (Fernandez Barredo et al., 2007, Renou et al., 2007), dall'appartenere al sesso maschile e dal risiedere in aree costiere (Lewis et al., 2008).

Gli ambiti dove è possibile intervenire sono quindi quelli correlati alla trasmissione di tipo alimentare e alla gestione del rapporto uomo-animale.

Per quanto riguarda la trasmissione alimentare, è stato recentemente dimostrato che il virus non resiste a temperature di cottura superiori ai 56°C, e in particolare viene rapidamente inattivato tramite la frittura (Feagins et al., 2008). Studi estensivi sulla resistenza di HEV nei molluschi filtratori non sono stati ancora condotti, ma è presumibile che la cottura possa abbattere significativamente o eliminare tutto completamente la carica virale presente. La cottura degli alimenti rappresenta quindi un ottimo fattore di prevenzione, in particolare per tessuti, quali il fegato, in cui la carica virale è nettamente elevata (Feagins et al., 2008). Tuttavia non si possono escludere contaminazioni crociate con alimenti (ad esempio verdure) consumate crude; a tale riguardo le buone pratiche di manipolazione, conservazione e preparazione degli alimenti rappresenterebbero un buono strumento di profilassi anche nel caso di HEV.

Per quanto riguarda la trasmissione da animali all'uomo, sono segnalati i casi di trasmissione da un maialino vietnamita da compagnia (Renou et al., 2007) o da un gatto (Okamoto et al., 2004) e da suino macellato verso un macellatore (Fernandez Barredo et al., 2007). Esistono comunque altre testimonianze indirette della trasmissione soprattutto da suini all'uomo, come quella riportata da Zheng et al., 2006 che dimostra come le persone che lavorano a contatto con i suini abbiano un rischio del 74% superiore di contrarre l'infezione. Inoltre gli Autori dimostrano che le comunità che vivono a valle di allevamenti suinicoli hanno il 29% di rischio in più di contrarre l'infezione rispetto a quelle che vivono a monte.

Nel caso di trasmissione da animali da compagnia, l'unica misura profilattica è la corretta gestione del rapporto con l'animale, in particolare mettere in atto misure igieniche efficaci nella gestione degli escrementi, e lavarsi frequentemente le mani per evitare la contaminazione degli alimenti e l'ingestione del virus. Nel caso dell'epatite E come malattia professionale, gli addetti dovrebbero proteggersi da feci e sangue contaminati, mediante l'utilizzo di opportuni dispositivi di protezione individuale (ad esempio: mascherine e guanti).

6.2 PROFILASSI INDIRETTA

Questo tipo di profilassi è stata studiata solo nell'uomo, e non negli animali.

La somministrazione di sieri iperimmuni contenenti anticorpi specifici durante la malattia clinica non ha sortito risultati (Panda et al., 2007), quindi la profilassi vaccinale è l'unica forma di profilassi indiretta applicata nei confronti di HEV.

Esistono vaccini prodotti con diverse tecnologie e diretti verso diversi epitopi immunodominanti, localizzati in tutte e 3 le regioni ORF, anche se sembra che ai fini della risposta anticorpale, la regione ORF2 sia la più importante (Panda et al., 2007). Per questo, porzioni di ORF2 sono state espresse in diversi sistemi, come le cellule procariote, i lieviti o le cellule d'insetto.

Di seguito verranno indicate le diverse tecnologie e i vaccini prodotti, con cenni anche all'efficacia degli stessi.

6.2.1 Espressione in cellule procariote

Il più piccolo frammento della regione ORF2 in grado di indurre la produzione di anticorpi neutralizzanti, e con un elevato grado di cross-reattività tra diversi genotipi, è quello compreso tra l'amminoacido 452 e il 617 (Meng et al., 2001). Per questo motivo è stata soprattutto espressa in sistemi costituiti da *E. coli*, e il primo tentativo di vaccinazione con una porzione aminoacidica dell'ORF2 del Burmese Strain (prototipo del genotipo 1) è andato a buon fine su macachi sperimentalmente infetti (Purdy et al., 1993). Animali inoculati con un ceppo appartenente al genotipo 2 e immunizzati con la stessa porzione aminoacidica, hanno sviluppato l'infezione, ma non hanno manifestato compromissioni epatiche (Purdy et al., 1993).

6.2.2. Espressione in cellule d'insetto

Si pensa che il miglior candidato per la produzione di vaccini sia una porzione dell'ORF2 prodotta su cellule d'insetto tramite il sistema del Baculovirus ricombinante (Wang et al., 2004). La proteina inizialmente prodotta ha dimensioni di 72ku, ma viene rapidamente degradata in proteine di 53ku e 56ku. Quando utilizzate in prove di challenge vaccinale, si è osservato che quella da 56ku ha superiore potenziale immunogeno (Zhang et al., 2001) e che l'immunità post vaccinazione varia da 6 mesi ad un anno (Zhang et al., 2002).

6.1.3 Espressione in lieviti e altre cellule

Recentemente proteine vaccinali sono state espresse in sistemi di cellule di lievito, perché presentano alcuni vantaggi come quello di produrre elevate quantità di proteina senza difficoltà (Wang et al., 2004). Anche proteine espresse dal genoma di HEV sono state espresse in questi sistemi con immunizzazione successiva di primati non umani (Lu et al., 2001).

Porzioni amminoacidiche di HEV sono state espresse con buone rese anche su cellule derivate da piante, ed in particolare dal tabacco (Li et al., 2002).

6.1.4 Vaccini a subunità

Sono vaccini costituiti da plasmidi con integrato DNA virale di porzioni codificanti per proteine antigeniche e elementi regolatori che permettono l'espressione di questo genoma in cellule di mammifero (Wang et al., 2004). Il DNA può essere prodotto facilmente in grandi quantità, e il vettore plasmidico non può diventare patogeno contrariamente ai virus attenuati utilizzati nei vaccini vivi (Wang et al., 2004). Un vaccino ricombinante è stato prodotto con successo anche per HEV, retro

trascrivendo in cDNA l'intero RNA virale e inserendolo in un plasmide pSGI (Panda et al., 2000).

6.1.5 HEV ricombinante in Virus Like Particles (VLPs)

Centoundici amminoacidi provenienti dalla proteina del capsido di HEV sono stati espressi in un sistema Baculovirus ricombinante, e successivamente inseriti in Virus Like Particles (VLPs, particelle virus simili) (Xing et al., 1999; Li et al., 2005b). Le VLPs sono composte da una singola proteina assemblata in particelle senza acido nucleico, quindi sono incapaci di replicare, ma sono simili ai virioni nativi, quindi altamente immunogeniche (Wang et al., 2004). La loro resistenza ai succhi gastrici e efficacia anche quando somministrate per bocca, ne fanno dei possibili candidati per la vaccinazione per via orale contro HEV (Wang et al., 2004).

INTRODUZIONE ALLA SEZIONE SPERIMENTALE

Nella sezione sperimentale di questa tesi verranno illustrati i risultati di cinque diverse indagini condotte per la maggior parte in Italia ma anche nel Regno Unito.

- Nella prima indagine riportata, sono stati presi in considerazione 6 diversi allevamenti suinicoli intensivi del Nord Italia. Sono stati esaminati campioni fecali provenienti da animali di tutte le classi di età e di tutte le categorie produttive presenti in azienda. Lo scopo principale era quello di valutare la diffusione dell'infezione all'interno dell'allevamento; e di acquisire maggiori informazioni sulla distribuzione dei diversi ceppi di HEV circolanti sul territorio nazionale.
- Nella seconda indagine è stato preso in considerazione un singolo allevamento, all'interno del quale un campione di animali è stato seguito attraverso le diverse fasi produttive, fino ad arrivare alla macellazione, dove sono stati prelevati campioni di fegato destinati all'alimentazione umana. Lo scopo di questo lavoro è stato di evidenziare la presenza del virus in animali di età progressivamente crescente, fino ad indagarne la presenza in sede di macellazione.
- Nella terza indagine sono stati esaminati suini inviati a scopo diagnostico presso le sezioni diagnostiche di Brescia e Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna. Sulla bile di questi animali, è stata ricercata con metodiche diagnostiche dirette il genoma di HEV e le positività riscontrate sono state messe in relazione con la presenza di eventuali altre patologie riscontrate all'esame autoptico o con la presenza di altri patogeni batterici e/o virali identificati. Scopo di questo lavoro era quello di mettere in relazione patologie e/o infezioni intercorrenti con la presenza di HEV nel tentativo di verificare se il virus possa

comportarsi come cofattore o come patogeno opportunista in corso di altre patologie.

- Nella quarta indagine è stata analizzata una popolazione demograficamente controllata di cinghiali, normalmente cacciati ed utilizzati per l'alimentazione umana. I dati ottenuti hanno dimostrato la presenza dell'infezione anche in suini selvatici, che possono quindi rappresentare un potenziale serbatoio di HEV per le altre specie domestiche e selvatiche con cui entrano in contatto. Queste specie possono inoltre rappresentare un potenziale fonte di infezione per l'uomo sia attraverso il contatto diretto sia attraverso il consumo di prodotti carnei infetti.
- Nell'ultima indagine, condotta nel Regno Unito nel corso di un periodo di formazione presso il VLA (Veterinary Laboratories Agency, Weybridge), sono stati presi in esame suini di diverse classi d'età provenienti da 10 diversi allevamenti dello Yorkshire Humberside, la regione a maggiore concentrazione suinicola del Paese. E' stato così possibile fornire dati estesi sulla prevalenza dell'infezione dei suini in UK, e si è potuto in particolare evidenziare la presenza del virus nei vasconi di stoccaggio dei liquami, che possono essere utilizzati per la fertirrigazione dei terreni circostanti l'allevamento.

Tutti i dati raccolti in queste indagini hanno contribuito ad ampliare le conoscenze sull'epidemiologia, la filogenesi e la patogenesi dell'infezione da HEV, e rivestono una particolare importanza dato il potenziale zoonosico di questa patologia.

CAPITOLO 7: INDAGINE SULLA PREVALENZA DI INFEZIONE PER CLASSI D'ETA' IN 6 ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA

In questo studio è stata valutata la prevalenza dell'infezione da HEV in suini appartenenti a diverse classi d'età e allevati in sei aziende suinicole del Nord Italia. L'indagine è stata condotta con lo scopo di ottenere maggiori informazioni sulla diffusione del virus negli allevamenti italiani e di valutare se anche in classi d'età che normalmente non vengono incluse in studi di prevalenza (in particolare le scrofe, sia giovani che anziane) l'infezione da HEV è presente. Lo studio ha inoltre permesso di acquisire nuove informazioni filogenetiche sulla distribuzione dei ceppi di HEV negli allevamenti italiani.

7.1 MATERIALI E METODI

7.1.1 CAMPIONAMENTO

Da gennaio a giugno del 2006 sono stati esaminati 6 diversi allevamenti intensivi del Nord Italia, di dimensioni variabili da un minimo di 500 ad un massimo di 1100 scrofe. Per ogni azienda sono state raccolte informazioni relative alla tipologia aziendale (ciclo chiuso o aperto) e alle dimensioni produttive (numero di scrofe presenti in allevamento).

Per ogni allevamento sono stati prelevati campioni fecali individuali degli animali delle seguenti classi d'età:

- Magroni (3-4 mesi)
- Animali grassi (8-9 mesi)
- Scrofette (nessun parto)
- Scrofe giovani (1-2 parti)
- Scrofe anziane (più di 2 parti)

In ogni allevamento sono stati prelevati campioni da almeno 10 animali per classe d'età. Hanno fatto eccezione solo le due aziende a ciclo aperto in cui non sono stati campionati gli animali grassi, essendo questi dislocati in un capannone diverso e decentrato. Questo schema di campionamento sistematico per classe d'età ha permesso di stimare la prevalenza aziendale di HEV considerando una prevalenza attesa del 30%, un errore accettabile del 25% e con un livello di confidenza del 95%,.

Pero ogni animale è stato raccolto un campione di feci direttamente dall'ampolla rettale, che è stato subito identificato e posizionato in un contenitore sterile. Il trasporto è stato effettuato in contenitori refrigerati, dopodiché i campioni sono stati trattati e conservati a -80°C.

7.1.2 TRATTAMENTO DEI CAMPIONI DI FECI

Per ogni campione di feci è stata preparata una sospensione in acqua DEPC (Dietilpirocarbonato), tramite il seguente protocollo:

- Sono state preparate un numero di eppendorf sterili da 1,5 ml pari ai campioni da risospendere, e in ciascuna è stato posto 1ml di acqua sterile DEPC.
- Da ciascun campione è stato pesato 1 grammo di feci prelevato con tampone sterile e introdotto nella eppendorf corrispondente.
- Per assicurare una completa miscelazione tra l'acqua e le feci ciascuna provetta è stata vortexata per almeno un minuto.
- Tutte le provette sono state centrifugate a 3000 rpm per 30 minuti alla temperatura di 4°C.
- Il surnatante ottenuto con la centrifugazione è stato prelevato e trasferito in una eppendorf sterile, subito stoccata a -80°C.

7.1.3 ESTRAZIONE DELL'RNA E RT-NESTED PCR

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata utilizzando un kit commerciale (QIAamp viral kit, Qiagen, Hilden, Germany), secondo le istruzioni del produttore. Brevemente, il processo di estrazione consisteva dei seguenti passaggi:

- *Lisi virale*: 140 µl di sospensione fecale sono stati lasciati a contatto per 10 minuti con un carrier RNA unito ad un buffer in grado di ledere l'involucro esterno del virus.
- *Precipitazione dell'RNA*: tramite l'utilizzo di etanolo assoluto e una serie di centrifugazioni successive, l'RNA virale è stato precipitato su un filtro selettivo in silice.
- *Lavaggio*: il filtro è stato lavato con una serie di centrifugazioni mediate da appositi buffer di lavaggio.
- *Eluizione*: l'RNA purificato contenuto nel filtro è stato eluito in acqua sterile e subito stoccato a -80°C.

A seguito dell'estrazione, l'RNA è stato retro trascritto in cDNA e amplificato mediante due successive amplificazioni (Nested-PCR), utilizzando le seguenti coppie di primers, disegnati da Erker et al., 1999a:

HEVORF2con-s1—5'GACAGAATTRATTTTCGTCGGCTGG-3'

HEVORF2con-a1—5' CTTGTTTCRTGYTGGTTRTCATAATC-3'

HEVORF2con-s2—5'GTGTCCTCRGCCAATGGCGAGC-3'

HEVORF2con-a2—5' GTTCRTGYTGGTTRTCATAATCCTG-3'

La reazione di RT-PCR è stata effettuata utilizzando un kit commerciale (SUPERScript III ONE STEP RT-PCR SYSTEM WITH PLATINUM TAQ, INVITROGEN Carlsbad, CA, USA) in grado di retrotrascrivere l'RNA e amplificare il template in un'unica reazione. La mix di reazione per questo primo passaggio è stata la seguente:

- buffer 5x 7,5µl
- primer A1(o 3156) 10mM 0,3µl
- primer A2 (o 3157) 10mM 0,3µl

- Taq superscript III 0,3µl

Agli 8,4 µl della mix sono stati aggiunti 6,6 µl dell'RNA del campione e la soluzione è stata incubata secondo il seguente profilo termico:

- 45°C per 30 minuti (retrotrascrizione)
- 94°C per 2 minuti (denaturazione iniziale)
- 40 cicli a 94°C per un minuto (denaturazione)
 - o 49°C per 90 secondi (annealing)
 - o 72°C per un minuto (elongation)
- 72°C per 5 minuti (elongation finale)

La reazione di NESTED PCR è stata condotta utilizzando l'Amplitaq DNA polymerase (Applied Biosystem, ABI, Foster City, CA, USA), secondo il seguente protocollo per campione:

- 2,5 mM MgCl₂
- 0.2µM per ciascun primer
- 1×PCR buffer
- 2 unità di AmpliTaq DNA Polymerase
- 10% del volume di reazione costituito dall'aggiunta del DNA amplificato nella prima reazione di PCR

Il profilo termico utilizzato è stato il seguente:

- 94°C per 9 minuti (denaturazione iniziale)
- 35 cicli a 94°C per 45 secondi (denaturazione)
 - o 49°C per 45 secondi (annealing)
 - o 72°C per un minuto (elongation)
- 72°C per 7 minuti (elongation finale)

Gli amplificati ottenuti in seconda PCR sono stati fatti correre su un gel di agarosio al 2%, in presenza di un marcatore di peso molecolare da 100bp, e i campioni in cui era possibile evidenziare una banda dell'altezza di 145bp sono stati considerati positivi (Erker et al., 1999a).

7.1.4 SEQUENZIAMENTO ED ANALISI FILOGENETICA

Sedici dei campioni risultati positivi in RT Nested PCR sono stati selezionati in maniera casuale da più allevamenti. La banda dell'altezza attesa è stata visualizzata su gel di agarosio al 2% e tagliata con bisturi sterile. Il DNA è stato purificato utilizzando un kit commerciale (Qiaquick gel extraction kit, Qiagen, Hilden, Germany), e successivamente sequenziato.

Le sequenze ottenute sono state allineate con software DNASIS (Hitachisoft) a quelle suine, umane e di cinghiale presenti in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). L'analisi filogenetica è stata condotta con il software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), ed il dendrogramma è stato ottenuto con il metodo UPGMA. Per la filogenesi sono stati inseriti ceppi umani e suini appartenenti a tutti i genotipi noti, ed in particolare:

- genotipo 1 (HuHEV, Mya86-Li strain, accession no. DQ079624);
- genotipo 2 (HuHEV, Mexico strain, accession no. M74506);
- genotipo 3 (SwHEV and HuHEV) (United States, accession no. AF082843 and AF060669), SwHEV swJ570 (Japan, accession no. AB073912), SwHEV NLSw15 and HuHEV NLSw20 (The Netherland, accession no. AF332620 and DQ200292), HuHEV (Hungary, accession no. AY940427.1), SwHEV (Hungary, accession no. EF530672), SwHEV P354 (United Kingdom, accession no. AF503511), SwHEV NLSW28 (The Netherlands, accession no. AF336292), campione di origine fognaria HEV BCN13 (Spagna, AF490994), ceppi suini italiani accession no.: MO/9_3/06/IT, EF681107; MO/36_4/06/IT, EF682083; HEVBO/01, EF681109; HEVPI/01, EF681110; ceppo umano italiano accession no. AF110390;
- genotipo 4 (HuHEV, JKK-SAP strain, accession no. AB074917 e SwHEV, swCH31 strain, accession no. DQ450072)

- avian HEV (Stati Uniti, accession no. AY535004) (Huang et al., 2004).

7.1.5 ANALISI STATISTICA

Per determinare possibili differenze nella prevalenza di HEV in relazione allo stadio di produzione e alle dimensioni dell'azienda è stata condotta un'analisi di regressione logistica. Per valutare l'effetto delle dimensioni aziendali, gli allevamenti sono stati arbitrariamente suddivisi in due categorie in base al numero medio di scrofe presenti:

- Grandi aziende: più di 1000 scrofe
- Piccole aziende: meno di 1000 scrofe

Prima della regressione logistica, la proporzione di animali positivi è stata valutata usando il test del χ^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).

7.2 RISULTATI

Centoquindici dei 274 suini testati (42%) sono risultati positivi per la ricerca del genoma di HEV. Tutte le sei aziende esaminate sono risultate infette per HEV, con una prevalenza media variabile tra il 12,8% e il 72,5%

(vedi **Tabella 7.1**). Suini positivi per la presenza di HEV sono stati identificati in tutti gli stadi di produzione e in tutti i gruppi d'età testati (vedi **Tabella 7.2**). Nell'ingrasso, la prevalenza per HEV più elevata è stata riscontrata nei magroni (90 - 120 giorni d'età), con 27 positivi su 64 testati (42,2%).

Negli animali grassi (oltre i 120 giorni d'età), invece, la prevalenza era del 27%.

Nel settore riproduzione, la prevalenza nelle scrofette era del 43,1%, nelle scrofe giovani del 38,6%, e nelle scrofe anziane del 53,4%.

I risultati dell'analisi di regressione logistica sono riportati in **Tabella 7.2**. Le dimensioni aziendali costituiscono un importante fattore di rischio: la probabilità di infezione negli animali provenienti da allevamenti di grandi dimensioni (> 1000 scrofe) è di circa 5 volte superiore rispetto ai soggetti allevati in aziende di dimensioni inferiori (OR = 4.98; 95% CI 2,73-9,09; p = 0.000).

Per quanto riguarda l'età, le scrofe anziane hanno un rischio di infezione (OR) di 2,54 volte superiore rispetto ai soggetti grassi e tale valore è prossimo alla significatività statistica (95% CI 0.98-6.55, p = 0.054).

Per quanto riguarda l'analisi filogenetica, è stata condotta su 16 dei 115 campioni risultati positivi. I ceppi suini identificati mostravano una omologia nucleotidica inferiore al 79% quando comparati con i ceppi dei genotipi 1, 2 e 4 (vedi **Figura 7.6**) e variabile tra il 79% e il 96,2% se paragonati ai ceppi del genotipo 3.

Tutti i ceppi identificati in questo studio appartenevano al genotipo 3, come tutti gli altri ceppi suini ed europei indigeni identificati fino ad adesso.

Tra i 16 ceppi, la percentuale di identità nucleotidica variava dal 90,5 al 100, anche se tutti i ceppi presentavano lo stesso profilo aminoacidico, con differenze localizzate solo nella terza base delle triplette, e per questo corrispondenti a mutazioni silenziose.

Per determinare il grado di somiglianza di questi ceppi con quelli appartenenti al genotipo 3 identificati in tutto il mondo, le diverse sequenze sono state tra loro comparate. I ceppi suini italiani mostravano un'identità

nucleotidica variabile tra l'87,6% e il 96,2% con gli altri ceppi considerati nell'analisi. In particolare, un gruppo di 7 ceppi italiani si collocava vicino (identità tra il 91,6% e i 96,2%) ad un ceppo umano identificato in Olanda nel 2005 (DQ200292). Altri nove ceppi suini italiani apparivano correlati (93,1%) sia ad un ceppo suino olandese (AF336292) sia ad un ceppo spagnolo di origine fognaria (AF490994). Gli ultimi due ceppi si classificavano nel sottotipo f del genotipo 3 (Lu et al., 2006).

Tabella 7.1: Prevalenza di HEV nelle feci per tipologia di allevamento

Tipologia aziendale*	Allevamento n°	Pigs positive/tested by production stage (%)										Prevalenza (%)	
		scrofette		scrofe goivani		scrofe anziane		magroni		grassi			
		(0 parti)	(0 parti)	(1-2 parti)	(1-2 parti)	(> 2 parti)	(> 2 parti)	(< 120 giorni)	(< 120 giorni)	(> 120 giorni)	(> 120 giorni)		
F-W	2	7/10	(70.0)	7/10	(70.0)	7/10	(70.0)	8/10	(80.0)	-	-	29/40	(72.5)
F-W	6	4/9	(44.4)	4/10	(40.0)	8/10	(80.0)	7/9	(77.8)	-	-	23/38	(60.5)
totale F-W		11/19	(57.9)	11/20	(55.0)	15/20	(75.0)	15/19	(78.9)	-	-	52/78	(66.7)
F-F	1	3/10	(30.0)	5/10	(50.0)	9/10	(90.0)	1/10	(10.0)	6/10	(60.0)	24/50	(48.0)
F-F	3	4/9	(44.4)	2/10	(20.0)	2/9	(22.2)	2/10	(20.0)	2/10	(20.0)	12/48	(25.0)
F-F	4	2/10	(20.0)	2/10	(20.0)	1/10	(10.0)	1/7	(14.3)	0/10	(0.0)	6/47	(12.8)
F-F	5	5/10	(50.0)	2/7	(28.6)	4/9	(44.4)	8/18	(44.4)	2/7	(28.6)	21/51	(41.2)
totale F-F		14/39	(35.9)	11/37	(29.7)	16/38	(42.1)	12/45	(26.7)	10/37	(27.0)	63/196	(32.1)
Tutti gli allevamenti		25/58	(43.1)	22/57	(38.6)	31/58	(53.4)	27/64	(42.2)	-	-	115/274	(42.0)

* F-W: ciclo aperto (farrow-to-weaning) ; F-F: ciclo chiuso(farrow-to-finish)

Tabella 7.2: Analisi di regressione logistica dell'escrezione di HEV in base a età degli animali, stadio produttivo e dimensioni aziendali

		Presenza di HEV nelle feci			
		Suini positivi/ totale (% positivi)	Odds ratio	95.0% C.I.per OR	P
stadio produttivo	scrofette (0 parti)	25/58 (43.1)	1.58	0.61-4.09	0.345
	Scrofe giovani (1-2 parti)	22/57 (38.6)	1.33	0.51-3.47	0.559
	Scrofe anziane (>2 parti)	31/58 (53.4)	2.54	0.98-6.55	0.054
	magroni (90- 120 giorni)	27/64 (42.2)	1.38	0.54-3.51	0.504
	grassi (> 120 giorni)	10/37 (27.0)	-	-	-
Dimensioni aziendali	> 1000 scrofe	97/179 (54.2)	4.98	2.73-9.09	0.000
	< 1000 scrofe	18/95 (18.9)	-	-	-
	Costante	-	0.15		0.000

Figura 7.1: Prevalenza complessiva per allevamento

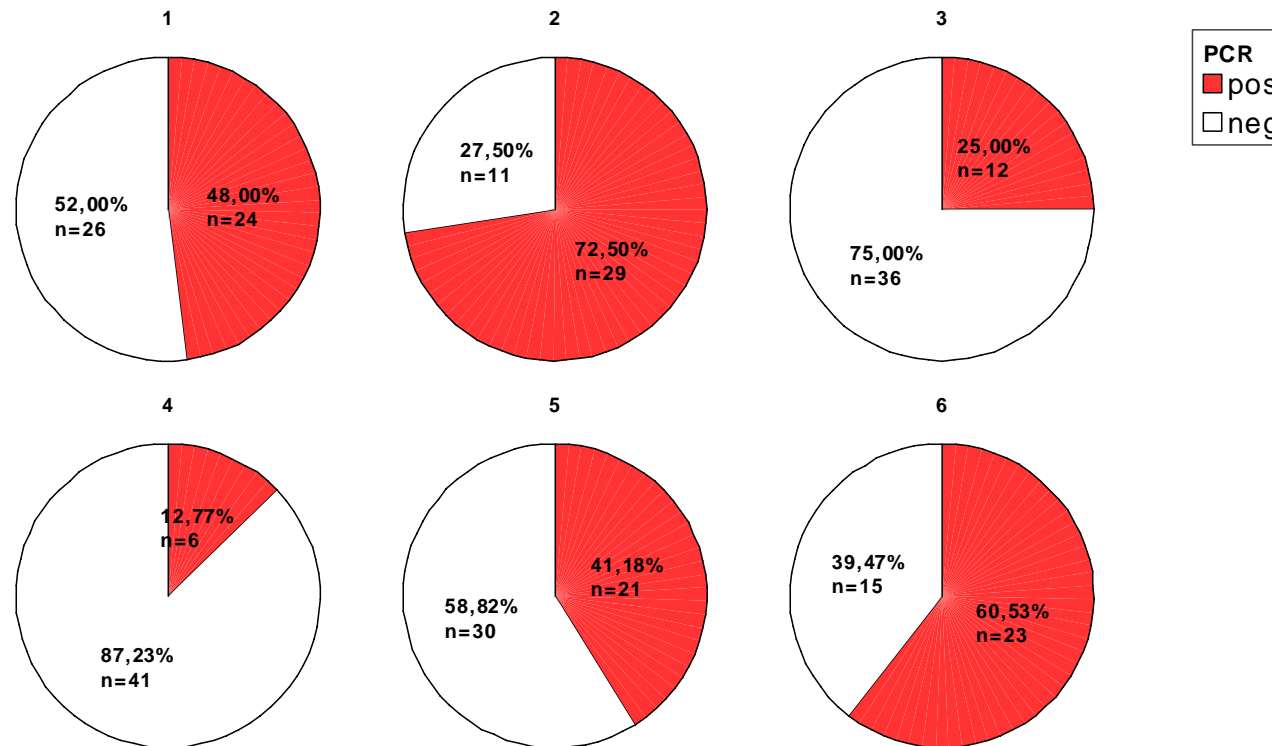


Figura 7.2: Prevalenza complessiva per categoria produttiva

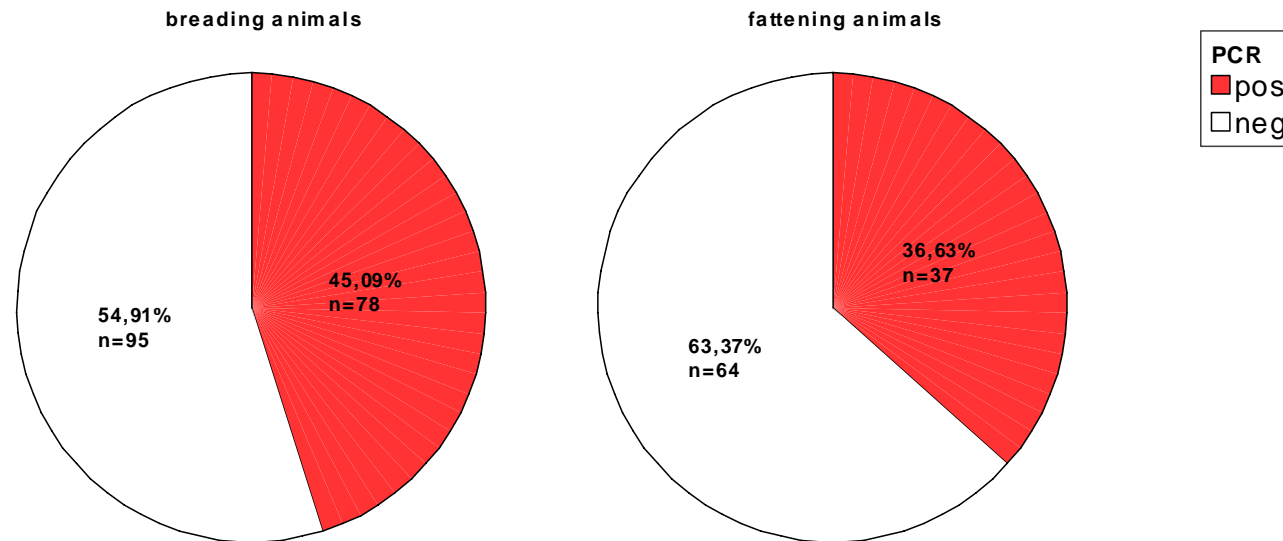


Figura 7.3: Prevalenza dei riproduttori per allevamento

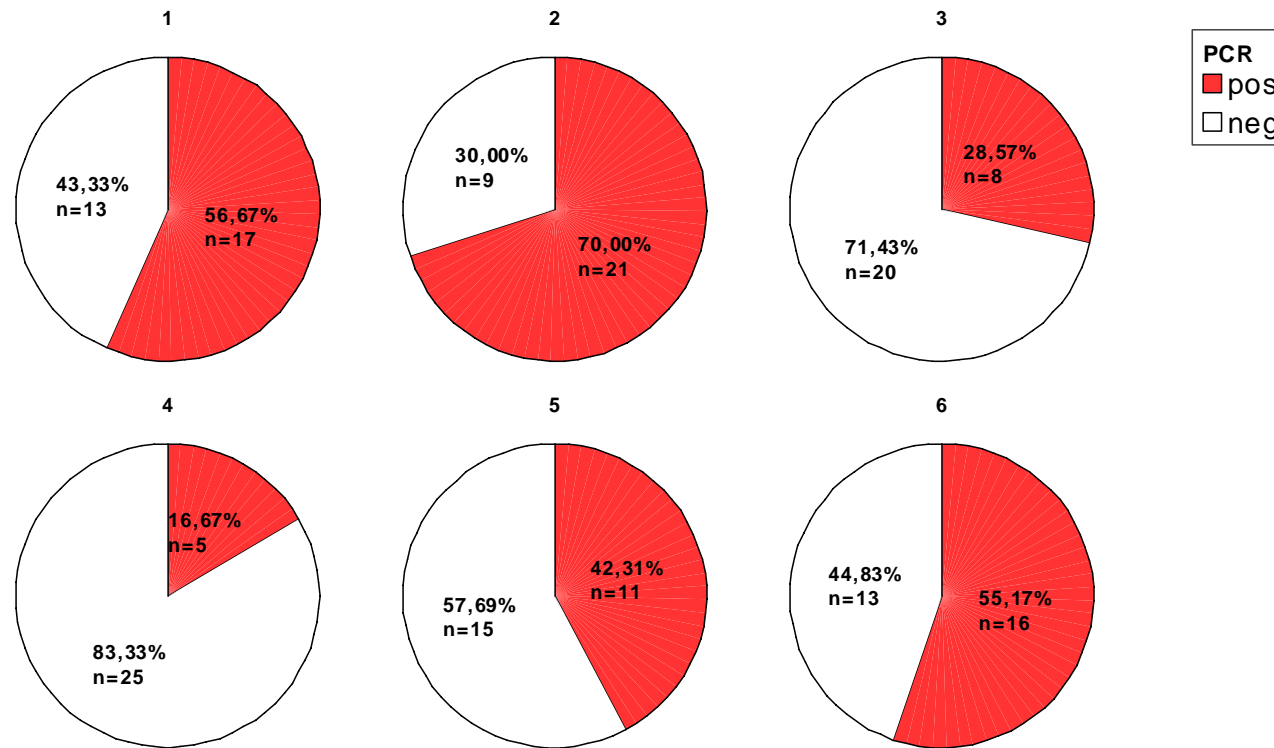


Figura 7.4: Prevalenza dei grassi per allevamento

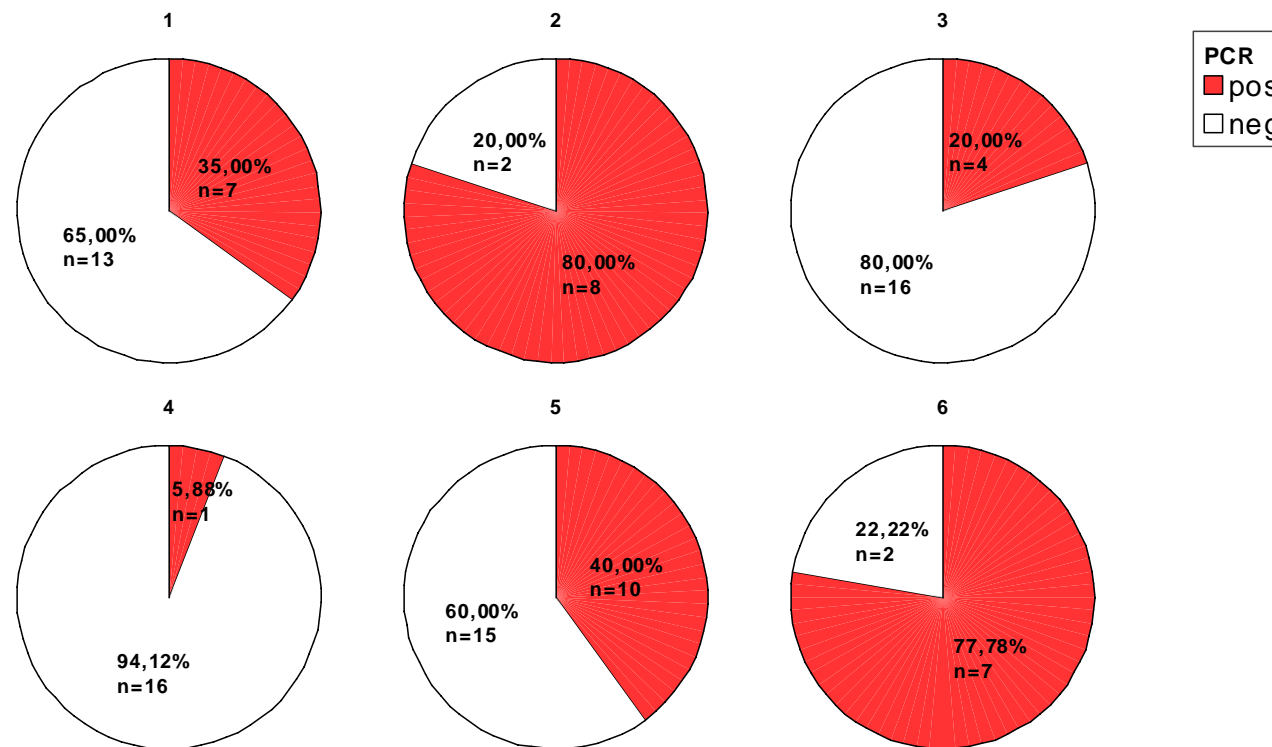


Figura 7.5: Prevalenza complessiva nei riproduttori per numero di parti

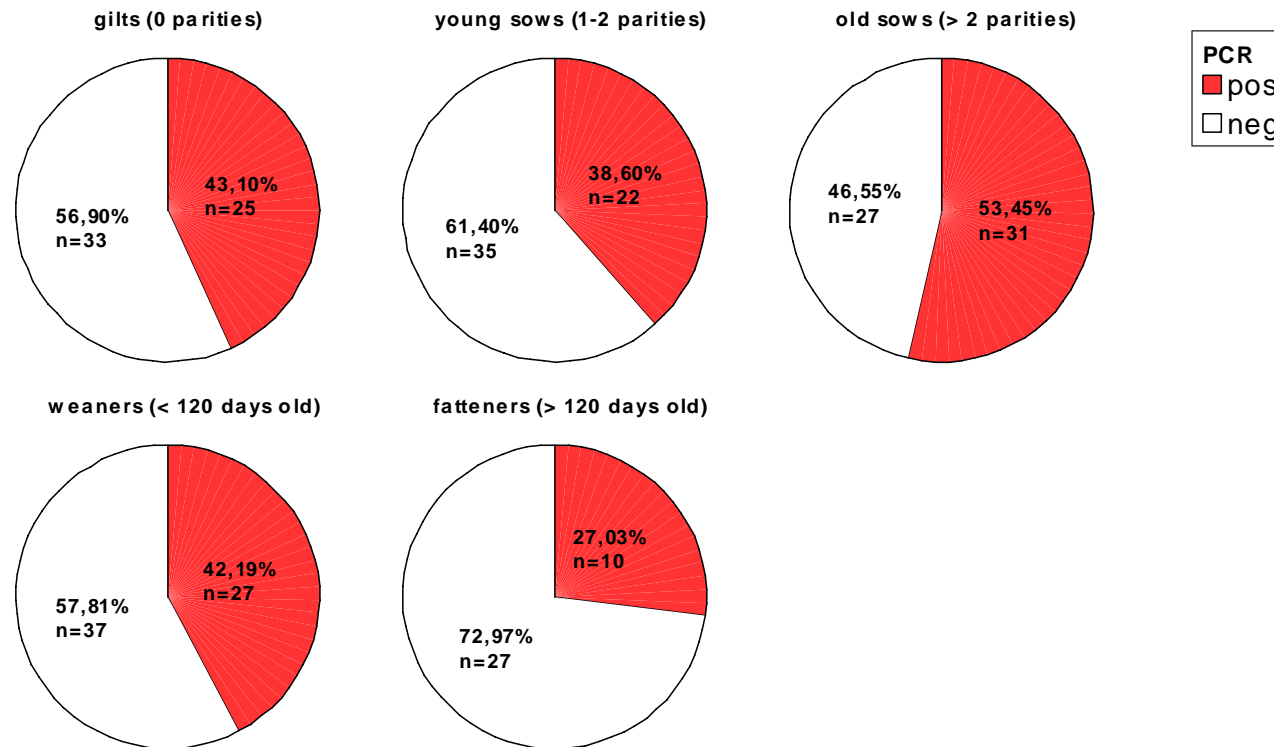
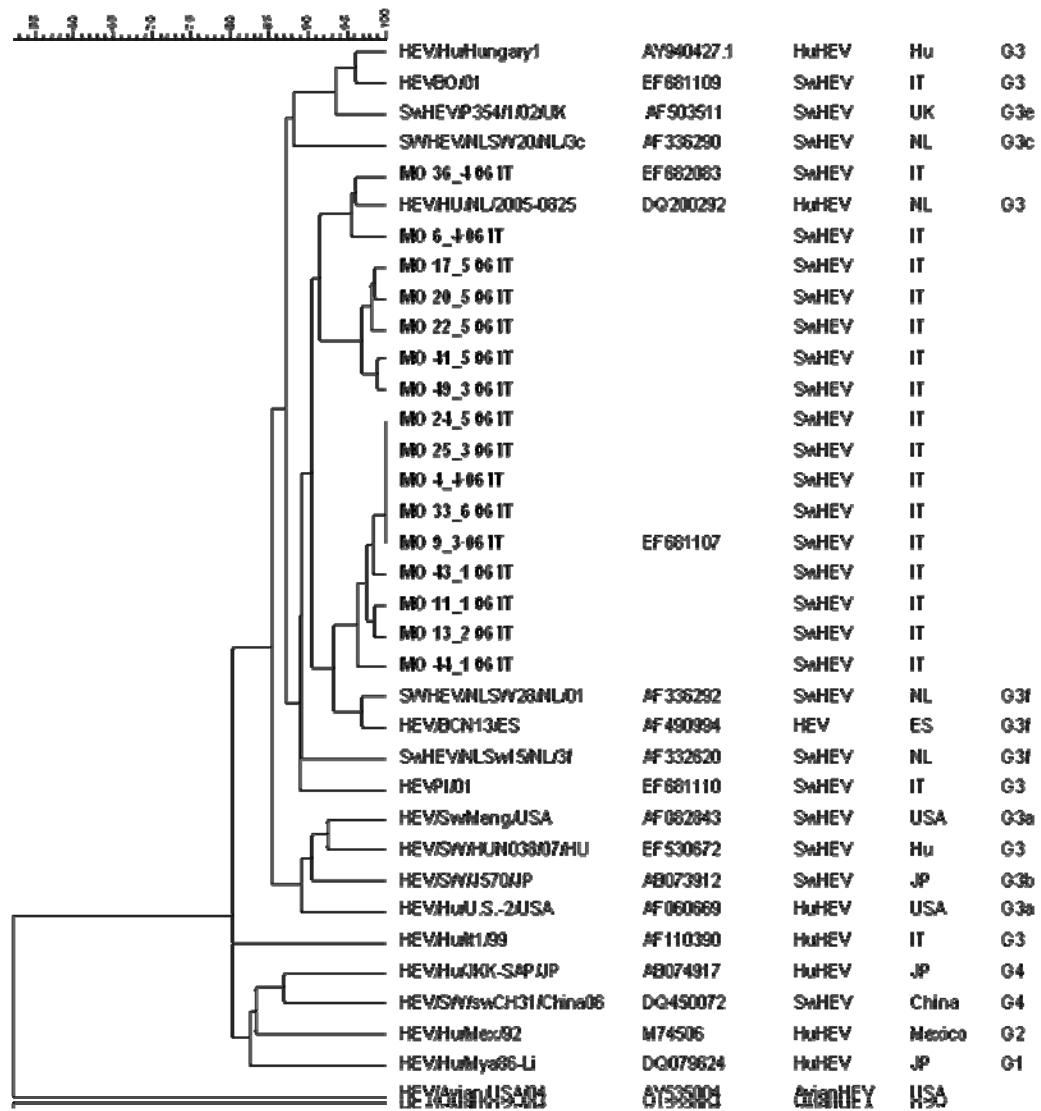


Figura7.6: Albero filogenetico delle sequenze identificate



7.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Questo studio rappresenta la prima indagine estesa sulla prevalenza dell'infezione da HEV negli allevamenti suini italiani. Il primo lavoro sulla presenza dell'infezione è stato pubblicato recentemente (Caprioli et al., 2007), ma il numero di campioni testati era decisamente inferiore (34 pool fecali e 22 sieri). La prevalenza riscontrata in tale indagine è stata del 5,9% (solo 2 pool fecali erano risultati positivi), quindi decisamente inferiore rispetto a quella media riscontrata in questo studio (42%). Probabilmente il primo report pubblicato (Caprioli et al., 2007) aveva sottostimato la prevalenza d'infezione, o per una differenza nel campionamento, o per un miglioramento successivo delle tecniche diagnostiche adottate (Rutjies et al., 2007). La prevalenza del 42% qui riscontrata è infatti in linea con quella di altri lavori condotti in Europa e pubblicati recentemente:

- Fernandez- Barredo et al., 2006: prevalenza del 23,29% (34\146).
- Rutjies et al., 2007: prevalenza del 55% (53\97).
- Seminati et al., 2008: prevalenza nei sieri del 27,3% (18\66) e nelle feci del 17,1% (7\41).

Questi dati suggeriscono che l'infezione da HEV negli allevamenti intensivi europei è più diffusa di quanto inizialmente sospettato, e confermano che il suino possa rappresentare un importante serbatoio dell'infezione (van der Poel et al., 2001; Banks et al., 2004b; Seminati et al., 2008; Fernandez-Barredo et al., 2007).

La prevalenza intra-allevamento variava dal 12,8% al 72,5%, indipendentemente dalla tipologia di allevamento (ciclo aperto \ ciclo chiuso). La prevalenza variava dal 66,7% negli allevamenti a ciclo aperto al 32,1% in quelli a ciclo chiuso, ma lo scarso numero dei primi non permette di arrivare a conclusioni definitive.

Gli allevamenti con un numero di scrofe superiore a mille hanno comunque presentato una prevalenza d'infezione superiore. Questo dato è comune nel caso della maggior parte delle malattie infettive del suino, e

può essere dovuto sia all'elevato numero di animali presenti in allevamento, sia alla maggiore frequenza di introduzione di nuovi soggetti e alle sostituzioni maggior numero di rimonte.

All'interno dell'allevamento, la presenza di HEV è stata riscontrata in animali di tutte le categorie produttive, con un pattern di escrezione simile in tutte le aziende. I primi studi virologici condotti su siero e feci di suini di allevamento avevano dimostrato che l'RNA di HEV poteva essere rinvenuto soprattutto in suini di 2-5 mesi d'età, mentre animali più giovani erano generalmente negativi (Meng et al., 1997; Meng et al., 1998b). Questo dato è in linea con la durata dell'immunità materna, che normalmente si esaurisce ai 2-3 mesi d'età (Nakai et al., 2006; Satou e Nishiura, 2007). Il dato di prevalenza (42,2%) riscontrato in questo studio negli animali di 90 - 120 giorni d'età sembra confermare questo pattern d'infezione. La maggior parte degli studi sperimentali e di campo condotti in passato riportavano che la viremia può avere una durata di 1-2 settimane dopo l'infezione e che il virus è escreto con le feci per 3-4 settimane, dopodiché si verifica siero conversione e l'eliminazione dell'infezione ad opera del sistema immunitario (Meng et al., 1998a; Nakai et al., 2006). Quindi, non ci si aspettava di rinvenire il virus in animali più anziani di 6-8 mesi. In realtà questo studio dimostra che HEV può essere rinvenuto nelle feci di animali di tutte le classi d'età, a partire dai magroni (42,2%) fino ad arrivare alle scrofe anziane (53,4%), che hanno un'età decisamente superiore ai 6-8 mesi. Dati simili sono stati recentemente pubblicati negli Stati Uniti (Feagins et al., 2007), in Spagna (Fernandez-Barredo et al., 2006; Fernandez-Barredo et al., 2007; de Deus et al., 2007b), in Giappone (Nakai et al., 2006), e in Canada (Leblanc et al., 2007). In tutti questi lavori gli Autori hanno rinvenuto HEV sia nei riproduttori che in animali più anziani di 6-8 mesi, indicando che i suini possono essere suscettibili all'infezione a qualsiasi età. Questo dato può essere spiegato dal fatto che l'infezione in realtà sia più prolungata di quanto inizialmente pensato andando incontro ad una cronicizzazione favorita da una breve durata dell'immunità protettiva. Anche se fino ad adesso è stata ipotizzata la

presenza di un solo sierotipo di HEV, non si può escludere l'ipotesi di continue reinfezioni da parte di ceppi differenti circolanti sullo stesso territorio e magari introdotti in allevamento con le rimonte. Questa ipotesi potrebbe giustificare l'elevata prevalenza d'infezione rinvenuta nelle scrofe anziane.

In questo studio, tutti i suini apparivano clinicamente sani, in linea con i dati presenti in bibliografia che sostengono che l'infezione è asintomatica (Clemente-Casares et al., 2003; Banks et al., 2004a; Zheng et al., 2006; Fernandez-Barredo et al., 2006).

L'analisi filogenetica ha evidenziato che tutti i ceppi identificati appartenevano al genotipo 3, e presentavano tra loro una identità del 100% a livello aminoacidico. Questi ceppi italiani presentavano un'omologia nucleotidica maggiore con ceppi suini e umani appartenenti allo stesso genotipo e circolanti in Europa, che con altri ceppi dello stesso genotipo ma provenienti da differenti aree geografiche (van der Poel et al., 2001; Banks et al., 2004a). Negli 80bp presi in considerazione per l'analisi filogenetica, i ceppi identificati presentavano un'identità nucleotidica variabile dal 90,5% al 100%. I ceppi inclusi nell'analisi erano rappresentativi delle diverse aziende e 5 ceppi provenienti da 4 aziende diverse erano tra loro identici. L'analisi dimostra che almeno 12 varianti virali (o ceppi) stavano circolando nelle aziende al momento del campionamento, che più di un ceppo può circolare nello stesso allevamento, e che inoltre lo stesso ceppo può circolare in aziende separate geograficamente, suggerendo per quel ceppo una fonte comune di infezione.

Il ritrovamento del virus in animali prossimi all'età di macellazione desta qualche preoccupazione per la sanità pubblica, in quanto si può verificare una trasmissione zoonotica o per contatto diretto con gli animali infetti, o per ingestione di carni infette crude o poco cotte (Banks et al., 2007; Satou e Nishiura, 2007; Feagins et al., 2007).

CAPITOLO 8: STUDIO LONGITUDINALE DI PREVALENZA DI HEV IN ALLEVAMENTO: DAI RIPRODUTTORI AL MACELLO

Durante l'estate-autunno del 2006 sono stati effettuati campionamenti in una grossa azienda suinicola del Nord Italia (>1000 scrofe), con lo scopo di ottenere un numero di campioni indicativo per classe d'età, sia nei riproduttori sia negli ingrassi. I suini campionati a fine carriera sono stati poi seguiti al macello, dove per alcuni animali di quella partita sono stati raccolti campioni di fegato e bile. Non esistono informazioni infatti sulla presenza del virus in alimenti destinati all'uomo, anche se in altri stati sono stati effettuati campionamenti a tale scopo e il virus è stato rinvenuto in campioni di fegato.

8.1 MATERIALI E METODI

8.1.1 Raccolta dei campioni

Campioni di feci e di sieri sono stati raccolti in parallelo negli animali da ingrasso, mentre negli animali da riproduzione per ciac animale sono state raccolte solo feci.

Dal settore riproduzione sono stati raccolti i seguenti campioni fecali:

- Scrofette (nessun parto): 6 animali
- Primo parto: 6 animali
- Secondo parto: 6 animali
- Terzo parto: 6 animali
- Scrofe pluripare: 3 animali

Dal settore ingrasso sono stati raccolti i seguenti campioni fecali appaiati per ciascun animale a corrispondente campione di siero:

- Animali di 63 giorni (circa 2 mesi): 12 campioni, ogni animale prelevato da un box diverso
- Animali di 91 giorni (circa 3 mesi): 4 campioni
- Animali di 119 giorni (circa 4 mesi): 4 campioni
- Animali di 147 giorni (circa 5 mesi): 4 campioni
- Animali di 175 giorni (circa 6 mesi): 2 campioni
- Animali di 203 giorni (circa 7 mesi): 2 campioni
- Animali di 231 giorni (circa 8 mesi): 2 campioni
- Animali di 260 giorni (circa 9 mesi): 2 campioni

Quattro mesi dopo il primo campionamento in azienda, è stata seguita al macello una partita di animali già campionati (4-5 mesi all'epoca del primo campionamento). Da questa partita sono stati prelevati

- 76 campioni di fegato (successivamente introdotto in filiera e destinato all'alimentazione umana)
- 24 campioni di bile

8.1.2 Preparazione dei campioni

I sieri e i fegati raccolti sono stati subito stoccati a -80°C .

I campioni di bile sono stati diluiti 1:10 in acqua DEPC (Dietilpirocarbonato) sterile e stoccati a -80°C .

I campioni di feci sono stati risospesi in acqua sterile seguendo il seguente protocollo:

- In una eppendorf da 1,5 ml è stato inserito 1 ml di acqua, e a questa è stato aggiunto, per campione, 1 grammo di feci.
- Ciascuna eppendorf è stata vortexata per almeno un minuto al fine di omogeneizzare la soluzione il più possibile.
- È stata effettuata una centrifuga a 3000 rpm (rotazioni per minuto), e temperatura di $+4^{\circ}\text{C}$, per 30 minuti.

- Il surnatante è stato prelevato, trasferito in una eppendorf sterile estoccatato a -80°C.

8.1.3 Estrazione dell'RNA e RT NESTED PCR

L'RNA dei campioni di feci, siero e bile è stato estratto utilizzando il QIAamp virla RNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germania), seguendo le istruzioni del produttore e come precedentemente descritto.

Per i campioni di fegato è stato invece utilizzato il kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germania), secondo il seguente protocollo:

- Preparazione di una soluzione buffer di lisi addizionato a beta-mercaptoetanololo per campione
- Pesata di 30mg di tessuto tagliato con bisturi sterile
- Lisi del tessuto all'interno della soluzione tramite utilizzo di un micro pestello sterile
- Eliminazione di residui tramite centrifuga seguita da prelievo del surnatante
- Precipitazione dell'RNA mediante utilizzo di etanololo al 50%
- Centrifughe ripetute in spin columns per selezione RNA
- Lavaggio del filtro mediante centrifughe ripetute con buffer di lavaggio
- Eluizione in acqua sterile dell'RNA

I primers utilizzati sono stati (Erker et al., 1999a) per la RT-PCR:

A1: 5'- CTT GTT CRT GYT GGT TRT CAT AAT C- 3'

S1: 5'- GAC AGA ATT RAT TTC GTC GGC TGG- 3'

Per la NESTED-PCR:

A2: 5' - GTT CRT GYT GGT TRT CAT AAT CCT G- 3'
S2: 5' - GTY GTC TCR GCC AAT GGC GAG C- 3'

La reazione di RT-PCR è stata effettuata utilizzando un kit commerciale (SUPERSSCRIPT III ONE STEP RT-PCR SYSTEM WITH PLATINUM TAQ, INVITROGEN Carlsbad, CA, USA) in grado di retrotrascrivere l'RNA e amplificare il template in un'unica reazione. La mix di reazione per questo primo passaggio è stata la seguente:

- buffer 5x 7,5µl
- primer A1(o 3156) 10mM 0,3µl
- primer A2 (o 3157) 10mM 0,3µl
- Taq superscript III 0,3µl

Agli 8,4 µl della mix sono stati aggiunti 6,6 µl dell'RNA del campione e la soluzione è stata incubata secondo il seguente profilo termico:

- 45°C per 30 minuti (retrotrascrizione)
- 94°C per 2 minuti (denaturazione iniziale)
- 40 cicli a 94°C per 1 minuto (denaturazione)
 - o 49°C per 90 secondi (annealing)
 - o 72°C per un minuto (elongation)
- 72°C per 5 minuti (elongation finale)

La reazione di NESTED-PCR è stata effettuata utilizzando la *Taq* DNA Polymerase, recombinant (FERMENTAS Burlington, Ontario, Canada) per amplificare un frammento interno al template già ottenuto nella prima amplificazione. La mix di reazione per la Nested-PCR è stata per ogni campione la seguente:

- buffer 10x 2,5 µl
- dNTP 10 uM 2 µl
- MgCl₂ 25mM 1,5 µl
- Primer A2 (3158) 10mM 0,8 µl

- Primer S2 (3159) 10mM 0,8 μ l
- Acqua DEPC 15,2 μ l
- Taq 5u/ul 0,2 μ l

Ai 23 μ l della mix sono stati aggiunti 2 μ l del templatato precedentemente ottenuto e la soluzione è stata incubata secondo il seguente profilo termico:

- 95°C per 3 minuti (denaturazione iniziale)
- 39 cicli a 94°C per 45 secondi (denaturazione)
 - 49°C per un minuto (annealing)
 - 72°C per 2 minuti (elongation)
- 72°C per 7 minuti (elongation finale)

Il prodotto ottenuto è stato conservato a -20°C fino al momento dell'elettroforesi.

8.2 RISULTATI

La prevalenza complessiva di infezione nelle feci era del 38,6%; i riproduttori mostravano una prevalenza complessiva del 57,7%, mentre la categoria dell'ingrasso era positiva per il 22,6% degli animali (vedi **Tabella 8.1**).

Tabella 8.1: Prevalenza di infezione nelle feci per categoria produttiva

		HEV (feci)		Total
		neg	pos	
categoria	ingrasso	24	7	31
	riproduttori/ingrasso	77,4%	22,6%	100,0%
	riproduttori	11	15	26
		42,3%	57,7%	100,0%
Total		35	22	57
		61,4%	38,6%	100,0%

Per quanto riguarda la prevalenza per classe d'età, quella maggiormente positiva era quella delle scrofette (83,3%), ma anche le scrofe pluripare presentavano una prevalenza elevata (66,7%). Per quanto riguarda gli ingrassi, è stato possibile riscontrare la presenza di infezione negli animali fino a 91 giorni; i suini di età superiore si sono rivelati tutti negativi (vedi **Tabella 8.2**).

Tabella 8.2: Prevalenza di infezione nelle feci per classe d'età

		HEV (feci)		Total
		neg	pos	
età	scrofette	1	5	6
		16,7%	83,3%	100,0%
	scrofe 1 parto	2	4	6
		33,3%	66,7%	100,0%
	scrofe 2 parto	2	3	5
		40,0%	60,0%	100,0%
	scrofe 3 parto	5	1	6
		83,3%	16,7%	100,0%
	scrofe > 3 parto	1	2	3
		33,3%	66,7%	100,0%
	63 giorni	7	5	12
		58,3%	41,7%	100,0%
	91 giorni	2	2	4
		50,0%	50,0%	100,0%
	119 giorni	4	0	4
		100,0%	,0%	100,0%
	147 giorni	3	0	3
		100,0%	,0%	100,0%
	175 giorni	2	0	2
		100,0%	,0%	100,0%
	203 giorni	2	0	2
		100,0%	,0%	100,0%
	231 giorni	2	0	2
		100,0%	,0%	100,0%
	260 giorni	2	0	2
		100,0%	,0%	100,0%
Total		35	22	57
		61,4%	38,6%	100,0%

Per quanto riguarda la prevalenza nei sieri (prelevati solo negli animali da ingrasso), la positività si è assestata tra il 30% (magroni) e il 33,3% (grassi) (vedi **Tabella 8.3**).

Tabella 8.3: Prevalenza di infezione nei sieri in magroni e grassi

	HEV (siero)		Total
	neg	pos	
riproduttori / magroni / grassi	14 70,0%	6 30,0%	20 100,0%
grassi	8 66,7%	4 33,3%	12 100,0%
Total	22 68,8%	10 31,3%	32 100,0%

Alcuni animali nella fase di ingrasso erano positivi nei sieri ma negativi nelle feci.

Per quanto riguarda la prevalenza di infezione nei campioni prelevati al macello, il 20,8% delle bili e l'11,9% dei fegati è risultato positivo. Si è provato inoltre a correlare questi dati di prevalenza con il numero di sieri positivi nella fase di ingrasso, ma la correlazione non è risultata statisticamente significativa ($P < 0,005$) (vedi **Tabella 8.4**).

Tabella 8.4: Prevalenza nei fegati, nelle bili e nei sieri in fase di ingrasso

		HEV		Total
		neg	pos	
tipo	bile	19	5	24
		79,2%	20,8%	100,0%
	fegato	67	9	76
		88,2%	11,8%	100,0%
	siero	8	4	12
		66,7%	33,3%	100,0%
Total		94	18	112
		83,9%	16,1%	100,0%

8.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI

La prevalenza complessiva riscontrata è stata del 38,6%. Questo dato è in linea con quello ottenuto nello studio di prevalenza in 6 diversi allevamenti italiani presentato in questa tesi (42% prevalenza media), ma anche con quelli riportati in altri lavori sulla prevalenza di HEV in suini europei, come quello di Rutijes et al., 2007 (prevalenza 55%).

L'elevata prevalenza riscontrata nelle scrofette (83,3%) è probabilmente dovuta al fatto che sono stati campionati solo 6 animali, anche se in precedenti studi il virus è stato rinvenuto in questa categoria produttiva:

- Nell'altra indagine condotta in questa tesi su allevamenti italiani le scrofette erano risultate positive nel 43,1% dei casi (25 positive su 58 campionate).
- Nell'indagine condotta nel Regno Unito e illustrata in questa tesi il 6% delle scrofe (non distinte per classe d'età) è risultato positivo.

- In un indagine condotta in Spagna (Fernandez-Barredo et al., 2006) il 21,9% delle scrofette era risultato positivo.

Nelle scrofe al primo, secondo e terzo parto la prevalenza d'infezione progressivamente diminuiva (rispettivamente 66,7%, 60% e 16,7%), per poi aumentare di nuovo bruscamente nelle scrofe con più di 3 parti (66,7%). I dati disponibili in letteratura sull'andamento dell'infezione nei riproduttori purtroppo non sono molti, ma in base a questi dati si possono avanzare delle ipotesi. Le scrofette sono la classe d'età maggiormente positiva, e questo potrebbe essere dovuto al fatto che vengono spostate e messe a contatto con le scrofe anziane, quindi animali precedentemente negativi potrebbero infettarsi e iniziare ad eliminare grandi quantità di virus, essendo scoperti dal punto di vista immunitario. Progressivamente poi l'infezione diminuisce, probabilmente per lo sviluppo di un'immunità protettiva, che diminuisce il tasso di eliminazione virale. Nelle scrofe anziane si potrebbe poi avere un nuovo picco per un progressivo esaurimento dell'immunità passiva (non ci sono dati in grado di confermare che sia protettiva per tutta la durata della vita), contemporanea al contatto con nuovi ceppi virali.

Per quanto riguarda la prevalenza nei granchi nelle feci, negli animali di 2-3 mesi varia dal 41,7% al 50%, mentre ad età successive tutti gli animali sono negativi. Nei sieri di 5 animali negativi nelle feci è stato comunque possibile rinvenire il virus. La completa negatività nelle feci al di sopra dei 91 giorni d'età è sicuramente da ricondurre allo scarso numero di campioni testati (4 o 2 per classe d'età).

CAPITOLO 9: EPIDEMIOLOGIA E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) IDENTIFICATI IN SUINI ITALIANI CON DIFFERENTI QUADRI PATOLOGICI

L'obiettivo di questa sezione sperimentale è stato la stima della prevalenza dell'infezione da HEV in suini inviati a scopo diagnostico presso le sezioni di Brescia e Reggio-Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER).

Sui ceppi di virus dell'epatite E messi in evidenza in tali soggetti, sono state svolte analisi filogenetiche con lo scopo di studiare l'epidemiologia molecolare del virus in Italia.

Per ciascun campione sono state inoltre raccolte informazioni relative al referto autoptico al fine di evidenziare eventuali correlazioni tra l'infezione da HEV e la presenza di altre patologie concomitanti, o di evidenziare fattori di rischio correlati all'infezione nel suino, dato che in letteratura non sono stati ancora completamente chiariti.

9.1 MATERIALI E METODI

9.1.1 Animali

Sono stati esaminati 137 suini di età compresa tra 2 e 4 mesi, selezionati in modo casuale tra quelli inviati a scopo diagnostico presso le sezioni di Brescia e Reggio-Emilia dell'IZSLER. Gli animali esaminati provenivano da 45 allevamenti del Nord Italia, di diversa tipologia (allevamenti a ciclo chiuso, allevamenti a ciclo aperto, centri di selezione genetica). Tutti i suini stati sottoposti a necropsia presso le sezioni dell'IZSLER. Al fine di emettere la diagnosi, in tali sedi sono stati eseguiti campionamenti su tessuti ed organi con lo scopo di identificare eventuali virus, batteri o

parassiti responsabili della patologia in corso. Per ogni suino campionato è stato quindi possibile risalire ad una dettagliata diagnosi necroscopica, batteriologica, virologica, parassitologica e sierologica, successivamente utilizzata per evidenziare eventuali correlazioni tra la presenza di HEV ed altre patologie intercorrenti.

Per ogni suino, sono state raccolte informazioni relative a: età (lattoni o magroni), tipologia dell'allevamento di provenienza (ciclo aperto, chiuso, ingrasso, centro genetico) e presenza di patologie concomitanti evidenziate, macroscopicamente, in sede autoptica. I microrganismi ricercati mediante le indagini di laboratorio variavano in funzione del sospetto diagnostico e/o in funzione del quadro anatomopatologico riscontrato.

Le patologie riscontrate sono state classificate in base alla localizzazione preminente delle lesioni in: patologie gastroenteriche, epatiche, polmonari o multiple (quando veniva evidenziato il coinvolgimento di più di un organo/apparato).

9.1.2 Prelievo e trattamento dei campioni

La ricerca di HEV è stata effettuata dalla bile dei soggetti esaminati. Questo tipo di campionamento è stato scelto in base alla considerazione che tra i diversi campioni prelevabili in sede autoptica quello più frequentemente positivo in soggetti infetti è proprio la bile (de Deus et al., 2007b).

Durante la necroscopia la parete della cistifellea è stata incisa con un bisturi sterile e, attraverso l'apertura praticata, è stata introdotta una siringa sterile senza ago. In questo modo la bile è stata aspirata e successivamente trasferita in contenitori sterili. I campioni, durante la loro permanenza (durata al massimo 15 giorni) presso gli le sezioni dell'IZSLER sono stati conservati ad una temperatura di -20°C. In seguito sono stati trasportati in condizioni di congelamento presso i laboratori del Dipartimento di Sanità

Pubblica Veterinaria e Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna.

Subito dopo il loro arrivo, sono state preparate delle soluzioni a diluizione 1:10, composte da 100 µl di bile diluite in 900 µl di acqua DEPC sterile (diethylpirocarbonato). Sia le bili sia le soluzioni diluite sono state conservate a -80°C fino al momento in cui sono state esaminate.

9.1.3 Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA è stata eseguita utilizzando un kit commerciale: Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Hiden, Germany), basato sull'uso di colonnine contenenti una membrana di silice che lega selettivamente l'RNA totale presente in fluidi biologici. Il protocollo di estrazione prevedeva una prima fase di lisi virale tramite l'utilizzo di uno specifico buffer di lisi (Buffer AVL, addizionato di un carrier RNA). Tale reagente veniva messo a contatto con 140 µl del campione in esame e veniva fatto reagire per 10 minuti, durante i quali la soluzione veniva periodicamente vortexata. Dopo questa prima fase, il campione lisato veniva addizionato a 560 µl di etanolo assoluto e quindi vortexato e centrifugato. A questo punto la soluzione veniva trasferita in una colonnina provvista di un filtro di silice, alla base del legame selettivo dell'RNA e corredata ad un tubo collettore per la raccolta dei liquidi dopo le centrifugazioni. Dopo una centrifugazione a 8000 rpm per un minuto, l'RNA totale presente nel campione veniva trattenuto nel filtro e la rimanente parte della soluzione veniva raccolta in un tubo collettore sottostante alla colonnina e successivamente eliminata. In seguito sono stati utilizzati due buffer di lavaggio (nel volume di 500 µl ciascuno) al fine di eliminare eventuali impurità presenti nel filtro con centrifugazioni rispettivamente di 8000 rpm per un minuto e di 14000 rpm per 3 minuti. L'ultimo passaggio prevedeva l'eluizione dell'RNA presente nel filtro di silice tramite l'utilizzo di un apposito buffer (buffer AVE nel volume di 50 µl) che veniva lasciato a

contatto con il filtro per 15 minuti a 4°C. Successivamente, veniva effettuata una centrifugazione a 8000 rpm per un minuto e l'eluato veniva raccolto in una provetta sterile da 1,5 ml sottostante alla colonnina. Quest'ultimo passaggio veniva ripetuto una seconda volta al fine di assicurare il completo recupero dell'RNA presente nel filtro. L'eluato veniva immediatamente utilizzato per l'amplificazione e poi conservato a -80°C.

9.1.4 PCR e NESTED PCR

Ai fini dell'identificazione dell'infezione da virus dell'epatite E sono stati applicati due protocolli di RT- NESTED- PCR che utilizzavano 4 coppie di primers disegnati da Erker et al., 1999a (protocollo 1) e da Huang et al., 2002 (protocollo 2). Per ogni campione sono state effettuate 2 reazioni: la prima prevedeva la retrotrascrizione dell'RNA e una prima amplificazione del cDNA ottenuto; la seconda consisteva in una seconda amplificazione interna al frammento di prima PCR ottenuto.

I primers utilizzati nel protocollo 1 sono stati: per la RT-PCR:

A1: 5'- CTT GTT CRT GYT GGT TRT CAT AAT C- 3'

S1: 5'- GAC AGA ATT RAT TTC GTC GGC TGG- 3'

Per la NESTED-PCR:

A2: 5'- GTT CRT GYT GGT TRT CAT AAT CCT G- 3'

S2: 5'- GTY GTC TCR GCC AAT GGC GAG C- 3'

I primers utilizzati nel protocollo 2 sono stati: per la RT-PCR:

3156: 5'- AAT TAT GCC(T) CAG TAC(T) CGG(A) GTT G- 3'

3157: 5'- CCC TTA(G) TCC(T) TGC TGA(C) GCA TTC TC- 3'

Per la NESTED-PCR:

3158: 5' - GTT(A) ATG CTT(C) TGC ATA(T) CAT GGC T - 3'

3159: 5' - AGC CGA CGA AAT CAA TTC TGT C -3'

La reazione di RT-PCR è stata effettuata utilizzando un kit commerciale (SUPERScript III ONE STEP RT-PCR SYSTEM WITH PLATINUM TAQ, INVITROGEN Carlsbad, CA, USA) in grado di retrotrascrivere l'RNA e amplificare il template in un'unica reazione. La mix di reazione per questo primo passaggio è stata la seguente:

- buffer 5x 7,5µl
- primer A1(o 3156) 10mM 0,3µl
- primer A2 (o 3157) 10mM 0,3µl
- Taq superscript III 0,3µl

Agli 8,4 µl della mix sono stati aggiunti 6,6 µl dell'RNA del campione e la soluzione è stata incubata secondo il seguente profilo termico:

- 45°C per 30 minuti (retrotrascrizione)
- 94°C per 2 minuti (denaturazione iniziale)
- 40 cicli a 94°C per 1 minuto (denaturazione)
 - o 49°C per 90 secondi (annealing)
 - o 72°C per un minuto (elongation)
- 72°C per 5 minuti (elongation finale)

La reazione di NESTED-PCR è stata effettuata utilizzando la *Taq* DNA Polymerase, recombinant (FERMENTAS Burlington, Ontario, Canada) per amplificare un frammento interno al template già ottenuto nella prima amplificazione. La mix di reazione per la Nested-PCR è stata per ogni campione la seguente:

- buffer 10x 2,5 µl
- dNTP 10 uM 2 µl

- MgCl₂ 25mM 1,5 µl
- Primer A2 (3158) 10mM 0,8 µl
- Primer S2 (3159) 10mM 0,8 µl
- Acqua DEPC 15,2 µl
- Taq 5u/ul 0,2 µl

Ai 23 µl della mix sono stati aggiunti 2 µl del templatato precedentemente ottenuto e la soluzione è stata incubata secondo il seguente profilo termico:

- 95°C per 3 minuti (denaturazione iniziale)
- 39 cicli a 94°C per 45 secondi (denaturazione)
 - 49°C per un minuto (annealing)
 - 72°C per 2 minuti (elongation)
- 72°C per 7 minuti (elongation finale)

Il prodotto ottenuto è stato conservato a -20°C fino al momento dell'elettroforesi.

9.1.5 Elettroforesi

Per visualizzare le bande ottenute in Nested-PCR, per ogni reazione di amplificazione è stato preparato un gel di agarosio al 2% contenente etidio bromuro (EtBr). Ogni gel conteneva un numero di pozzetti proporzionale al numero di campioni da testare. In ogni pozzetto sono stati caricati 5 µl di prodotto Nested-PCR miscelati a 1 µl di blu bromofenolo.

Per calcolare l'altezza delle bande, in ogni gel è stato inserito un marcatore di peso molecolare GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus.

Ogni corsa elettroforetica è stata effettuata a 100V, 500mA per 30 minuti.

9.1.6 Purificazione

Per effettuare il sequenziamento di alcuni (5 con il primo set di primers, 15 con il secondo) campioni risultati positivi all'elettroforesi, è stato utilizzato un kit di purificazione da gel di agarosio (High Pure Product Purification Kit, ROCHE). Per ogni campione è stato applicato il protocollo con i seguenti passaggi:

- 1) Corsa su gel di agarosio all'1% di una notevole quantità di prodotto Nested-PCR addizionato, in rapporto 1:8, al blu bromofenolo, per 30 minuti a 90V e 500mA.
- 2) Una volta visualizzate le bande sul gel tramite l'utilizzo di un transilluminatore, queste sono state tagliate con un bisturi sterile e la porzione di gel contenente il DNA amplificato è stata riposta in una provetta eppendorf da 1,5ml.
- 3) Ad ogni 100 mg di gel sono stati aggiunti 300 µl di Binding buffer e il gel è stato sciolto mediante un'incubazione a 56°C per 10 minuti.
- 4) La soluzione così ottenuta è stata trasferita in una colonnina contenente un filtro selettivo ed è stata effettuata una centrifugazione a 14000 rpm per 30-60 secondi.
- 5) Sono stati successivamente aggiunti 500 µl di Washing buffer ed è stata effettuata una seconda centrifugazione a 14000 rpm per 1 minuto.
- 6) Sono stati nuovamente aggiunti 200 µl di Washing buffer ed è stata fatta un'ulteriore centrifugazione a 14000 rpm per 1 minuto.
- 7) L'eluizione del DNA è stata effettuata pulendo il filtro con 50 µl di Elution buffer e centrifugando a 14000 rpm per 1 minuto.
- 8) Ciascun campione è stato disidratato mediante l'utilizzo del DNA Speed Vac (SAVANT) e risospeso in 21 µl di acqua DEPC.

Ogni campione purificato è stato quantificato facendo correre 1 µl della soluzione finale, addizionato a 4 µl di acqua ed a 1 µl di blu bromofenolo, in un gel di agarosio all'1%.

La banda ottenuta è stata quantificata mediante l'utilizzo di un software (FLUOR-S, QUANTITY ONE OLD).

9.1.7 Sequenziamento ed analisi filogenetica

Per la caratterizzazione dei ceppi identificati e purificati, alcuni tra questi (5 ottenuti con il primo set di primers, 15 con il secondo), scelti in maniera casuale, sono stati sequenziati utilizzando ABI PRISM BigDye Terminator Kit 2.0 (APPLIED BIOSYSTEMS). I frammenti sequenziati sono stati allineati con quelli presenti nella banca dati NCBI ed analizzati utilizzando il DNASIS Max software (HITACHISOFT). L'analisi filogenetica è stata effettuata con il software Bionumerics ed il dendrogramma è stato ottenuto con il metodo UPGMA, utilizzando un ceppo di Avian HEV come outgroup.

9.1.8 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati considerando la prevalenza per HEV in funzione dei seguenti fattori di rischio:

- età dei soggetti (lattoni: < 80 giorni di vita; magroni: > 80 giorni di vita);
- tipologia dell'allevamento (ciclo aperto, ciclo chiuso, ingrasso, centro di selezione genetica);
- segnalazione, all'esame anatomopatologico, di patologie a carico del fegato, dell'intestino, del polmone;
- diagnosi di infezione da PRRSV;
- diagnosi di infezione da PCV2.

L'analisi è stata condotta inizialmente con una procedura bivariata, prendendo in considerazione i singoli fattori di rischio relativi all'infezione da HEV. Per verificare l'esistenza di una correlazione fra i fattori di rischio

considerati e la prevalenza della malattia, è stato impiegato il test del chi-quadrato.

Successivamente, è stata condotta una analisi multivariata utilizzando una tecnica di regressione logistica.

Il modello è stato costruito utilizzando una procedura di tipo backward stepwise introducendo inizialmente tutte le variabili in blocco e successivamente operando una selezione “a ritroso” delle variabili utilizzando un test parziale.

Preliminarmente alla regressione logistica è stata esaminata la matrice di correlazione per verificare potenziali collinearità tra le variabili indipendenti (Dohoo et al., 1996).

Tale procedura ha permesso inizialmente di verificare l’eventuale associazione tra fattore di rischio e presenza di HEV e successivamente ha valutato l’effetto derivante dalla simultanea presenza di più fattori di rischio. In questo modo è stato ridotto l’effetto di possibili fattori di confondimento.

La regressione logistica fornisce come risultato, per ogni fattore di rischio considerato, un valore di *odds ratio* (OR), con relativo intervallo di confidenza (IC), per il quale è stato prescelto un livello di probabilità del 95%. L’*odds ratio* esprime di quante volte la presenza del fattore esaminato aumenti le probabilità di infezione.

Un valore di OR superiore a 1, il cui limite inferiore di IC al 95% sia superiore a 1 va considerato come indice di una associazione statisticamente significativa ($p \leq 0,05$) fra il fattore stesso e la presenza di HEV.

Di converso, un valore di OR inferiore a 1, il cui limite superiore di IC al 95% sia anch’esso inferiore a 1, suggerisce una associazione di segno inverso: al crescere dell’esposizione diminuisce significativamente il rischio di positività.

9.2 RISULTATI

Quarantuno dei 137 campioni analizzati (29,9%) sono risultati positivi per HEV con almeno uno dei due set di primers utilizzati.

Non sono state rilevate associazioni statisticamente significative tra la diagnosi di infezione da HEV e la presenza di patologie concomitanti, o le diverse tipologie di allevamento esaminate. I risultati dell'analisi multivariata indicano che i soggetti in magronaggio (età 80-120 giorni) presentavano tuttavia una probabilità di essere infetti significativamente più elevata rispetto ai soggetti più giovani (Odd Ratio=3,78; p:0,009). Nei magroni, infatti, la prevalenza riscontrata era nettamente più elevata (46,9%) rispetto ai soggetti in svezzamento (20%).

Per quanto riguarda l'analisi filogenetica, i ceppi identificati, confrontati con ceppi suini ed umani provenienti da USA, Giappone ed Europa, sono risultati tutti appartenere al genotipo 3 e hanno dimostrato di avere, tra loro, un'omologia nucleotidica variabile dall'81,8% al 99,6%. Il profilo aminoacidico dalle diverse sequenze nucleotidiche ottenute, appariva sostanzialmente invariato. Le differenze nucleotidiche evidenziate nei diversi ceppi non esiterebbero quindi in sostanziali modificazione della proteina codificata da quel segmento di genoma (proteina del capsido), ma sarebbero per lo più mutazioni silenziose.

In Tabella 9.1 sono riassunti i risultati dell'analisi di regressione logistica dei relativi ai diversi fattori di rischio analizzati.

In Tabella 9.2 vengono riportati le informazioni disponibili relative ai campioni di origine dei ceppi sequenziati con il primo set di primers (Erker et al., 1999a).

In Tabella 9.3 vengono riportati le informazioni disponibili relative ai ceppi sequenziali con il secondo set di primers (Huang et al. 2002).

In Figura 9.1 viene riportato il dendrogramma costituito dai ceppi identificati con il primo set di primers.

La Figura 9.2 riporta il confronto del profilo amminoacidico derivato da diversi ceppi.

In Figura 9.3 viene riportato il dendrogramma costituito dai ceppi identificati con il secondo set di primers.

Tabella 9.1: Risultati dell'analisi di regressione logistica

		Positivi/ esaminati	Prevalenza (%)	OR	IC 95%	P
Età (giorni)	<80	17/85	20,0	-	-	-
	80-120	23/49	46,9	3,78	1,39-10,26	0,009
Patologia epatica	Presente	6/24	25,0	0,60	0,18-2,04	0,413
	Assente	35/113	31,0	-	-	-
Patologia intestinale	Presente	20/58	34,5	1,43	0,55-3,72	0,457
	Assente	21/79	26,6	-	-	-
Patologia polmonare	Presente	28/81	34,6	2,03	0,74-5,53	0,167
	Assente	13/56	23,2	-	-	-
Altre patologie	Presente	19/68	27,9	0,74	0,30-1,81	0,505
	Assente	22/69	31,9	-	-	-
PCV2	positive	14/36	38,9	1,02	0,36-2,92	0,966
	negative	27/101	26,7	-	-	-
PRRSV	positive	17/54	31,5	0,53	0,20-1,41	0,203
	negative	24/83	28,9	-	-	-
Tipologia dell'allevamento	ciclo aperto	4/17	23,5	-	-	-
	ciclo chiuso	22/72	30,6	1,77	0,30-10,40	0,525
	ingrasso	5/8	62,5	1,19	0,34-4,11	0,787
	centro genetico	8/23	34,8	1,76	0,24-12,99	0,581
	Costante	-		0.05	-	0,003

N° accettazione	PCR (Huang)	PCR (Erker)	età	Principali reperti anatomo patologici	Esame microbiologico	Esame virologico	tipologia allevamento
303155 RE NUM 8	POSITIVO	POSITIVO	147 GG				CENTRO GENETICO
47776/3 BS NUM 18	negativo	POSITIVO	sottoscrofa	Stipsi del colon con ostruzione. Enterite catarrale del tenue con distensione delle anse. Edema del mesocolon.	Presenza di E.coli setticemico e Clostridium perfringens intestinale. Negativo per Salmonella.	M.E. (pool1-4) negativa con siero convalescente anti-rotavirus e anti-coronavirus della PED; non rilevati altri tipi di particelle virali. PCR (pool 1-4) negativa per PCV2 ed influenza, positiva per PRRS (europeo). ELISA negativa per rotavirus tipo A.	Ciclo chiuso.
49400/1 BS NUM 19	POSITIVO	POSITIVO	svezzamento	Polmonite interstiziale perilobulare.	Presenza di Pasteurella multocida polmonare. Negativo per Salmonella	PCR(pool1-4) positiva per PRRS (europeo), negativa per PCV2 e influenza.	Sito 2.
49400/3 BS	POSITIVO	POSITIVO	svezzamento	Dimagrimento.	Batterologico negativo.	PCR(pool1-4) positiva per	Sito 2.

NUM 21				Epatomegalia. Polmonite interstiziale.	Negativo per Salmonella	PRRS (europeo), negativa per PCV2 e influenza.	
79105 BS NUM 99	negativo	POSITIVO	svezzamento	Lieve congestione delle meningi. Emorragie sottocutanee e muscolari diffuse a tutto il corpo. Striature emorragiche miocardiche, coagulo addominale. Rene grinzoso.	Batteriologico negativo. Negativo per Salmonella.	PCR negativa per PRRS, PCV2 e influenza.	Ciclo aperto.

Tabella 9.2: Dati disponibili relativi ai campioni di origine dei ceppi sequenziati con il primo set di primers (Erker et al., 1999a).

N° accettazione	PCR (Huang)	PCR (Erker)	età	Principali reperti anatomo patologici	Esame microbiologico	Esame virologico	tipologia allevamento
300565/3 RE NUM 5	POS	POS	97 GG	polisierosite			CENTRO GENETICO
303357 NUM 8	POS	POSITIVO	56 GG		E.Coli K 88 +		CICLO CHIUSO SU TRE SITI
303155 RE NUM 9	POS	POS	147 GG				CENTRO GENETICO
292/1 RE NUM 12	POS	NEG	120 GG		E.Coli K88	<u>Coronavirus</u>	
49400/3 BS NUM 21	POS	POS	svezzamento	Dimagrimento. Epatomegalia. Polmonite interstiziale.	Batterologico negativo. Negativo per Salmonella	<u>PCR(pool1-4)</u> positiva per PRRS (europeo), negativa per PCV2 e influenza.	Sito 2.
260961/1 RE NUM 71	POS	NEG	110 GG		Streptococcus		CENTRO GENETICO
73922\1 BS NUM 85	POS	POS	magronaggio	Dimagrimento. Enterite catarrale con contenuto acquoso del tenue e cieco. Linfadenite dei meseraici. Polmonite	Presenza di E.coli in testinale. Negativo per Salmonella e Clostridium spp..	<u>PCR(pool1-3)</u> positiva per PRRS (americano) e per PCV2, negativa per influenza. <u>M.E.(pool1-3)</u> non evidenziata la	Ingrasso. Sito 3.

				con epatizzazione grigia ai lobi apicali e medi.	Negativo all'esame microscopico per <i>Brachyspira</i> spp.. <u>PCR (pool 1-3)</u> negativa per <i>Lawsonia intracellularis</i> .	presenza di particelle virali con sieri convalescenti anti-Rotavirus del suino e anti-Coronavirus (PED). Evidenziata la presenza di particelle virali riferibili Piccoli Virus (Circovirus) (+). <u>ELISA (pool1-3)</u> negativa per Rotavirus gruppo A. <u>Immunofluorescenza</u> negativa per PCV2.	
73922\3 BS NUM 86	POS	POS	magronaggio	Dimagrimento. Enterite catarrale-emorragica diffusa. Pleurite e pericardite cronica aderenziale.	Presenza di <i>E.coli</i> in testinale. Negativo per <i>Salmonella</i> e <i>Clostridium</i> spp.. Negativo all'esame microscopico per <i>Brachyspira</i> spp.. <u>PCR (pool 1-3)</u>	<u>PCR(pool1-3)</u> positiva per PRRS (americano) e per PCV2, negativa per influenza. <u>M.E.(pool1-3)</u> non evidenziata la presenza di particelle virali con sieri convalescenti anti-Rotavirus del suino e anti-Coronavirus (PED).	Ingrasso. Sito 3.

					negativa per Lawsonia intracellularis.	Evidenziata la presenza di particelle virali riferibili Piccoli Virus (Circovirus) (+). <u>ELISA (pool1-3)</u> negativa per Rotavirus gruppo A. <u>Immunofluorescenza</u> negativa per PCV2.	
73467 BS NUM 87	POS	POS	svezzamento	Congestione poliorganica. Epatosplenomegalia di modica entità.	Presenza di Streptococco spp. da cervello e polmone. Negativo per Salmonella.	<u>PCR</u> negativa per PRRS, PCV2 e influenza.	Ciclo chiuso.
73922\2 BS NUM 88	POS	POS	magronaggio	Dimagrimento. Grave linfadenite generalizzata con edema perilinfonodale. Dermatite. Nefrite. Enterite catarrale con contenuto fluido del	Presenza di E.coli in testinale. Negativo per Salmonella e Clostridium spp.. Negativo all'esame microscopico per Brachyspira spp..	<u>PCR(pool1-3)</u> positiva per PRRS (americano) e per PCV2, negativa per influenza. <u>M.E.(pool1-3)</u> non evidenziata la presenza di particelle virali con sieri convalescenti anti-Rotavirus del suino e	Ingrasso. Sito 3.

				tenue e cieco con tratti dell'intestino tenue congesti ed emorragici	<u>PCR (pool 1-3)</u> negativa per Lawsonia intracellularis.	anti-Coronavirus (PED). Evidenziata la presenza di particelle virali riferibili Piccoli Virus (Circovirus) (+). <u>ELISA (pool1-3)</u> negativa per Rotavirus gruppo A. <u>Immunofluorescenza</u> negativa per PCV2.	
74624 BS NUM 91	POS	POS	magronaggio	Versamento toracico e pericardico. Aderenze pleuriche. Lieve gastrite.	Batteriologico negativo	<u>PCR</u> positiva per PRRS (europeo) e per PCV2, negativa per influenza.	Ingrasso. Sito 3.
88796 BS NUM 122	POS	POS	magronaggio	Dermatite papulo-pustolosa localizzata alivello di muso, arti ed addome. Ileite e colite.	Presenza di Staphylococcus aureus cutaneo e linfonodale. Negativo per Salmonella e Clostridium spp.. PCR negativa per Lawsonia intracellularis.	<u>PCR</u> negativa per PRRS, PCV2 e influenza.	Sito 3.
91723/2 BS	POS	NEG	magronaggio	Gastrite localizzata al	Presenza di E.coli	<u>PCR</u> negativa per PRRS,	Ciclo chiuso.

NUM 127				fondo dello stomaco. Dilatazione della parete del grosso intestino con contenuto liquido verdastro. Ispessimento dell'ileo ed erosione della mucosa.	intestinale. Negativo per Salmonella e Clostridium spp.. Negativo all'esame microscopico per Brachyspira spp.. PCR negativa per Lawsonia intracellularis.	PCV2 e influenza.	
94591\1 BS NUM 138	POS	POS	svezzamento	Pericardite purulenta ed epatizzazione grigia polmonare.	Presenza di E.coli intestinale. Negativo per Salmonella.	PCR (pool 1-2) positiva per PCV2, negativa per PRRS e influenza.	Ciclo aperto.
94591\2 BS NUM 139	POS	NEG	svezzamento	Enterocolite.	Presenza di E.coli intestinale. Negativo per Salmonella.	PCR (pool 1-2) positiva per PCV2, negativa per PRRS e influenza.	Sito 2.

Tabella 9.3: Dati disponibili relativi ai campioni di origine dei ceppi sequenziati con il secondo set di primers (Hang et al., 2002).

Figura 9.1: Risultati dell'analisi filogenetica effettuata sui ceppi identificati con i primers di Huang et al., 2002

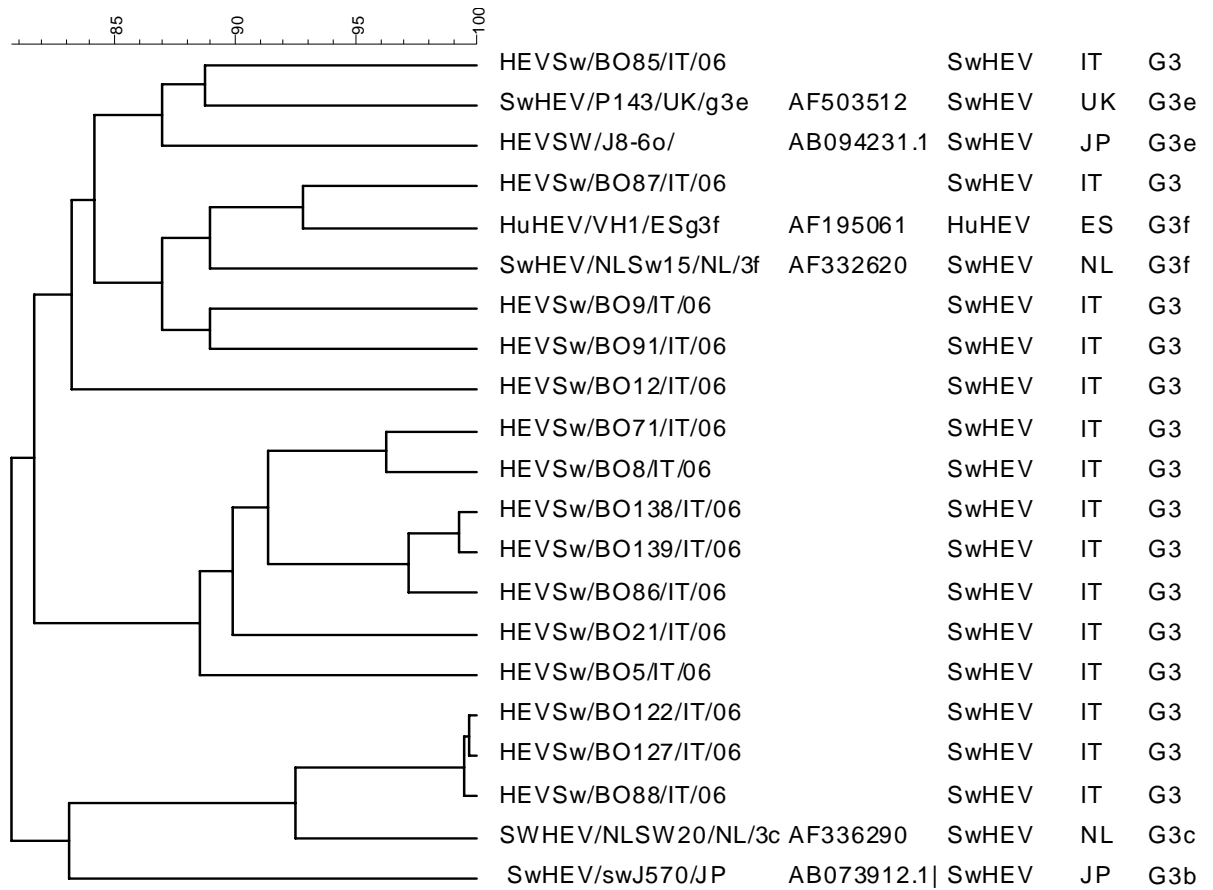


Figura 9.2: Confronto del profilo amminoacidico derivato da diversi ceppi

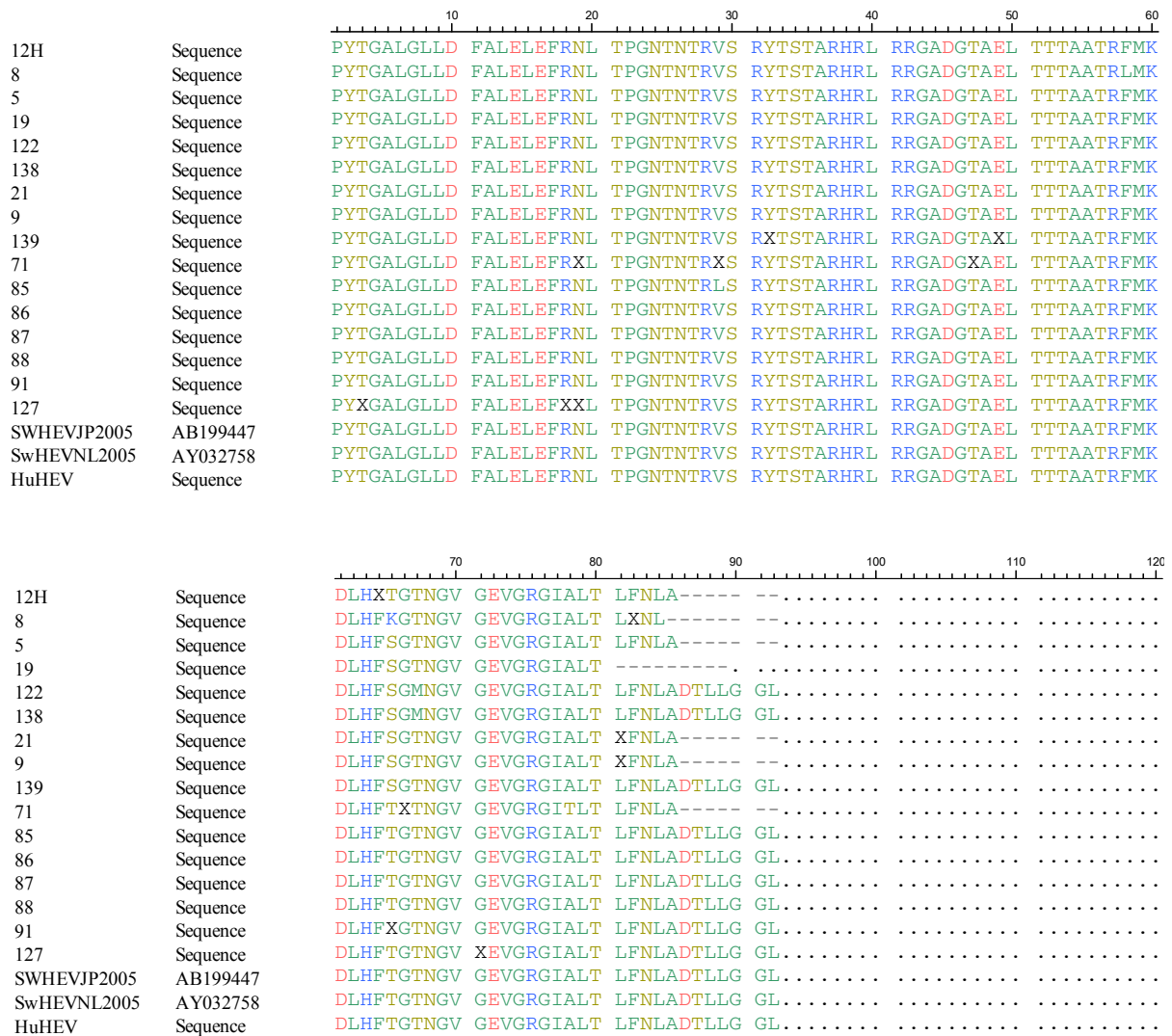
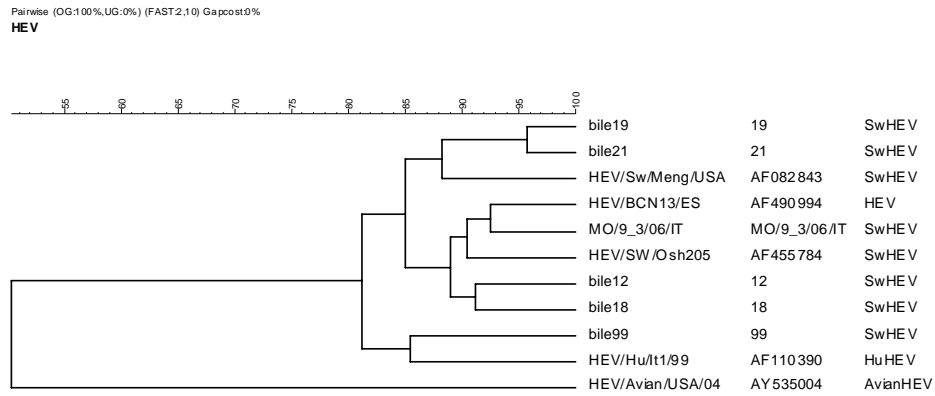


Figura 9.3: Albero filogenetica dei ceppi ottenuti con i primers di Erker et al., 1999a.



9.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI

L'elevata prevalenza riscontrata (29,9%), conferma la presenza e la larga diffusione dell'infezione da HEV negli allevamenti suinicoli intensivi del Nord Italia (Caprioli et al., 2007; Di Bartolo et al., 2007) ed è simile a quella riportata in altri paesi europei (Fernandez-Barredo et al., 2006; van der Poel et al., 2001; de Deus et al., 2007b).

La maggiore prevalenza riscontrata nei soggetti in magronaggio concorda con quanto già riscontrato in altri lavori ed è verosimilmente da mettere in relazione con il calo dell'immunità materna che può determinare un aumento della probabilità di infezione da HEV dei suini appartenenti a questa classe di età (Fernandez-Barredo et al., 2006; Huang et al., 2002; de Deus et al., 2007b).

Nei soggetti in magronaggio, il rischio di infezione è risultato essere 3,78 volte superiore rispetto agli animali in svezzamento (tab. 1). Ciò porterebbe ad ipotizzare che, nell'ambito dei soggetti esaminati, gli altri fattori di rischio (tipologia aziendale, presenza di lesioni anatomopatologiche a carico di diversi organi, altre coinfezioni virali) abbiano un ruolo marginale nel determinare un aumento del rischio di infezione. Va tuttavia ricordato che la tipologia di soggetti esaminati è assolutamente peculiare e non confrontabile con quella utilizzata in altri lavori sperimentali (Fernandez-Barredo et al., 2006; Meng et al., 1997; Zheng et al., 2006). Si tratta infatti di soggetti scelti in maniera non casuale tra quelli presenti in allevamento e la cui numerosità non rispecchia le dimensioni aziendali. In altri termini, i soggetti esaminati non possono essere considerati un campione statisticamente rappresentativo dei soggetti presenti nelle rispettive aziende di provenienza, sia da un punto di vista quantitativo sia da un punto di vista qualitativo (erano infatti soggetti che presentavano evidenti problemi sanitari).

L'osservazione che la presenza di patologie concomitanti a carico di uno o più apparati non era correlata ad una maggiore probabilità di

infezione da HEV nei soggetti esaminati, potrebbe confermare l'ipotesi che l'infezione nel suino evolve in modo asintomatico. Tuttavia, in considerazione del particolare tipo di campionamento utilizzato, non è possibile escludere che l'infezione da HEV non sia implicata in patologie multifattoriali o condizionate o non contribuisca ad aggravare altre infezioni, quali ad esempio quelle sostenute da PCV2 o PRRSV.

I risultati ottenuti evidenziano che a fronte di una differenza non statisticamente significativa, la prevalenza più elevata è stata tuttavia osservata nei soggetti in cui all'infezione da HEV si associava anche un'altra infezione virale. Va ricordato però che, almeno per quanto riguarda PCV2 la sola identificazione del virus non depone per nessuna patologia in atto.

Dal punto di vista filogenetico, tutti i ceppi identificati sono risultati appartenere al genotipo 3, in accordo con quanto rilevato in Italia, in Europa e in altri Paesi industrializzati (Banks et al., 2004a; Caprioli et al., 2007; Clemente-Casares et al., 2003; Di Bartolo et al., 2007; de Deus et al., 2007b; Fernandez-Barredo et al., 2006; Van der Poel et al., 2001). Altri studi hanno rilevato che, da un punto di vista filogenetico, i ceppi di HEV di origine umana o di origine suina circolanti in una determinata area geografica appartengono allo stesso genotipo (Banks et al., 2004b; van der Poel et al., 2001; Panda et al., 2007).

A fronte di una grande omogeneità di genotipo, tuttavia i ceppi circolanti in una determinata area geografica, possono comunque presentare, tra loro, gradi di omologia variabili (Panda et al., 2007; Lu et al., 2006; Fernandez-Barredo et al., 2006). Tale rilievo è confermato anche dai risultati ottenuti sequenziando alcuni dei campioni positivi.

Il grado di omologia nucleotidica tra i ceppi identificati è risultato variabile, sebbene le differenze non risultino presumibilmente in modificazioni della struttura della proteina codificata, osservazione particolarmente importante dato che la regione genomica amplificata è

responsabile della codifica della proteina del capsido, a sua volta implicata nella risposta immunitaria. L'epidemiologia molecolare dei ceppi sequenziati nei diversi allevamenti ha evidenziato due differenti situazioni: in alcuni casi, ceppi provenienti da allevamenti diversi presentavano gradi di omologia nucleotidica anche molto elevati (99,6%), facendo ipotizzare la circolazione di ceppi di HEV appartenenti ad un unico lineaggio filogenetico. Al contrario, in altri casi, è stato riscontrato che all'interno dello stesso allevamento potevano circolare ceppi anche molto diversi tra loro. L'elevata omologia nucleotidica dei ceppi provenienti da allevamenti diversi potrebbe essere dovuta all'introduzione diretta in più allevamenti dello stesso ceppo, presente anche in altre aziende, mediante la commercializzazione di animali, oppure attraverso contatti indiretti. La presenza di ceppi anche molto diversi tra loro all'interno di un'unica azienda potrebbe essere invece la conseguenza dell'introduzione di suini di diversa origine o l'effetto della pressione selettiva esercitata sul virus da parte dell'immunità di popolazione. Non va tuttavia tralasciata anche la possibilità che l'evidenziazione di ceppi virali diversi all'interno dello stesso allevamento sia la conseguenza di mutazioni spontanee o di mutazioni indotte dalla pressione selettiva esercitata dall'immunità di popolazione.

Complessivamente, la prevalenza osservata (29,9%) è risultata superiore a quella evidenziata in altri paesi (Huang et al., 2002; Clemente-Casares et al., 2003; Banks et al., 2004a). Anche in questo caso, tuttavia, la tipologia di soggetti da noi esaminati non trova riscontri in altri lavori, trattandosi di soggetti con problemi di tipo sanitario.

L'elevata prevalenza riscontrata, insieme al fatto che l'infezione da HEV è verosimilmente sub-clinica nel suino, desta qualche preoccupazione relativamente al rischio di trasmissione zoonosica dell'infezione mediante il contatto con suini infetti, l'ingestione di carne o organi contaminati, la possibilità di contaminazione crociata

tra prodotti carnei crudi ed altri alimenti pronti per il consumo ed il rischio di diffusione del virus nell'ambiente con i reflui di allevamento con conseguente possibile contaminazione dei vegetali e delle acque ad uso potabile (Yazaki et al., 2003; Matsuda et al., 2003; Tamada et al., 2003; Tei et al., 2003, Kasorndorkbua et al., 2003). A rischio sarebbero inoltre alcune categorie professionali come allevatori, personale addetto agli animali e veterinari che possono venire in contatto con i suini nel periodo di viremia e di escrezione del virus nelle feci. Per tali categorie, non è poi da escludere la possibilità d'infezione per via indiretta attraverso il contatto con strumenti ed attrezzi da lavoro contaminati dalle feci degli animali.

In conclusione, l'ampia diffusione dell'infezione da HEV riscontrata negli allevamenti suini italiani indica la necessità di condurre studi e ricerche che possano meglio chiarire l'impatto dell'infezione sulla salute e produttività degli animali, i fattori di rischio ad essa correlati, il ruolo che il suino può svolgere come serbatoio d'infezione per l'uomo, le possibili implicazioni per la salute pubblica e l'eventuale ruolo patogenetico di HEV nel determinismo di patologie condizionate o ad eziologia multifattoriale.

CAPITOLO 10: IDENTIFICAZIONE DI HEV IN UNA POPOLAZIONE DI CINGHIALI SOTTOPOSTA A CONTROLLO DEMOGRAFICO

Obbiettivo di questa indagine è stato valutare la presenza e l'eventuale prevalenza dell'infezione da virus HEV in una popolazione di cinghiali demograficamente controllata. Lo studio di questo tipo di popolazione ha consentito inoltre di fare valutazioni sulla diffusione del virus nelle diverse classi d'età, e sulla possibile identificazione di fattori di rischio correlati all'infezione.

10.1 MATERIALI E METODI

10.1.1 Popolazione dei cinghiali

La popolazione di cinghiali oggetto della valutazione è quella presente all'interno del Parco Regionale dei Gessi Bolognesi (Ozzano dell'Emilia, Bologna), che ricopre una superficie di 48,15 km². Nel 2001, la densità di cinghiali nell'area era di 18 animali/ km², causando notevoli problemi per le coltivazioni agricole dell'area. Per limitare il problema del sovrannumero, è stato iniziato un programma di controllo demografico basato sul contemporaneo utilizzo di metodiche di abbattimento selettivo e di cattura con apposizione di marche auricolari per l'identificazione dei singoli soggetti. In questo modo è stato possibile mantenere e monitorare una subpopolazione di animali marchiati strutturata per età e per sesso. Dal momento di inizio del programma di controllo la densità di popolazione dei cinghiali è stata ridotta ad un numero variabile dai 2 animali/ km² (periodo pre-riproduzione) ai 5,5 animali km² (periodo post-riproduzione). La densità viene stimata valutando il numero di nuovi nati e la frequenza di cattura e ricattura degli individui marchiati.

10.1.2 Raccolta dei campioni

Ottantotto animali apparentemente sani abbattuti tra Marzo e Settembre del 2006 sono stati scelti per questo studio. Per ogni animale sono state raccolte informazioni relative a:

- *Età*: è stata calcolata in base alla valutazione di tempi di eruzione dentaria e di sostituzione della dentizione (Vicente et al., 2004). L'età degli animali variava tra i 4 e i 37 mesi, ma maggior parte degli individui selezionati (83\88) aveva un'età superiore ai sei mesi. Sono stati deliberatamente scelti perché animali di età e quindi taglia inferiore non vengono abbattuti per essere destinati al consumo umano e quindi non rappresentano una potenziale fonte alimentare di trasmissione dell'infezione all'uomo.
- *Sesso*: si è cercato di considerare un numero omogeneo di maschi e femmine, rispettando così la sex-ratio di popolazione.
- *Lunghezza del corpo*: è stata misurata per ogni animale a partire dalla punta del naso fino all'estremità della coda.
- *Peso*: tutte le carcasse sono state pesate prima e dopo l'eviscerazione.
- *Area del parco*: il parco si può suddividere indicativamente in due zone, separate da un corso d'acqua. Normalmente animali che si trovano in una zona non vengono mai campionati nell'altra.

In **tabella 10.1** sono riportati i dati ottenuti per ciascun animale associati alla positività o negatività per la ricerca del virus.

In ogni animale, durante l'esame necroscopico è stata praticata un'incisione con bisturi sterile sulla parete della cistifellea. Attraverso questa apertura è stata introdotta una siringa senz'ago sterile ed è stata prelevata la bile contenuta, in quantità minima di 1 ml per animale. Il campione è stato trasportato in contenitori refrigerati fino al Dipartimento di Sanità pubblica veterinaria e Patologia Animale dell'Università di medicina Veterinaria di Bologna, dove è stato subito preparato e conservato a -80°C .

10.1.3 Estrazione dell'RNA e NESTED RT PCR

Essendo la bile troppo densa per essere estratta tal quale utilizzando kit commerciali con filtri in silice, ogni campione è stato preventivamente diluito 1:10 con acqua sterile DEPC (diethylpirocarbonato).

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il kit commerciale QiaAmp viral RNA kit (Qiagen, Hiden, Germania), seguendo le istruzioni fornite dalla ditta. Brevemente, 140 µl di bile diluita 1:10 sono stati lasciati a contatto con il buffer di lisi fornito dal kit (buffer AVE addizionato con carrier RNA), e successivamente precipitato con 560 µl di etanolo assoluto. L'RNA è stato separato dagli altri componenti mediante trasferimento e centrifugazione della soluzione in *spin column* con filtro in silice selettivo per l'RNA. Purificato con due cicli di lavaggio, è stato poi eluito con apposito buffer in 50 µl.

L'RNA estratto è stato subito retro trascritto ed amplificato con una procedura *one tube* (sia la retrotrascrittasi che la DNA polimerasi lavorano in un unico step di reazione) mediante l'utilizzo del kit Superscript III One step RT-PCR System with Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Il profilo termico utilizzato è stato il seguente:

- 45°C per 30 minuti (retrotrascrizione)
- 94°C per 2 minuti (denaturazione iniziale)
- 39 cicli a 94°C per un minuto (denaturazione)
 - 49°C per 90 secondi (annealing)
 - 72°C per un minuto (elongation)
- 72°C per 5 minuti (elongation finale)

I primers utilizzati sono stati quelli disegnati sulla regione ORF2 da Erker et al., 1999a:

HEVORF2conA1: 5'- CTT GTT CRT GYT GGT TRT CAT AAT C- 3'

HEVORF2conS1: 5'- GAC AGA ATT RAT TTC GTC GGC TGG- 3'

Il DNA amplificato durante la prima PCR è stato poi amplificato nuovamente mediante l'utilizzo di primers interni alla regione genomica amplificata, al fine di aumentare la sensibilità della reazione (Erker et al., 1999a).

HEVORF2conA2: 5'- GTT CRT GYT GGT TRT CAT AAT CCT G- 3'

HEVORF2conS2: 5'- GTY GTC TCR GCC AAT GGC GAG C- 3'

La reazione è stata condotta con la Taq DNA polymerase (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) seguendo le istruzioni della ditta e il seguente profilo termico:

- 95°C per 3 minuti (denaturazione iniziale)
- 39 cicli a 94°C per 45 secondi (denaturazione)
 - 49°C per un minuto (annealing)
 - 72°C per 2 minuti (elongation)
- 72°C per 7 minuti (elongation finale)

10.1.4 Sequenziamento ed analisi filogenetica

Dieci campioni positivi, corrispondenti ad una frazione omogenea degli animali campionati, in base ad età e sesso, sono stati sottoposti a sequenziamento ed analisi filogenetica. Alcuni dei prodotti amplificati in nested PCR e corrispondenti all'altezza attesa di 145bp sono stati corsi su un gel di agarosio all'1% e la banda visualizzata è stata tagliata con bisturi sterile. Il DNA così isolato è stato poi purificato utilizzando l'High Pure PCR Product Purification kit (Roche, IN, USA), seguendo le istruzioni del produttore. Il DNA purificato è stato poi quantificato e sequenziato per confermare che si trattasse effettivamente di un segmento amplificato del genoma di HEV.

Le sequenze ottenute sono state messe in relazione ad altre sequenze di HEV umane, suine e di cinghiale depositate in Genbank e provenienti da Giappone, USA, Europa, ed in particolare anche Italia.

10.1.5 Analisi statistica

Per identificare una possibile correlazione tra presenza di infezione ed età degli animali, i cinghiali sono stati suddivisi in tre categorie: giovani (età < 12 mesi), sub-adulti (12 - 24 mesi), adulti (oltre 24 mesi), in base ad una classificazione precedentemente riportata (Vicente et al., 2004). Inoltre, per valutare il possibile effetto dell'infezione sulle caratteristiche biometriche degli animali, peso e lunghezza corporea dei cinghiali positivi per HEV sono stati comparati con quelli degli animali negativi della stessa età e sesso.

Per verificare la normalità della distribuzione dei dati è stato utilizzato il test di Kolmogorov-Smirnov, e sulla base dei risultati di questo il test della *t* di Student è stato utilizzato per comparare i dati quantitativi. Tutti i dati sono stati analizzati con il software SPSS per Windows 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). La prevalenza per classe e per sesso d'età è stata calcolata con un intervallo di confidenza (CI) del 95%.

10.2 RISULTATI

Il genoma di HEV è stato identificato in 22 degli 88 animali testati (prevalenza 25%, IC 95% 18,6-32,6%).

La prevalenza è stata valutata nella popolazione generale, e per gruppi di sesso e classi di età (i risultati sono riportati in **Tabella 10.2**). Nessuna differenza statisticamente significativa ($P > 0,05$) è stata identificata tra classi d'età e sessi diversi.

Le caratteristiche biometriche (peso e lunghezza corporea) degli animali infetti non differivano statisticamente da quelle degli animali non infetti della stessa classe d'età e dello stesso sesso.

L'allineamento delle 10 sequenze ottenute in Nested PCR ha dimostrato che erano tra loro identiche. Il ceppo identificato (wbITBO06) apparteneva al genotipo 3, come altri ceppi indigeni isolati in Europa dall'uomo, suino e cinghiale.

Il ceppo identificato aveva una percentuale di omologia nucleotidica del:

- 92% con un ceppo identificato in una rete fognaria in Spagna (referenza Genebank AF490994, Clemente Casares et al., 2003).
- 92,2% con un ceppo suino identificato in Olanda (AF336292, van der Poel et al, 2001).
- 91% e 92,2% son due ceppi MO736_4/IT/06 e MO/9_3/IT/06 identificati nel 2005 in un allevamento del Nord Italia (vedi capitolo 7).
- 83-86% con altri due ceppi suini identificati in Italia nel 2004 (HEVPI/01 e HEV BO01, Caprioli et al., 2007).
- 83,1% con un ceppo umano autoctono identificato in Italia (83,1%).
- 66-88% con ceppi di cinghiale identificati in Giappone (DQ079630, AB222184, AB189070).

In **figura 10.1** è riportato il dendrogramma contenente il ceppo di cinghiale italiano identificato.

Tabella 10.1: Dati disponibili per ciascun animale campionato e risultati della ricerca del virus.

C: zona uno del parco, a nord del fiume

L: zona due del parco a sud del fiume

n°UNIBO	RISULTATO	SESSO	ETA'(mesi)	ZONA	PESO(kg)	LUNGH.
CINGHO1	negativo	F	12\13	C	31	104
CINGHO2	negativo	F	27	L	63	135
CINGHO3	negativo	F	12	L	30	117
CINGHO5	negativo	F	12\13	C	52	108
CINGHO6	negativo	M	22\23	L	53	134
CINGHO7	negativo	F	19\22	C	46	118
CINGHO8	negativo	M	18\20	L	42	115
CINGHO9	POSITIVO	M	12\13	C	50	132
CINGHO10	negativo	M	24\26	L	70	130
CINGHO11	negativo	M	12\13	C	38	109
CINGHO12	negativo	F	6\7	C	22	95,5
CINGHO13	negativo	M	12\13	C	32	108
CINGHO14	negativo	F	17\18	L	48	120
CINGHO15	negativo	F	5	C	50	121,5
CINGHO16	negativo	M	15\17	L	52	125
CINGHO17	POSITIVO	M	10\12	L	32	118
CINGHO18	negativo	M	14\15	L	53	130
CINGHO19	negativo	F	24\26	C	40	116
CINGHO20	negativo	F	7\8	C	25	100
CINGHO21	POSITIVO	M	18\22	L	47	127
CINGHO22	negativo	F	18\20	L	44	122
CINGHO23	negativo	M	16\17	L	53	125
CINGHO24	negativo	M	12\13	C	38	118
CINGHO25	negativo	M	16\17	L	40	131
CINGHO26	POSITIVO	F	12\13	C	35	111
CINGHO27	POSITIVO	M	14\15	C	44	116
CINGHO28	negativo	F	21,5\23,5	C	60	127
CINGHO29	negativo	F	12\13	L	51	116
CINGHO30	negativo	F	20\22	L	41	123

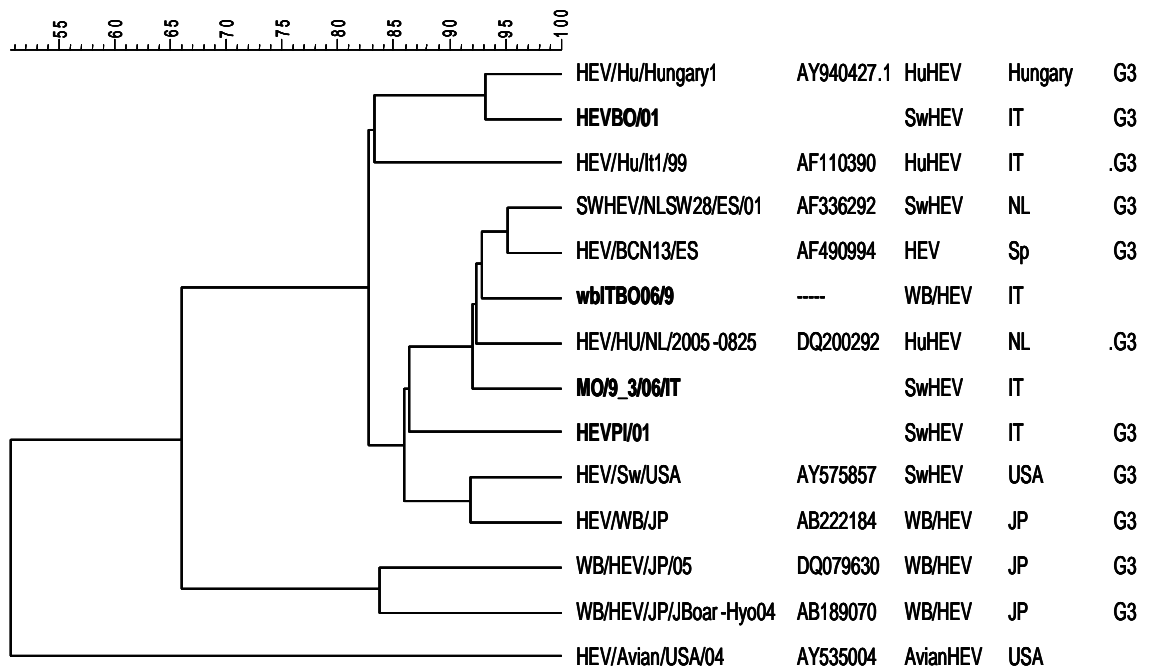
CINGHO31	negativo	F	18\20	L	40	112
CINGHO32	negativo	M	14\15	C	42	119
CINGHO33	POSITIVO	F	12\13	C	39	116
CINGHO34	negativo	M	14\15	C	44	120
CINGHO35	negativo	F	24\26	L	50	127
CINGHO36	POSITIVO	M	10\12	L	33	112
CINGHO37	negativo	F	18	L	39	116
CINGHO38	negativo	M	12\13	L	34	110
CINGHO39	negativo	F	16\17	C	50	126
CINGHO40	POSITIVO	F	14\15	C	35	112
CINGHO41	negativo	M	16\18	L	38	121
CINGHO42	POSITIVO	F	18\20	L	38	120
CINGHO43	POSITIVO	M	31\37	C	91	144
CINGHO44	negativo	F	31\45	L	10	89
CINGHO45	negativo	F	14\15	L	40	117
CINGHO46	negativo	M	14\15	C	35	104
CINGHO47	negativo	M	19\21	L	41	116
CINGHO48	POSITIVO	F	16\17	L	46	117
CINGHO49	negativo	F	19\21	L		
CINGHO50	negativo	M	14\15	C	37	113
CINGHO51	POSITIVO	M	20\24	L	48	128
CINGHO52	negativo	F	16\18	L	42	121
CINGHO53	negativo	F	14\15	C	37	105
CINGHO54	negativo	F	28\31,5	C	39	120
CINGHO55	negativo	F	31\37	C	50	137
CINGHO56	negativo	F	16\17	L	41	120
CINGHO57	negativo	F	17\18	L	45	118
CINGHO58	negativo	F	14\16	L	38	115
CINGHO59	negativo	F	17\18	C	47	118
CINGHO60	negativo	M	14\15	C	35	112
CINGHO61	negativo	M	18\20	L	42	106

CINGHO62	negativo	M	17\18	C	55	126
CINGHO63	negativo	M	36\39	L	63	129
CINGHO64	POSITIVO	F	10\12	L	30	114
CINGHO65	POSITIVO	F	15\17	L	43	132
CINGHO66	POSITIVO	F	31\37	C	51	127
CINGHO67	negativo	F	16\18	L	33	114
CINGHO68	negativo	F	18\22	L	37	115
CINGHO69	negativo	F	12\13	C	32	111
CINGHO70	POSITIVO	M	28\31,5	L	63	130
CINGHO71	POSITIVO	F	18\22	L	38	118
CINGHO72	negativo	F	24\26	L	39	114
CINGHO73	negativo	F	24\26	L	41	116
CINGHO74	POSITIVO	F	17\18	L	45	124
CINGHO75	negativo	F	4\5	L	12	75
CINGHO76	POSITIVO	F	19\22	L	50	124
CINGHO77	POSITIVO	F	5\6	L	15	98
CINGHO78	negativo	F	18	L	22	95
CINGHO79	negativo	F	24	L	40	110
CINGHO80	negativo	F	5\6	L	20	87
CINGHO81	negativo	F	4\5	L	13	76
CINGHO82	negativo	M	>36	C	68	136
CINGHO83	negativo	M	14\15	C	36	66
CINGHO84	negativo	F	36	L	60	136
CINGHO85	negativo	F	11\13	L	27	100
CINGHO86	POSITIVO	F	14\15	L	44	118
CINGHO87	negativo	M	30	L	62	124
CINGHO88	negativo	M	29\31	L	60	131

Tabella 10.2: Prevalenza di HEV per età e sesso

Sex class	Age class	Estimated total population	Total examined	HEV positive	HEV prevalence	Estimated prevalence in the whole population (95% CI)
All animals	<12 months	172	23	8	34.8	20.4 - 51.7
	13-24 months	87	53	11	20.8	14.9 - 27.6
	> 24 months	20	12	3	25.0	15.0 - 40.0
	Total	279	88	22	25.0	18.6 - 32.6
Male	<12 months	74	8	4	50.0	25.7 - 74.3
	13-24 months	39	20	3	15.0	7.7 - 28.2
	> 24 months	6	6	2	33.3	-
	Total	119	34	9	26.5	16.8 - 38.7
Female	<12 months	98	15	4	26.7	12.2 - 46.9
	13-24 months	51	33	8	24.2	17.7 - 33.3
	> 24 months	11	6	1	16.7	9.1 - 36.4
	Total	160	54	13	24.1	16.3 - 33.7

Figura 10.1: Dendrogramma contenente il ceppo wbITBO06/9



10.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Questo è stato il primo studio condotto sulla prevalenza dell'infezione nel cinghiale (*Sus scrofa scrofa*) da HEV in Italia, e ha apportato ulteriori conoscenze riguardo alla circolazione di HEV nelle popolazioni di cinghiali europee. Finora si hanno a questo proposito quindi dati riguardanti Italia, Spagna (de Deus et al., 2007a), e Germania (Kaci et al., 2008).

I precedenti report sulla presenza dell'infezione nel cinghiale provenivano tutti da Giappone (Sonoda et al., 2004; Masuda et al., 2005; Michitaka et al., 2007), ed erano quindi tutti relativi a cinghiali appartenenti ad un diverso lineaggio filogenetico (*S. scrofa leucomysta* e *S. scrofa riukiuanus*) (Watanobe et al., 1999).

Per quanto riguarda il valore di prevalenza identificato in questo studio (25%), è più alto rispetto a quelli riportati in letteratura:

- 2,4% Sonoda et al., 2004
- 2,3% Nishizawa et al., 2005
- 42,8% Kitajima et al., 2004 (ma era uno studio condotto solo su 8 animali)
- 19,6% de Deus et al., 2007a
- 3% Michitaka et al., 2007
- 5,3% Kaci et al., 2008

Questo potrebbe essere dovuto ad una effettiva maggiore prevalenza d'infezione nei cinghiali italiani testati, ma anche al tipo di campione utilizzato. La popolazione analizzata presentava peculiari caratteristiche genetiche, di densità, ambientali, che potrebbero avere determinato una maggiore suscettibilità all'infezione rispetto alle popolazioni considerate negli altri lavori. E' comunque da sottolineare che negli altri report è sempre stato utilizzato il siero, mentre la bile, utilizzata in questo lavoro, è normalmente più frequentemente positiva negli animali infetti rispetto siero (de Deus et al., 2007b).

Relativamente ai fattori di rischio presi in considerazione (età e sesso), nessuno dei due sembra statisticamente influenzare la prevalenza di HEV ($P > 0,05$). Animali positivi sono stati identificati in tutte le classi d'età, inclusa quella dei giovani (4 mesi), indicando che l'infezione può essere presente anche nelle prime fasi di vita dell'animale, come avviene tra l'altro nel suino, in cui il picco di positività si riscontra tra i 4 e i 6 mesi d'età (Meng et al., 1998a). La presenza dell'infezione da HEV è stata dimostrata anche in animali adulti di 24 mesi, confermando quanto riportato in altri lavori (Nishizawa et al., 2005). Questo dato sembrerebbe in contrasto con quelli ottenuti nel suino, in cui sembra che l'infezione si manifesti principalmente in animali giovani (Meng et al., 1997; Meng et al., 1998a). Recentemente, comunque, sono stati pubblicati dati che testimoniano la presenza dell'infezione anche nei riproduttori (Fernandez-Barredo et al., 2007). Anche nel capitolo 7 di questa tesi è riportata la presenza dell'infezione in scrofe anziane quindi anche al di sopra dei due anni di età. Probabilmente la maggioranza dei dati presenti in letteratura riguardo al suino sono viziati dal fatto che i campionamenti sono stati effettuati solo in animali destinati alla macellazione, che generalmente avviene (in Paesi diversi dall'Italia) intorno ai 6 mesi di età. I cinghiali hanno un'aspettativa di vita superiore, quindi gli adulti potrebbero essere positivi per una cronicizzazione dell'infezione o per continue reinfezioni favorite da un'immunità non completamente proteggente. La constatazione di una presenza dell'infezione a cavallo di tutte le classi d'età potrebbe anche indicare che il virus sia entrato in una popolazione priva di immunità a qualsiasi livello poco prima del campionamento. I dati anche desunti da altri lavori (de Deus et al., 2007a; Kaci et al., 2008) però, rendono evidente che le popolazioni di cinghiali europee sono infette da almeno 10 anni da ceppi di HEV. Inoltre, le specie selvatiche tendono a rappresentare un serbatoio di infezione per l'infezione nelle domestiche, quindi è più logico pensare che l'infezione nelle popolazioni di cinghiale sia presente addirittura da prima di quella del suino.

Le caratteristiche biometriche (peso e lunghezza del corpo) non variavano tra animali infetti e non, confermano l'ipotesi, precedentemente dimostrato nel suino (Meng et al., 1998a), che l'infezione da HEV decorra anche nei cinghiali in modo asintomatico, non influenzando la massa corporea e le caratteristiche di accrescimento degli animali .

Per quanto riguarda l'analisi delle sequenze virali, queste si sono rivelate identiche al 100% tra loro. Questo dato è abbastanza insolito in quanto, sebbene la regione analizzata consistesse solo in 97 nucleotidi, è raro trovare in quel tratto del genoma una omogeneità così elevata. Questo potrebbe indicare che un unico ceppo circolava nella popolazione del parco dei Gessi Bolognesi al momento del campionamento, o che nei selvatici ci sia una maggiore conservazione delle sequenze virali. Questo dato è parzialmente confermato da Michitaka et al., 2007, che ha riportato che sequenze di HEV messe in evidenza in cinghiali provenienti e segregati nella stessa area geografica presentavano sequenze identiche tra loro. Va comunque specificato che la regione genomica presa in considerazione nello studio giapponese (Michitaka et al., 2007) è quella che codifica per la polimerasi virale, che biologicamente è più conservata rispetto alla regione ORF2 da noi analizzata. Nel caso dei report europei, le sequenze identificate erano strettamente correlate ma non identiche nel caso della Germania (Kaci et al., 2008), e con un'omologia nucleotidica variabile dal 77 al 100% in quello della Spagna (de Deus et al., 2007a).

L'analisi filogenetica (vedi **Figura 10.1**) ha mostrato come il ceppo di cinghiale italiano sia più vicino a ceppi suini ed umani identificati in Europa (van der Poel et al., 2001; Clemente Casares et al., 2003), piuttosto che ai ceppi di cinghiale identificati in Giappone (Sonoda et al., 2004, Nishizawa et al., 2005). Questo dato concorda con la constatazione che i ceppi di HEV tendono a formare dei clusters geografici, e che quindi ceppi appartenenti allo stesso territorio sono maggiormente correlati tra loro piuttosto che ceppi di differenti aree geografiche, anche se appartenenti alla stessa specie (van der Poel et al., 2001).

I dati ottenuti in questo studio destano un certo interesse soprattutto per quanto riguarda i cacciatori e le persone addette alla macellazione dei cinghiali del Parco dei Gessi Bolognesi. Essendo molti cinghiali positivi per la ricerca di HEV, è corretto pensare che misure di profilassi più strette devono essere portate avanti da queste persone, e che le carni di questi animali devono essere cotte al cuore, per evitare ogni possibile rischio.

CAPITOLO 11: ESCREZIONE FECALE DI HEV A DIFFERENTI STADI DI PRODUZIONE E NEI LAGONI DI STOCCAGGIO IN UK

Questa indagine è stata condotta nei mesi Aprile-Luglio 2007 presso i laboratori del Veterinary Laboratories Agency di Weybridge (London, UK), sotto la guida del dottor Malcom Banks, con la collaborazione del Royal Veterinary College di Londra, nell'ambito dell'attività formativa della Scuola di Dottorato di Ricerca in Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi.

Sebbene fossero già disponibili informazioni riguardo alla presenza e prevalenza dell'infezione da HEV nella popolazione suina inglese (Levine et al., 2000; Banks et al. 2004a ; Banks et al., 2004b; Dalton et al., 2007b), ulteriori dati relativi alla distribuzione per classe d'età ed eventuale presenza nei vasconi di raccolta dei liquami erano necessari per meglio comprendere l'epidemiologia di questa infezione in UK. In più, l'area dove è stato effettuato il campionamento (Yorkshire e Humberside), che è la maggiore zona di produzione suinicola inglese, non era mai stata precedentemente presa in considerazione ai fini della valutazione della prevalenza di HEV.

11.1 MATERIALI E METODI

11.1.1 Campionamento delle feci

Tra Aprile e Maggio 2007 sono state campionate 10 aziende nell'area Yorkshire e Humberside in UK. I suini erano suddivisi per classi d'età in box, e da ciascun settore sono stati raccolti 5 campioni di feci individuali fresche. Le classi d'età campionate sono state le seguenti:

- Appena svezzati (3-5 settimane)

- Magroni (10-12 settimane)
- Grassi (6 mesi)
- Scrofe in asciutta

Nell'azienda numero 5 non sono stati campionati gli animali grassi.

In tutte le aziende (tranne che nella numero 7) è stato poi raccolto un campione dai vasconi di raccolta dei liquami collocati in prossimità dell'allevamento e destinati, dopo trattamento, ad essere utilizzati per la ferti-irrigazione delle zone circostanti.

Tutti i campioni fecali raccolti sono stati stoccati a -20°C.

11.1.2 Risospensione delle feci

Ciascun campione di feci è stato scongelato a temperatura ambiente. Nel frattempo sono state preparate bottigliette di vetro da 5 ml (bijoux) in numero uguale a quello dei campioni. In ciascuna bottiglietta sono state inserite 6-8 palline di vetro, che avevano lo scopo di rompere meccanicamente gli aggregati di feci e liberare il virus nella sospensione. Ogni bijoux è stato numerato e riempito con 1,8 ml di PBS sterile (0,01M pH 7,2). Sono stati pesati 0,2 grammi di feci per campione ed inseriti nella bottiglietta corrispondente. La miscela è stata poi vortexata per almeno 1 minuto alla massima velocità. Il surnatante è stato raccolto e inserito in una eppendorf da 2 ml sterile, successivamente centrifugata per 2 minuti a 10000 rpm. Il surnatante è stato di nuovo raccolto, trasferito in una eppendorf sterile e stoccato a -80°C.

11.1.3 Estrazione dell'RNA e housekeeping RT PCR

Centoquaranta µl della sospensione fecale sono stati estratti utilizzando il QiaAmp Viral RNA mini kit (Qiagen, Hiden, Germany), seguendo le

istruzioni del produttore. Ogni 5 campioni fecali è stato inserito un campione di acqua sterile, per controllare eventuali cross contaminazioni durante il processo di estrazione.

Per controllare l'avvenuta estrazione dell'RNA in ogni campione, è stata condotta per ogni estrazione una Housekeeping Real Time RT-PCR utilizzando il software MX4000 (STRATAGENE) (vedi **Figura 11.3**). Questo particolare tipo di PCR ha come scopo l'individuazione nel campione estratto del gene codificante per la beta-actina nel genoma del suino. A seguito dell'estrazione, infatti, si ottiene l'RNA totale contenuto nel campione analizzato, quindi anche quello derivante dalle cellule somatiche suine. Il protocollo utilizzato (Duvigneau et al., 2005) era stato ottimizzato per campioni di diversa origine, prevalentemente sangue e siero. La quantità di RNA cellulare suino in questi campioni è sicuramente più elevata, essendovi contenuta una maggiore quantità di cellule. Anche nei campioni fecali, comunque, è stato possibile identificare, anche se in minore quantità, DNA del gene beta-actina suina. Per ogni reazione sono stati utilizzati controlli negativi (acqua sterile) e positivi (campioni di siero suino positivi per beta-actina).

Il kit utilizzato è stato il Superscript III Platinum one step Quantitative RT PCR System (INVITROGEN, USA), ed i primers e il probe (disegnati da Duvigneau et al., 2005):

Beta-actin up 5'CTCGATCATGAAGTGCGACGT

Beta-actin down 5'GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT

Beta-actin probe 5'8ATCAGGAAGGACCTACGCCAACACGG[3BQI]

Il protocollo utilizzato per ciascun campione è stato il seguente:

Reaction mix (2X) 25µl

Magnesium Sulphate (50 mM) 5µl

RNasin RNAase Inhibitor (PROMEGA) 0,25 µl

ROX reference dye (25 µM) 0,1 µl

ssIII/Taq (1 react\µl) 1 µl
Primer up (60 pM/µl) 1 µl
Primer down (60 pM/µl)
Probe (25 pM/µl) 1 µl
acqua 12,65 µl

Alla mix di reazione di ciascun campione sono stati aggiunti 3 µl di RNA e il profilo termico utilizzato è stato il seguente:

50°C per 15 minuti
95°C per 2 minuti
Poi 40 cicli a – 95°C per 15 secondi
 – 60°C per 30 secondi

11.1.4 RT.NESTED PCR

Il cDNA è stato sintetizzato con il seguente protocollo:

3µl first strand buffer (1X)
2µl DDT (12,5 mM)
1µl random hexamers (0,2 µg/µl)
1.8µl dNTP (10 mM)
1.2µl RNAase inhibitor porcine (RNAguard RNAase Inhibitor porcine, AMMERSHAM BIOSCIENCE)
1µl MMLV rev. transcriptase (200 U/µl) (INVITROGEN, USA)

Alla mix di reazione sono stati addizionati 5 µl di RNA e il profilo termico utilizzato è stato il seguente:

22°C per 5 minuti
37°C per 90 minuti

95°C per 5 minuti

Il cDNA è stato amplificato utilizzando il kit QIAGEN fast cycling PCR (QIAGEN, USA). I primers utilizzati per il primo ciclo di amplificazione sono stati i seguenti (Huang et al., 2002), entrambi disegnati sulla regione ORF2 del genoma:

3156N (sense): 5'-AATTATGCYCAGTAYCGBGTKG-3'

3157N (anti-sense): 5'-CCCTTRTCYTGCTGMGCRTTCTC-3'

La mix di reazione utilizzata è stata la seguente:

10 µl PCR mix (2X)

0,2µl primer 3156N (50 µM)

0,2 µl primer 3157N (50µM)

7,6 µl acqua

Alla mix di reazione sono stati aggiunti 3 µl di campione, e il profilo termico utilizzato è stato il seguente:

96°C per 5 minuti

35 cicli per 96°C per 5 secondi

55°C per 5 secondi

75°C per 30 secondi

72°C per 1 minuto

Utilizzando il DNA amplificato nella prima PCR come template, è stata effettuata una seconda amplificazione (nested PCR) utilizzando QIAGEN fast cycling PCR (QIAGEN, USA). I primers utilizzati sono stati i seguenti (Huang et al., 2002):

3158N (sense): 5'-GTWATGCTYTGATWCATGGCTC-3'

3159N (anti-sense): 5'-AGCCGACGAAATCAATTCTCTC-3'

La mix di reazione preparata per ogni campione è stata la seguente:

10 µl PCR mix (2X)
0,5 µl primer 3158 N (20 µM)
0,5 µl primer 3159N (20 µM)
8 µl di acqua

Per ogni campione sono stati addizionati 2 µl di DNA amplificato nella prima reazione ed il profilo termico utilizzato è stato il seguente:

96°C per 5 minuti
45 cicli per 96°C per 5 secondi
 55°C per 5 secondi
 72°C per 15 secondi
72°C per 1 minuto

11.1.5 Sequenziamento ed analisi filogenetica

Alcune delle bande dell'altezza attesa (348bp) sono state tagliate dal gel di agarosio e purificate utilizzando il QIAamp gel purification kit (QIAGEN, USA), seguendo le istruzioni del produttore.

Il DNA purificato è stato quantificato con lo spettrofotometro e sequenziato. Le sequenze ottenute sono state analizzate e allineate utilizzando CLUSTALX (versione 1.81) con altre sequenze di origine umana o suina presenti in GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

L'analisi filogenetica è stata condotta con PHYLIP (versione 3.67) utilizzando DNADIST e NEIGHBOR. Il dendrogramma è stato visualizzato con Treeview (versione 1.6.6).

11.1.6 Analisi statistica

I campioni sono stati divisi in 4 diversi gruppi d'età per valutare gli effetti dell'età sulla prevalenza d'infezione da HEV. I dati sono stati analizzati per verificarne la distribuzione normale, ed in base ai risultati di questa analisi la proporzione di animali positivi è stata valutata usando il test del χ^2 .

Un test ANOVA one way è stato utilizzato per comparare i campioni dei vasconi di raccolta dei liquami positivi o negativi e la prevalenza media dell'allevamento.

Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando il software SPSS per Windows 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

11.2 RISULTATI

In ogni azienda campionata, almeno un campione di feci è risultato positivo per la ricerca di HEV, con una prevalenza aziendale media variabile dal 5% (1/20) al 35% (7/20) (vedi **Tabella 11.1**). La prevalenza complessiva è risultata del 21,5% (43/195). Le prevalenze medie per classe di produzione erano del 26,0%, 44,0%, 7,9% e 6,0% rispettivamente per gli animali di 3-5, 10-12, 22-24 settimane e per le scrofe in asciutta (vedi **Figura 11.1**). Le differenze nelle prevalenze di escrezione tra le varie classi d'età sono risultate statisticamente significative ($p < 0,0001$).

Due dei 9 campioni raccolti nei vasconi di stoccaggio sono risultati positivi per la ricerca del virus (22,2%).

Tutte le sequenze ottenute appartenevano al genotipo 3. L'analisi filogenetica ha indicato che le sequenze tendevano a formare clusters con quelle di altri ceppi sia umani che suini di HEV circolanti in UK (vedi **Figura 11.2**). La sequenza del lagone della azienda numero 3 presentava un'omologia del 100% con un campione di feci individuale ottenuto da un suino dello stesso allevamento. Le sequenze ottenute mostravano tra loro

gradi di omologia variabili dall'86% al 100%, e dell'87%-92% con un ceppo suino identificato nel 2004 (AF503511; Banks et al., 2004a).

Tabella 11.1: Numero di suini positivi per azienda e per classe d'età.

Azienda	categoria produttiva				Totale
	3-5 SettimaneGiovani	10-12 Settimane Magroni	22-24 Settimane Grassi	Scrofe Adulti	
1	2/5	1/5	0/5	0/5	3/20
2	1/5	4/5	1/5	0/5	6/20
3	0/5	2/5	1/5	0/5	3/20
4	0/5	1/5	0/5	0/5	1/20
5	1/5	2/5	N/C	1/5	4/15
6	2/5	2/5	0/5	0/5	4/20
7	0/5	2/5	1/5	1/5	4/20
8	2/5	1/5	1/5	1/5	5/20
9	4/5	3/5	0/5	0/5	7/20
10	1/5	4/5	0/5	0/5	5/20

N/c = non campionati.

Figura 11.1: Rappresentazione grafica della prevalenza media per classe d'età

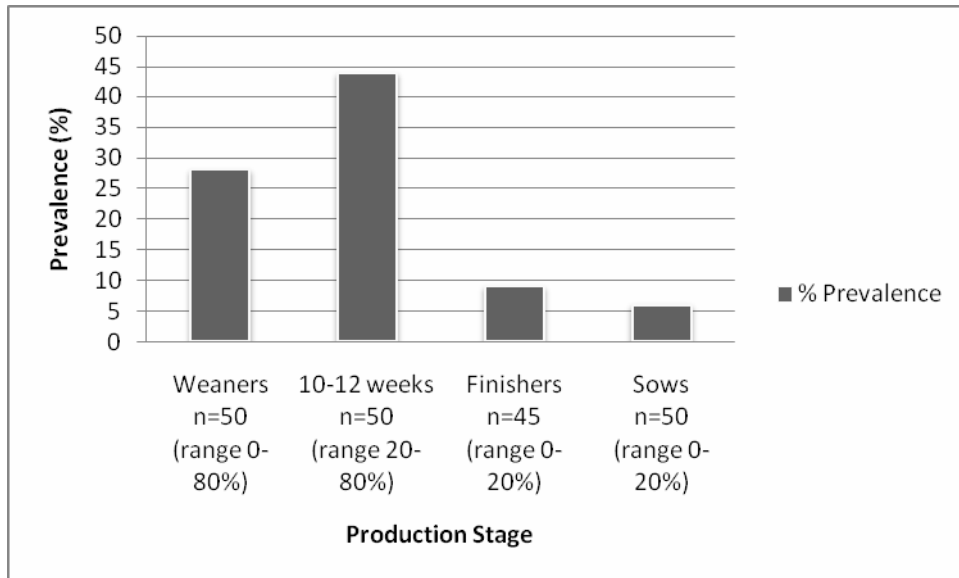


Figura 11.2: Albero filogenetico generato da un frammento di 304bp della regione genomica ORF2. Nell'albero è stato inserito un campione di liquame (63) e campioni individuali di feci provenienti da diverse aziende. Gli altri ceppi inseriti se non specificati sono di origine umana. Avian HEV (AY043166) è stato utilizzato come outgroup.

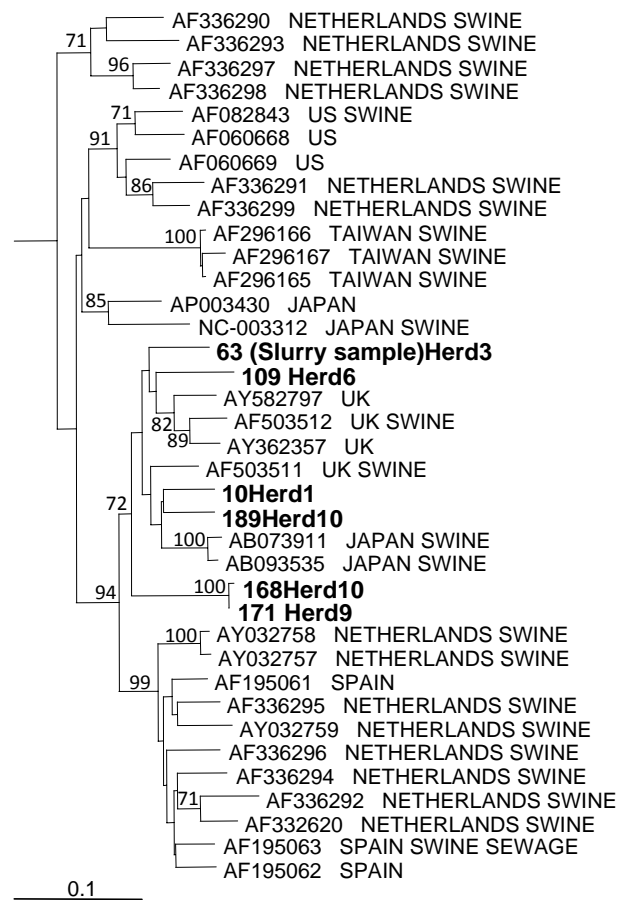
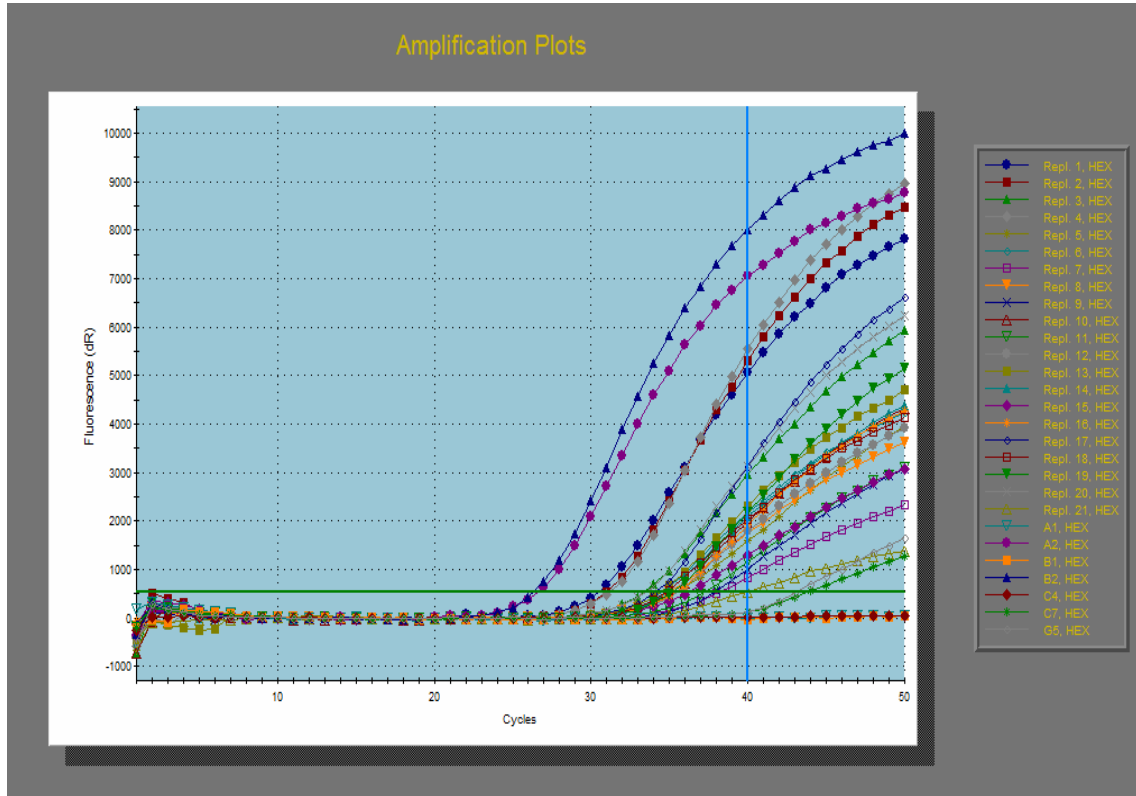


Figura 11.3: Housekeeping PCR Azienda 1

A) Curve di amplificazione dei campioni e dei controlli



B) Schema della distribuzione dei campioni nella piastra (i campioni sono numerati; NTC sono i controlli negativi di estrazione-No Template Control)

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HEX Neg No Ct	HEX Pos+ 26.66	Unknown 30.49	Unknown 35.45	Unknown 34.94	Unknown 37.26	Unknown 36.23	Unknown 34.75				
B	HEX Neg No Ct	HEX Pos+ 26.29										
C			Unknown 31.00	NTC No Ct	Unknown 37.87	Unknown 35.41	NTC No Ct	Unknown 35.13				
D												
E			Unknown 33.39	Unknown 34.47	Unknown 35.13	Unknown 34.37	Unknown 35.40	Unknown 33.43				
F												
G			Unknown 31.15	Unknown 38.13	NTC No Ct	Unknown 34.82	Unknown 34.11					
H								Unknown 39.77				

11.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI

La prevalenza complessiva riscontrata in questa indagine (21,5%) è simile a quella riscontrata in altri studi epidemiologici sull'escrezione di HEV in allevamenti suini. In Spagna una prevalenza del 23,3% è stata riscontrata in 146 campioni fecali raccolti in suini di varie classi d'età (Fernandez-Barredo et al., 2006). In un precedente studio condotto in UK in due aziende, con suini campionati solo ad uno stadio produttivo (animali di 12-15 settimane), la prevalenza riscontrata è stata del 26,19% (Banks et al., 2004b). Negli USA è stata riportata positività virologica nel 26,3% dei suini di 2-4 mesi (Huang et al., 2002), mentre in Nuova Zelanda nel 37,8% di suini di 7-17 settimane (Garavenko et al., 2001). In uno studio spagnolo che aveva riguardato 21 aziende, la prevalenza d'allevamento era stata del 50% (Fernandez-Barredo et al., 2006) e negli Stati Uniti 20 su 37 allevamenti erano risultati positivi in almeno un campione per HEV (Huang et al., 2002). In questo lavoro 10 aziende su 10 sono risultate positive, e questo può essere dovuto al fatto che nei precedenti lavori il numero di allevamenti visitati era stato superiore, ma il numero di campioni per allevamento era stato decisamente inferiore. Comunque una maggiore prevalenza nella zona dello Yorkshire Humberside in UK rispetto ad altri Paesi non può essere esclusa.

In Spagna la più alta prevalenza per classe d'età (60%) è stata trovata nel gruppo dei suini nel primo mese di ingrasso (Fernandez-Barredo et al., 2006). Anche in questo studio la classe d'età con la maggior prevalenza d'infezione è risultata essere quella che comprendeva gli animali di 10-12 settimane (44% di positività). In uno studio condotto in Giappone, poi, (Nakai et al., 2006) è stata riportata una progressiva diminuzione della prevalenza all'aumentare dell'età (da 75-100% nei giovani al 7% nei grassi). Concordemente a questi risultati anche in questo studio si è potuta osservare una progressiva diminuzione delle positività fino ad arrivare all'8,8% dei grassi.

Un altro dato interessante è la positività del 6% delle scrofe (3/50). Nello studio spagnolo (Fernandez-Barredo et al., 2006) il 21,9% delle scrofe testate era risultato positivo. Questi dati difficilmente si sposano con quelli disponibili sulla patogenesi dell'infezione, secondo i quali circa il 100% degli animali in allevamento dovrebbe avere acquisito un'immunità protettiva già a 3 mesi d'età (Meng et al., 1997). Per spiegare la positività nelle scrofe si potrebbe ipotizzare una depressione post-partum del sistema immunitario dell'animale, con conseguente nuova escrezione virale, o una nuova infezione delle madri da parte di suinetti infetti di altre nidiatae.

La classe d'età maggiormente infetta risulta comunque sempre essere quella degli animali dalle 10 alle 12 settimane d'età, quindi lontana dalla macellazione. In termini di rischio sanitario per l'uomo, quindi, questo dato è consolante per quanto riguarda la possibile trasmissione alimentare, ma lascia intatte le preoccupazioni di trasmissione dell'infezione alle categorie professionalmente esposte (veterinari, allevatori, ecc.) (Meng et al., 2002).

Dall'analisi filogenetica risulta inoltre chiaro come gli isolati suini di questo studio siano vicini ad altri ceppi umani e suini identificati in UK precedentemente, e questo dato conferma la tendenza di HEV di costituire dei clusters geografici (Huang et al., 2002). Inoltre questa constatazione rafforza l'ipotesi che il suino possa rappresentare il serbatoio d'infezione di HEV, da cui deriverebbero i casi autoctoni di infezione testimoniati negli ultimi anni in UK (Levine et al., 2000; Banks et al., 2004b; Ijaz et al., 2005; Lewis et al., 2008).

Due dei 9 campioni prelevati dai vasconi di stoccaggio dei liquami in allevamento sono risultati positivi (22,2%). In uno studio condotto negli USA (Kasorndorkbua et al., 2005) 3 campioni sugli 8 prelevati in aziende con simili modalità di stoccaggio dei liquami sono risultati positivi per la presenza di HEV RNA. Uno di questi campioni, utilizzato come inoculo in corso di infezione sperimentale, ha dimostrato di contenere un ceppo virale infettante (Kasorndorkbua et al., 2005). In Spagna sono stati testati liquami non stoccati e in 8 delle 16 aziende campionate è stato possibile rinvenire il virus (Fernandez-Barredo et al., 2006). Il rinvenimento del virus in

campioni di liquami destinati alla fertirrigazione desta qualche preoccupazione in termini di dispersione del patogeno nell'ambiente (El-Esnawy et al., 2000).

CONCLUSIONI

Nel complesso, i dati ottenuti nel corso del lavoro svolto portano a concludere che, in Italia, l'infezione da virus dell'epatite E sia estremamente diffusa sia in termini di allevamenti interessati (prevalenza di aziende infette) sia per quanto riguarda il numero e la tipologia dei capi infetti (prevalenza individuale). E' stata inoltre fornita l'evidenza che l'infezioni circoli anche in popolazioni di animali selvatici (cinghiali).

All'interno degli allevamenti intensivi, tutte le categorie produttive sono interessate dall'infezione, che coinvolge sia gli animali destinati all'ingrasso sia i riproduttori, quindi i soggetti di età più avanzata. Negli animali prossimi alla macellazione è stata dimostrata l'eliminazione per via fecale del virus, mentre in sede di macellazione il genoma di HEV è stato evidenziato anche nel fegato, sito d'elezione della replicazione del virus ma, soprattutto, organo destinato al consumo umano.

A fronte di questa larga diffusione all'interno dell'allevamento suinicolo intensivo, non è stata evidenziata nessuna correlazione tra lo stato clinico dell'animale e eventuale presenza di patologie concomitanti. Ciò potrebbe confermare l'ipotesi, già ampiamente dimostrata, che l'infezione da HEV evolva in modo subclinico, senza apparenti ripercussioni di ordine sanitario e/o produttivo. Questo aspetto è di particolare rilievo in quanto animali infetti ma clinicamente sani vengono inoltrati al macello, inseriti nella filiera produttiva come animali sani e possono essere quindi rappresentare una potenziale fonte di infezione diretta o mediata da cross-contaminazioni, per il consumatore.

L'elevata prevalenza riscontrata esaminando il comparto suinicolo italiano, trova conferma, oltre che dai risultati emersi in altre indagini, anche dalla parte del lavoro svolta nel Regno Unito. Risultato importante di questa parte del lavoro è stata la conferma della presenza di HEV all'interno dei vasconi di stoccaggio aziendale dei liquami. Tale risultato dimostra la presenza di un altro potenziale rischio relativo all'infezione da HEV. In considerazione dell'utilizzo a scopo di fertirrigazione dei liquami non è

possibile escludere la possibile contaminazione delle acque di falda utilizzate sia per gli animali sia per l'uomo e/o la possibile contaminazione di vegetali freschi.

Per quanto riguarda la filogenesi e l'epidemiologia molecolare di HEV, i ceppi virali evidenziati nei diversi studi sono risultati appartenere tutti al genotipo 3. A tale genotipo appartengono (ad oggi) tutti i ceppi di HEV responsabili di infezione nel suino e autoctona dell'uomo, segnalata nei Paesi industrializzati. I ceppi messi in evidenza erano caratterizzati da elevati gradi di omologia nucleotidica rispettivamente, tra loro e 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. Questa osservazione rappresenta una conferma indiretta della possibilità di trasmissione di ceppi virali dal suino all'uomo e quindi il potenziale zoonotico di HEV.

Se si accetta la possibilità di trasmissione zoonotica dell'infezione da virus dell'epatite E (HEV), ormai ampiamente dimostrata, è chiaro che all'aumentare della prevalenza di aziende suinicole infette e della prevalenza negli animali serbatoio, corrisponde un rischio maggiore di trasmissione dell'infezione all'uomo. Approfondire le conoscenze relative all'epidemiologia dei ceppi di HEV nei suini allevati in Italia ed eventualmente in altre specie domestiche o selvatiche e studiare dal punto di vista genetico ed epidemiologico tali virus è quindi il primo importante contributo per stabilire se, anche nel nostro Paese, esiste un problema di sanità pubblica legato alla presenza di HEV in popolazioni animali. In particolare, i rischi per la salute umana sarebbero da ricondurre a due ambiti distinti: a) contatto professionale con animali o carcasse e, b) esposizione accidentale al virus in ambito domestico.

Relativamente al primo punto, particolarmente a rischio sarebbero quelle categorie professionali come allevatori, personale addetto agli animali, macellatori e veterinari che possono venire in contatto con i suini nel periodo di viremia e di escrezione del virus nelle feci. Per tali categorie, non è poi da escludere la possibilità d'infezione per via indiretta attraverso

il contatto con strumenti ed attrezzi da lavoro contaminati dalle feci degli animali.

Relativamente al secondo punto, occorre prendere in considerazione la possibilità di infezione mediata dalla manipolazione o consumo di prodotti di origine suina. In considerazione delle non elevate resistenze del virus alle temperature di cottura appare più probabile che la possibile infezione mediante questa modalità sia rappresentata dalla manipolazione, in condizione di scarso rispetto delle norme igieniche, di prodotti carnei crudi con possibile cross-contaminazione di alimenti da consumarsi crudi o già cotti, o la diffusione di nuove abitudini alimentari (consumo di prodotti crudi di origine animali: sashimi, sushi, ecc.). Altra possibile fonte di infezione da HEV in ambito domestico potrebbe essere rappresentata dalla contaminazione delle acque potabili o delle acque in cui vengono allevati molluschi eduli filtratori utilizzati sempre nell'alimentazione umana. Esiste infatti un possibile rischio di diffusione del virus nell'ambiente attraverso i reflui zootecnici, con conseguente possibile contaminazione dei vegetali e delle acque ad uso potabile.

In conclusione, l'ampia diffusione dell'infezione da HEV riscontrata anche negli allevamenti suini italiani indica la necessità di implementare sistemi di sorveglianza che possano meglio chiarire l'impatto dell'infezione negli allevamenti, i fattori di rischio ad essa correlati, il ruolo che il suino può svolgere come serbatoio d'infezione per l'uomo e le possibili implicazioni per la salute pubblica.

BIBLIOGRAFIA

- Acharya, S. K. and S. K. Panda. 2006. Hepatitis E virus: epidemiology, diagnosis, pathology and prevention. *Trop Gastroenterol* 27:63-8.
- 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. 2000. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol* 15:9-20.
- Aggarwal, R. and S. R. Naik. 1994. Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread. *J Hepatol* 21:718-23.
- Aggarwal, R., H. Shahi, S. Naik, S. K. Yachha, and S. R. Naik. 1997. Evidence in favour of high infection rate with hepatitis E virus among young children in India. *J Hepatol* 26:1425-6.
- Ahn, J. M., N. Rayamajhi, S. Gyun Kang, and H. Sang Yoo. 2006. Comparison of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nested or commercial reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of hepatitis E virus particle in human serum. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56:269-74.
- Amon, J. J., J. Drobeniuc, W. A. Bower, J. C. Magana, M. A. Escobedo, I. T. Williams, B. P. Bell, and G. L. Armstrong. 2006. Locally acquired hepatitis E virus infection, El Paso, Texas. *J Med Virol* 78:741-6.
- Arankalle, V. A., M. S. Chadha, K. Banerjee, M. A. Srinivasan, and L. P. Chobe. 1993. Hepatitis E virus infection in pregnant rhesus monkeys. *Indian J Med Res* 97:4-8.

- 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., M. S. Chadha, and L. P. Chobe. 1999. Long-term serological follow up and cross-challenge studies in rhesus monkeys experimentally infected with hepatitis E virus. *J Hepatol* 30:199-204.
- Arankalle, V. A., M. S. Chadha, L. P. Chobe, R. Nair, and K. Banerjee. 1995. Cross-challenge studies in rhesus monkeys employing different Indian isolates of hepatitis E virus. *J Med Virol* 46:358-63.
- Arankalle, V. A., M. S. Chadha, B. M. Dama, S. A. Tsarev, R. H. Purcell, and K. Banerjee. 1998. Role of immune serum globulins in pregnant women during an epidemic of hepatitis E. *J Viral Hepat* 5:199-204.
- Arankalle, V. A., L. P. Chobe, and M. S. Chadha. 2006. Type-IV Indian swine HEV infects rhesus monkeys. *J Viral Hepat* 13:742-5.
- Arankalle, V. A., L. P. Chobe, M. V. Joshi, M. S. Chadha, B. Kundu, and A. M. Walimbe. 2002. Human and swine hepatitis E viruses from Western India belong to different genotypes. *J Hepatol* 36:417-25.
- Arankalle, V. A., L. P. Chobe, A. M. Walimbe, P. N. Yergolkar, and G. P. Jacob. 2003. Swine HEV infection in south India and phylogenetic analysis (1985-1999). *J Med Virol* 69:391-6.
- Arankalle, V. A., M. V. Joshi, A. M. Kulkarni, S. S. Gandhe, L. P. Chobe, S. S. Rautmare, A. C. Mishra, and V. S. Padbidri. 2001. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hepat* 8:223-7.
- Arankalle, V. A., S. Paranjape, S. U. Emerson, R. H. Purcell, and A. M. Walimbe. 1999. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates

- from India (1976-1993). *J Gen Virol* 80 (Pt 7):1691-700.
- Arankalle, V. A., S. A. Tsarev, M. S. Chadha, D. W. Alling, S. U. Emerson, K. Banerjee, and R. H. Purcell. 1995. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992. *J Infect Dis* 171:447-50.
- Arora, N. K., S. K. Panda, S. K. Nanda, I. H. Ansari, S. Joshi, R. Dixit, and R. Bathla. 1999. Hepatitis E infection in children: study of an outbreak. *J Gastroenterol Hepatol* 14:572-7.
- Aye, T. T., T. Uchida, X. Z. Ma, F. Iida, T. Shikata, H. Zhuang, and K. M. Win. 1992. Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. *Nucleic Acids Res* 20:3512.
- Balayan, M. S. 1993. Hepatitis E virus infection in Europe: regional situation regarding laboratory diagnosis and epidemiology. *Clin Diagn Virol* 1:1-9.
- Balayan, M. S. 1997. Epidemiology of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat* 4:155-65.
- Balayan, M. S., A. G. Andjaparidze, S. S. Savinskaya, E. S. Ketiladze, D. M. Braginsky, A. P. Savinov, and V. F. Poleschuk. 1983. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 20:23-31.
- Balayan, M. S., R. K. Usmanov, N. A. Zamyatina, D. I. Djumalieva, and F. R. Karas. 1990. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol* 32:58-9.
- Banks, M., R. Bendall, S. Grierson, G. Heath, J. Mitchell, and H. Dalton. 2004a. Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 10:953-5.

- Banks, M., S. Grierson, H. J. Fellows, W. Stableforth, R. Bendall, and H. R. Dalton. 2007. Transmission of hepatitis E virus. *Vet Rec* 160:202.
- Banks, M., G. S. Heath, S. S. Grierson, D. P. King, A. Gresham, R. Girones, F. Widen, and T. J. Harrison. 2004b. Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *Vet Rec* 154:223-7.
- Berke, T. and D. O. Matson. 2000. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol* 145:1421-36.
- Boccia, D., J. P. Guthmann, H. Klovstad, N. Hamid, M. Tatay, I. Ciglenecki, J. Y. Nizou, E. Nicand, and P. J. Guerin. 2006. High mortality associated with an outbreak of hepatitis E among displaced persons in Darfur, Sudan. *Clin Infect Dis* 42:1679-84.
- Bouwknegt, M., F. Lodder-Verschoor, W. H. van der Poel, S. A. Rutjes, and A. M. de Roda Husman. 2007. Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. *J Food Prot* 70:2889-95.
- Buti, M., P. Clemente-Casares, R. Jardi, M. Formiga-Cruz, M. Schaper, A. Valdes, F. Rodriguez-Frias, R. Esteban, and R. Girones. 2004. Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J Hepatol* 41:126-31.
- Buti, M., A. Dominguez, P. Plans, R. Jardi, M. Schaper, J. Espunes, N. Cardenosa, F. Rodriguez-Frias, R. Esteban, A. Plasencia, and L. Salleras. 2006. Community-based seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Catalonia, Spain. *Clin Vaccine Immunol* 13:1328-32.

- Buti, M., R. Jardi, M. Cotrina, F. Rodriguez-Frias, H. Troonen, L. Viladomiu, J. I. Esteban, R. Esteban, and J. Guardia. 1995. Hepatitis E virus infection in acute hepatitis in Spain. *J Virol Methods* 55:49-54.
- Cacopardo, B., R. Russo, W. Preiser, F. Benanti, G. Brancati, and A. Nunnari. 1997. Acute hepatitis E in Catania (eastern Sicily) 1980-1994. The role of hepatitis E virus. *Infection* 25:313-6.
- Caprioli, A., F. Martelli, F. Ostanello, I. Di Bartolo, F. M. Ruggeri, L. Del Chiaro, and F. Tolari. 2007. Detection of hepatitis E virus in Italian pig herds. *Vet Rec* 161:422-3.
- Caron, M., V. Enouf, S. C. Than, L. Dellamonica, Y. Buisson, and E. Nicand. 2006. Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J Clin Microbiol* 44:3440-2.
- Chandler, J. D., M. A. Riddell, F. Li, R. J. Love, and D. A. Anderson. 1999. Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet Microbiol* 68:95-105.
- Choi, C. and C. Chae. 2003. Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. *J Hepatol* 38:827-32.
- Choi, C., S. K. Ha, and C. Chae. 2004. Development of nested RT-PCR for the detection of swine hepatitis E virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues and comparison with in situ hybridization. *J Virol Methods* 115:67-71.
- Christoph Renou, J. C. M. B. P. H. D. O. H. R. P. C. Possible zoonotic transmission of hepatitis E from pet pig to its owner. *Emerging Infectious diseases* 13[7], 1094-1096. 2007.
- Clemente-Casares, P., S. Pina, M. Buti, R. Jardi, M. MartIn, S. Bofill-Mas,

- and R. Girones. 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* 9:448-54.
- Cooper, K., F. F. Huang, L. Batista, C. D. Rayo, J. C. Bezanilla, T. E. Toth, and X. J. Meng. 2005. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J Clin Microbiol* 43:1684-8.
- 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. 1996. A waterborne outbreak of hepatitis E virus transmission in southwestern Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 54:559-62.
- Dalton, H. R., H. J. Fellows, E. J. Gane, P. Wong, S. Gerred, B. Schroeder, M. C. Crosson, and O. Garkavenko. 2007a. Hepatitis E in new zealand. *J Gastroenterol Hepatol* 22:1236-40.
- 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. 2007b. Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J Viral Hepat* 14:304-9.
- de Deus, N., B. Peralta, S. Pina, A. Allepuz, E. Mateu, D. Vidal, F. Ruiz-Fons, M. Martin, C. Gortazar, and J. Segales. 2007a. Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet Microbiol*, in press.
- de Deus, N., C. Seminati, S. Pina, E. Mateu, M. Martin, and J. Segales. 2007b. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet Microbiol* 119:105-14.

- De Silva, A. N., A. K. Muddu, J. P. Iredale, N. Sheron, S. I. Khakoo, and E. Pelosi. 2008. Unexpectedly high incidence of indigenous acute hepatitis E within South Hampshire: Time for routine testing? *J Med Virol* 80:283-8.
- Di Bartolo I., Inglese N., Pourshaban M., Martelli F., Caprioli A., Ostanello F., Ruggeri F. M. 2007. Prevalence of hepatitis E virus in Italian pig herds. Atti del settimo international symposium on the epidemiology and control of foodborne pathogens in pork, Verona, Italy, 9-11 Maggio 2007.
- Dohoo IR., Montgomery ME., 1996. A field trial to evaluate a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine: effects on lung lesions and growth rates in swine. *J Anim Sci* 82(5): 299-302.
- Domingo, E., C. Escarmis, N. Sevilla, A. Moya, S. F. Elena, J. Quer, I. S. Novella, and J. J. Holland. 1996. Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J* 10:859-64.
- 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. 2001. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* 184:1594-7.
- Duvigneau, J. C., R. T. Hartl, S. Groiss, and M. Gemeiner. 2005. Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines. *J Immunol Methods* 306:16-27.
- El-Esnawy, N. A. 2000. Examination for hepatitis E virus in wastewater treatment plants and workers by nested RT-PCR and ELISA. *J Egypt Public Health Assoc* 75:219-31.
- Emerson, S. U., V. A. Arankalle, and R. H. Purcell. 2005. Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis* 192:930-3.

- Emerson, S. U., P. Clemente-Casares, N. Moiduddin, V. A. Arankalle, U. Torian, and R. H. Purcell. 2006. Putative neutralization epitopes and broad cross-genotype neutralization of Hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay. *J Gen Virol* 87:697-704.
- Emerson, S. U. and R. H. Purcell. 2003. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 13:145-54.
- Emerson, S. U. and R. H. Purcell. 2007. Hepatitis E. *Pediatr Infect Dis J* 26:1147-8.
- Engle, R. E., C. Yu, S. U. Emerson, X. J. Meng, and R. H. Purcell. 2002. 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* 40:4576-80.
- Enouf, V., G. Dos Reis, J. P. Guthmann, P. J. Guerin, M. Caron, V. Marechal, and E. Nicand. 2006. Validation of single real-time TaqMan PCR assay for the detection and quantitation of four major genotypes of hepatitis E virus in clinical specimens. *J Med Virol* 78:1076-82.
- Erker, J. C., S. M. Desai, and I. K. Mushahwar. 1999a. Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. *J Virol Methods* 81:109-13.
- Erker, J. C., S. M. Desai, G. G. Schlauder, G. J. Dawson, and I. K. Mushahwar. 1999b. A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J Gen Virol* 80 (Pt 3):681-90.
- Fabrizi, F., G. Lunghi, G. Bacchini, M. Corti, A. Pagano, and F. Locatelli. 1997. Hepatitis E virus infection in haemodialysis patients: a

- seroepidemiological survey. *Nephrol Dial Transplant* 12:133-6.
- Farci, P., A. Shimoda, A. Coiana, G. Diaz, G. Peddis, J. C. Melpolder, A. Strazzer, D. Y. Chien, S. J. Munoz, A. Balestrieri, R. H. Purcell, and H. J. Alter. 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 288:339-44.
- Fauquet C.M., M. M. A. M. J. D. V. B. L. A. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. 853-857. 2005.
- Favorov, M. O., M. Y. Kosoy, S. A. Tsarev, J. E. Childs, and H. S. Margolis. 2000. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J Infect Dis* 181:449-55.
- Feagins, A. R., T. Opriessnig, D. K. Guenette, P. G. Halbur, and X. J. Meng. 2007. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol* 88:912-7.
- Feagins, A. R., T. Opriessnig, D. K. Guenette, P. G. Halbur, and X. J. Meng. 2008. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol* 123 (1-2): 32-37.
- Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian, R. H. Purcell, H. J. Alter, and P. V. Holland. 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 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. 2007. Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs. *Can J Vet Res* 71:236-40.
- Fernandez-Barredo, S., C. Galiana, A. Garcia, S. Vega, M. T. Gomez, and

- M. T. Perez-Gracia. 2006. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 18:462-5.
- Fix, A. D., M. Abdel-Hamid, R. H. Purcell, M. H. Shehata, F. Abdel-Aziz, N. Mikhail, H. el Sebai, M. Nafeh, M. Habib, R. R. Arthur, S. U. Emerson, and G. T. Strickland. 2000. Prevalence of antibodies to hepatitis E in two rural Egyptian communities. *Am J Trop Med Hyg* 62:519-23.
- Fodor, D., A. Katai, G. Reuter, Z. Maszarovics, and E. Menyharth. 2005. Endemic hepatitis E infections in South-East Hungary. *Orv Hetil* 146:2311-5.
- Garkavenko, O., A. Obriadina, J. Meng, D. A. Anderson, H. J. Benard, B. A. Schroeder, Y. E. Khudyakov, H. A. Fields, and M. C. Crosson. 2001. Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J Med Virol* 65:525-9.
- Goens, S. D. and M. L. Perdue. 2004. Hepatitis E viruses in humans and animals. *Anim Health Res Rev* 5:145-56.
- Grandadam, M., S. Tebbal, M. Caron, M. Siriwardana, B. Larouze, J. L. Koeck, Y. Buisson, V. Enouf, and E. Nicand. 2004. Evidence for hepatitis E virus quasispecies. *J Gen Virol* 85:3189-94.
- Grieco, A., L. Miele, G. Gasbarrini, and R. Grillo. 2001. Sporadic HEV hepatitis in Italy. *Gut* 48:580.
- Gyarmati, P., N. Mohammed, H. Norder, J. Blomberg, S. Belak, and F. Widen. 2007. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. *J Virol Methods* 146:226-35.

- Ha, S. K. and C. Chae. 2004. Immunohistochemistry for the detection of swine hepatitis E virus in the liver. *J Viral Hepat* 11:263-7.
- 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. 2001. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol* 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. 2002. 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* 83:2201-9.
- Haqshenas, G., H. L. Shivaprasad, P. R. Woolcock, D. H. Read, and X. J. Meng. 2001. 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* 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. 2006b. Evidence that rodents are a reservoir of hepatitis E virus for humans in Nepal. *J Clin Microbiol* 44:1208.
- Herremans, M., E. Duizer, E. Jusic, and M. P. Koopmans. 2007a. Detection of hepatitis E virus-specific immunoglobulin a in patients infected with hepatitis E virus genotype 1 or 3. *Clin Vaccine Immunol* 14:276-80.
- Herremans, M., H. Vennema, J. Bakker, B. van der Veer, E. Duizer, C. A.

- Benne, K. Waar, B. Hendrixks, P. Schneeberger, G. Blaauw, M. Kooiman, and M. P. Koopmans. 2007b. Swine-like hepatitis E viruses are a cause of unexplained hepatitis in the Netherlands. *J Viral Hepat* 14:140-6.
- Hirano, M., X. Ding, T. C. Li, N. Takeda, H. Kawabata, N. Koizumi, T. Kadosaka, I. Goto, T. Masuzawa, M. Nakamura, K. Taira, T. Kuroki, T. Tanikawa, H. Watanabe, and K. Abe. 2003a. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol Res* 27:1-5.
- Hirano, M., X. Ding, H. T. Tran, T. C. Li, N. Takeda, T. Sata, S. Nakamura, and K. Abe. 2003b. Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn J Infect Dis* 56:8-11.
- Hsieh, S. Y., X. J. Meng, Y. H. Wu, S. T. Liu, A. W. Tam, D. Y. Lin, and Y. F. Liaw. 1999. 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* 37:3828-34.
- Huang, C. C., D. Nguyen, J. Fernandez, K. Y. Yun, K. E. Fry, D. W. Bradley, A. W. Tam, and G. R. Reyes. 1992. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 191:550-8.
- Huang, F. F., G. Haqshenas, D. K. Guenette, P. G. Halbur, S. K. Schommer, F. W. Pierson, T. E. Toth, and X. J. Meng. 2002. 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* 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. 2004. 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* 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. 2005. Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis* 192:1166-72.
- Inoue, J., M. Takahashi, K. Ito, T. Shimosegawa, and H. Okamoto. 2006a. Analysis of human and swine hepatitis E virus (HEV) isolates of genotype 3 in Japan that are only 81-83 % similar to reported HEV isolates of the same genotype over the entire genome. *J Gen Virol* 87:2363-9.
- Inoue, J., M. Takahashi, Y. Yazaki, F. Tsuda, and H. Okamoto. 2006b. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J Virol Methods* 137:325-33.
- Ippagunta, S. K., S. Naik, B. Sharma, and R. Aggarwal. 2007. Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. *J Med Virol* 79:1827-31.
- Jameel, S. 1999. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert Rev Mol Med* 1999:1-16.
- Jary, C. 2005. Hepatitis E and meat carcasses. *Br J Gen Pract* 55:557-8.
- Jothikumar, N., T. L. Cromeans, B. H. Robertson, X. J. Meng, and V. R.

- Hill. 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131:65-71.
- Jung, K., B. Kang, D. S. Song, and C. Chae. 2007. Prevalence and genotyping of hepatitis E virus in swine population in Korea between 1995 and 2004: a retrospective study. *Vet J* 173:683-7.
- Kaci, S., K. Nockler, and R. Johne. 2008. Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. *Vet Microbiol.*128 (3-4): 380-5.
- Kasorndorkbua, C., D. K. Guenette, F. F. Huang, P. J. Thomas, X. J. Meng, and P. G. Halbur. 2004. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clin Microbiol* 42:5047-52.
- Kasorndorkbua, C., P. G. Halbur, P. J. Thomas, D. K. Guenette, T. E. Toth, and X. J. Meng. 2002. Use of a swine bioassay and a RT-PCR assay to assess the risk of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Virol Methods* 101:71-8.
- Kasorndorkbua, C., T. Opriessnig, F. F. Huang, D. K. Guenette, P. J. Thomas, X. J. Meng, and P. G. Halbur. 2005. Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking. *Appl Environ Microbiol* 71:7831-7.
- Kasorndorkbua, C., B. J. Thacker, P. G. Halbur, D. K. Guenette, R. M. Buitenwerf, R. L. Royer, and X. J. Meng. 2003. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can J Vet Res* 67:303-6.
- Khuroo, M. S., S. Kamili, and S. Jameel. 1995. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* 345:1025-6.

- Khuroo, M. S., M. R. Teli, S. Skidmore, M. A. Sofi, and M. I. Khuroo. 1981. Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am J Med* 0:252-5.
- Koonin, E. V., A. E. Gorbalenya, M. A. Purdy, M. N. Rozanov, G. R. Reyes, and D. W. Bradley. 1992. 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 U S A* 89:8259-63.
- Krawczynski, K. 1993. Hepatitis E. *Hepatology* 17:932-41.
- Krawczynski, K., R. Aggarwal, and S. Kamili. 2000. Hepatitis E. *Infect Dis Clin North Am* 14:669-87.
- Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjoback, B. Sjogreen, L. Strombom, A. Stahlberg, and N. Zoric. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27:95-125.
- Kuno, A., K. Ido, N. Isoda, Y. Satoh, K. Ono, S. Satoh, H. Inamori, K. Sugano, N. Kanai, T. Nishizawa, and H. Okamoto. 2003a. Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus. *Hepatology* 26:237-242.
- Kwo, P. Y., G. G. Schlauder, H. A. Carpenter, P. J. Murphy, J. E. Rosenblatt, G. J. Dawson, E. E. Mast, K. Krawczynski, and V. Balan. 1997. Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin Proc* 72:1133-6.
- Labrique, A. B., D. L. Thomas, S. K. Stoszek, and K. E. Nelson. 1999. Hepatitis E: an emerging infectious disease. *Epidemiol Rev* 21:162-79.
- Leblanc, D., P. Ward, M. J. Gagne, E. Poitras, P. Muller, Y. L. Trottier, C.

- Simard, and A. Houde. 2007. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *Int J Food Microbiol* 117:160-6.
- Lee, S. H., S. C. Kang, D. Y. Kim, J. H. Bae, and J. H. Kim. 2007. Detection of swine hepatitis E virus in the porcine hepatic lesion in Jeju Island. *J Vet Sci* 8:51-5.
- Levine, D. F., R. P. Bendall, and C. G. Teo. 2000. Hepatitis E acquired in the UK. *Gut* 47:740.
- Lewis, H., D. Morgan, S. Ijaz, and E. Boxall. 2006. Indigenous hepatitis E virus infection in England and Wales. *BMJ* 332:1509-10.
- Lewis, H. C., S. Boisson, S. Ijaz, K. Hewitt, S. L. Ngui, E. Boxall, C. G. Teo, and D. Morgan. 2008. Hepatitis E in England and Wales. *Emerg Infect Dis* 14:165-7.
- 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. 2006a. Seroprevalence of hepatitis E virus infection, rural southern People's Republic of China. *Emerg Infect Dis* 12:1682-8.
- Li, S. W., J. Zhang, Z. Q. He, S. X. Ge, Y. Gu, J. Lin, R. S. Liu, and N. S. Xia. 2002. The study of aggregate of the ORF2 peptide of hepatitis E virus expressed in *Escherichia coli*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 18:463-7.
- Li, T. C., K. Chijiwa, N. Sera, T. Ishibashi, Y. Etoh, Y. Shinohara, Y. Kurata, M. Ishida, S. Sakamoto, N. Takeda, and T. Miyamura. 2005a. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 11:1958-60.
- Li, T. C., M. Saito, G. Ogura, O. Ishibashi, T. Miyamura, and N. Takeda. 2006b. Serologic evidence for hepatitis E virus infection in

- mongoose. *Am J Trop Med Hyg* 74:932-6.
- Li, T. C., N. Takeda, T. Miyamura, Y. Matsuura, J. C. Wang, H. Engvall, L. Hammar, L. Xing, and R. H. Cheng. 2005b. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol* 79:12999-3006.
- Li, X., S. Kamili, and K. Krawczynski. 2006c. Quantitative detection of hepatitis E virus RNA and dynamics of viral replication in experimental infection. *J Viral Hepat* 13:835-9.
- Lu, J., H. Zhao, and Q. Mong. 2001. Detection of anti-HAV IgM and anti-HEV IgM in patients with sporadic acute hepatitis in Beijing between 1995-2000. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 15:157-9.
- Lu, L., C. Li, and C. H. Hagedorn. 2006. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 16:5-36.
- Magden, J., N. Takeda, T. Li, P. Auvinen, T. Ahola, T. Miyamura, A. Merits, and L. Kaariainen. 2001. Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *J Virol* 75:6249-55.
- Malcolm, P., H. Dalton, H. S. Hussaini, and J. Mathew. 2007. The histology of acute autochthonous hepatitis E virus infection. *Histopathology* 51:190-4.
- Mansuy, J. M., J. M. Peron, F. Abravanel, H. Poirson, M. Dubois, M. Miedouge, F. Vischi, L. Alric, J. P. Vinel, and J. Izopet. 2004. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol* 74:419-24.
- Martelli, F., A. Caprioli, M. Zengarini, A. Marata, C. Fiegna, I. Di Bartolo, F. M. Ruggeri, M. Delogu, and F. Ostanello. 2008. Detection of

- Hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet Microbiol* 126:74-81.
- Martin, M., J. Segales, F. F. Huang, D. K. Guenette, E. Mateu, N. de Deus, and X. J. Meng. 2007. Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs. *Vet Microbiol* 122:16-24.
- Masuda, J., K. Yano, Y. Tamada, Y. Takii, M. Ito, K. Omagari, and S. Kohno. 2005. Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepato Res* 31:178-83.
- Mateos, M. L., A. Molina, J. L. Patier, and V. Moreira. 2005. [Sporadic hepatitis E in Spain: study of 9 autochthonous and 3 imported cases]. *Med Clin (Barc)* 125:118-9.
- Matsuda, H., K. Okada, K. Takahashi, and S. Mishiro. 2003. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 188:944.
- Matsuura, Y., M. Suzuki, K. Yoshimatsu, J. Arikawa, I. Takashima, M. Yokoyama, H. Igota, K. Yamauchi, S. Ishida, D. Fukui, G. Bando, M. Kosuge, H. Tsunemitsu, C. Koshimoto, K. Sakae, M. Chikahira, S. Ogawa, T. Miyamura, N. Takeda, and T. C. Li. 2007. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152:1375-81.
- Meky, F. A., S. K. Stoszek, M. Abdel-Hamid, S. Selim, A. Abdel-Wahab, N. Mikhail, S. El-Kafrawy, M. El-Daly, F. Abdel-Aziz, S. Sharaf, M. K. Mohamed, R. E. Engle, S. U. Emerson, R. H. Purcell, A. D. Fix, and G. T. Strickland. 2006. Active surveillance for acute viral hepatitis in rural villages in the Nile Delta. *Clin Infect Dis* 42:628-33.

- Melenhorst, W. B., Y. L. Gu, W. J. Jaspers, and A. H. Verhage. 2007. Locally acquired hepatitis E in the Netherlands: associated with the consumption of raw pig meat? *Scand J Infect Dis* 39:454-6.
- Meng, J., X. Dai, J. C. Chang, E. Lopareva, J. Pillot, H. A. Fields, and Y. E. Khudyakov. 2001. Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology* 288:203-11.
- Meng, X. J. 2000. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis? *J Hepatol* 33:842-5.
- Meng, X. J. 2003. Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Curr Top Microbiol Immunol* 278:185-216.
- 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. 1998a. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol* 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. 1998b. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 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. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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. 2002. 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* 40:117-22.
- Michitaka, K., K. Takahashi, S. Furukawa, G. Inoue, Y. Hiasa, N. Horiike, M. Onji, N. Abe, and S. Mishiro. 2007. Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan. *Hepatol Res* 37:214-20.
- Mizuo H., Suzuki K., Takikawa Y., Sugai Y., Tokita H., Akahane Y., Itoh K., Gotanda Y., Takahashi M., Nishizawa T., Okamoto H., 2002. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin. Microbiol.*40 (9): 3209-18.
- Mochizuki, M., A. Ouchi, K. Kawakami, T. Ishida, T. C. Li, N. Takeda, H. Ikeda, and H. Tsunemitsu. 2006. Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet Rec* 159:853-4.
- Montella, F., G. Rezza, F. Di Sora, P. Pezzotti, and O. Recchia. 1994. Association between hepatitis E virus and HIV infection in homosexual men. *Lancet* 344:1433.
- Munne, M. S., S. Vladimirovsky, L. Otegui, R. Castro, L. Brajterman, S. Soto, E. Guarnera, V. Molina, M. Monfellano, G. G. Schlauder, and J. E. Gonzalez. 2006. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol* 78:1579-83.
- Nakai, I., K. Kato, A. Miyazaki, M. Yoshii, T. C. Li, N. Takeda, H. Tsunemitsu, and H. Ikeda. 2006. Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis E virus at three Japanese swine farms. *Am J Trop Med Hyg* 75:1171-7.
- Nakamura, M., K. Takahashi, K. Taira, M. Taira, A. Ohno, H. Sakugawa,

- M. Arai, and S. Mishiro. 2006. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res* 34:137-40.
- Ning, H., Z. Niu, R. Yu, P. Zhang, S. Dong, and Z. Li. 2007. Identification of genotype 3 hepatitis E virus in fecal samples from a pig farm located in a Shanghai suburb. *Vet Microbiol* 121:125-30.
- Ning, H., S. Yu, Y. Zhu, S. Dong, R. Yu, S. Shen, Z. Niu, and Z. Li. 2008. Genotype 3 hepatitis E has been widespread in pig farms of Shanghai suburbs. *Vet Microbiol* 126:257-263.
- Nishizawa, T., M. Takahashi, K. Endo, S. Fujiwara, N. Sakuma, F. Kawazuma, H. Sakamoto, Y. Sato, M. Bando, and H. Okamoto. 2005. Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J Gen Virol* 86:3321-6.
- Nishizawa, T., M. Takahashi, H. Mizuo, H. Miyajima, Y. Gotanda, and H. Okamoto. 2003. Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99 % identity over the entire genome. *J Gen Virol* 84:1245-51.
- Okamoto, H. 2008. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res*.127(2): 216-218.
- Okamoto, H., M. Takahashi, and T. Nishizawa. 2003. Features of hepatitis E virus infection in Japan. *Intern Med* 42:1065-71.
- Okamoto, H., M. Takahashi, T. Nishizawa, K. Fukai, U. Muramatsu, and A. Yoshikawa. 2001. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 289:929-36.
- Okamoto, H., M. Takahashi, T. Nishizawa, R. Usui, and E. Kobayashi.

2004. Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats. *Infection* 32:57-8.
- Olsen, B., D. Axelsson-Olsson, A. Thelin, and O. Weiland. 2006. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand J Infect Dis* 38:55-8.
- Oncu, S., S. Oncu, P. Okyay, S. Ertug, and S. Sakarya. 2006. Prevalence and risk factors for HEV infection in pregnant women. *Med Sci Monit* 12:CR36-39.
- Orru, G., G. Masia, G. Orru, L. Romano, V. Piras, and R. C. Coppola. 2004. Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *J Virol Methods* 118:77-82.
- Panda, S. K., I. H. Ansari, H. Durgapal, S. Agrawal, and S. Jameel. 2000. The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious. *J Virol* 74:2430-7.
- Panda, S. K., D. Thakral, and S. Rehman. 2007. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 17:151-80.
- Pavia, M., E. Iiritano, M. A. Veratti, and I. F. Angelillo. 1998. Prevalence of hepatitis E antibodies in healthy persons in southern Italy. *Infection* 26:32-5.
- Pei, Y. and D. Yoo. 2002. Genetic characterization and sequence heterogeneity of a canadian isolate of Swine hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 40:4021-9.
- Perez-Gracia, M. T., M. L. Mateos, C. Galiana, S. Fernandez-Barredo, A. Garcia, M. T. Gomez, and V. Moreira. 2007. Autochthonous Hepatitis E Infection in a Slaughterhouse Worker. *Am J Trop Med Hyg* 77:893-896.

- 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. 2007. Liver histology in patients with sporadic acute hepatitis E: a study of 11 patients from South-West France. *Virchows Arch* 450:405-10.
- Peron, J. M., J. M. Mansuy, H. Poirson, C. Bureau, E. Dupuis, L. Alric, J. Izopet, and J. P. Vinel. 2006. Hepatitis E is an autochthonous disease in industrialized countries. Analysis of 23 patients in South-West France over a 13-month period and comparison with hepatitis A. *Gastroenterol Clin Biol* 30:757-62.
- Pina, S., M. Buti, M. Cotrina, J. Piella, and R. Girones. 2000. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* 33:826-33.
- Pina, S., J. Jofre, S. U. Emerson, R. H. Purcell, and R. Girones. 1998. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol* 64:4485-8.
- Preiss, J. C., A. Plentz, E. Engelmann, T. Schneider, W. Jilg, M. Zeitz, and R. Duchmann. 2006. Autochthonous hepatitis E virus infection in Germany with sequence similarities to other European isolates. *Infection* 34:173-5.
- Purcell, R. H. 1996. pp. 283143 . Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Purdy, M. A., K. A. McCaustland, K. Krawczynski, J. Spelbring, G. R. Reyes, and D. W. Bradley. 1993. Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus (HEV). *J Med Virol* 41:90-4.

- Rehman, S., N. Kapur, H. Durgapal, and S. K. Panda. 2008. Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase. *Virology* 370:77-92.
- Renou, C., J. 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* 13[7], 1094-1096. 2007.
- Reuter, G., D. Fodor, A. Katai, and G. Szucs. 2006. Identification of a novel variant of human hepatitis E virus in Hungary. *J Clin Virol* 36:100-2.
- Reyes, G. R. 1993. Hepatitis E virus (HEV): molecular biology and emerging epidemiology. *Prog Liver Dis* 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. 1990. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247:1335-9.
- Reyes, G. R., P. O. Yarbough, A. W. Tam, M. A. Purdy, C. C. Huang, J. S. Kim, D. W. Bradley, and K. E. Fry. 1991. Hepatitis E virus (HEV): the novel agent responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Gastroenterol Jpn* 26 Suppl 3:142-7.
- Robson, S. C., S. Adams, N. Brink, B. Woodruff, and D. Bradley. 1992. Hospital outbreak of hepatitis E. *Lancet* 339:1424-5.
- Romano, L., E. Tanzi, and A. Zanetti. 1999. The role of HEV in acute non-A, non-C hepatitis and the identification of a new variant HEV in Italy. *Ann Ig* 11:451-9.
- Rutjes, S. A., W. J. Lodder, M. Bouwknegt, and A. M. de Roda Husman.

2007. Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *J Virol Methods* 143:112-6.
- Saad, M. D., H. A. Hussein, M. M. Bashandy, H. H. Kamel, K. C. Earhart, D. J. Fryauff, M. Younan, and A. H. Mohamed. 2007. Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. *Infect Genet Evol* 7:368-73.
- Sadler, G. J., G. F. Mells, N. H. Shah, I. M. Chesner, and R. P. Walt. 2006. UK acquired hepatitis E--An emerging problem? *J Med Virol* 78:473-5.
- Sainokami, S., K. Abe, I. Kumagai, A. Miyasaka, R. Endo, Y. Takikawa, K. Suzuki, H. Mizuo, Y. Sugai, Y. Akahane, Y. Koizumi, Y. Yajima, and H. Okamoto. 2004. Epidemiological and clinical study of sporadic acute hepatitis E caused by indigenous strains of hepatitis E virus in Japan compared with acute hepatitis A. *J Gastroenterol* 39:640-8.
- Sanchez, G., A. Bosch, G. Gomez-Mariano, E. Domingo, and R. M. Pinto. 2003. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* 315:34-42.
- Satou, K. and H. Nishiura. 2007. Transmission dynamics of hepatitis E among swine: potential impact upon human infection. *BMC Vet Res* 3:9.
- Schlauder, G. G., G. J. Dawson, J. C. Erker, P. Y. Kwo, M. F. Knigge, D. L. Smalley, J. E. Rosenblatt, S. M. Desai, and I. K. Mushahwar. 1998. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 79 (Pt 3):447-56.
- Schlauder, G. G., S. M. Desai, A. R. Zanetti, N. C. Tassopoulos, and I. K.

- Mushahwar. 1999. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol* 57:243-51.
- Schlauder, G. G. and I. K. Mushahwar. 2001. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol* 65:282-92.
- Schneider, W. L. and M. J. Roossinck. 2001. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *J Virol* 75:6566-71.
- Sedyaningsih-Mamahit, E. R., R. P. Larasati, K. Laras, A. Sidemen, N. Sukri, N. Sabaruddin, S. Didi, J. M. Saragih, K. S. Myint, T. P. Endy, A. Sulaiman, J. R. Campbell, and A. L. Corwin. 2002. First documented outbreak of hepatitis E virus transmission in Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96:398-404.
- Segales, J., G. M. Allan, and M. Domingo. 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 6:119-42.
- Seminati, C., E. Mateu, B. Peralta, N. de Deus, and M. Martin. 2008. Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J* 175(1): 130-2.
- Seow, H. F., N. M. Mahomed, J. W. Mak, M. A. Riddell, F. Li, and D. A. Anderson. 1999. Seroprevalence of antibodies to hepatitis E virus in the normal blood donor population and two aboriginal communities in Malaysia. *J Med Virol* 59:164-8.
- Shrestha, S. M., S. Shrestha, F. Tsuda, T. Nishizawa, Y. Gotanda, N. Takeda, and H. Okamoto. 2003. Molecular investigation of hepatitis E virus infection in patients with acute hepatitis in Kathmandu, Nepal. *J Med Virol* 69:207-14.
- Shukla, P., U. K. Chauhan, S. Naik, D. Anderson, and R. Aggarwal. 2007.

- Hepatitis E virus infection among animals in northern India: an unlikely source of human disease. *J Viral Hepat* 14:310-7.
- Singh, S., A. Mohanty, Y. K. Joshi, D. Deka, S. Mohanty, and S. K. Panda. 2003. Mother-to-child transmission of hepatitis E virus infection. *Indian J Pediatr* 70:37-9.
- Siochu , Froesner , Tassis , Kyriakis , Alexopoulos , and Kyriakis . First report of the prevalence of anti-hepatitis E virus (anti-HEV) IgG in blood serum of blood donors, slaughtermen and swine farmers in Greece. Proceedings 18th International Pig Veterinary Society (IPVS) congress 1, 367. 2004.
- Smith, H. M., R. Reporter, M. P. Rood, A. J. Linscott, L. M. Mascola, W. Hogrefe, and R. H. Purcell. 2002. Prevalence study of antibody to ratborne pathogens and other agents among patients using a free clinic in downtown Los Angeles. *J Infect Dis* 186:1673-6.
- Sonoda, H., M. Abe, T. Sugimoto, Y. Sato, M. Bando, E. Fukui, H. Mizuo, M. Takahashi, T. Nishizawa, and H. Okamoto. 2004. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol* 42:5371-4.
- Stroffolini, T., M. Menchinelli, V. Dambrosio, F. Menniti Ippolito, A. Costantino, M. Rapicetta, R. Lecce, and G. Taliani. 1996. Prevalence of hepatitis E in a central Italian town at high endemicity for hepatitis C virus. *Ital J Gastroenterol* 28:523-5.
- Tahan, V., O. Ozdogan, and N. Tozun. 2003. Epidemiology of viral hepatitis in the Mediterranean basin. *Rocz Akad Med Bialymst* 48:11-7.
- Takahashi, K., J. H. Kang, S. Ohnishi, K. Hino, and S. Mishiro. 2002.

Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis. *J Infect Dis* 185:1342-5.

Takahashi, K., N. Kitajima, N. Abe, and S. Mishiro. 2004. 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* 330:501-5.

Takahashi, M., T. Nishizawa, H. Miyajima, Y. Gotanda, T. Iita, F. Tsuda, and H. Okamoto. 2003. Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol* 84:851-62.

Takahashi, M., T. Nishizawa, A. Yoshikawa, S. Sato, N. Isoda, K. Ido, K. Sugano, and H. Okamoto. 2002. Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not travelled abroad. *J Gen Virol* 83:1931-40.

Takahashi, M., T. Tanaka, M. Azuma, E. Kusano, T. Aikawa, T. Shibayama, Y. Yazaki, H. Mizuo, J. Inoue, and H. Okamoto. 2007. Prolonged fecal shedding of hepatitis E virus (HEV) during sporadic acute hepatitis E: evaluation of infectivity of HEV in fecal specimens in a cell culture system. *J Clin Microbiol* 45:3671-9.

Tam, A. W., M. M. Smith, M. E. Guerra, C. C. Huang, D. W. Bradley, K. E. Fry, and G. R. Reyes. 1991. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185:120-31.

Tam, A. W., R. White, E. Reed, M. Short, Y. Zhang, T. R. Fuerst, and R. E. Lanford. 1996. In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes. *Virology* 215:1-9.

- Tam, A. W., R. White, P. O. Yarbough, B. J. Murphy, C. P. McAtee, R. E. Lanford, and T. R. Fuerst. 1997. In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* 238:94-102.
- Tamada, Y., K. Yano, H. Yatsunami, O. Inoue, F. Mawatari, and H. Ishibashi. 2004. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* 40:869-70.
- Tanaka, T., M. Takahashi, E. Kusano, and H. Okamoto. 2007. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* 88:903-11.
- 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. 2006. Molecular tracing of Japan-indigenous hepatitis E viruses. *J Gen Virol* 87:949-54.
- Tassopoulos, N. C., K. Krawczynski, A. Hatzakis, A. Katsoulidou, I. Delladetsima, M. G. Koutelou, and D. Trichopoulos. 1994. Case report: role of hepatitis E virus in the etiology of community-acquired non-A, non-B hepatitis in Greece. *J Med Virol* 42:124-8.
- Tei, S., N. Kitajima, S. Ohara, Y. Inoue, M. Miki, T. Yamatani, H. Yamabe, S. Mishiro, and Y. Kinoshita. 2004. 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* 74:67-70.
- Tei, S., N. Kitajima, K. Takahashi, and S. Mishiro. 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362:371-3.
- Teo, C. G. 2006. Hepatitis E indigenous to economically developed countries: to what extent a zoonosis? *Curr Opin Infect Dis* 19:460-6.

- Teo, C. G. 2007. The two clinico-epidemiological forms of hepatitis E. *J Viral Hepat* 14:295-7.
- Vaidya, S. R., S. D. Chitambar, and V. A. Arankalle. 2002. Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *J Hepatol* 37:131-6.
- Vaidya, S. R., B. N. Tilekar, A. M. Walimbe, and V. A. Arankalle. 2003. Increased risk of hepatitis E in sewage workers from India. *J Occup Environ Med* 45:1167-70.
- van Cuyck-Gandre, H., H. Y. Zhang, S. A. Tsarev, R. L. Warren, J. D. Caudill, N. J. Snellings, L. Begot, B. L. Innis, and C. F. Longer. 2000. Short report: phylogenetically distinct hepatitis E viruses in Pakistan. *Am J Trop Med Hyg* 62:187-9.
- van Cuyck, H., J. Fan, D. L. Robertson, and P. Roques. 2005. Evidence of recombination between divergent hepatitis E viruses. *J Virol* 79:9306-14.
- van der Poel, W. H., F. Verschoor, R. van der Heide, M. I. Herrera, A. Vivo, M. Kooreman, and A. M. de Roda Husman. 2001. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 7:970-6.
- Vicente, J., J. Segales, U. Hofle, M. Balasch, J. Plana-Duran, M. Domingo, and C. Gortazar. 2004. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Res* 35:243-53.
- Vishwanathan. Infectious Hepatitis in Delhi (1955-1956). *Indian Journal of Medical Research* 45, 49-58. 1957.
- Vital, C. L., M. A. Pinto, L. L. Lewis-Ximenez, Y. E. Khudyakov, D. R. dos Santos, and A. M. Gaspar. 2005. Serological evidence of

- hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:117-22.
- Vulcano, A., M. Angelucci, E. Candelori, V. Martini, A. M. Patti, C. Mancini, A. L. Santi, A. Calvani, L. Casagni, and A. Lamberti. 2007. HEV prevalence in the general population and among workers at zoonotic risk in Latium Region. *Ann Ig* 19:181-6.
- Waar, K., M. M. Herremans, H. Vennema, M. P. Koopmans, and C. A. Benne. 2005. Hepatitis E is a cause of unexplained hepatitis in The Netherlands. *J Clin Virol* 33:145-9.
- Wang, L. and H. Zhuang. 2004. Hepatitis E: an overview and recent advances in vaccine research. *World J Gastroenterol* 10:2157-62.
- Wang, W. K., S. R. Lin, C. M. Lee, C. C. King, and S. C. Chang. 2002. Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies. *J Virol* 76:4662-5.
- Wang, Y., R. Ling, J. C. Erker, H. Zhang, H. Li, S. Desai, I. K. Mushahwar, and T. J. Harrison. 1999. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 80 (Pt 1):169-77.
- Wang, Y. C., H. Y. Zhang, N. S. Xia, G. Peng, H. Y. Lan, H. Zhuang, Y. H. Zhu, S. W. Li, K. G. Tian, W. J. Gu, J. X. Lin, X. Wu, H. M. Li, and T. J. Harrison. 2002. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J Med Virol* 67:516-21.
- Watanobe, T., N. Okumura, N. Ishiguro, M. Nakano, A. Matsui, M. Sahara, and M. Komatsu. 1999. Genetic relationship and distribution of the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) and Ryukyu wild boar (*Sus scrofa riukiuanus*) analysed by mitochondrial DNA. *Mol Ecol*

8:1509-12.

- Wei, S., P. Walsh, R. Huang, and S. S. To. 2000. 93G, a novel sporadic strain of hepatitis E virus in South China isolated by cell culture. *J Med Virol* 61:311-8.
- Wibawa, I. D., D. H. Muljono, Mulyanto, I. G. Suryadarma, F. Tsuda, M. Takahashi, T. Nishizawa, and H. Okamoto. 2004. 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* 73:38-44.
- Williams, T. P., C. Kasorndorkbua, P. G. Halbur, G. Haqshenas, D. K. Guenette, T. E. Toth, and X. J. Meng. 2001. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol* 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. 2002. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am J Trop Med Hyg* 66:384-8.
- Wolinsky, S. M., B. T. Korber, A. U. Neumann, M. Daniels, K. J. Kunstman, A. J. Whetsell, M. R. Furtado, Y. Cao, D. D. Ho, and J. T. Safrit. 1996. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* 272:537-42.
- Wong, D. C., R. H. Purcell, M. A. Sreenivasan, S. R. Prasad, and K. M. Pavri. 1980. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* 2:876-9.
- Worm, H. C., H. Wurzer, and G. Frosner. 1998. Sporadic hepatitis E in Austria. *N Engl J Med* 339:1554-5.

- Wu, J. C., I. J. Sheen, T. Y. Chiang, W. Y. Sheng, Y. J. Wang, C. Y. Chan, and S. D. Lee. 1998. The impact of traveling to endemic areas on the spread of hepatitis E virus infection: epidemiological and molecular analyses. *Hepatology* 27:1415-20.
- Xing, L., K. Kato, T. Li, N. Takeda, T. Miyamura, L. Hammar, and R. H. Cheng. 1999. Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes. *Virology* 265:35-45.
- Yazaki, Y., H. Mizuo, M. Takahashi, T. Nishizawa, N. Sasaki, Y. Gotanda, and H. Okamoto. 2003. 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* 84:2351-7.
- Yoo, D. and A. Giulivi. 2000. Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine viruses. *Can J Vet Res* 64:193-203.
- Yoo, D., P. Willson, Y. Pei, M. A. Hayes, A. Deckert, C. E. Dewey, R. M. Friendship, Y. Yoon, M. Gottschalk, C. Yason, and A. Giulivi. 2001. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:1213-9.
- Yu, C., C. Zimmerman, R. Stone, R. E. Engle, W. Elkins, G. A. Nardone, S. U. Emerson, and R. H. Purcell. 2007. Using improved technology for filter paper-based blood collection to survey wild Sika deer for antibodies to hepatitis E virus. *J Virol Methods* 142:143-50.
- Zanetti, A. R. and G. J. Dawson. 1994. Hepatitis type E in Italy: a seroepidemiological survey. Study Group of Hepatitis E. *J Med Virol* 42:318-20.

- Zanetti, A. R., G. G. Schlauder, L. Romano, E. Tanzi, P. Fabris, G. J. Dawson, and I. K. Mushahwar. 1999. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol* 57:356-60.
- Zhang, F., X. Li, Z. Li, T. J. Harrison, H. Chong, S. Qiao, W. Huang, H. Zhang, H. Zhuang, and Y. Wang. 2006. Detection of HEV antigen as a novel marker for the diagnosis of hepatitis E. *J Med Virol* 78:1441-8.
- Zhang, M., S. U. Emerson, H. Nguyen, R. Engle, S. Govindarajan, W. C. Blackwelder, J. Gerin, and R. H. Purcell. 2002. Recombinant vaccine against hepatitis E: duration of protective immunity in rhesus macaques. *Vaccine* 20:3285-91.
- Zhang, M., S. U. Emerson, H. Nguyen, R. E. Engle, S. Govindarajan, J. L. Gerin, and R. H. Purcell. 2001. Immunogenicity and protective efficacy of a vaccine prepared from 53 kDa truncated hepatitis E virus capsid protein expressed in insect cells. *Vaccine* 20:853-7.
- Zhang, W., Q. Shen, J. Mou, Z. B. Yang, C. L. Yuan, L. Cui, J. G. Zhu, X. G. Hua, C. M. Xu, and J. Hu. 2007. Cross-species infection of hepatitis E virus in a zoo-like location, including birds. *Epidemiol Infect* 1-7.
- Zhao, C., Z. Li, B. Yan, T. J. Harrison, X. Guo, F. Zhang, J. Yin, Y. Yan, and Y. Wang. 2007. Comparison of real-time fluorescent RT-PCR and conventional RT-PCR for the detection of hepatitis E virus genotypes prevalent in China. *J Med Virol* 79:1966-73.
- Zheng, Y., S. Ge, J. Zhang, Q. Guo, M. H. Ng, F. Wang, N. Xia, and Q. Jiang. 2006. Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. *J Infect Dis* 193:1643-9.
- Zuckerman, J. N. 2003. Hepatitis E and the traveller. *Travel Med Infect Dis*

1:73-76.