

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ZOOTECNICHE E
ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

SEZIONE DI ISPEZIONE

TESI DI DOTTORATO IN

Produzione e Sanità degli alimenti di origine animale

- XXII ciclo -

**EPATITE E: UNA ZONOSI EMERGENTE.
IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE
DEL VIRUS IN ALLEVAMENTI SUINICOLI
DEL SUD ITALIA**

TUTOR

Prof.ssa Teresa Sarli

Prof. Adriano Santoro

CANDIDATA

Dott.ssa Ester Maione

COORDINATORE

Prof.ssa M.L.Cortesi

ANNI ACCADEMICI 2006- 2009

a Teresa Sarli

INDICE

Riassunto.....	12
Abstract.....	15
INTRODUZIONE.....	18
CAPITOLO 1: EZIOLOGIA.....	22
Cenni storici.....	22
Classificazione tassonomica.....	26
Caratteri del virus.....	28
▪ <i>Organizzazione</i>	
<i>genomica.....</i>	<i>30</i>
▪ <i>Genotipi virali.....</i>	<i>34</i>
▪ <i>Ciclo replicativo.....</i>	<i>38</i>
- <i>Spettro d'ospite invitro.....</i>	<i>42</i>
- <i>Spettro d'ospite in vivo.....</i>	<i>43</i>
CAPITOLO 2: EPIDEMIOLOGIA.....	46
EPIDEMIOLOGIA NELL'UOMO.....	46
Caratteristiche dell'infezione nei Paesi in via di	
sviluppo.....	50

-Vie di trasmissione dell'infezione nei Paesi in via di sviluppo.....50

-Fattori di rischio correlati all'infezione nei paesi in via di sviluppo.....53

Caratteristiche dell'infezione nei paesi industrializzati.....51

-Modalità d'acquisizione dell'infezione nei paesi industrializzati.....59

-Fattori di rischio correlati all'infezione nei Paesi industrializzati.....61

EPIDEMIOLOGIA NELLE SPECIE ANIMALI RECETTIVE ALL'IFEZIONE.....63

L'infezione negli animali.....63

HEV nel suino.....67

Altre specie recettive.....74

Roditori.....74

Pollame.....76

CAPITOLO 3: PATOLOGIA E

SINTOMATOLOGIA.....78

MALATTIA NELL’UOMO.....78

Patogenesi nell’uomo.....78

Caratteristiche cliniche.....86

Aspetti istopatologici.....93

Prognosi e profilassi.....95

MALATTIA NEL SUINO.....99

Patogenesi nel suino.....99

Aspetti clinici.....104

CAPITOLO 4:DIAGNOSI DI

INFEZIONE DA HEV.....109

Diagnosi clinica.....109

Tecniche di diagnostica diretta:

Microscopia elettronica.....111

Polymerase Chain Reaction(PCR).....112

PCR qualitativa.....112

PCR quantitativa.....116

Coltivazione in culture cellulari.....118

Tecniche istopatologiche.....120

Tecniche di diagnostica indiretta.....121

CAPITOLO 5: HEV COME ZONOSI...124

Possibilità di infezione interspecifica.....128

Il rischio zoonotico.....134

**Casi di trasmissione alimentare nel
mondo...144**

Contatto con animali e reflui infetti.....	147
---	------------

SEZIONE SPERIMENTALE

CAPITOLO 6: SCOPO DELLA TESI.....	150
--	------------

CAPITOLO 7: MATERIALI E METODI.....	154
--	------------

<i>Raccolta dei campioni.....</i>	<i>154</i>
--	-------------------

<i>-Prelievo campioni fecali.....</i>	<i>156</i>
---------------------------------------	------------

<i>-Prelievo campioni di fegato e siero.....</i>	<i>156</i>
--	------------

<i>- Ripartizione sul territorio degli allevamenti sottoposti ad analisi.....</i>	<i>157</i>
---	------------

Preparazione dei campioni.....162

Estrazione dell'RNA virale.....164

Retrotrascrizione dell'RNA virale...167

Amplificazione del cDNA.....170

RT-PCR one-tube e nested-PCR...174

SEQUENZIAMENTO E ANALISI FILOGENETICA....178

**SEPARAZIONE ELETTROFORETICA SU GEL
DI POLIACRILAMMIDE (SDS-PAGE) E
WESTERN BLOTTING.....180**

CAPITOLO 8 : RISULTATI.....182

Risultati campioni fecali.....182

Risultati fegati analizzati.....189

Ricerca di anticorpi anti-HEV in sieri suini...	191
SEQUENZIAMENTO ED ANALISI FILOGENETICA..	193
CAPITOLO 9 : DISCUSSIONE DEI RISULTATI	
E CONCLUSIONI.....	197
Bibliografia.....	211
Ringraziamenti.....	244

RIASSUNTO

Il virus HEV è l'agente eziologico dell'epatite E, una forma acuta di epatite infettiva diffusa un po' in tutto il mondo. La malattia è causata da un piccolo RNA virus a singolo filamento privo di envelope, classificato in un genere separato come Hepevirus. L'infezione da HEV rappresenta un serio problema di sanità pubblica nei paesi in via di sviluppo dove ha carattere endemico ed è primariamente trasmesso per via oro-fecale. Negli ultimi anni, un certo numero di casi sporadici è stato descritto anche nei paesi industrializzati, Italia inclusa. L'HEV nel suino fu identificato per la prima volta nel 1997 ed ora è considerato un virus ubiquitario. In Italia, HEV umano è stato isolato per la prima volta nel 1999, mentre l'infezione nel suino è stata riportata nel 2006. L'infezione da HEV nel suino è asintomatica; nell'uomo il virus provoca epatite acuta epidemica nei Paesi in via di sviluppo e casi sporadici in Paesi industrializzati. Le caratteristiche cliniche dell'epatite E sono simili a quelle dell'epatite A. La malattia presenta un periodo di incubazione variabile tra le tre e le nove settimane, e ciò ne rende, talvolta, difficile l'identificazione. I sintomi sono simil influenzali ed includono: febbre, stanchezza, ittero, e disordini gastrointestinali. La diagnosi è basata sui segni clinici ed è poi confermata sierologicamente. L'infezione non cronicizza e non vi è nessuna evidenza di trasmissione

sessuale. La mortalità complessiva è dal 0.5-4% , quindi lievemente più elevata rispetto all'epatite A. Tuttavia, la malattia può essere molto pericolosa per le donne in gravidanza, in cui la mortalità è talvolta più elevata del 25%. E' stata dimostrata un'elevata sieroprevalenza in persone che vivono a stretto contatto con animali infetti rispetto alla popolazione di controllo. Molti autori ipotizzano che il virus abbia tendenza ad endemizzare modificandosi geneticamente ed adattandosi all'ambiente in cui vive. Le sequenze umane e suine isolate nella stessa area geografica presentano un'elevata omologia nucleotidica ed infezioni sperimentali dimostrano la possibilità di trasmissione crociata di ceppi suini all'uomo e di ceppi umani a primati non-umani. Il virus è stato isolato in vari animali selvatici e domestici, inclusi pollo, suino, ratto cervo, cinghiale ed altri. La trasmissione di HEV da suino all'uomo tramite l'ingestione di carne infetta è stata già dimostrata. Perciò si presume che il suino possa rappresentare una fonte di infezione per l'uomo. Dei casi umani di epatite E sono stati attribuiti al consumo di carne cruda o inadeguatamente cotta proveniente da animali HEV positivi. Casi recenti di HEV, in Giappone, sono stati associati all'ingestione di carne cruda o poco cotta di maiale, cinghiale o cervo ed oggi la malattia è considerata una zoonosi emergente. In questo studio è stata svolta una piccola sintesi sulle

conoscenza epidemiologiche e virologiche sull' infezioni da HEV. Inoltre è stata investigata la presenza dell'infezione di HEV in diversi allevamenti suinicoli del sud-Italia. Sono stati raccolti 101 campioni fecali da 11 differenti fattorie dislocate nella regioni di Napoli, Benevento, Foggia e Potenza. I campioni fecali sono stati prelevati da un pool di feci provenienti da animali di età compresa tra due ed otto mesi. Successivamente , al macello, sono stati raccolti 10 campioni di fegato e 13 campioni di siero da animali provenienti da uno degli allevamenti dove è stata rilevata una forte prevalenza del virus. L'analisi dei campioni è stata effettuata mediante PCR per i campioni fecali e di fegato e mediante Western Blotting per i campioni di siero. I risultati hanno indicato una forte presenza del virus nella maggior parte degli allevamenti esaminati. La prevalenza riportata è stata del 79,2% per i campioni fecali, del 30% per i campioni di fegato, del 69,2% per i campioni di siero. Alcuni amplificati virali, dei campioni positivi, sono stati sequenziati e messi a confronto con quelli disponibili in banche dati. I risultati dell'analisi filogenetica hanno indicato che l'HEV suino isolato negli allevamenti del sud-Italia presenta un elevato grado di omologia con isolati suini ed umani di origine europea.

Parole chiave: virus dell'epatite E, zoonosi, sud-italia.

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is the etiologic agent of hepatitis E, the most common form of acute infectious hepatitis worldwide. The disease is caused by a small, non-enveloped single-stranded RNA virus classified as the separate genus Hepevirus. Hepatitis E Virus (HEV) infection represents an important public health problem in developing countries where it is frequently epidemic and primarily transmitted by the faecal-oral route. In the last few years, a certain number of sporadic cases have been also described in industrialized countries, Italy included. Swine HEV was first identified in 1997 and is now considered an ubiquitous virus. In Italy, human HEV has been isolated for the first time in 1999, while the infection in the swine has been reported in 2006. HEV infection in swine is asymptomatic; in humans the virus causes hepatitis E epidemics in the developing world and sporadic cases in developed Countries. The clinical characteristics of hepatitis E are similar to those of hepatitis A. The incubation period is three to nine weeks, which can render detection of a common source problematic. Symptoms and signs include fever, fatigue, jaundice, and gastrointestinal complaints. Diagnosis on the basis of clinical signs is confirmed by specific serologic assay. Chronic infection is not known to occur, and there is no evidence of sexual

transmission. Overall mortality is 0.5-4%, which is only slightly higher than that of hepatitis A. However, the disease can be dangerous for pregnant women, whose mortality rates from hepatitis E approach 25%. Seroprevalence is higher in people living in close contact with infected animals than in control population. All that leads to hypothesize that the virus has the tendency to endemize, transform his genetic outfit according to the environment in which he lives. The sequences of human and swine isolates of identical geographical origin are highly homologous and in experimental infections, the possibility of cross-species transmission of swine strains to humans and of human strains to non-human primates has been demonstrated. Strains have been isolated from various wild and domestic animals, including chickens, swine, rats, deer, boars, and others. Therefore, the transmission of HEV from swine to man through ingestion of infected meat has been ascertained. Therefore it is assumed that swine may represent a source of infection for humans. Some cases of human hepatitis E have resulted from the consumption of raw or inadequately cooked meats that were contaminated with animal HEV strains. Recently in Japan, cases of HEV hepatitis have been directly associated to the ingestion of uncooked tissues from pigs, wild boar or deer and today the disease is considered an emerging zoonosis.

In this study has been introduced a small synthesis of the virological and epidemiological knowledge on HEV infections. Moreover we have investigated the presence of HEV infection in different swine farms in sud-Italy. 101 fecal samples were collected from 11 different farms located in the region of Napoli, Benevento, Foggia and Potenza. Fecal samples represented pools of feces from animals of age between two and eight months. Subsequently, at the abattoir, were collected 10 samples of liver and 13 samples of serum of animals coming from a farm where a great prevalence of the virus has been found. The analysis have been performed by PCR on fecal and liver samples and by western blotting on serum samples. The results showed that the virus is present in more of the examined farms. The prevalence has been reported of 79,2% for the fecal samples, of 30% for the liver samples, of 69,2% for the serum samples. Several amplified fragments were sequenced and phylogenetic analysis was performed. The results indicated that the swine HEV isolates from sud-italian farm share a high degree of homology with European published human and swine HEV sequences.

Key words : *hepatitis E virus, zoonosis, sud-Italy*

Introduzione

Gli alimenti possono essere causa della trasmissione all'uomo di vari agenti patogeni di natura batterica o virale, provocando l'insorgenza di manifestazioni patologiche diverse, che, nonostante i progressi fatti nel settore della prevenzione, rappresentano ancora un serio problema di sanità pubblica.

Recentemente, la sicurezza alimentare è divenuto uno dei punti di maggiore interesse della sanità pubblica a causa dei modificati sistemi di approvvigionamento degli alimenti (catene alimentari più lunghe che in passato), alla modifica della popolazione esposta a rischi acquisibili con il cibo (aumento dei soggetti in condizioni critiche, di immunodepressione e maggiore suscettibilità), alla modifica dei comportamenti sociali (ricorso alla ristorazione collettiva), alle mutate condizioni ambientali (modifiche di nicchie ecologiche) (Salmaso et al.2001;Crocì et al.2001).

Le modificazioni sociali dell'ultimo secolo hanno, infatti, reso più facile l'emergenza o la riemergenza di nuovi patogeni: la crescita della popolazione mondiale e la migrazione, insieme alla facilità di spostarsi da un continente all'altro, creano le condizioni per un simile fenomeno. A ciò va aggiunto che la diffusione del commercio internazionale, unitamente alle mutate abitudini alimentari, è stata una delle cause che

maggiormente ha contribuito alla diffusione delle malattie trasmesse da alimenti e alle zoonosi.

E' importante rilevare che l'incidenza delle tossinfezioni alimentari e delle zoonosi, trasmissibili all'uomo attraverso gli alimenti o il contatto diretto, causate da patogeni emergenti è in costante aumento. A favorire questo fenomeno esiste un processo di continuo miglioramento delle tecniche diagnostiche e una più ampia applicazione dei metodi epidemiologici soprattutto nello studio degli eventi epidemici.

Uno degli aspetti importanti di questo gruppo di infezioni è la loro relazione con l'ambiente animale. Il serbatoio naturale di diversi microrganismi è costituito da animali che nel loro stato di portatori non manifestano necessariamente sintomi di malattia.

Anche questo fattore rende più difficile il controllo e la prevenzione di queste infezioni. In questi casi la collaborazione tra epidemiologi, clinici, microbiologi e veterinari deve mirare allo scopo di mettere in atto un approccio integrato per la risoluzione del problema.

Spesso la rilevanza della patologia è legata non tanto all'agente specifico o al quadro clinico che questo provoca, quanto alla modalità con cui la malattia viene acquisita. In effetti spesso la malattia trasmessa da alimenti viene riconosciuta o sospettata solo in base al quadro clinico del paziente. Per alcuni quadri clinici esiste una consolidata letteratura medica che li

riconduce ad uno specifico agente eziologico, ma in altri casi non è così o talvolta malattie con sintomatologia simile, possono essere facilmente confuse soprattutto se non indagate. Infatti molto spesso l'incidenza globale di una tossinfezione o di una zoonosi è difficile da stimare anche perché un enorme parte di episodi non arriva all'attenzione del medico o non viene segnalata.

Circa il 75% delle nuove malattie che hanno afflitto l'uomo negli ultimi dieci anni sono causate da patogeni derivati dagli animali o da prodotti di origine animale.

Come si legge nella presentazione della sezione di salute pubblica veterinaria dell'OMS "La salute umana è inestricabilmente legata alla salute e alla produzione animale". Questo legame tra uomo, popolazioni animali e ambiente, è particolarmente stretto nelle regioni sottosviluppate dove gli animali sono mezzi di trasporto, forniscono calore, energia e nutrimento.

Sia nei Paesi sviluppati che in quelli in via di sviluppo, tuttavia, questo legame può portare gravi rischi per la salute pubblica con serie conseguenze economiche.

Sempre l'OSM riporta che in un anno (nel 1998) circa 2,2 milioni di persone tra cui 1,8 milioni di bambini, sono morti per malattie diarroiche. La maggior parte di questi decessi è correlabile ad infezioni acquisite con gli alimenti o l'acqua.

Le malattie alimentari in particolare, oltre a produrre mortalità causano un danno commerciale, hanno un riflesso negativo sulle attività legate al turismo e possono essere fonte di controversie.

Dati epidemiologici e clinici dimostrano che i virus stanno assumendo una crescente importanza come causa di malattie trasmesse con gli alimenti, nonostante ci sia ragione di credere che il numero di eventi patologici rappresentati da gastroenteriti ed epatiti virali sia ancora sottostimato, non solo in Italia ma anche nel resto del mondo.

Alla luce di queste premesse abbiamo intrapreso una ricerca sull'Epatite E, ormai considerata una nuova zoonosi emergente non solo in molti Paesi in via di sviluppo, ma anche in quelli industrializzati.

CAPITOLO 1: **EZIOLOGIA**

Cenni storici

L'epatite virale è una malattia che ha afflitto l'umanità fin dall'antichità, il riconoscimento come malattia, viene storicamente collocato nel V secolo a.c. per merito di Ippocrate, che riconobbe nell'ittero un'entità patologica che poteva manifestarsi anche in forma epidemica.

Le prime ipotesi sulla natura infettiva dell'epatite virale, frequentemente descritta nelle cronache medioevali, specie durante i periodi bellici, possono farsi risalire al VIII secolo d.c., epoca in cui furono segnalate forme di ittero ritenute contagiose.

Virchow, nella seconda metà del 19° secolo suppose che tale malattia fosse la conseguenza di una infiammazione a livello duodenale che comportava un'alterazione del deflusso epatico per occlusione della papilla del Vater, solo dopo la I guerra mondiale a seguito di studi post-mortem si osservarono le alterazioni epatiche.

Nel 1947, Mc Callum sulla base delle osservazioni che trasse dai propri studi identificò due distinte modalità di trasmissione, enterica e parenterale, e propose di indicare le rispettive forme di infezioni con i termini di epatite A ed epatite B.

Egli infatti identificò due distinte modalità di trasmissione, enterica e parenterale, e propose di indicare le rispettive forme di infezione con i termini di epatite A e epatite B (Bradlet et al.,1994). Negli anni '70, Blumberg scopre il virus dell'epatite B e da allora si susseguono una serie di scoperte che portano all'identificazione di nuovi virus epatotropici. Oggi i virus epatitici ben definiti sono: il virus dell'epatite A (HAV), dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV), dell'epatite D (delta), dell'epatite E (HEV) e dell'epatite G (HGV) .

I virus epatitici A ed E si trasmettono per via oro-fecale e causano una forma di epatite ad andamento acuto-subacuto; i virus epatitici B, C, D e G si trasmettono per via parenterale e parenterale inapparente e possono essere responsabili di una malattia cronica che può evolvere verso la cirrosi epatica e l' adenocarcinoma epatico. Circa il 10-20% delle epatiti acquisite per via enterica o parenterale, l' agente eziologico rimane ignoto.

Diversi virus sono stati chiamati in causa per spiegare la quota di epatiti non legate ai classici virus, anche se al momento mancano delle conferme sperimentali.

Il virus dell'epatite E (HEV) è l' agente eziologico della principale forma di epatite acuta sporadica nei Paesi in via di sviluppo, dove può essere responsabile

anche di epidemie che insorgono attraverso la contaminazione delle sorgenti idriche.

L'epatite E è stata riconosciuta come patologia distinta solo nel 1980 in India, quando test sierologici per la diagnosi dell'epatite A e B furono applicati a campioni umani conservati durante precedenti epidemie di epatite conseguente a contaminazione idrica. La maggiore di queste occorse a Nuova Delhi dal 1955 al 1956 in seguito alla contaminazione fecale del più grande impianto di trattamento delle acque. Tali epidemie erano molto simili a quelle causate dall'infezione da HAV dal punto di vista clinico, ma fu coinvolta principalmente la popolazione dei giovani adulti (Balayan et al.,1993), e questo rappresentava un dato straordinario tenendo conto che in India, come in altri Paesi a basso livello socio-economico, la prevalenza di anticorpi nei confronti del virus dell'epatite A può raggiungere anche il 100% fra i bambini. I test diagnostici applicati esclusero che si trattasse di una epidemia da epatite A, e quindi si ipotizzò la presenza di un nuovo virus.

Questa nuova malattia fu denominata epatite trasmessa per via enterica non A, non-B.

L'agente fu riconosciuto come nuovo virus epatotropo con gli studi condotti da Balayan nel 1983.

Un volontario che in passato aveva già contratto

l'epatite A ingerì una sospensione di materiale fecale proveniente da un paziente infetto e dopo circa due settimane sviluppò un'epatite acuta. Le particelle virali furono evidenziate tramite microscopia elettronica nelle feci del volontario e la trasmissione fu riprodotta successivamente dall'uomo a scimmie del genere *cynomolgus*, stabilendo il ruolo eziologico di HEV nell'epatite non A non B non C epidemica. A causa delle difficoltà della coltivazione *in vitro* di HEV, le conoscenze sulle sue caratteristiche biologiche sono rimaste per lungo tempo scarse. Recentemente il virus dell'Epatite E è stato clonato e sequenziato completamente e la conoscenza della caratterizzazione del suo genoma ha reso possibile l'allestimento di test diagnostici da utilizzare nella routine diagnostica e quindi lo studio delle caratteristiche epidemiologiche e clinico-evolutive di tale forma di epatite virale .

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

Classificazione tassonomica

Dopo la prima identificazione del virus tramite il microscopio elettronico, avvenuta nel 1983, fu suggerito di inserire il virus nella famiglia dei Picornaviridae (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 codificanti. In seguito al clonaggio ed al sequenziamento completo del primo ceppo di Hev (Burna strains), HEV fu inserito provvisoriamente in un genere separato della famiglia Caliciviridae, sulla base della loro somiglianza in termini di organizzazione genomica e di caratteristiche morfologiche (Tam et al., 1991). Questa classificazione era stata ipotizzata a seguito dell'analisi della regione genomica codificante la proteina capsidica. Considerando invece le regioni genomiche codificanti la proteina capsidica. Considerando invece le regioni genomiche per l'elicasi e la polimerasi, più conservate rispetto a quella presa in considerazione precedentemente, i ceppi di epatite E sono stati esclusi dalla famiglia delle Caliciviridae (Berke and Matson, 2000). Inoltre, l'osservazione che HEV possiede all'estremità 5' del genoma virale un cap mentre i Calicivirus presentano una VPg, ha portato alla successiva esclusione di HEV dalla

famiglia delle Caliciviridae. 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 and Matson, 2000). Come conseguenza di ciò, il Comitato Internazionale per la Tassonomia dei Virus (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses) ha classificato il virus dell'epatite E come unico membro di un genere separato denominato Hepevirus (da H epatitis E virus) nella famiglia delle hepeviridae (Fauquet, 2005).

Caratteri del virus.

Caratteri Fisici, chimici, biologici.

Si tratta di un virus di forma sferica con simmetria icosaedrica di 27-34 nm di diametro, sprovvisto di envelope con una molecola di RNA (ss+ RNA_v) a singolo filamento a polarità positiva che ha capacità di agire direttamente da mRNA.



Il coefficiente di sedimentazione in saccarosio è di 165S e la densità in tartrato di potassio è di $1,29\text{g/cm}^3$. Le caratteristiche morfologiche lo rendono non facilmente distinguibile da altri virus enterici come il virus Norwalk, un membro della famiglia *Caliciviridae*. E' inattivato, dal processo di cottura, dalle temperature di refrigerazione e dalle soluzioni con concentrazione salina elevata (CsCl). Può essere conservato poiché resiste alle temperature di

congelamento, risulta rapidamente degradato quando è congelato-scongelato. Nei campioni congelati l'HEV, resiste al trasporto se avviene in ghiaccio secco (CO₂ solida, -70°C), o in N₂ liquido (-120°C). I virioni rimangono inalterati dopo l'esposizione a trifluorotrichloroethane (*Emerson et al.,2004*), mentre vengono inattivati a seguito all'esposizione a sostanze a base di cloro e di iodio, o al trattamento in autoclave dell'acqua. Il virus è sensibile alla degradazione proteolitica operata dagli enzimi .

Per quanto riguarda la resistenza del virus al calore, esistono due diversi studi a riguardo. In un primo studio è stata comparata la stabilità termica di diversi ceppi di HEV tramite incubazioni di sospensioni fecali del virus a differenti temperature, successiva infezione in culture cellulari permissive. Il primo testato (AKluj strain, appartenente al genotipo 1 e proveniente da un paziente indiano affetto da epatite virale) veniva inattivato completamente a 56°C. il secondo ceppo (Sar 55 strain, appartenente al genotipo 1) si era dimostrato più stabile a 56°C ma veniva inattivato per più dell'80% a 60%. Il terzo ceppo (Mex 14 strain, appartenente al genotipo 2) veniva inattivato per il 50% a 56°C e per il 96% a 60°C. Sebbene HEV si è dimostrato meno stabile al calore rispetto al virus dell'epatite A, alcuni ceppi di HEV potrebbero

sopravvivere alle temperature interne della carne non adeguatamente cotta(Emerson et al.,2005).

Nel secondo studio (Feagins et al., 2008) è stata valutata la possibilità di inattivare con il calore il virus presente in fegati suini. Sono state utilizzate tre diverse combinazioni di temperatura e tempo, associate a differenti tipologie di cottura: 56°C per 1 ora (cottura in acqua), 191°C per 5 minuti (cottura in olio) e 100°C per 5 minuti (bollitura). Tramite successive infezioni sperimentali di maiali sani per via intravenosa, è stato dimostrato che solo i fegati incubati a 56°contenevano virus ancora infettante. Questo lavoro ha dimostrato che l'infettività di HEV presente in fegati suini commercializzati è completamente inattivata mediante un'adeguata cottura.

Organizzazione genomica

Il genoma virale, di circa 7,2 kb, è costituito da una corta regione non tradotta 5' (27-35 nucleotidi) seguita da 3 open reading frames(ORFs) e da una seconda regione non tradotta di circa 65-74 nucleotidi, con una sequenza poly A all'estremità 3'-terminale

poliadenilata di 39-72 nucleotidi (Wang Y. *et al* , 2000). Un'altra regione non codificante è contigua ad ORF 2 e termina con una coda di 150-200 adenosine.

ORF 1 (5073-5124 nucleotidi) codifica una poliproteina non strutturale di circa 1690 amminoacidi che subisce processi proteolitici postraduzionali ed è coinvolta nella replicazione del virus e nella processazione di proteine virali; possiede inoltre due regioni chiamate domini X e Y di funzione sconosciuta. ORF1 è la regione codificante più estesa delle tre, circa 5100bp, questa codifica per proteine non-strutturali e termina con una coda di 150-200 adenosine. In ORF1 sono stati identificati motivi caratteristici di varie proteine virali: 1) una metil transferasi; 2) una sequenza di funzione sconosciuta denominata dominio Y in analogia a quella ritrovata in altri virus; 3) una cisteina proteasi simile alla papaina; 4) una regione ricca in proline che contiene una regione ipervariabile; 5) un dominio X a funzione sconosciuta; 6) una elicasi; 7) una RNA polimerasi RNA dipendente (Koonin E.V. *et al.*, 1992).

ORF 2 codifica per la maggiore proteina capsidica virale, composta da 660 aminoacidi. In vitro, in cellule

animali, è espressa in tre forme: una di 78kDa denominata pORF2, una di 82kDa e una di 86kDa; quest'ultime sono glicosilate e denominate rispettivamente gORF2 e ggORF2. La glicosilazione avviene nel reticolo endoplasmatico. I siti di glicosilazione sono tre residui di asparagina in posizione 137, 310 e 562. La forma non glicosilata sembra essere il vero precursore della proteina capsidica di HEV in quanto la glicosilazione non è fondamentale nel processo di replicazione virale e le proteine glicosilate sono instabili (Torresi J. *et al.*, 1999).

ORF2 codifica per il principale epitopo immunogeno, situato all'estremità 3' ed utilizzato per la preparazione di vaccini, e per altri importanti epitopi.

ORF 3, è il più piccolo open reading frames(366-369 nucleotidi) e si sovrappone ampiamente con ORF 2 molto probabilmente codifica per una fosfoproteina di 123 amminoacidi (pORF3) (14,5 kDA) associata al citoscheletro. Il genoma virale contiene piccole regioni non traducibili (**UTR**) agli estremi 5'-3'rispettivamente formate da 27-35 nucleotidi e 65-74 nucleotidi.

Recenti studi hanno dimostrato che la proteina codificata da ORF3 interagisce con la proteina non glicosilata da ORF2 suggerendo un suo possibile ruolo

nei processi di assemblaggio del virione . ORF3 potrebbe anche intervenire in processi di modulazione dell'espressione genetica cellulare interagendo con diverse proteine cellulari (Tyagi S. *et al.*, 2002). Lo studio della biologia replicativa dell'HEV suggerisce che pORF 3 sia in grado di associarsi al citoscheletro delle cellule epatiche fungendo da sito di ancoraggio (Caprioli et al.2005)

E' stato dimostrato che ORF3 è necessaria per l'infezione nei macachi (Graff J. *et al.*,2005).

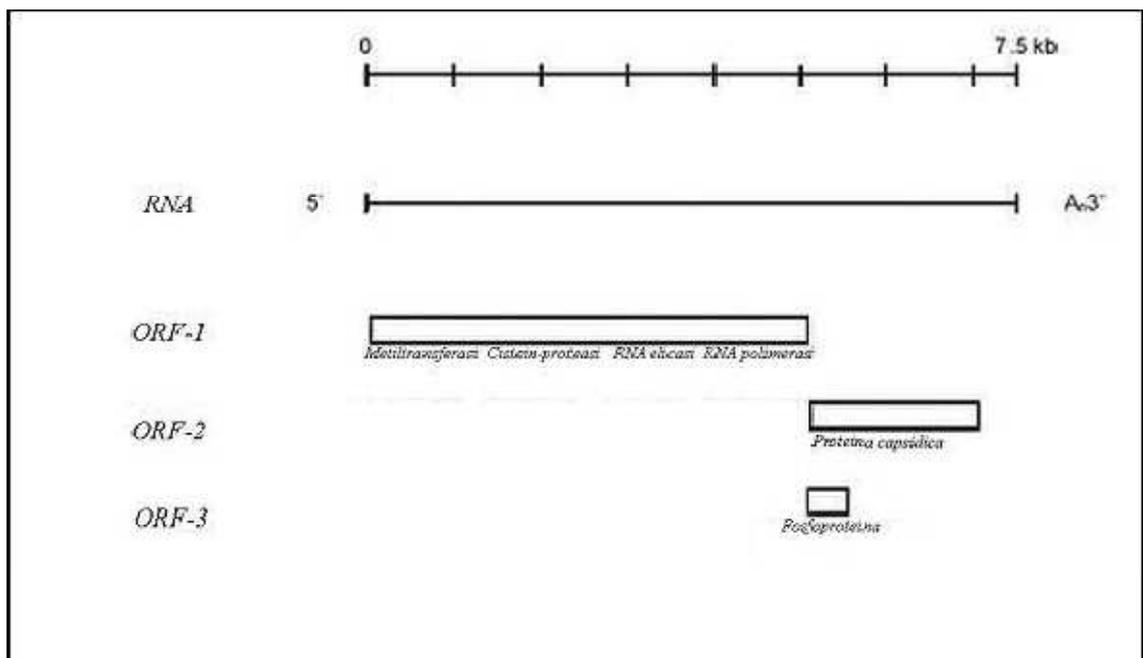


Figura 1: organizzazione genomica di HEV

Genotipi virali

Hev non è coltivabile in vitro con rese accettabili quindi, le tecniche diagnostiche e la caratterizzazione dei ceppi sono basate sull'analisi dell'RNA virale mediante tecniche biomolecolari (Caprioli et al.,2005). I diversi ceppi sono classificati sulla base delle regioni codificanti dagli ORFs. Fino ad oggi sono stati identificati 4 maggiori genotipi virali, due dei quali includono sia isolati umani che suini, ma il quadro è in continua evoluzione e non esiste un consenso unanime su tale classificazione. E' invece universalmente riconosciuto un unico sierotipo.

Dalla fine degli anni'80 sono stati isolati numerosi stipiti virali. L'analisi delle sequenze nucleotidiche delle regioni strutturali e non strutturali, ha permesso il riconoscimento di almeno 9 gruppi differenti, raccolti nei 4 genotipi maggiori(Martinelli, 2005).

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

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

Il gruppo 2 include il prototipo messicano e vari isolati

nigeriani, il gruppo 3 gli isolati nordamericani umani e suini. Nel gruppo 4 ci sono gli isolati italiani, strettamente correlati agli isolati suini della Nuova Zelanda. Il gruppo 5 è formato da stipiti isolati in Grecia e in Spagna, mentre il 6 da ulteriori stipiti greci. Il gruppo 7 è costituito dagli stipiti virali isolati in Argentina nel corso di casi sopradici autoctoni. I gruppi 8 e 9 sono rappresentati dagli isolati cinesi . Quindi la maggior parte delle infezioni in Asia ed Africa è causata dal genotipo 1, mentre in Messico e Nigeria prevale il genotipo 2. Nei paesi industrializzati, dove fino a poco tempo fa l'infezione era considerata non endemica, sono stati descritti solo ceppi appartenential genotipo 3 e 4(Caprioli et al.2005).

Il genotipo 3 prevale in USA, mentre il 4 in Cina e a Taiwan. Alcuni isolati provenienti dall'Europa ed anche dall'Italia sono stati assegnati a nuovi genotipi per la diversità nucleotidica, ma probabilmente potrebbero essere raggruppati insieme ai ceppi americani in un più grande ed eterogeneo gruppo.

Il primo ceppo animale di HEV è stato identificato e caratterizzato nelle regioni centro-occidentali degli USA nel 1997. Il virus, denominato Swine Hepatitis E virus o Swine HEV, apparteneva al genotipo 3 e presentava un'elevata omologia con alcuni ceppi umani(Caprioli et al.,2005). In particolare l'ORF2 del ceppo suino presentava il 92% di identità nucleotidica

ed il 97% di identità amminoacidica con 2 ceppi di HEV umani considerati autoctoni (ceppi US-1 e US-2), tale analogia ha consentito di ipotizzare l'appartenza dei 2 ceppi alla medesima famiglia e di considerare il suino come modello animale alternativo per lo studio dell'HEV umano. Altri ceppi di HEV suino, tutti appartenenti al genotipo 3 e , sono stati identificati successivamente in altri paesi industrializzati e sono risultati spesso geneticamente simili ai ceppi responsabili di episodi sporadici di malattia nell'uomo.

Come i ceppi umani anche i ceppi suini sono geneticamente piuttosto diversi tra loro da regione a regione.

Recentemente, ceppi di HEV sono stati isolati anche da Roditori e da polli. In Nepal, analisi filogenetiche degli isolati virali di origine murina hanno dimostrato una stretta correlazione con gli stammi di HEV di origine umana, con il 95-98% di omologia nucleotidica ed il 98% di omologia amminoacidica . L'HEV aviario è invece geneticamente correlato ma, nettamente distinto dagli altri ceppi di HEV ed è stato associato alla sindrome epatomegalia-splenomegalia (HS) dei polli. Tale sindrome fu per la prima volta segnalata in Canada nel 1991 ed in seguito è stata descritta anche negli USA. La malattia è caratterizzata da un aumento di mortalità nei boiler da riproduzione e nei polli, nonché da un calo di produzione delle uova di circa il

20%. Regressione delle ovaie, accumulo di fluido in addome, aumento di volume di fegato e milza ed un quadro istologico caratterizzato da necrosi ed emorragie epatiche sono le lesioni predominanti negli animali infetti (Caprioli et al., 2005). Sperimentalmente il virus è infettante anche per il tacchino ma, al contrario dell'HEV suino, non lo è per le scimmie. L'identità nucleotidica di HEV aviare con i ceppi umani e suini è soltanto del 48-60% anche se anticorpi specifici sono cross reagenti nei confronti di proteine capsidi che di entrambi i virus, dimostrando la presenza di epitopi comuni. Ad oggi non è chiaro se questo agente rappresenti un nuovo genotipo di HEV o se sia un parente più lontano dei virus umani e suini.

Ciclo replicativo

A causa della sua limitata capacità di replicazione in colture cellulari, il modello di replicazione di HEV è stato dedotto basandosi sulle analogie con altri virus a RNA positivo. Studi su suini hanno dimostrato la presenza di RNA virale a polarità positiva in diversi tessuti: fegato, milza, reni, linfonodi, polmoni, piccolo intestino, colon, tonsille, ghiandole salivari, stomaco; tuttavia la replicazione virale è stata dimostrata, attraverso la rilevazione di RNA a polarità negativa virale, solo in fegato, piccolo intestino, colon e linfonodi (Williams T.P.E. *et al.*, 2001). Un notevole contributo alla comprensione dei meccanismi di replicazione del virus è stato dato con l'utilizzo della transfezione con plasmidi contenenti l'intero genoma di HEV (Panda S.K. *et al.*, 2000).

I meccanismi di adsorbimento, penetrazione ed *uncoating* del virus sono sconosciuti, ma si presume che il virus si attacchi primariamente ad un recettore situato su epatociti, cellule del piccolo intestino, del colon e dei linfonodi.

Dopo la penetrazione nella cellula, viene tradotta solo la poliproteina non strutturale codificata da ORF1 da cui derivano, per clivaggio enzimatico, le metiltransferasi, le proteasi, l'elicasi e l'RNA polimerasi.

A questo punto l'RNA polimerasi RNA dipendente genera una copia a polarità negativa dell'intero RNA virale che viene utilizzata come stampo per produrre il genoma virale a polarità positiva e per produrre RNA messaggero che viene utilizzato per produrre le proteine strutturali codificate da ORF2 e ORF3. Le proteine strutturali si assemblano formando il capside e incorporano il genoma virale formando virioni infettanti che vengono rilasciati mediante lisi cellulare.

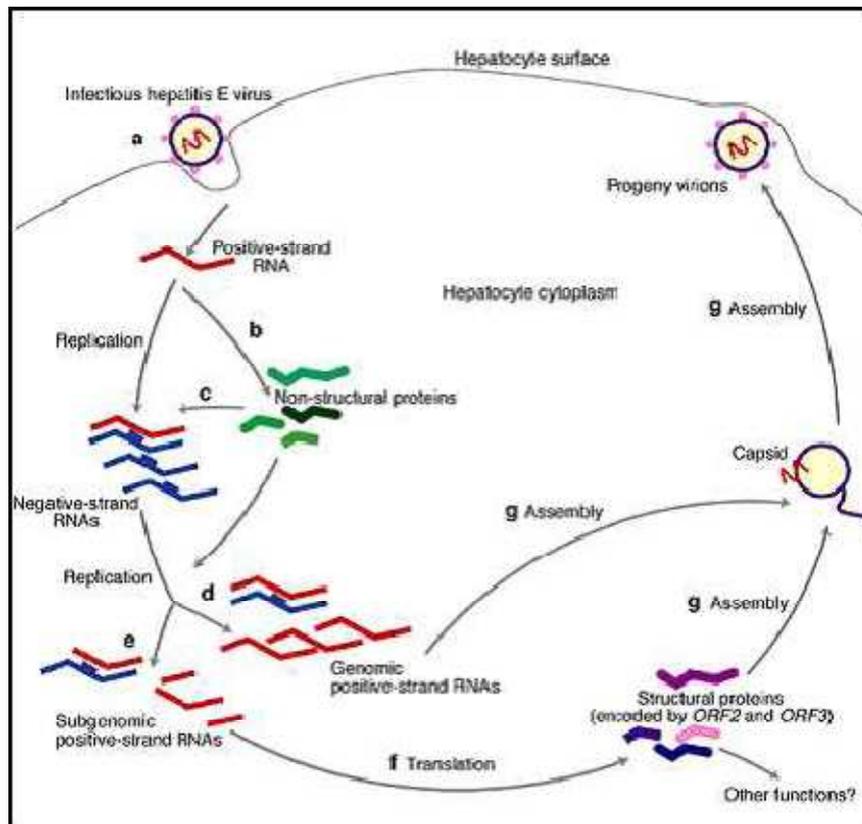


Figura 2: modello proposto per la replicazione di HEV, da <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/99001337h.htm> (Shahid Jameel).

La strategia replicativa del virus è quasi del tutto sconosciuta a causa della mancanza di un sistema di coltura cellulare idoneo. Poco è noto circa i recettori virali per HEV ed il meccanismo di ingresso.

Per quanto riguarda la strategia di replicazione del virus, il modello proposto si basa sulle somiglianze e sull'omologia di sequenza di altri virus a RNA a filamento positivo meglio caratterizzati (Reyes et al., 1993; Chandra et al., 2008). Le cellule in cui avviene la replicazione virale sono prevalentemente gli epatociti, ma sono stati identificati anche siti di replicazione extraepatica, tra cui il piccolo intestino, la milza, i linfonodi, il colon, ed i monociti del sangue periferico (Williams et al., 2001). Una volta penetrato in una cellula permissiva, l'RNA genomico virale viene decapsidato e tradotto, nel citosol della cellula infettata, in una poliproteina non strutturale codificata dall'ORF 1. mediante proteasi cellulari, la poliproteina viene quindi processata nelle unità funzionali individuali, rappresentate dalle proteine non strutturali metiltransferasi, proteasi, elicasi e RNA polimerasi RNA dipendente (RdRP). Grazie all'enzima virale RdRP, il filamento genomico positivo viene trascritto in un filamento ad orientamento negativo.

Quest'ultimo rappresenta un intermedio replicativo e, per analogia con gli Alphavirus, è stato postulato che possa servire come stampo per la sintesi di copie

addizionali di filamenti di RNA positivo. Come avviene per gli Alphavirus, infatti, questo RNA intermedio presenta una sequenza che agisce come promotore sub genomico. L'RNA sub genomico a filamento positivo viene quindi tradotto nelle proteine strutturali che a loro volta vanno a circondare il genoma virale per formare la progenie dei virioni infettanti. Nonostante queste conoscenze, il meccanismo e la sintesi delle proteine strutturali a partire dall'RNA sub genomico ha bisogno di ulteriori chiarimenti.

Inoltre, la modalità di uscita del virus dalla cellula infettata e la sua presenza nel sangue e nella bile devono essere maggiormente indagate (Panda et al.,2007).

I filamenti genomici a polarità positiva sono stati rilevati con maggiore abbondanza rispetto ai filamenti negativi. Entrambi i filamenti si ritrovano nel fegato, il sito primario di replicazione, mentre nel siero e nella bile si ritrovano solamente i filamenti positivi di RNA(Nanda et al., 1994). Recentemente è stato dimostrato che il virus si localizza primariamente nel reticolo endoplasmatico della cellula ospite , che probabilmente rappresenta il sito primario di replicazione(Reheman et al.,2008).

-Spettro d'ospite in vitro.- La replicazione del virus HEV in colture cellulari è abbastanza limitata risultati parziali sono stati ottenuti usando cellule di polmone umano ed epatociti umani o di scimmia, tale elemento ha fortemente limitato lo studio del suo ciclo replicativo per cui le informazioni disponibili sulla caratterizzazione dei ceppi sono state principalmente ottenute studiando l' RNA virale con tecniche biomolecolari. Negli ultimi anni, studi di transfezione con plasmidi contenenti l'intero genoma di HEV su diverse linee cellulari hanno reso possibile l'espressione dei vari trascritti, lo studio delle loro funzioni e la produzione di particelle virali infettanti (Reyes et al.,1993). E' stato proposto, un modello sperimentale per la replicazione di HEV, sulla base di omologie con altri virus a RNA a polarità positiva.

Quando il virus entra nella cellula permissiva, l'RNA virale viene tradotto all'interno del citoplasma producendo le proteine non strutturali (nsP) codificate dalla regione ORF 1. Fra queste, la replicasi virale sarebbe implicata nella sintesi di intermediari replicativi a polarità negativa a partire dalla catena genomica positiva. Gli intermediari si comportano da "stampo" per la sintesi di copie addizionali di RNA genomico e subgenomico che possono venire tradotte in proteine strutturali nelle fasi successive. Le proteine strutturali si assembleranno a costituire il capsido e

inglobano il genoma dando origine a una nuova particella virale che sarà poi rilasciata per lisi cellulare

-Spettro d'ospite in vivo. - Sperimentalmente, è stato dimostrato che l'HEV è capace di infettare numerose specie di animali, dato confermato dal fatto che anticorpi anti-HEV sono stati riscontrati in molte specie di animali domestici e selvatici, in particolare nei suini, cinghiali, bovini, pecore, capre, polli, bufali, cervi, ratti, topi, gatti e scimmie, facendo sorgere il sospetto che alcuni costituiscano la riserva dell'infezione nelle aree non endemiche.

Negli ultimi anni è stata dimostrata sperimentalmente la trasmissione interspecie. In particolare, sono stati infettati primati con HEV di origine suina e ovini, suini, e roditori con uno stipo di HEV umano. In corso di tali esperimenti i suini infettati con l'isolato umano sierconvertirono rapidamente, dimostrando che questa variante virale si adatta perfettamente al suino.

Indagini sieroepidemiologiche condotte in numerosi Paesi, soprattutto in via di sviluppo, hanno messo in evidenza che il virus è molto diffuso nella popolazione suina dove infetta prevalentemente soggetti sopra i tre

mesi di età causando scarsa sintomatologia clinica e lievi alterazioni a livello epatico.

La trasmissione fra i suini avviene essenzialmente per via oro-fecale, il periodo di incubazione è in media 4 settimane e l'escrezione del virus con le feci avviene tra il periodo di incubazione e l'inizio della fase acuta. La viremia è transitoria da una a due settimane, gli anticorpi di classe IgM compaiono alla fine del periodo di incubazione mentre quelli di classe IgG all'inizio della fase acuta. Al contrario di ciò che avviene nel suino, nel ratto la viremia persiste per molto tempo e questo potrebbe spiegare la diffusione del virus nell'ambiente.

Nel corso degli anni, ulteriori stipiti di HEV suino sono stati isolati in numerosi Paesi, e sono risultati antigenicamente e geneticamente omologhi a quelli umani isolati nella stessa area geografica.

In Spagna, *Pina e coll.* hanno identificato isolati virali di HEV nel siero dei pazienti e in campioni di acque reflue di mattatoi, dove si macellavano prevalentemente suini. L'HEV suino isolato in Spagna presenta un' omologia nella regione ORF 2 del 85,5% con gli stipiti nordamericani. Inoltre, in quello stesso studio, furono riscontrati anticorpi anti-HEV nella popolazione suina studiata nella percentuale del 25%. Indagini siero epidemiologiche per HEV, eseguite su persone che lavorano a stretto contatto con i suini hanno evidenziato siero prevalenza più elevata rispetto

ai normali donatori di sangue. In Italia la sieroprevalenza in addetti alla macellazione di suini nella Regione Lazio è risultata nettamente superiore (33%) rispetto a quella della popolazione generale (2,9-3,3%). Nel Nord Carolina la presenza di anticorpi anti-HEV in allevatori di suini è risultata di 4,5 volte superiore rispetto ad altre categorie professionali.

CAPITOLO 2: **EPIDEMIOLOGIA**

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 di gran parte dell'Asia, Nord Africa, Medio Oriente e America centro-meridionale l'infezione è endemica e si manifesta con focolai di vasta portata generalmente conseguenti alla contaminazione delle fonti d'acqua in concomitanza di forti piogge e inondazioni. In queste aree la sieroprevalenza è di circa il 5% nei bambini sotto i 10 anni e tende ad aumentare con valori che raggiungono il 10-

40% negli adulti sopra i 25 anni. I casi di trasmissione interumana sono rari con tassi d'attacco secondario all'interno dei nuclei familiari inferiori al 5%, quindi molto più bassi rispetto a quelli dell'epatite A (50%-70%).

Questo potrebbe dipendere da differenze nella dose infettante, nella qualità di virus escreto con le feci, nella capacità del virus di persistere nell'ambiente. E' stato, inoltre, stato dimostrato che il 50% delle donne che si infettano durante il 3° trimestre di gravidanza trasmettono l'infezione al feto.

Nei Paesi industrializzati, invece, dove gli standard igienico-sanitari sono più elevati la malattia si manifesta sporadicamente ed è generalmente la conseguenza di infezioni contratte durante soggiorni nelle aree endemiche (cosiddetti casi di importazione). Tuttavia, sono in aumento le segnalazioni di casi di epatite E in soggetti che non risultano aver viaggiato in zone a rischio (cosiddetti casi autoctoni). Questa tipologia di casi è stata segnalata in UK, Olanda,

Spagna, Germania, Francia, Italia, Austria, Grecia, Giappone USA, Canada.

I ceppi responsabili di tali episodi sono risultati geneticamente differenti rispetto a quelli circolanti nei Paesi in via di sviluppo, facendo supporre che questi casi di malattia siano ascrivibili a virus endemici sul territorio.

In queste aree si manifesta in genere con episodi epidemici che coinvolgono fasce molto ampie di popolazione e che possono essere prolungati nel tempo con tassi d'attacco variabili dall'1% al 15% e con gli adulti più colpiti rispetto ai giovani.

Diversi studi sieropidemiologici hanno inoltre rilevato una notevole prevalenza anticorpale anti-HEV(5-20%) nella popolazione sana di molti Paesi industrializzati, Italia compresa. Questi valori di sieroprevalenza appaiono elevati se comparati con la prevalenza clinica della malattia. Non è ancora chiaro perciò se l'elevata sieropositività in aree non endemiche sia dovuta ad infezioni subcliniche, cross-reattività con altri agenti eziologici, falsi positivi ai test sierologici, infezione

subclinica con HEV suino o altri virus HEV simili o ad una combinazione di questi fattori. 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 ottenuti in contesti geografici diversi. Per giustificare le positività sierologiche e virologiche autoctone, sono state avanzate diverse ipotesi, tutte correlate alla presenza di un serbatoio animale sul territorio (Aggarwal et al. 2000; Clemente-Casares et al. 2003; Emerson and Purcell, 2003; Ijazeta et al. 2005; Li et al. 2006a).

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 centromeridionale, dove l'infezione si manifesta in modo epidemico (Aggarwal et al.,2000; Emerson and Purcell, 2003; Meng et al., 2002). I tasso di letalità correlato all'infezione a HEV si aggirano 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).

-Vie di trasmissione dell'infezione nei Paesi in via di sviluppo

La principale via di trasmissione è quella oro-fecale, in particolare legata alla contaminazione delle acque: nei

Paesi in via di sviluppo, infatti, l'infezione 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); tuttavia, epidemie 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-Mamaihit et al., 2002). In India il 30-60% dei casi sporadici di epatite è causato da HEV (Panda et al., 2007).

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 ad una fonte d'infezione comune piuttosto che al contagio interpersonale (Aggarwal and Naik, 1994).

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., 2001).

Sono stati riportati casi di epidemie intra-ospedaliere dovuti alla presenza di personale alle prime fasi di infezione da virus dell'epatite E. (Robson et al., 1992).

Altra via di trasmissione considerata quella 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 di 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 coloro che fanno uso di droghe per via endovenosa.

-Fattori di rischio correlati all'infezione nei paesi in via di sviluppo

E' ancora da chiarire se l'età rappresenti un fattore di rischio per l'infezione nelle regioni iper-endemiche, visto che sull'andamento demografico dell'infezione da HEV in letteratura, tutt'oggi, esistono dati incompleti e contrastanti (Emerson and Purcell, 2007;Teo, 2006).

Le epidemie colpiscono fasce molto ampie di popolazione e possono essere prolungate nel tempo con tassi di attacco che vanno dal 1% al 15%, con i giovani

adulti più colpiti dei bambini (Aggarwal and Krawczynski, 2000).

Infatti, la siero prevalenza nella maggior parte delle aree endemiche è di circa il 5% nei bambini al di sotto dei 10 anni e tende ad aumentare fino al 10-40 % negli adulti sopra i 25 anni (Aggarwal et al., 2000; Emerson and Purcell, 2003).

Questo comportamento portrebbe 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.

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%) ed in persone provenienti da aree rurali (45%-50%) (Seow et al., 1999).

Anche in India le epidemie hanno mostrato un tasso di 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; vaidya et al., 2003).

Altro fattore di rischi 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).

Caratteristiche dell'infezione nei paesi industrializzati

L'infezione da HEV è oggi ritenuta un problema emergente anche nei paesi industrializzati. Di recente, in USA, Giappone ed Europa sono stati segnalati sempre più spesso casi sporadici di malattia in soggetti che non risultavano aver viaggiato all'estero in zone a rischio (Banks et al., 2004) (Pandae t al., 2007).

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 aree a rischio (Acharya and Panda. 2000).

Numerosi studi epidemiologici 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, seppure in genere a livello subclinico.

Negli ultimi anni sono state descritte una trentina di epidemie di HEV in vari Paesi ed è stato verificato che

molte epidemie del passato erroneamente attribuite al virus dell'epatite A erano in realtà provocate da HEV.

In Italia, il virus dell'epatite E sembra essere responsabile di circa il 10% dell'epatiti virali non-A e non-B, non-C (Zanetti and 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 tipo si è rivelato geneticamente diverso dai virus isolati in altri Paesi, mostrando una relativa analogia nucleotidica solo con i ceppi americani del genotipo 3, 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 del nostro paese 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 (Zaletti and 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 molto diffusa al Sud di consumare molluschi crudi possa essere un fattore di rischio aggiuntivo (Cacopardo et al.. 1997). Analogamente, un gradiente di casi umani di epatite E sull'asse Nord-Sud è stato riportato in Francia (Renou et al.,1007).

L'ultima epidemia è stata riscontrata pochi mesi fa, esattamente nel mese di settembre 2009 in Corsica ed erano correlati al consumo di una salsiccia tipica della Corsica, costituita da fegato di maiale crudo. (ASL, TO2).

-Modalità d'acquisizione dell'infezione nei paesi industrializzati

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

- UK
- Olanda
- Spagna
- Germania
- Francia
- Italia
- Austria
- Grecia
- Svezia e scandinavia
- Ungheria
- Giappone

- Usa
- Canada

La maggior parte dei casi riportati coinvolgono persone di ritorno da viaggi nelle aree iper-endemiche, e la maggior parte degli studi disponibili in letteratura descrivono casi isolati ed in piccolo numero.

Esistono però altri studi, condotti in Inghilterra e Galles (Ijaz et al.,2005), in cui è stato riscontrata una piccola percentuale di pazienti sierologicamente positivi per HEV senza anamnesi di viaggi all'estero, nelle aree iperendemiche. 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.

Le modalità di acquisizione dell'infezione comprendono la via alimentare, il contatto con animali infetti, l'esposizione ai reflui di allevamenti suinicoli infetti tramite rete fognaria.

Eccezione alla sporadicità dell'infezione sono i focolai di origine alimentare che sono riportati in Giappone. In questi casi l'infezione non è isolata ma si manifesta in forma di epidemie in piccola scala, collegate all'assunzione dello stesso alimento contaminato (Teo, 2006).

-Fattori di rischio correlati all'infezione nei Paesi industrializzati

Rappresentano fattori di rischio tutte le condizioni associate al contatto con animali serbatoio. Tra i casi di trasmissione zoonotica che verranno discussi nel capitolo 5, vi sono l'esposizione professionale a suini infetti, o in allevamento o al macello,(Casar et al., 2003) il contatto domestico con suini (Renou et al.,2007), l'assunzione di carne ed organi infetti crudi o poco cotti.

Non è ancora chiaro se esistano delle predisposizioni di sesso ed età nel contrarre l'infezione.

In uno studio condotto da Ijaz e colleghi 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 siatica, mentre quelli del gruppo Nt 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. 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).

EPIDEMIOLOGIA NELLE SPECIE ANIMALI RECETTIVE ALL'INFEZIONE

L'infezione negli animali

Anticorpi anti-HEV sono stati evidenziati nei suini, nei ratti, nei topi, nelle scimmie, nelle aree in cui l'epatite è endemica; nei suini, nei bovini, negli ovini, nel pollame, nei cani, nei gatti, nei roditori, nei primati non umani, praticamente in tutto il mondo. In particolare, diverse specie animali sono state testate in India, dove l'infezione da HEV nell'uomo è endemica.

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 anticorpio anti-HEV, come quelli dei bufali, pecore, topi,e suini testati.

L'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-sw HEV (Meng et al.,1997), ma successivamente la presenza di ceppi di HEV molto simili a quelli di origine umana è stata dimostrata in almeno altre 4 specie animali sia in aree con infezione endemica sia nei Paesi industrializzati (figura 1).

Nel cervo sono stati rilevati anticorpi specifici e il consumo di carne cruda o poco cotta di questa specie animale è stata messa in relazione con alcuni casi

umani di HEV in Giappone. Sempre in Giappone, il 21% delle manguste esaminate è risultato sieropositivo e da un animale è stato possibile evidenziare RNA di HEV.

In Egitto, il 13% dei cavalli esaminati è risultato sieropositivo, ed il 4% viremico. In un caso di epatite E di origine autoctona in Giappone la fonte di infezione più probabile è stata individuata nel gatto domestico; nello stesso Paese, il 32,6% dei gatti domestici è risultato sieropositivo.

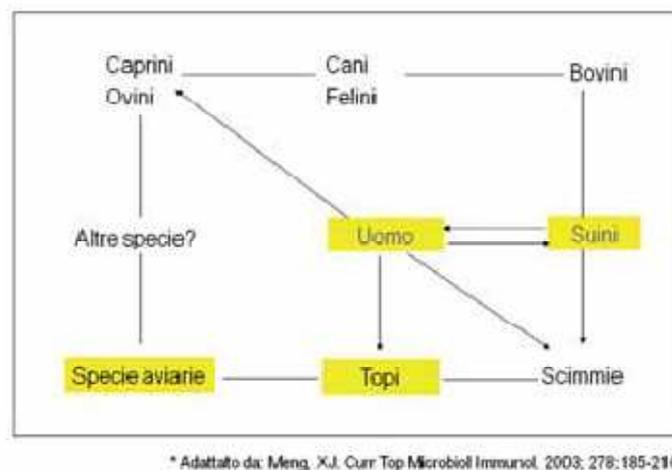


Fig. 1 infezione negli animali recettivi

Il primo ceppo di epatite E aviare fu identificato negli Stati Uniti da polli con sindrome di epatomegalia-

splenomegalia (*HS syndrome*), malattia emergente in Nord America, ma di cui fino al 2001, non era stato individuato l'agente eziologico.

L'agente eziologico della *HS syndrome* ha struttura genomica e sequenza nucleotidica simili a quelli dell'HEV umano, ma il genoma è più corto e, in generale, l'identità nucleotidica tra i ceppi aviari e umani è solo del 50% circa.

Recentemente tuttavia sono stati identificati da campioni provenienti da uccelli, ceppi di HEV che presentavano 98% di omologia nucleotidica con quelli isolati dai mammiferi nella stessa area geografica.

La presenza di anticorpi anti-HEV è stata inoltre documentata anche in topi, cani, bovini, ovi-caprini, scimmie, cavie, bufali, anche se in alcuni di questi casi non può essere esclusa l'esistenza di anticorpi cross-reattivi con antigeni eterologhi.

Dato per assunto che HEV ha una notevole capacità di jumping - come è documentato dalla trasmissione di virus suino ai primati non umani ed all'uomo, e di virus umano ai suini , si esaminano di seguito alcuni aspetti relativi ad HEV nel suino, nei roditori, nel pollame.

HEV nel suino

Il primo ceppo di HEV suino è stato identificato nel 1997 negli Stati Uniti.

Il virus si è rivelato simile ma distinto dai ceppi circolanti nell'uomo dello stesso territorio: il gene ORF2 aveva il 79-80% di identità al livello nucleotidico ed il 90-92% a livello amminoacidico con la stessa regione dei ceppi umani(Meng et al.,1997). Dal momento della sua scoperta, swine-HEV è stato

identificato in suini provenienti da tutto il mondo, 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.

Attualmente esistono numerosi studi che descrivono l'epidemiologia del virus dell'epatite E in suini allevati in diverse regioni del mondo.

In Canada 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, ed un ceppo virale è stato identificato nelle feci di un suinetto (Yoo et al., 2001).

In uno studio condotto successivamente è stata investigata la presenza di virus in diverse classi di età su un gruppo di 51 suini allevati in uno stabulario che simulava la distribuzione di 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. 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, ed 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 41,22% (Leblanc et al.,2007).

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

Riguardo la presenza di HEV nei suini in Sud America, in letteratura si possono trovare due studi. Nel primo la prevalenza di anticorpi anti-HEV nei suini era del 24,3% (Vital et al.,2005), mentre nel secondo (Munne et al.,2006) la siero prevalenza tra varie regioni dell'Argentina variava dal 4% al 58%.

In questo ultimo studio sono stati anche testati dei campioni di feci per la ricerca diretta del virus, e 48 su 54 sono risultati positivi (Munne et al., 2006).

In Olanda, L'RNA di HEV è stato identificato nel 22% dei pool di feci ottenuti da 115 diversi allevamenti nel

territorio (Van de Poel et al.,2001). Con lo stesso metodo di campionamento nel 2005 sono stati raccolti nuovi 97 pool fecali di allevamenti olandesi. 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 sono stati testati due allevamenti per la presenza del virus e 256 sieri provenienti dal territorio nazionale per la ricerca 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).

In particolare, due studi sono interessanti per quanto riguarda la prevalenza dell'infezione nel suino. Nel primo sono stati presi in considerazione i diversi stadi di produzione dei suini in allevamento, per identificare l'eventuale presenza di un'età maggiore a rischio di infezione. 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). 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 è stata presa in considerazione la sieroprevalenza in 41 allevamenti dislocati del territorio spagnolo. Quaranta degli allevamenti testati erano positivi per la presenza di IgG anti-HEV (97,6%), e la classe di età con 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 esistono due studi sulla presenza di HEV nel suino. La prima identificazione dei HEV negli allevamenti suinicoli italiani è stata realizzata nel 2004, esaminando 34 poll fecali e 22 campioni di siero raccolti da animali clinicamente sani di 2-5 mesi di età allevati in 5 aziende a ciclo chiuso del centro-nord Italia (Caprioli et al.,2007). La prevalenza riscontrata è stata del 5,9% e l'analisi filogenetica ha dimostrato l'appartenenza dei ceppi identificati al genotipo 3.

Nelle indagini successive (Di Bartolo et al.,2008), condotte nel periodo gennaio-giugno 2006, sono stati esaminati 6 diversi allevamenti del nord Italia, prelevando campioni fecali individuali da animali clinicamente sani, di diverse categorie: magroni (3-4 mesi), suini grassi (8-9 mesi), scrofette (nessun parto), scrofe giovani (1-2 parti), scrofe anziane (più di 2 parti).

La prevalenza riscontrata in questo secondo studio è stata del 42%. La notevole differenza riscontrata tra le due indagini è stata giustificata ipotizzando che, nel primo lavoro, il numero di campioni testati era

decisamente inferiore rispetto alla seconda indagine. Probabilmente il primo report pubblicato (Caprioli et al., 2007) aveva sottostimato la prevalenza d'infezione, o per una differenza nel campionamento, o per miglioramento successivo delle tecniche diagnostiche adottate (Rutjes et al., 2007).

La prevalenza del 42% riscontrata nel secondo lavoro è infatti in linea con quella di altri lavori condotti in Europa.

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. Le prevalenze anticorpali si sono rilevate molto alte (96,5%).

Anche in Giappone la presenza di HEV nel suino è stata dimostrata, 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).

Altre specie recettive

Roditori

Alcuni lavori effettuati negli U.S.A. hanno permesso di evidenziare la presenza di anticorpi anti-HEV in roditori (*Rattus*, *Mus*, *Peromyscus*) catturati sia in aree rurali che in aree urbane.. Il dato interessante emerso da queste indagini è che la prevalenza è risultata più elevata nei soggetti catturati nelle aree urbane/metropolitane (New York City, Baltimora, Miami, Atlanta, New Orleans), con un valore medio di 60.5%, piuttosto che in quelli catturati nelle aree rurali, con un valore medio di 26.5%. L'alta prevalenza rilevata indica un alto tasso di infezione da HEV o da virus simile cross-reattivo (che avrebbe dato reazioni di falsa positività): quest'ultima evenienza è ritenuta però improbabile, dopo che in Nepal è stato isolato un ceppo di HEV da roditori, con sequenze simili a quelle ottenute dai pazienti con infezione da HEV in quel Paese. L'alta prevalenza di sieropositivi, la loro

diffusione generalizzata, la consistenza dei rilievi sierologici, supportano l'ipotesi che anche i roditori possano fungere da reservoir del virus, soprattutto nei confronti degli animali d'allevamento (specie nei Paesi industrializzati), ma anche nei confronti dell'uomo laddove sussistono condizioni di promiscuità e di carenza di igiene diffuse: in presenza di questi fattori potrebbe anche verificarsi una circolarità di trasmissione e di mantenimento dell'infezione nell'ambiente coinvolgente uomo-animale da allevamento-roditori, con la concreta possibilità che si producano delle varianti virali, ed anche con un indubbio aumento del rischio di jumping e di trasmissione/diffusione interspecifica. Si osserva infine che *Rattus norvegicus* è associato a diverse infezioni zoonotiche come la peste, la leptospirosi, il tifo murino, ed alcune malattie da Hantavirus.

Pollame

Il ceppo aviario della HEV è stato segnalato per la prima volta in Canada. Dal 2001 è stato evidenziato nel pollame allevato negli U.S.A. dove è responsabile della Sindrome epatite-splenomegalia (HS syndrome). Dalle analisi compiute è emerso che il virus dell'epatite E aviario è antigenicamente correlato ai ceppi umani e suini conosciuti e ad un virus aviario presente in Australia, l'Australian chicken big liver and spleen disease virus (BLSV). Da tali analisi è emerso che il 48/60% delle sequenze nucleotidiche del virus aviario ed umano sono simili, tale valore raggiunge 80% nel confronto tra virus aviario e il BLSV. La sindrome provocata dal virus è responsabile di un aumento dei tassi di mortalità negli allevamenti di polli e nelle galline in deposizione (tra la 30^a e la 72^a settimana di età), e calo di deposizione superiore al 20%. Si evidenziano lesioni anatomopatologiche quali regressione ovarica, epatosplenomegalia, necrosi epatica, presenza di liquido emorragico in cavità

addominale. Il virus è stato identificato sia in soggetti con sindrome clinicamente evidente, sia in soggetti sani. Anche il ceppo aviario ha la capacità di "saltare" la barriera di specie; infatti è stato provato che può infettare il tacchino.

CAPITOLO 3: **PATOLOGIA E SINTOMATOLOGIA**

MALATTIA NELL'UOMO

Patogenesi nell'uomo

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

Come nel caso dell'epatite A, il meccanismo patogenetico non è ancora completamente noto.

Le numerose informazioni relative alla patogenesi dell'infezione da HEV sono state ottenute infettando sperimentalmente sia volontari umani sia primati non umani.

Nella maggior parte dei casi la malattia è di lieve entità. Una quota significativa di individui che

vivono nei paesi industrializzati risulta, infatti, sieropositiva per gli anticorpi anti-HEV, sebbene essi non abbiano anamnesi di malattie epatiche pregresse. E' noto infatti che anche l'epatite E è una malattia dose dipendente: pazienti esposti ad alte dosi di HEV spesso sviluppano i sintomi clinici, mentre soggetti esposti a basse dosi del virus hanno infezioni subcliniche(Purcell and Emerson,2001).

Non è certo se il sito di replicazione iniziale sia il tratto intestinale perché studi condotti su animali hanno dimostrato la trasmissibilità del virus attraverso la inoculazione endovenosa di materiale infetto.

L'infezione può avvenire per via endovenosa e per via orale; quest'ultima che rappresenta la principale via naturale di trasmissione, richiede una carica infettante circa 10.000 volte maggiore rispetto alla via endovenosa.

Dopo l'ingestione,il periodo di incubazione è in genere di 4-5 settimane. Le vie e i meccanismi

con cui HEV raggiunge il fegato non sono ancora stati chiariti, ma una volta in questo organo, il virus si 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.

Ad oggi non sono stati dimostrati con certezza 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.

E' certo che dopo la localizzazione epatica, il virus replica nel citoplasma degli epatociti e viene escreto nella bile e nel sangue. HEV è stato trovato in grandi quantità anche nella bile di primati infettati sperimentalmente per cui si presume che la maggior parte del virus presente nel tratto gastrointestinale origini dal fegato. In modelli sperimentali suini, HEV RNA è stato riscontrato, oltre che nel fegato, nel piccolo

intestino, nei linfonodi mesenterici, nel colon e nella bile, suggerendo che esistano siti di replicazione extra-epatici (Pieri,2008).

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

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

La viremia è stata rilevata 22 giorni dopo l'esposizione, tramite RT-PCR, quindi verso la fine del periodo di incubazione, tenendo presente che la malattia che si manifesta dopo circa 30 giorni post esposizione .

Tuttavia, sono stati segnalati pazienti in cui la viremia si è protratta per più di 100 giorni.

La maggiore escrezione del virus nelle feci e nella bile si ha dal 34° giorno post infezione e rimane presente per 1-2 settimane.

Le transaminasi raggiungono il picco di concentrazione ematica intorno al 45° giorno, periodo che coincide con la elevazione del titolo anticorpale.

Come è stato osservato anche nell'epatite A, IgM ed IgG specifiche sono presenti al momento in cui si manifesta la malattia. Nel 90% dei casi le IgM compaiono dopo 10 giorni, mentre nel 60% dei casi all' esordio e il loro andamento è sovrapponibile a quello della viremia.

Le IgM, che vengono prodotte solo dal 90% dei pazienti, scompaiono dopo alcuni mesi. Le IgG sono svelabili per molto tempo dopo l'infezione (oltre i tre mesi) e persistono per anni.

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

Nonostante la modalità di trasmissione dell'infezione da HEV e quella da HAV sia la stessa, sono riconoscibili delle differenze cliniche. In particolare, si è visto che il tasso di mortalità dell'epatite E è maggiore di dieci volte rispetto a quello dell'epatite A raggiungendo anche l' 1-2%.

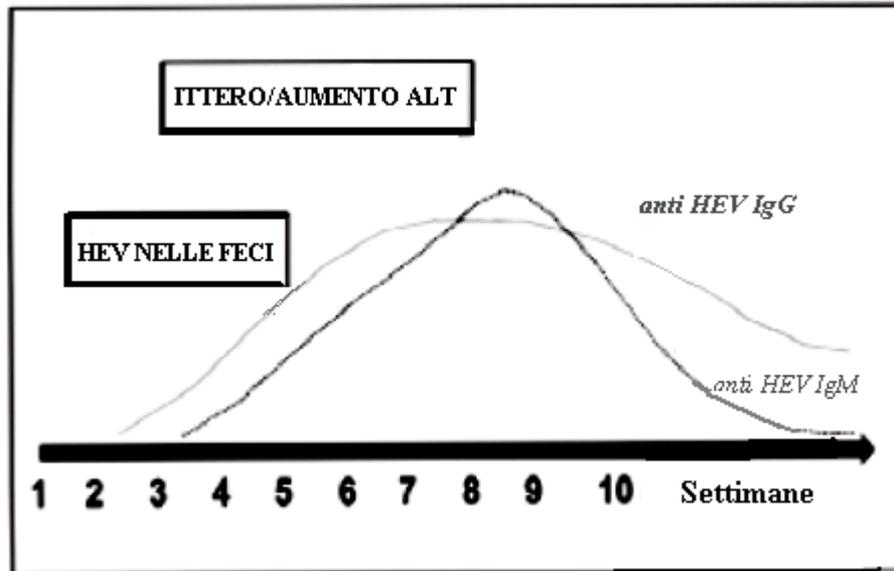
Come per gli altri virus epatitici maggiori, non è stato dimostrato inequivocabilmente un effetto citopatico diretto. Nel citoplasma di epatociti di macachi infettati sperimentalmente è stato identificato l' antigene virale HEV Ag nelle prime fasi dell'infezione. E' stato osservato che la comparsa di tale antigene nel fegato precede o coincide con l' elevazione degli indici di necrosi epatica. Inoltre, HEV Ag induce la formazione di anticorpi anti-HEV negli stessi primati infetti e la guarigione dall'infezione si accompagna allo sviluppo di anticorpi specifici. Si può concludere che il danno epatocellulare causato dall'infezione

da HEV sia indotto dall' attivazione della risposta immunitaria di tipo cellulo-mediata verso gli antigeni virali non rilevabili nel sangue ma solo a livello epatico, pertanto, più tardivo rispetto all'ingresso del virus nel parenchima epatico. Anche nell'uomo è caratteristica la dissociazione fra l'andamento della viremia e degli indici di necrosi: le transaminasi sieriche raggiungono valori elevati all'inizio della malattia, per poi diminuire progressivamente mentre la viremia è bassa nelle fasi iniziali e poi aumenta gradualmente. Al contrario, nelle altre forme di epatite virale, la comparsa degli anticorpi coincide con la scomparsa della viremia.

Secondo alcuni Autori la viremia si riduce rapidamente durante la successiva fase itterica ed il genoma non è più rilevabile nel momento in cui le transaminasi raggiungono il picco massimo di concentrazione sierica (Pieri, 2008). Esistono tuttavia, casi di viremia protratta in cui la positività permane fino a 16 settimane dopo l'

inizio dei sintomi. Da un recente studio condotto in Cina non è emersa alcuna correlazione tra i livelli sierici di ALT ed HEV-RNA: su 44 pazienti affetti da epatite acuta da HEV, 36 (81,8%) presentavano elevati livelli di viremia anche dopo il picco di transaminasi, e la viremia persisteva elevata per lunghi periodi (in media 53 giorni) nonostante la riduzione degli indici di citolisi epatica. Questo dato suggerisce la possibilità dell'esistenza di un meccanismo differente dalla lisi cellulare per spiegare la liberazione del virus dall'epatocita e avvalora l'ipotesi dell'esistenza di siti extraepatici di replicazione virale, come precedentemente menzionato.

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



Andamento delle transaminasi sieriche.

Caratteristiche cliniche

L'Epatite E non può essere differenziata dalle altre epatiti acute virali solo sulla base degli aspetti clinici. Le indagini sieroepidemiologiche mettono in evidenza che sono frequenti le infezioni subcliniche.

L'epatite E, infatti, si manifesta con forme cliniche di diversa intensità, che vanno da forme subcliniche a malattie fulminanti.

Tuttavia, nelle forme acute sintomatiche (epatite acuta itterica), come avviene in corso di epidemie, le manifestazioni cliniche sono simili a quelle di altre epatiti virali e l'andamento della malattia può essere suddiviso in quattro fasi. Il periodo di incubazione (asintomatico) può durare dai 14 ai 64 giorni (in media 42). Già prima della comparsa dei sintomi può essere messo in evidenza un aumento delle transaminasi sieriche. Il secondo periodo è definito "preitterico" ed è caratterizzato da una sintomatologia aspecifica, con sintomi simil-influenzali quali tremori, anoressia, nausea, vomito, diarrea, dolori articolari, temporale rash cutaneo, disturbi dispeptici (nel 50%), dolore all'ipocondrio destro (70%), malessere, astenia, febbre (nel 15%). Il terzo periodo, "itterico", rappresenta la fase conclamata che vede la

comparsa di urine ipercromiche, feci ipocoliche e ittero.

I pazienti presentano bilirubinuria, bilirubinemia, elevazione degli enzimi epatici. I valori di transaminasi, bilirubina e fosfatasi alcalina sieriche ritornano solitamente normali entro 1-6 settimane.

Con la comparsa dell'ittero, la febbre e gli altri sintomi prodromici tendono rapidamente ad attenuarsi fino a scomparire. Alla palpazione dell'addome è frequente apprezzare un fegato ingrandito, di consistenza parenchimatosa e lieve splenomegalia.

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

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 (Caprioli et al, 2005).

L'epatite E è una patologia a carattere acuto che

non tende alla cronicizzazione e alla cirrosi. In alcuni pazienti si può tuttavia avere una forma prolungata con colestasi, persistenza dell'ittero e intenso prurito. La prognosi è comunque per lo più favorevole e la malattia e l'ittero tendono a risolversi spontaneamente nel giro di 2-6 mesi.

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

La letalità è generalmente inferiore al 2% ma, nelle donne in gravidanza, in particolare nel 2° e 3° trimestre, l'esito può essere infausto nel 15-25% dei casi.

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 gravide sono sconosciute.

Nel 1980 si verificò in Madaia, una città algerina, un focolaio di epatite E conseguente alla contaminazione accidentale da scarichi fognari del

fiume che riforniva la maggior parte della regione colpita, in seguito a un difettoso funzionamento dell'impianto di clorazione dell'acqua potabile. Le persone colpite furono per lo più giovani adulti e fu osservata una drammatica mortalità fra le donne gravide: tutte le 9 pazienti gravide ricoverate in ospedali morirono.

Questo dato si contrappone all'andamento delle altre forme virali in cui lo stato di gravidanza non rappresenta di per sé un fattore di rischio di evoluzione in epatite fulminante. La ragione di questa elevata mortalità non è infatti del tutto chiara, ma secondo alcuni Autori lo stato di gravidanza predisporrebbe ad una maggiore suscettibilità verso le prostaglandine ed i leucotrieni, mediatori chimici presumibilmente coinvolti nella patogenesi delle epatiti fulminanti. E' stata avanzata l'ipotesi infatti secondo cui la letalità particolarmente elevata nelle donne in gravidanza possa essere dovuta alla particolare suscettibilità di questa categoria all'effetto

endotossina mediato. Sembra infatti che l'HEV danneggi le cellule epatiche riducendo la resistenza alle endotossine prodotte dai batteri nel tratto intestinale. La stessa reazione infiammatoria del 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. Dalla comparsa dei primi sintomi epatici, la morte sopraggiunge in 4-8 settimane a causa dell'encefalopatia fulminante, diatesi emorragica o collasso renale.

Ricerche su animali hanno infatti confermato un ruolo diretto del virus HEV nel precipitare lo stato di pre-eclampsia come conseguenza del danno dell'epitelio dei tubuli renali causato dalla localizzazione e dalla replicazione virale in questa sede, probabilmente favorita dalle citochine rilasciate dalle cellule di Kupffer attivate. Nonostante il tropismo selettivo del virus per il

tessuto renale, sembra che non si verificano particolari danni d'organo al feto nelle donne gravide che sopravvivono.

E' certo che l' infezione in gravidanza è associata ad una maggiore percentuale di parti prematuri comunque a un maggior numero di complicanze *peri o post partum*.

Da ulteriori studi è stato constatato che la malattia si può trasmettere verticalmente da madre a feto, ma non per via sessuale (Emerson et al.,2002).

Alcuni autori (Teo et al.,2007) hanno distinto sia clinicamente che epidemiologicamente le due forme di epatite E, che si manifesta 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 maggiore 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.

L'infezione da HEV può anche essere 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.

Aspetti istopatologici

Dal punto di vista istopatologico l'epatite E presenta alcuni

aspetti differenti dalle altre forme di epatite acuta.

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, caratterizzata da ricchi infiltrati parenchimali e periportali con proliferazione dei colangioli, intensa colestasi citoplasmatica ed evidenti trombi biliari. In altri pazienti è possibile riscontrare la presenza di *cellule balloniformi* (epatociti degenerati) e necrosi epatocitaria focale o confluyente. In tal caso, le lesioni focali sono molto simili a quelle osservate in corso di epatiti associate a farmaci, con alterazioni regressive disseminate degli epatociti, accentuata colestasi, con accumulo di bile, infiammazione portale con infiltrazione di neutrofili, macrofagi e linfociti.

Talvolta si osserva un infiltrato infiammatorio lobulare costituito prevalentemente da macrofagi e linfociti; nella forma ad impronta colestatica, l'infiltrato è costituito invece da leucociti polimorfonucleati.

Un'altra caratteristica peculiare è rappresentata dalla ipertrofia e iperplasia delle cellule di Kupffer e di quelle perisinusoidali, mentre gli

spazi portali sono sede di infiltrato infiammatorio misto. Infatti l'essudato infiammatorio infiltra gli spazi portali ed è composto principalmente da linfociti e macrofagi, mentre i linfociti polimorfonucleati sono scarsi ed interessano soprattutto le forme colestatiche. Durante le lesioni fulminanti le lesioni sono gravi, gran parte degli epatociti sono colpiti da necrosi massiva, fino al collasso del parenchima epatico.

Prognosi e profilassi

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

ricorrenti sono state descritte sperimentalmente solo nei primati.

La prognosi a lungo termine dell'epatite E è buona ma i tassi di mortalità rimangono tuttora elevati in determinate categorie a rischio, in primo luogo fra le gestanti specie se contraggono l' infezione durante il III trimestre di gravidanza.

Anche la denutrizione sembra essere un fattore favorente l'evoluzione verso forme fulminanti, ma negli ultimi anni si è stabilito che la superinfezione con HEV determina un aggravamento di un'eventuale malattia epatica cronica. Nei pazienti affetti da epatite cronica HBV o HCV correlata il virus dell'epatite E aumenta la mortalità: molti pazienti sviluppano una sindrome epato-renale, un'encefalopatia epatica o necrosi massiva del parenchima epatico. Per tale motivo, i pazienti con epatopatie croniche o cirrosi dovrebbero prendere ogni precauzione soprattutto in vista di viaggi verso zone endemiche per HEV.

L'infezione può essere anche del tutto asintomatica; la frequenza di queste forme non è nota, ma probabilmente supera ampiamente i casi con manifestazioni cliniche.

Sono in fase di sperimentazione vaccini prodotti con antigeni ricombinati. Un vaccino sperimentale ricombinante che utilizza ORF 2 è risultato in grado di proteggere i macachi dalla malattia ma non dall'infezione (Tsarev S.A. *et al.*, 1997). Un nuovo e promettente vaccino orale è stato ottenuto sfruttando la capacità della proteina capsidica di HEV di autoassemblarsi in vitro quando viene espressa in cellule di insetto, formando delle pseudo-particelle virali prive di acido nucleico.

Tali particelle sono risultate protettive per le scimmie senza bisogno di utilizzare adiuvanti (Li T.C. *et al.*, 2004).

In mancanza quindi di una profilassi vaccinale, riveste particolare importanza la profilassi igienico-sanitaria soprattutto nei casi epidemici; questa si basa sulla sanificazione dell'acqua e

sull'eliminazione delle contaminazioni fecali dell'acqua da bere e del cibo. Data la provata trasmissione del virus attraverso l'assunzione di fegato di animali infetti si dovrebbe evitare di consumare carne cruda o poco cotta. Da evitare anche il consumo di molluschi marini crudi.

Non è chiaro se l'immunità acquisita nel corso dell'infezione da HEV sia vitalizia come nel caso dell'epatite A.

Malattia nel suino

Patogenesi nel suino

La trasmissione dell'infezione nel suino è stata ottenuta sperimentalmente per inoculazione intravenosa e per via orale somministrando sospensioni fecali infette (Kasorndorkbua C. *et al.*, 2004). In condizioni naturali la trasmissione oro-fecale sembra essere quella principale. Non è stata ottenuta la trasmissione dell'infezione mediante estratti di tonsille e secrezioni nasali (Kasorndorkbua C. *et al.*, 2004); la trasmissione iatrogena mediante aghi da un soggetto all'altro non sembra avere importanza, infatti la scarsa quantità di sangue che rimane nell'ago dopo l'iniezione e la breve durata della viremia fanno sì che non vengano veicolate abbastanza particelle virali per trasmettere l'infezione (Kasorndorkbua C. *et al.*, 2004). I tessuti nei quali HEV si replica

precocemente e più a lungo, da 3 a 27 giorni p.i. (*post infection*), sono fegato, intestino tenue, colon e linfonodi (Halbur *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001).

Il fatto che in corso d'infezione sperimentale l'RNA virale sia presente nelle feci prima che nella bile ed in quantità 10 volte maggiore rispetto a quest'ultima hanno fatto ipotizzare che, una volta penetrato per via orale e prima d'indurre viremia, il virus replichi nell'intestino. Successivamente raggiunge il fegato tramite la vena porta, replica nel citoplasma degli epatociti e viene rilasciato nella bile e nel sangue.

Sperimentalmente la viremia compare da 5 a 14 giorni dopo l'inoculazione intravenosa e si protrae per 1 - 2 settimane in alcuni casi con fasi di intermittenza (Kasorndorkbua C *et al.*, 2004). L'escrezione virale con le feci inizia circa una settimana post infezione e dura per 3-4 settimane (Meng X.J. *et al.*, 1998). La sierconversione si ha a 2 settimane p.i. (Meng X-J *et al.*, 1998).

Analogamente a quanto accade nell'uomo, si ritiene che la via principale di trasmissione sia quella oro-fecale, mentre non è stata dimostrata la trasmissione verticale del virus. Sperimentalmente è stata provata la trasmissione dell'infezione da animali inoculati ad animali sani posti a contatto (Caprioli et al, 2005).

Anche per il suino, non è ancora chiaro in che modo HEV, una volta penetrato, raggiunga il fegato né quali siano i siti iniziali di replicazione. In animali infettati per via endovenosa è possibile rilevare 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, oltre che nel fegato si ritrova soprattutto nel tratto intestinale e nei linfonodi. La bile è il campione in cui le possibilità di evidenziazione di HEV sono più alte, seguita dai linfonodi mesenterici, fegato, feci e siero.

La maggiore presenza del virus nella bile e nei linfonodi mesenterici sarebbe giustificata dal fatto che il fegato e i linfonodi rappresenterebbero i siti principali di replicazione. La viremia ha una durata di circa 2 settimane, mentre nelle feci è possibile rilevare HEV per un periodo medio di 3-4 settimane. La sier conversione avviene 2-3 settimane p.i. Queste osservazioni ed il fatto che in corso d'infezione sperimentale l'RNA virale sia riscontrabile nelle feci prima che nella bile, hanno fatto ipotizzare che, una volta penetrato per via oro-fecale e prima di indurre viremia, il virus si replichi nell'intestino. 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 soggetti sotto i 2 mesi e sopra i 6-8 mesi di vita sono negativi.

In seguito a queste rilevazioni e poiché si ritiene che l'immunità materna duri circa 2 mesi, si

ipotizza che l'infezione naturale avvenga normalmente a circa 2-3 mesi d'età.

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, con successiva siero conversione ed eliminazione del virus ad opera del sistema immunitario. L'infezione sarebbe quindi di breve durata, autoestinguendosi nel giro di poche settimane. Recentemente, tuttavia, il virus è stato rinvenuto anche in animali prossimi all'età di macellazione (circa 6 mesi), nei riproduttori (> 8 mesi) e nel fegato di animali macellati. Non è chiaro se la presenza di HEV in soggetti adulti sia il risultato di un'infezione prolungata nel tempo, acquisita tardivamente, o di reinfezione.

Questa osservazione potrebbe mettere in discussione la presenza di un solo sierotipo di HEV: non è infatti possibile escludere re-infezioni successive nel corso della vita dell'animale,

causate da ceppi verso cui la precedente immunità non sarebbe protettiva.

Dal punto di vista sierologico, a seguito dell'infezione inizia la produzione di IgM, seguita 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 sieroconversione avviene in seguito alla fase viremica intorno ai 3-4 mesi di vita (picco anticorpale a 4 mesi) e gli animali restano positivi fino a 5-6 mesi di vita, quando le IgG cominciano lentamente a decrescere.

Aspetti clinici

In uno studio di P.G. HALBUR diversi suini sono stati infettati sperimentalmente, una parte con uno

stipite di HEV di origine umana e una parte con uno stipite di origine suina, e successivamente testati con RT-PCR virale su siero, feci, fegato e bile. Il genoma virale è stato svelato nelle feci e nel siero dal 7° giorno p.i. fino al 35°-42° giorno p.i., rispettivamente per suini infettati con ceppo suino ed umano, e fino al 27° giorno p.i. soltanto nel siero. Nel fegato e nella bile la presenza del virus è stata rilevata al secondo giorno p.i. (Halbur P.G. *et al.*, 2001).

Le uniche alterazioni patologiche rilevate macroscopicamente durante l'infezione da HEV, dal settimo al cinquantesimo giorno post infezione, erano un medio moderato ingrossamento dei linfonodi mesenterici ed epatici. Microscopicamente è stata osservata una epatite linfoplasmocitaria multifocale caratterizzata dalla presenza di modesti infiltrati sinusoidali e periportali e di limitate aree focali, a distribuzione irregolare, di vacuolizzazione e necrosi epatocellulare (Meng X.J. *et al.*, 1997;

Meng *et al.*, 1998; Marcato P.S. e Perillo A., 2000; Halbur P.G. *et al.*, 2001 ; Williams T.P.E *et al.*, 2001).

Il virus non sembra essere particolarmente patogeno per il suino domestico: HEV provoca di regola infezioni subcliniche con segni di epatite rilevabile solo a livello istologico e caratterizzata da presenza di infiltrati linfoplasmocitari multifocali sinusoidali e periportali e di aree focali a distribuzione irregolare di vacuolizzazione e necrosi epatocellulare. In alcuni casi è stata rilevata un'enterite linfoplasmocitaria e una nefrite interstiziale multifocale linfoplasmocitaria. In animali infettati sperimentalmente è stato inoltre riscontrato un ingrossamento dei linfonodi mesenterici ed epatici. 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 HEV non risulta patogeno per le scrofe

gravide e non interferisce con lo sviluppo fetale (Kasorndorkbua *et al.*, 2003).

Alcuni autori hanno ipotizzato (Caprioli *et al.* 2005) che il virus nel suino possa avere un comportamento analogo a quello dell'epatite A nell'uomo il quale è patogeno solo per i soggetti adulti e non nei giovani. Secondo questa ipotesi, nella maggior parte dei casi la malattia non si manifesterebbe in maniera 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 protettiva.

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 linfocitica 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.

Alcuni Autori ritengono che HEV, di per sé scarsamente patogeno, possa però agire in sinergia con altri agenti virali come ad esempio il porcine circo virus 2 (PCV2), determinando così malattia. Se i due virus possano agire in sinergia o essere l'uno predisponente la presenza dell'altro resta comunque ancora da chiarire.

CAPITOLO 4: **DIAGNOSI DI INFEZIONE DA HEV**

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, rendono difficile identificare un optimum diagnostico, soprattutto nel caso del suino in cui non sono disponibili dati clinici di supporto.

Diagnosi clinica

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

- viaggi in zone endemiche

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

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

Tecniche di diagnostica diretta:

Microscopia elettronica

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

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

PCR qualitativa

Il primo clonaggio dell'intero genoma virale è stato ottenuto nel 1991 (Tam et al., 1991). Da allora numerose coppie di primer sono state disegnate per amplificare porzioni più o meno vaste di 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. 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 ad 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, i campioni in cui la carica virale era bassa in partenza, si possono ottenere risultati di falsa negatività.

In alternativa alla metodica basata su due reazioni consecutive, si possono utilizzare la tecnica di RT-PCR one-tube in cui le reazioni di retro trascrizione e amplificazione avvengono nello stesso passaggio, coesistendo nella mix di reazione sia l'enzima retrotrascrittasi che l'enzima DNA polimerasi. Tale metodica utilizza la *Platinum Taq Dna* polimerasi, una Taq Dna ricombinante complessata con anticorpi, che bloccano l'attività della polimerasi a temperatura ambiente. L'attività enzimatica è pertanto ferma durante la fase RT e riprende dopo il primo step di

denaturazione a 94°C della successiva reazione di PCR, provvedendo ad un automatico “*hot start*” che consente di aumentare sensibilità e specificità. Un vantaggio ulteriore di questa procedura è la minimizzazione del rischio di cross-contaminazione tra campioni, poiché la provetta di reazione viene aperta una sola volta al termine del procedimento, per il controllo del prodotto.

Per quanto riguarda la reazione di amplificazione, i primer più utilizzati sono disegnati sulla base delle regioni del genoma più conservate tra i diversi ceppi, tra cui quelle che codificano per l’elicasi e la polimerasi, e la parte terminale dell’ORF2. I primer utilizzati nei controlli 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, proprio per evitare il rischio di non identificare come positivo un campione solo

perché infetto da un ceppo appartenente ad un genotipo differente.

In genere 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 primer 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. Con questa metodica, inoltre, si ottiene anche una maggiore specificità poiché una seconda fase di riconoscimento(oligonucleotidi interni) del template dà prodotti solo se il template è effettivamente la sequenza cercata. A sensibilità e specificità notevolmente aumentate si contrappone lo svantaggio di poter facilmente dare luogo a

contaminazioni crociate. Manipolando un prodotto già amplificato è infatti molto frequente poter cross- contaminare diversi campioni, quindi si rendono necessarie severe misure di controllo.

Una volta effettuata la reazione di amplificazione, si effettua una corsa elettroforetica su gel di agarosio, 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.

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. Ciò 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 e in più, rispetto alla PCR tradizionale si possono avere dati quantitativi molto accurati.

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.

Per quanto riguarda la diagnostica quantitativa di HEV, esistono diversi protocolli pubblicati in letteratura (Orrù et al,2004;gyarmati etal.,2007).

In generale, i protocolli di real time sono più sensibili rispetto a quelli di PCR convenzionale, anche se nel caso della nested-PCR la differenza si riduce di molto.

Coltivazione in culture cellulari

Il primo esperimento di coltivazione di HEV su linee cellulari risale al 1996 (Tam et al., 1996). Epatociti provenienti da scimmie sperimentalmente infettate con HEV (Burma strains, prototipo del genotipo 1) furono isolati dai fegati messi in coltura.

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 si replicava anche nel sistema in vitro.

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; in seguito l'inoculo 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 protocollo di PCR qualitativa(Mizuo et al.,2002), e quantitativa (Jothikumar et al.,2006). Una sola linea cellulare è stata in grado di supportare efficacemente la replicazione del virus, quella costituita dalle PLC/PRFR/5, cellule di epatocarcinoma umano,con rese ottimali a temperatura di incubazione di 35,5°C. Gli autori hanno dimostrato che così è possibile sviluppare un sistema colturale adeguato anche per HEV, anche se rimane un virus difficile da coltivare con rese accettabili(Tanaka et al.,2007).

Tecniche istopatologiche

Il virus può essere evidenziato direttamente all'interno dei tessuti tramite 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. 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.

In un lavoro successivo sono state comparate le tecniche di RT- nested-PCR a partire da tessuti fissati in formalina o paraffinati, con quelle 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 anche in campioni paraffinati archiviati, con

possibilità quindi di effettuare studi di prevalenza di tipo retrospettivo.

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

Tecniche di diagnostica indiretta

La diagnostica 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).

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 state espresse con successo in diversi sistemi ricombinanti quali cellule procariote, lieviti, cellule animali (particolarmente utilizzate quelle dell'intestino) 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 igM i ritrovano nelle prime due settimane dall'inizio della siero conversione, mentre la presenza di igG indica un'infezione non necessariamente recente.

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.

I virus suini sono geneticamente ed antigenicamente correlati a quelli umani ed aviari, ed in letteratura è ampiamente riportato come molti epitopi, in particolare quelli di ORF2, cross-reagiscono tra le varie specie ed i vari ceppi. Tuttavia, anche se sono stati allestiti Kit commerciali ELISA che usano, come antigeni, proteine ricombinanti create appositamente per l'individuazione degli anticorpi anti-HEV sul siero suino, sono comunemente utilizzati come antigeni derivanti da ceppi umani, cambiando poi semplicemente l'anti-anticorpo marcato di rivelazione. Questo fatto indica che gli epitopi comuni dei ceppi umani vengono riconosciuti anche dalle igG specifiche anti-swHEV.

CAPITOLO 5: **HEV** come zoonosi

In questi ultimi anni le maggiori conoscenze delle caratteristiche epidemiologiche e virologiche di HEV hanno dimostrato come l'epatite E possa essere considerata una zoonosi emergente.

Il principale serbatoio animale è rappresentato proprio dal suino e le persone che lavorano a stretto contatto con tali animali sono considerate a rischio di infezione.

Allevatori, personale addetto agli animali e veterinari possono venire in contatto con il virus nel periodo viremico e di massima escrezione fecale.

Studi recenti hanno evidenziato un' alta prevalenza di anticorpi anti-HEV nei soggetti che lavorano a stretto contatto con i suini rispetto alla popolazione generale e ad altre categorie professionali (Martelli et al,2008).

Inoltre, non deve essere sottostimato il possibile rischio di diffusione del virus nell'ambiente con i reflui di allevamenti suinicoli, con conseguente contaminazione dei vegetali e delle acque, sia ad uso potabile, che di balneazione.

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

Per quanto riguarda le altre modalità di trasmissione, essendo breve la durata della

viremia (nonostante siano stati riportati casi di viremia protratta fino a 4-6 mesi), la trasmissione attraverso scambi di sangue è piuttosto rara, ma teoricamente possibile (Martelli et al,2008).

I pochi casi di infezione avvenuti con questa modalità sono stati segnalati in personale sanitario ospedaliero e nei feti di madri infettatesi durante il terzo trimestre di gravidanza. Tuttavia i rari casi viremia prolungata potrebbero costituire un pericolo per quanto riguarda la trasmissione dell'infezione attraverso il sangue infetto: la determinazione degli anticorpi anti-HEV non viene eseguita di routine in corso di donazione di sangue, pertanto alcuni casi potrebbero sfuggire ai normali controlli clinico-sierologici aumentando il rischio di trasmissione

dell'infezione per via parenterale.

Sembra inoltre che il virus HEV sia presente nel colostro con una concentrazione notevolmente più bassa rispetto al sangue materno ed è stato concluso che l'allattamento al seno sembra essere sicuro. La presenza del virus nelle feci, e quindi l'infettività, appare limitata alla settimana precedente l'esordio della malattia e alle due immediatamente successive.

Questo periodo è considerato quello di maggior contagiosità. Il titolo infettante di HEV nelle feci è pari a 10^7 particelle virali per grammo, 2 volte inferiore al titolo fecale in corso di infezione da HAV. Non essendo stati segnalati casi di cronicizzazione della malattia né portatori sani del virus, le fonti di contagio sono costituite dai soli soggetti con infezione acuta (Martelli et al, 2008).

Possibilità di infezione interspecifica

Già a partire dai primi anni '90 anticorpi anti Hev erano stati rilevati in numerose specie animali quali scimmie, suini, roditori, polli, cani, gatti, bovini, ovicaprini, sia in Paesi in via di sviluppo, sia industrializzati. Fin da allora era stato quindi avanzato il sospetto che l'HEV umano fosse in grado di infettare altre specie animali o, che esistessero in natura virus HEV simili.

Oggi la capacità di HEV di effettuare il salto di specie è stato ampiamente confermato da infezioni sperimentali che hanno dimostrato la possibilità di infettare il suino con ceppi umani ed i primati non umani con ceppi suini. I ceppi suini in grado di infettare le scimmie

appartengono fino ad ora esclusivamente al genotipo 3. Tali virus causano sostanzialmente infezioni asintomatiche, ma, vista anche la notevole variabilità genetica del virus, alcuni Autori non escludono che particolari stipiti possano risultare più patogeni di altri o che, in situazioni particolare dell'ospite, anche ceppi scarsamente virulenti possono causare una malattia più o meno grave. Altre importanti evidenze che supportano la possibilità di trasmissione zoonosica della malattia, sono venute dall'analisi genetica e filogenetica di ceppi suini ed umani isolati in varie regioni del mondo (Alini D., 2008).

La trasmissione interspecie è stata dimostrata sperimentalmente: uno stipite americano di HEV umano è stato trasmesso al suino ed uno stipite di origine suina è risultato infettante per

le scimmie (*Macaca mulatta*) e per gli scimpanzé (*Pantroglodytes*) (Meng X.J. *et al.*, 1998a). Questi due stipiti appartengono entrambi al genotipo 3, mentre tentativi di infettare il suino con isolati umani appartenenti al genotipo 1 sono falliti (Meng X.J. *et al.*, 1998b).

I ceppi suini in grado di infettare le scimmie in condizioni sperimentali, appartengono fino ad ora esclusivamente al genotipo 3. Tali virus causano infezioni asintomatiche ma, vista la notevole variabilità genetica del virus, alcuni Autori non escludono che particolari stipiti possano risultare più patogeni di altri o che, in situazioni particolari dell'ospite, anche ceppi scarsamente virulenti possano causare una malattia più o meno grave (Meng X.J. *et al.*,

1998a; Meng X.J. *et al.*, 1998b; Halbur P.G. *et al.*, 2001; Pei Y. e Yoo D., 2002).

Anticorpi anti-HEV sono stati trovati in suini, cinghiali, bovini, pecore, capre, polli, bufali, cervi, ratti, topi, gatti e scimmie, facendo sorgere il sospetto che alcuni animali possano fungere da riserva dell'infezione anche nelle aree non endemiche (Favorov M.O. *et al.*, 2000; He J. *et al.*, 2002; Sonoda H. *et al.*, 2004; Wang Y.C. *et al.*, 2002).

Anche se inizialmente tali positività potevano essere correlate ad una cross-reattività con un virus simile ad HEV, il successivo isolamento del virus in alcune specie animali ha dimostrato che era in causa lo stesso virus che infetta l'uomo.

Il primo stipite di HEV di origine animale è stato identificato nel suino negli Stati Uniti.

Questo nuovo virus è stato denominato HEV suino (Meng X.J. *et al.*, 1997) e ha mostrato una somiglianza genetica con due isolati umani statunitensi di HEV (US- 1 e US-2) provenienti da pazienti che non avevano viaggiato in aree endemiche (Meng X.J. *et al.*, 1998a). Da allora numerosi ceppi di HEV suino sono stati isolati in vari paesi: USA, Taiwan, Canada, Olanda, Spagna, Nuova Zelanda, Corea, Indonesia, India, Australia, Regno Unito e Giappone (Banks M. *et al.*, 2004; Huang F.F. *et al.*, 2002; Pina S. *et al.*, 2000; van der Poel W.H.M. *et al.*, 2001; Wibawa I.D.N. *et al.*, 2004).

Più recentemente, un ceppo di HEV isolato da un paziente in Gran Bretagna ha mostrato il 100% di omologia aminoacidica con 2 ceppi suini circolanti sul territorio inglese (Banks M. *et al.*, 2004b).

L'osservazione che stipiti suini di HEV sono antigenicamente e geneticamente omologhi a quelli umani isolati nella stessa area geografica piuttosto che a stipiti suini da altre zone, ha avvalorato l'ipotesi che stipiti virali di origine suina possano infettare anche l'uomo.

Il virus è stato poi isolato anche in altre specie animali: cinghiali, cervi Sika e manguste (He J. *et al.*, 2002; Nakamura M. *et al.*, 2006; Sonoda H. *et al.*, 2004; Tei S. *et al.*, 2003). La contemporanea presenza di HEV e di bassi livelli di IgG anti-HEV nei ratti fa pensare che in questi animali la viremia possa persistere per un certo periodo di tempo dopo la comparsa degli anticorpi, contribuendo alla diffusione del virus nell'ambiente; studi su ratti (*Rattus norvegicus*) catturati in diverse regioni degli

Stati Uniti hanno messo in evidenza elevate sieroprevalenze (Lazizi Y.K. *et al.*, 1999).

Il ruolo del suino nella trasmissione di HEV all'uomo non è ancora chiaro; il virus risulta essere molto diffuso nella popolazione suina dove infetta prevalentemente soggetti sopra i tre mesi di età causando lievi alterazioni a livello epatico.

Un ulteriore supporto all'ipotesi che vede il suino quale probabile serbatoio d'infezione per l'uomo è venuto da studi sieroepidemiologici condotti in USA, Taiwan, Moldavia e Grecia. In questi studi sono state osservate sieropositività nei confronti di HEV significativamente più elevate in persone professionalmente esposte al contatto con suini rispetto a popolazioni di controllo. La presenza di anticorpi anti- HEV in allevatori di suini del Nord Carolina è risultata

di 4,5 volte superiore rispetto a quella in altre categorie professionali (Withers M.R. *et al.*, 2002).

Sempre negli Stati Uniti , Meng e coll. hanno rilevato che il 26% dei veterinari è sieropositivo per HEV contro il 18% dei normali donatori di sangue (Meg X.J. *et al.*, 2002).

A Taiwan e in Moldova rispettivamente il 26,7% ed il 51,1% delle persone che persone che lavorano a contatto con suini possiedono anticorpi anti-HEV, contro l'8% ed il 24,5% delle rispettive popolazioni di controllo (Hsieh S.Y *et al.*, 1999; Drobeniuc J. *et al.*, 2001).

In Grecia è stato rilevato che il 40% degli allevatori di suini ed il 22,2% dei macellatori sono sieropositivi per HEV, contro il 15,7% dei normali donatori di sangue (Siochu A. *et al.*, 2004).

Il rischio zoonotico

Nella storia della ricerca su HEV sono emerse prove che conducono all'ipotesi dell'esistenza di un rischio zoonotico e la consolidano, prima tra tutte la scoperta di anticorpi anti - HEV nel siero di specie animali diverse, in tutte le parti del mondo. In seguito l'analisi filogenetica dei virus isolati nelle diverse specie ha permesso di evidenziare correlazioni aminoacidiche, nucleotidiche, antigeniche tra di loro, ed importanti correlazioni tra questi ed il virus umano.

Queste correlazioni sono particolarmente evidenti tra i ceppi umani e quelli suini, i quali non raramente risultano geneticamente identici.

Approfondendo ulteriormente le indagini, si è constatato che esiste una netta territorialità di

HEV: il ceppo animale isolato in una determinata regione risulta strettamente correlato con il ceppo umano presente nella stessa regione, e viceversa, ma presenta anche significative divergenze con i ceppi isolati in altre regioni (Alini D., 2008).

L'esistenza di un rischio zoonotico è supportata da altre prove, di seguito riportate. L'isolamento in aree endemiche (Nepal, 1995) di ceppi umani dalle feci di suini domestici viventi a stretto contatto con persone infette. La capacità di HEV di saltare le barriere di specie, confermata da infezioni sperimentali HEV umano/primati, HEV del pollame/tacchino, HEV suino/primati, HEV suino/uomo.

I ceppi HEV animali causano infezioni subcliniche, eccetto quelli aviari, ma considerando la loro alta variabilità genetica, non è da escludere che alcuni siano naturalmente più virulenti di altri, ed anche che si possa avere un comportamento simile a quello del virus dell'influenza aviaria, che in certe condizioni ospite-correlate può passare da un livello di bassa patogenicità (LPAIV), ad uno di alta patogenicità (HPAIV). Una evidenza diretta che il suino, e probabilmente altre specie animali, possono infettare l'uomo, si è avuta in Giappone, dove alcuni casi di epatite E sono stati associati al consumo di carni e visceri crudi o poco cotti, di suino, cinghiale, cervo, 15-50 giorni prima dell'insorgenza dei sintomi, come risulta da indagini epidemiologiche precedentemente

svolte (Li T-C. et al, 2005; Meng et al.1999)

Questi avvenimenti non a caso sono stati riscontrati in Giappone: in questo Paese infatti è abitudine alimentare consolidata il consumo di pesce crudo (sashimi, sushi) e, anche se meno frequentemente, di carne cruda (incluso il fegato di alcuni mammiferi). Queste abitudini possono almeno parzialmente spiegare la situazione di "endemicità nascosta" o "criptica" dell'infezione da HEV in Giappone (Matsuda et al., 2003). La casistica riportata in letteratura e riferita al Giappone è molto varia: un caso coinvolgente due persone, di cui una deceduta, fu dovuto al consumo di fegato di cinghiale poco cotto; altri furono dovuti al consumo di carni di cervo poco cotte.

A titolo esemplificativo si descrivono brevemente due avvenimenti ritenuti

interessanti. Il primo è un caso legato al consumo di carne di cinghiale cacciato (Li T-C. et al, 2005) : la paziente consumò una prima volta la carne come componente di un "hot pot" (piatto simile alla fondue bourguignonne, nel quale la carne viene "cotta" al momento del consumo, immergendola in una pentola in cui sobbollono peperoncini, spezie, verdure) 11 settimane prima dell'insorgenza dei sintomi, e una seconda volta grigliata, 3 settimane dopo. Quest'ultima volta il pasto venne consumato insieme ad altre 10 persone, nessuna delle quali presentò malattia.

La paziente non aveva effettuato viaggi negli ultimi 30 anni.

Vennero analizzate delle porzioni avanzate dei due pasti (congelate dalla paziente all'atto della preparazione) e venne evidenziata una identità

nucleotidica del 99.95% tra il virus isolato dalla carne consumata la seconda volta, ed il virus isolato dalla paziente. La conclusione fu che l'infezione venne trasmessa dalla carne grigliata. Una osservazione interessante è che una sola persona su 11 presentò malattia, e quindi ciò potrebbe indicare che anche la sensibilità individuale abbia un ruolo importante nella evoluzione dell'infezione subclinica, clinica, fulminante.

Il secondo avvenimento interessante deriva da 9 casi di epatite E dovuti a consumo di fegato suino grigliato o poco cotto. Vennero effettuate analisi virologiche sul fegato posto in vendita nei negozi dell'isola di Hokkaido: il 2% dei campioni analizzati risultò positivo alla ricerca dell'RNA virale.

Da notare che uno dei pazienti aveva consumato fette di fegato fritto per sette giorni consecutivi (Yazaki et al., 2003). Per quanto riguarda l'Italia, esiste un lavoro svolto a Catania tra il 1980 ed il 1994 (Cacopardo et al., 1997) nel quale si evidenzia il rischio HEV (oltre che HAV, salmonella) rappresentato dal consumo di molluschi bivalvi crudi o poco cotti. Un recente caso di epatite E in Francia (2005) (Renou et al., 2007), in cui il paziente, abitante in area urbana ed al riparo da fattori di rischio (no viaggi in aree a rischio da almeno 1 anno, no alcool, no droghe i.v., no consumo di carne suina cruda/poco cotta), 8 settimane prima dell'insorgenza dei sintomi aveva acquistato un maiale vietnamita di 3 mesi di età, nato in Francia. Questo animale urinava e defecava

all'esterno dell'abitazione, ed il proprietario cambiava frequentemente la lettiera; l'animale era comunque spesso in casa ed altrettanto spesso veniva in contatto con il proprietario. Le analisi effettuate sugli isolati di uomo e pet hanno evidenziato due virus appartenenti al genotipo 3 con una omologia nucleotidica del 92%, ed aminoacidica del 98%. La divergenza nucleotidica osservata tra le due sequenze (8%) è nel range di omologia dei 10 sottotipi del genotipo 3 (90-94%) e depone per la estrema variabilità del virus, che fa parlare di "quasispecie" virali. A differenza dei casi di infezione trasmessi da alimenti precedentemente descritti, nei quali l'omologia era praticamente identica (tutte le "quasispecie" trasmesse), in questo caso non tutte lo sono state; probabilmente la diversa via di trasmissione

potrebbe avere attivato un fenomeno di selezione delle varianti con maggior potenziale zoonotico. E' evidente che in questo caso si può parlare di trasmissione diretta dell'infezione, visti i contatti frequenti uomo/animale e uomo/deiezioni dell'animale.

Casi di trasmissione alimentare nel mondo.

In Giappone è stato dimostrato che alla base di una parte considerevole dei casi di infezione umana vi è la trasmissione alimentare (Martelli et al,2008).

Alcuni pazienti hanno manifestato una forma acuta di epatite E dopo aver consumato carne

cruda di cervo Sika, carne di cinghiale alla griglia o bollita, fegato crudo di cinghiale.

In molti di questi casi, la trasmissione alimentare è stata dimostrata attraverso la messa in evidenza di ceppi di HEV geneticamente identici in campioni provenienti da pazienti affetti da malattia e nella carne o negli organi ancora conservati e ritenuti all'origine dell'infezione. Sempre in Giappone, è stato dimostrato che i consumatori abituali di carne cruda di selvaggina presentano valori di siero prevalenza più elevati rispetto a gruppi di controllo. Indagini effettuate su fegati crudi venduti in alcune macellerie giapponesi hanno dimostrato la presenza di HEV ad alti titoli in circa il 2% degli organi; analoghe ricerche condotte negli USA hanno rivelato percentuali di positività pari all'11%. La somministrazione

di questi organi suinetti SPF ha dimostrato che il virus presente era ancora infettante. Recentemente, anche in Olanda è stato segnalato un possibile caso di trasmissione alimentare di HEV correlato al consumo di carne di suino poco cotta mentre in Ungheria è stata segnalata un'associazione tra il consumo di salsicce crude e l'incidenza di HEV.

Nel suino è stato dimostrato che HEV si replica soprattutto nel fegato e nel tratto intestinale; il muscolo invece non sembra essere una sede elettiva di replicazione, anche se è comunque possibile che possa stazionare in queste sedi durante la fase viremica.

Anche l'ingestione di molluschi filtratori crudi potrebbe rappresentare un fattore di rischio, come suggerito dalle più elevate siero

prevalenze riscontrate in persone con questa abitudine alimentare (Martelli et al,2008).

Contatto con animali e reflui infetti

Studi sieroepidemiologici condotti in numerosi Paesi industrializzati hanno rilevato prevalenze anticorpali per HEV significativamente più elevate in persone professionalmente esposte al contatto con suini rispetto a popolazioni di controllo (Martelli et al,2008).

Anche l'esposizione alle carcasse di suini infetti o la lavorazione delle carni potrebbe rappresentare un fattore di rischio: casi di

epatite E sono stati infatti diagnosticati in operatori del macello nel Regno Unito e in Spagna. In Francia, recentemente è stato riportato anche un caso di possibile trasmissione di HEV da un maialino vietnamita da compagnia.

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. Potenziali vie d'infezione comprendono quindi anche il contatto con liquami e acque contaminati e il consumo di cibi da questi contaminati. Va tuttavia considerato che il virus è stato fino ad ora rilevato nelle vasche di raccolta dei liquami, ma non è finora stato riscontrato 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 improbabile la trasmissibilità con le acque nei Paesi industrializzati (Martelli, Di Bartolo, Caprioli, Ruggeri, Ostanello; 2008).

CAPITOLO 6 : **SCOPO DELLA TESI**

Negli ultimi 20 anni la patologia suina di origine virale si è arricchita di una serie di “nuove” malattie quali la sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV), la sindrome multi sistemica del deperimento post-svezzamento (PMWS) e le malattie associate all’infezione da porcine Circovirus 2 (PDNS, PNP, PRDC).

Oltre a queste patologie emergenti, recentemente sono stati evidenziati altri virus (ad esempio virus dell’epatite E, Torque Teno Virus), responsabili di infezioni apparentemente asintomatiche. L’importanza di queste infezioni emergenti va interpretata alla luce di alcune considerazioni:

- a) l’epidemiologia, il ruolo patogenetico e le modalità di trasmissione di questi virus sono spesso poco noti;
- b) l’attuale apatogenicità non esclude la possibilità di una loro evoluzione in grado di causare forme cliniche di malattia, in analogia con quanto è accaduto per il

PCV2; c) alcuni di questi virus, come appunto quello dell'epatite E, sono molto simili ai virus responsabili di patologia nell'uomo(Martelli et al.,2005).

L'epatite E è un problema emergente di sanità pubblica, non solo nei paesi in via di sviluppo, dove le condizioni igienico-sanitarie sono inadeguate, ma anche in numerosi paesi industrializzati fino a poco tempo fa considerati a basso rischio come quelli Europei.

Per ciò che concerne l'Italia, è disponibile un numero limitato di dati riguardanti la prevalenza di HEV nei suini, e questi derivano da due studi pubblicati recentemente, in cui sono stati presi in esame allevamenti suini della stessa area geografica (Caprioli et al.,2007; Di Bartolo et al.,2008). I dati emersi sono risultati in linea con quelli di altri lavori condotti in Europa e 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 .

In aggiunta, il ritrovamento del virus in animali prossimi all'età di macellazione desta qualche preoccupazione per la sanità pubblica, sottolineando un possibile trasmissione dell'infezione per ingestione di carni infette crude o poco cotte, in aggiunta al contatto diretto con gli animali lungo la filiera del suino.

La conoscenza dell'epidemiologia di HEV negli allevamenti suinicoli italiani è una premessa indispensabile per valutare se, anche nel nostro Paese, esistono ragionevoli possibilità di trasmissione dell'infezione all'uomo e se, quindi, possano essere necessarie delle misure sanitarie per la tutela dei consumatori, degli addetti al settore e delle produzioni suinicole. Nel suino la diagnostica presenta molte difficoltà per l'assenza di malattia manifesta, e per la carenza di dati di sequenza relativamente ai ceppi virali circolanti negli animali sia nel mondo che in particolare in Italia. HEV non è coltivabile su colture cellulari, e pertanto la sua presenza nei campioni deve essere evidenziata con metodiche che svelino i suoi antigeni o il suo genoma. Nella nostra indagine

abbiamo optato per la messa in evidenza della presenza dell'RNA virale mediante PCR. Tale tecnica ha raggiunto ottimi livelli di sensibilità, i costi si sono notevolmente ridotti ed in letteratura era già segnalata la sua applicazione per la ricerca di HEV. La PCR permette anche un ulteriore studio delle caratteristiche genetiche degli amplificati virali attraverso il loro confronto con quelli di altri isolati ottenuti da diverse specie animali e in diverse aree geografiche.

Lo scopo di questa tesi è stato di valutare la prevalenza di HEV nei suini domestici (Swine HEV), provenienti da diversi allevamenti suinicoli del sud-Italia, territorio dove tale indagine non è mai stata svolta, poiché per studiare le caratteristiche genetiche degli isolati virali e per meglio chiarire il ruolo del suino nell'infezione umana è importante avere a disposizione isolati virali da diverse aree geografiche.

L'indagine ha interessato diversi allevamenti dislocati nelle Province di Benevento, Foggia, Napoli e Potenza. L'indagine è stata svolta, con un lavoro di ricerca congiunto, nei laboratori di virologia dell'Ecolè

Veterinarie di Maison Alfort di Parigi ,dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma e nel laboratorio di Ispezione sanitaria degli alimenti di origine animale della facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli.

Gli animali sottoposti a tale indagine non presentavano alcuna patologia specifica, ed erano pronti per essere inseriti nella filiera produttiva e destinati all'alimentazione umana. I ceppi di HEV identificati nell'indagine sono stati, successivamente, caratterizzati geneticamente e correlati a livello filogenetico con altri ceppi suini ed umani, circolanti in diverse aree del mondo.

Lo scopo dello studio è stato quello di portare un contributo alla conoscenza della epidemiologia delle infezioni di HEV nel suino anche nella nostra Regione.

CAPITOLO 7: MATERIALI E METODI

Raccolta dei campioni

Nel periodo compreso tra Novembre 2008 e Giugno 2009 è stato eseguito sul territorio del sud Italia un monitoraggio per valutare la presenza del virus dell'Epatite E in 11 allevamenti.

I prelievi riguardavano campioni feci, fegato e siero.

La ricerca è stata condotta tenendo in considerazione quanto era riportato in letteratura per l'individuazione del virus in queste matrici, attenendoci alle ricerche condotte da altri autori in varie aree del mondo, sia in paesi industrializzati che in via di sviluppo.

Gli allevamenti interessati dal campionamento erano ubicati nel territorio delle province di: Benevento, Foggia, Napoli e Potenza.

Si trattava di allevamenti da ingrasso di cui 8 a ciclo aperto e 2 a ciclo chiuso, con una consistenza variabile di animali per allevamento.

-Prelievo campioni fecali: il campionamento è stato effettuato su un pool di feci, ottenuti prelevando campioni di feci in diversi punti all'interno dei box di stabulazione. Le feci raccolte sono state riposte in contenitori sterili da 120 ml con tappo a vite, trasportati, entro le 24 ore, in contenitore isotermico refrigerato al laboratorio e stoccati a -20°C .

-Prelievo campioni di fegato e siero: i campioni di fegato e siero sono stati prelevati direttamente al macello immessi in contenitori e provette sterili rispettivamente e immediatamente trasportati in contenitori isotermici refrigerati e in seguito stoccati a -80°C .

Tutti i suini campionati non presentavano alcuna patologia specifica, ed erano pronti per essere inseriti nella filiera produttiva e destinati all'alimentazione umana.

Una prima parte dei campioni è stata poi trasportata, in ghiaccio secco, per essere analizzata, a Parigi nel laboratorio di Virologia dell'Ecole Veterinaire di Maison Alfort sotto la direzione della dottoressa Nicole Paviò; ed una seconda parte a Roma nel laboratorio dell'Istituto Superiore di Sanità sotto la direzione del dottor Franco Maria Ruggeri.

- *Ripartizione sul territorio degli allevamenti sottoposti ad analisi*

La ripartizione degli allevamenti analizzati nel territorio è la seguente:

Provincia di Benevento:

- **B1:** data prelievo: 15/11/08, n. campioni: 3, età animali: 6-8 mesi , n. capi in allevamento: 650; n. Animali per box: 10;

- **B2:** data prelievo: 15/11/08, n. campioni: 3, età animali: 3 mesi, n. capi in allevamento: 600, n. animali per box: 20;

- **B3:** data prelievo: 15/11/08, n. campioni: 3, età animali: 5 mesi, n. capi in allevamento: 300, n. animali per box 20;

- **B4:** data prelievo: 15/11/08, n. campioni: 3, età animali: 4 mesi, n capi in allevamento: 750, n. animali per box: 20.

Provincia di Foggia:

- **F1:** data prelievo: 15/11/08, n. campioni: 3, età animali: 3-4 mesi, n. capi in allevamento: 1950, n. animali per box: 36;

- **F2**data prelievo: 15/11/08, n. campioni: 3, età animali: 3-4 mesi, n. capi in allevamento: 1800, n. animali per box: 112.

-**F3**data prelievo 19/06/09 n.campioni feci: 20; numero campioni fegato:10; numero campioni siero:20. Età animali 3-5 mesi, n.capi in allevamento:1600; n.animali per box n:40

-**F4** data prelievo 19/06/09 n.campioni: 20; età animali 3-5 mesi, n.capi in allevamento:1200; n.animali per box n:50

Provincia di Napoli:

- **N1** data prelievo: 15/11/08, n. campioni: 3, età animali: 3-4 mesi, n. capi in allevamento:1200, n. animali per box: 13 -14.

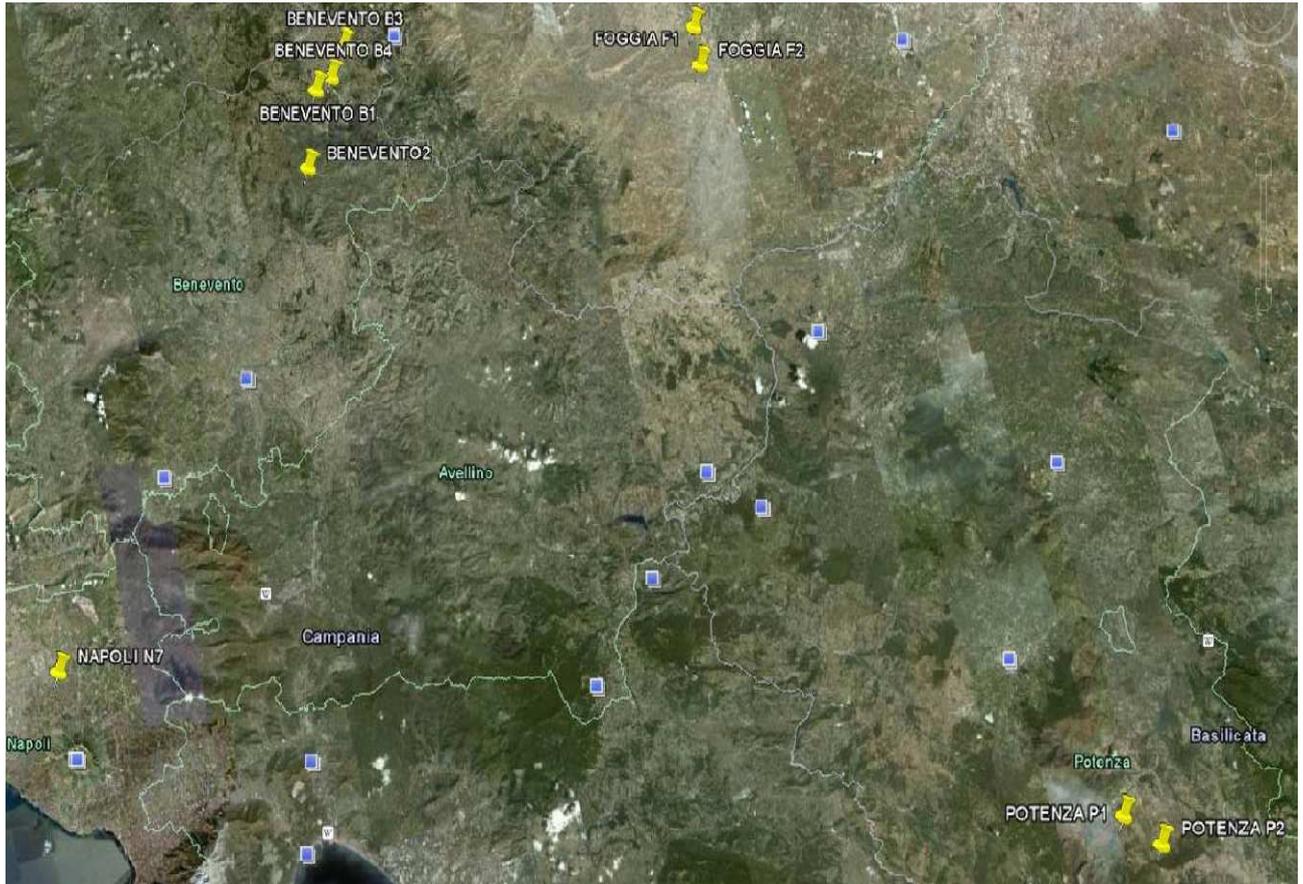
Successivamente sono stati analizzati 2 allevamenti a ciclo chiuso ubicati in

Provincia di Potenza:

- **P1** data: 28/01/09 n. campioni: 21, n. capi in allevamento: 120, età degli animali: 12-14 settimane, n. animali per box : 40, n. box 3;

- **P2** data: 28/01/09 n. campioni: 18, n. capi in allevamento: 35, età animali: 12-14 settimane, n. animali per box: 5;

per entrambe gli allevamenti sono stati analizzati 10 campioni con un totale di 20.



Dalla foto si evince la distribuzione geografica degli allevamenti indicati con i segnalini gialli

La distribuzione e le caratteristiche degli allevamenti esaminati.

Allevamento	Caratteristiche e Allevamento	Età degli animali	N°capi per allevamento	N°animali per box	N°campioni pool feci	N°campioni fegato	N°campioni siero
B1(Benevento)	Intensivo Ciclo aperto	6-8 mesi	650	10	3		
B2(Benevento)	Intensivo Ciclo aperto	3 mesi	600	20	3		
B3(Benevento)	Intensivo Ciclo aperto	5 mesi	300	20	3		
B4(Benevento)	Intensivo Ciclo aperto	4 mesi	750	20	3		
N1(Napoli)	Intensivo Ciclo aperto	3-4 mesi	1200	13-14	3		
F1(Foggia)	Intensivo Ciclo aperto	3-4 mesi	1950	36	3		
F2(Foggia)	Intensivo Ciclo aperto	3-4 mesi	1800	112	3		
F3(Foggia)	Intensivo Ciclo aperto	3-5 mesi	1600	30	20	10	13
F4(Foggia)	Intensivo Ciclo aperto	3-5 mesi	1200	30	20		
P1(Potenza)	Conduzione familiare Ciclo chiuso	3-5 mesi	120	3	20		
P2(Potenza)	Conduzione familiare Ciclo chiuso	3-5 mesi	35	5	20		
TOTALE	11				101	10	13

Preparazione dei campioni

Campioni di feci

Per l'analisi, sono state preparate sospensioni fecali al 10% in acqua sterile; dopo agitazione per circa 2 min

al vortex, il materiale grossolano è stato eliminato attraverso centrifugazione a 3000 rpm per 20 min a 4°C. I sopranatanti chiarificati sono stati utilizzati per l'estrazione di RNA genomico virale.

Campioni di fegato

I fegati sono stati tutti analizzati macroscopicamente, successivamente con bisturi sterili è stata escissa una piccolissima porzione di fegato dai 30 ai 50 mg in prossimità della vena porta. I pezzetti di fegato sono stati messi in eppendorf da 2ml è stato aggiunto 1 ml di una soluzione tampone; successivamente, sono state inserite biglie di metallo di 0.5mm.

Le eppendorf contenenti i campioni, il tampone di lisi e la biglia sono state inserite nell'omogenizzatore, TissueLyser (Qiagen) ad una potenza di 50Herzt per 5minuti, successivamente sono stati centrifugati per 5 minuti a 4°C a 12.000rpm. Il sovranatante dell'omogenato di fegato ottenuto, è stato raccolto e

centrifugato una seconda volta seguendo la stessa procedura.

Il sovranatante raccolto è stato quindi immediatamente utilizzato per l'estrazione dell'RNA.

Estrazione dell'RNA virale

Campioni di feci

L'RNA virale è estratto utilizzando il “QIAamp® Viral RNA kit” (Qiagen) seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Tale kit utilizza colonne contenenti una membrana capace di legare in modo reversibile l'RNA. Una volta che l'RNA si è legato alla colonna, mediante lavaggi con soluzioni contenenti etanolo, si rimuovono i contaminanti lasciando legato solo l'acido nucleico, che viene poi eluito con acqua bidistillata sterile o altro *buffer* acquoso.

Sono aggiunti 140 µl della sospensione fecale a 560 µl di *buffer* AVL, il quale fornisce le condizioni altamente denaturanti fondamentali per la lisi del capsido virale e per l'inattivazione delle RNasi. Nel *buffer* AVL è presente un RNA *carrier* che rende più affine il legame dell'RNA virale alla membrana e limita una possibile degradazione dovuta ad attività RNasica residua. Dopo aver agitato mediante *vortex* la soluzione per 15 secondi, questa è lasciata per 10 minuti a temperatura ambiente per completare la lisi.

Sono quindi aggiunti 560 µl di etanolo assoluto per favorire il legame dell'RNA con la membrana. La soluzione è caricata sulle colonne e centrifugata per 1 minuto a 8000 rpm per permettere all'RNA di legarsi alla membrana. Dopo aver scartato il filtrato, sono effettuati un primo lavaggio con 500 µl di *buffer* AW1 e una centrifugazione di 1 minuto a 8000 rpm. Seguono un secondo lavaggio con *buffer* AW2 (500 µl) e una centrifugazione di 3 minuti a 14000 rpm. Il filtrato è scartato ogni volta. L'RNA virale è eluito dalla colonna con 60 µl di *buffer* AVE, una soluzione

acquosa priva di RNasi. Il *buffer* è fatto agire per 1 minuto a temperatura ambiente; segue una centrifugazione della colonna di 1 minuto a 8000 rpm per recuperare infine l'RNA eluito.

Campioni di fegato

L'estrazione dell'RNA virale dai campioni di fegato è stata effettuata utilizzando il kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguendo le indicazioni del produttore.

Al campione è stato aggiunto 1 volume di etanolo al 50% ed è stata caricata una colonnina, per consentire il legame tra RNA e membrana. La colonnina è stata lavata in tre passaggi consecutivi mediante l'uso di due tamponi di lavaggio. Infine, l'RNA è stato eluito con

50 µl di tampone di eluizione, incubando per 1 min a temperatura ambiente. Quest'ultimo passaggio è stato ripetuto al fine di aumentare la resa di RNA purificato. I campioni di RNA sono stati immediatamente stoccati a -80°C.

Per entrambi i protocolli di estrazione, controlli negativi (costituiti di sola acqua) sono stati inseriti al fine di controllare l'insorgenza di eventuali contaminazioni.

Retrotrascrizione dell'RNA virale

Cinque µl della soluzione contenente l'RNA sono retrotrascritti utilizzando l'enzima *MMLV Reverse Transcriptase* (M-MLV RT), Roche, seguendo il protocollo fornito dalla ditta. M-MLV RT è un enzima estratto dal virus *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV) in grado, come tutte le trascrittasi inverse, di

sintetizzare DNA a singolo filamento a partire da RNA a singolo filamento. Per iniziare la reazione di retrotrascrizione, l'enzima necessita di un *primer*, nel nostro caso abbiamo utilizzato una miscela di oligo *random* di 6-9 nucleotidi che si lega in maniera aspecifica alla sequenza di RNA.

La procedura seguita prevede la preparazione di due miscele di reagenti, la prima contenente il campione con l'RNA, ed una miscela di desossinucleotidi dNTPs (*mix* RNA) e la seconda contenente l'enzima trascrittasi inversa ed un inibitore delle RNasi.

Il campione viene allestito preparando una *mix* costituita da 5 µl di RNA e 2,5 µl di Random Hexamer. Viene allestito anche un controllo positivo, dove RNA è sostituito da un eguale contenuto d'acqua.

La *mix* RNA è incubata per 5 minuti a 70°C per eliminare tutte le strutture secondarie presenti nell'RNA, le quali potrebbero impedire una fedele retrotrascrizione, e mantenuta a 4°C. È quindi aggiunta la *mix* RT per arrivare ad un volume totale di 12 µl.

La miscela è poi trasferita nel termociclatore a 25°C per 5 minuti ,42°C per 60 minuti,70°C per 15 minuti e successivamente a 4°C.Questo ciclo di temperature permette all'enzima RT di lavorare per permettere la retrotrascrizione dell'RNA virale. L'enzima M-MLV RT è quindi poi inattivato successivamente.

MIX RT	
Tampone 5x	2,4 µl
dNTP 10µM	1,2 µl
Rnase inhibitor(out)40µ/µl	0,2 µl
(M-MLV)RT 200 µl	2 µl
V.totale	12 µl

quantità di reagenti per la reazione di RT di un singolo campione

Amplificazione del cDNA

Il cDNA, ottenuto in seguito a retrotrascrizione, è utilizzato come stampo per le reazioni di amplificazione (PCR e *nested* PCR). Per la reazione a catena della polimerasi è stata utilizzata “Ampli Taq Gold” (Applied Biosystem®), una DNA polimerasi “*hot start*”, stabile a temperatura ambiente ed attivata solo alle alte temperature. Questa peculiarità tecnica è molto utile in quanto impedisce la formazione di prodotti aspecifici già a temperatura ambiente, potenzialmente risultanti dal non corretto appaiamento dei *primer*, o di dimeri di *primer*. Questa DNA polimerasi si attiva incubandola a 95°C per 10 minuti. I *primer* vengono utilizzati alla concentrazione finale di 0.3 µM, mentre il magnesio a 1.5 mM (già presente nel *buffer*).

I *primer* della PCR sono chiamati 3156 e 3157 (Meng X.J. *et al.*, 1997), mentre quelli della *nested* 3158 e 3159 (Meng X.J. *et al.*, 1997). Tutti i *primer* sono

localizzati nella regione ORF 2 di HEV. La prima PCR genera un frammento di 727 bp (*base pairs*), mentre la seconda uno di 347 bp.

PRIMER	SEQUENZA	TM	POSIZIONE
3156	AAYTATGCMCAGTACCGGGTTG	62.67	5687-5708
3157	CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC	64.55	6395-6414
3158	GTYATGYTYTGCATACATGGCT	59.88	5972-5993
3159	AGCCGACGAAATYAATTCTGTC	59.88	6298-6319

primer utilizzati nelle reazioni di PCR (Y = C o T; M = A o C).

Tutti e quattro i *primer* sono degenerati in modo da poter amplificare diversi genotipi del virus.

Due µl di cDNA ottenuti mediante retro trascrizione, sono stati immediatamente utilizzati per la PCR, utilizzando gli oligo 3156 e 3157, seguendo il protocollo e le condizioni di PCR descritte nella tabella sottostante.

MIX PCR	
H ₂ O	17,3µl
Tampon 10x	2,5 µl
MgCl ₂	1,5 µl
dNTP 10µM	0,5 µl
3156 10µM	0,5 µl
3157 10µM	0,5 µl
Taq polymerase	0,2 µl
cDNA	2 µl
V.totale	25 µl

Successivamente, il prodotto di PCR ottenuto è stato utilizzato nella reazione di Nested PCR con gli oligo 3158-3159. Utilizzando una quantità di stampo pari al 10% del volume finale di reazione. Il protocollo utilizzato risulta simile a quello della prima PCR, le condizioni di PCR sono descritte nella tabella sottostante.

Cicli PCR:

	Température	Temps	Nb cycle
Dénaturation	94°C	1 min	
Dénaturation	94°C	30s	} 30
Hybridation	52°C	30s	
Elongation	72°C	30s	
Dénaturation	94°C	30s	} 10
Hybridation	40°C	30s	
Elongation	72°C	30s	
Elongation	72°C	10 min	1
Fin	4°C	Infinito	1

Cicli Nested:

	Température	Temps	Nb cycle
Dénaturation	94°C	1 min	
Dénaturation	94°C	30s	} 35
Hybridation	52°C	30s	
Elongation	72°C	30s	
Elongation	72°C	10 min	1
Fin	4°C	infinito	1

Alcuni dei campioni analizzati sono stati sottoposti ad analisi anche mediante protocollo RT-PCR one-tube

RT-PCR one-tube e nested-PCR

L'RNA di HEV estratto è stato immediatamente retrotrascritto in cDNA e amplificato in un'unica reazione "one tube" utilizzando il sistema kit commerciale SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Per identificare il gene dell'ORF2, codificante la proteina capsidica, è stato applicato un protocollo di RT-NESTED-PCR che utilizzava come coppia di oligonucleotidi, disegnati da Huang et al., 2002 (primers 3156/3157 e 3158/3159).

Gli oligonucleotidi di Huang utilizzati per l'RT-PCR sono stati: l'oligo 3518 che appaia a 825 nucleotidi a valle dell'ATG e l'oligonucleotide 3519 che appaia a 831 nucleotidi a monte del TAA e precisamente ai nucleotidi 6010-6032 dell'ORF2 e ai nucleotidi 6347-6369, rispettivamente. Mentre gli oligonucleotidi utilizzati per la *nested*-PCR descritti da Huang si appaiano: l'oligonucleotide 3156 (FW) appaia sull'ORF2 a 539 nt a valle dell'ATG ai nucleotidi 5724-5746 e il 3157 (RV) appaia sull'ORF2 a 623 nt a monte del TAA ai nucleotidi 6555-6578.

La miscela di reazione è stata allestita nel modo seguente: 7.5 µl di tampone di reazione 2X, 0.6 µl di ciascun oligonucleotide [0.3 µM], 0.3 µl di RT/Platinum Taq Superscript III [0.5 U/µl], e 3 µl di RNA in un volume totale di 15 µl.

Il programma di amplificazione adottato consisteva di una reazione di RT a 45°C per 30 min, seguita da un ciclo di denaturazione a 94°C per 2 minuti, e da 40 cicli di PCR come segue: 15 secondi a 94°C

(denaturazione), 30 secondi a 49°C (appaiamento), 60 secondi a 68°C (polimerizzazione), seguiti da un'estensione finale di 5 minuti a 68°C.

Per aumentare la sensibilità diagnostica, un'aliquota dei campioni amplificati mediante RT-PCR è stata successivamente esaminata con un test di nested-PCR. Gli oligonucleotidi utilizzati sono stati il 3158 e 3159.

La miscela di reazione è stata allestita nel modo seguente: 3 µl di tampone di reazione 1x sono stati addizionati a 0.3 µl di ciascun oligonucleotide [0.1 µM] e a 2 µl di DNA e per ultimo sono stati aggiunti 0.1 µl di AmpliTaq DNA polymerase [0.5 U/µl] (Applied Biosystem, ABI, Foster City, CA, USA). La reazione è stata portata a un volume totale di 20µl con acqua sterile per PCR.

L'amplificazione è stata eseguita utilizzando come stampo il cDNA ottenuto come prodotto della precedente RT-PCR. Dopo una prima denaturazione a 94°C per 2 minuti, sono stati effettuati 35 cicli nelle

seguenti condizioni: 30 secondi a 94°C, 45 secondi a 49°C, 45 secondi a 72°C, seguiti da uno step finale di polimerizzazione a 72°C di 7 minuti.

In tutte le fasi di analisi dei campioni: estrazione, retro trascrizione, PCR e nested sono stati analizzati dei campioni negativi, contenenti solo acqua e per le feci una campione di feci positivo per HEV gentilmente fornito dal laboratorio del Dr. Ruggeri, ISS Roma.

Per evitare cross-contaminazioni sono state utilizzate tre locali di laboratorio differenti: uno per l'estrazione, uno per la preparazione delle reazioni di PCR e uno per l'analisi dei DNA ottenuti.

La presenza del frammento di PCR della taglia attesa in base agli oligonucleotidi utilizzati è stata rilevata attraverso migrazione su gel di agarosio all'1,5%, utilizzando il marcatore di peso molecolare GeneRuler

100bp DNA Ladder Plus (Fermentas Inc., MD, USA), e colorazione con bromuro di etidio. I campioni di DNA amplificati con i primers 3158/3159 hanno generato una banda di circa 310 bp (Huang et al., 2002).

SEQUENZIAMENTO E ANALISI FILOGENETICA

Le bande contenenti il frammento di DNA di interesse sono state prelevate dal gel con un bisturi sterile e sottoposte ad una procedura di purificazione, utilizzando il Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguendo le specifiche del produttore. Il DNA è stato eluito in un volume di 30 µl di acqua e successivamente quantificato. A tal fine, 3

μ l di DNA sono stati caricati su gel di agarosio in parallelo al marcatore di peso molecolare noto λ Hind III (Fermentas Inc., MD,USA).

Per la caratterizzazione dei ceppi identificati e purificati, i prodotti di PCR risultati positivi da analisi su gel sono stati sottoposti a sequenziamento nucleotidico per entrambi i filamenti.

Le reazioni di sequenziamento sono state effettuate presso la Ditta Genechron presso i laboratori dell'ENEA (Casaccia, Roma).

SEPARAZIONE ELETTROFORETICA SU GEL DI POLIACRILAMMIDE (SDS-PAGE) E WESTERN BLOTTING

Nel laboratorio dove è stato svolto questo lavoro sperimentale era disponibile la proteina capsidica virale VP1 di un ceppo suino di HEV. La proteina VP1 espressa è stata utilizzata per valutare la presenza di anticorpi anti-HEV nei sieri suini. L'antigene virale ricombinante è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), secondo il sistema discontinuo di Laemmli (Laemmli, 1970). I gel di poliacrilammide al 10% sono stati preparati secondo la metodica riportata da Sambrook (Sambrook *et. al.*, 1989) e la corsa condotta a temperatura ambiente a 200V per 1 ora in tampone di corsa (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, SDS 0,1%). Il campione proteico è stato quindi trasferito su membrana di nitrocellulosa (Optitran BA-S 83; Schleicher & Schuell) a 100V e 152 mA per 1,5 ore a

4°C, in tampone di trasferimento (Tris 25 mM, glicina 50 mM). Al termine del trasferimento, la membrana è stata incubata in una soluzione di PBST contenente 1% di latte (skim milk, Cell Signaling Technology Inc., Boston, MA, USA) per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi di due minuti in PBST, la membrana è stata incubata tutta la notte con i sieri suini diluiti 1:500 in PBST 1% latte. Il giorno successivo, la membrana è stata lavata brevemente per due volte in PBST, quindi incubata per 30 minuti in una soluzione dello stesso tampone, contenente l'anticorpo secondario anti-IgG suino coniugato con la fosfatasi alcalina (Sigma) diluito 1:12000. Dopo 3 lavaggi, il rilevamento è stato effettuato con una soluzione dei substrati nitroblutetrazolio (NBT; Promega) e 5-bromo,4-cloro,3-indolilfosfato (BCIP, Promega) in tampone per la fosfatasi alcalina. La fosfatasi dà luogo ad una reazione il cui prodotto colorato insolubile si deposita nel sito in cui l'enzima è legato. Al comparire del segnale la reazione viene fermata con acqua non deionizzata.

CAPITOLO 8: RISULTATI

Risultati campioni fecali

I campioni di BN1 e BN3 sono risultati negativi, mentre dei tre campioni di BN2 e BN4 sono risultati positivi 2 su 3 campioni per entrambe gli allevamenti.

I campioni dell'allevamento F1 sono risultati positivi 2 su 3;

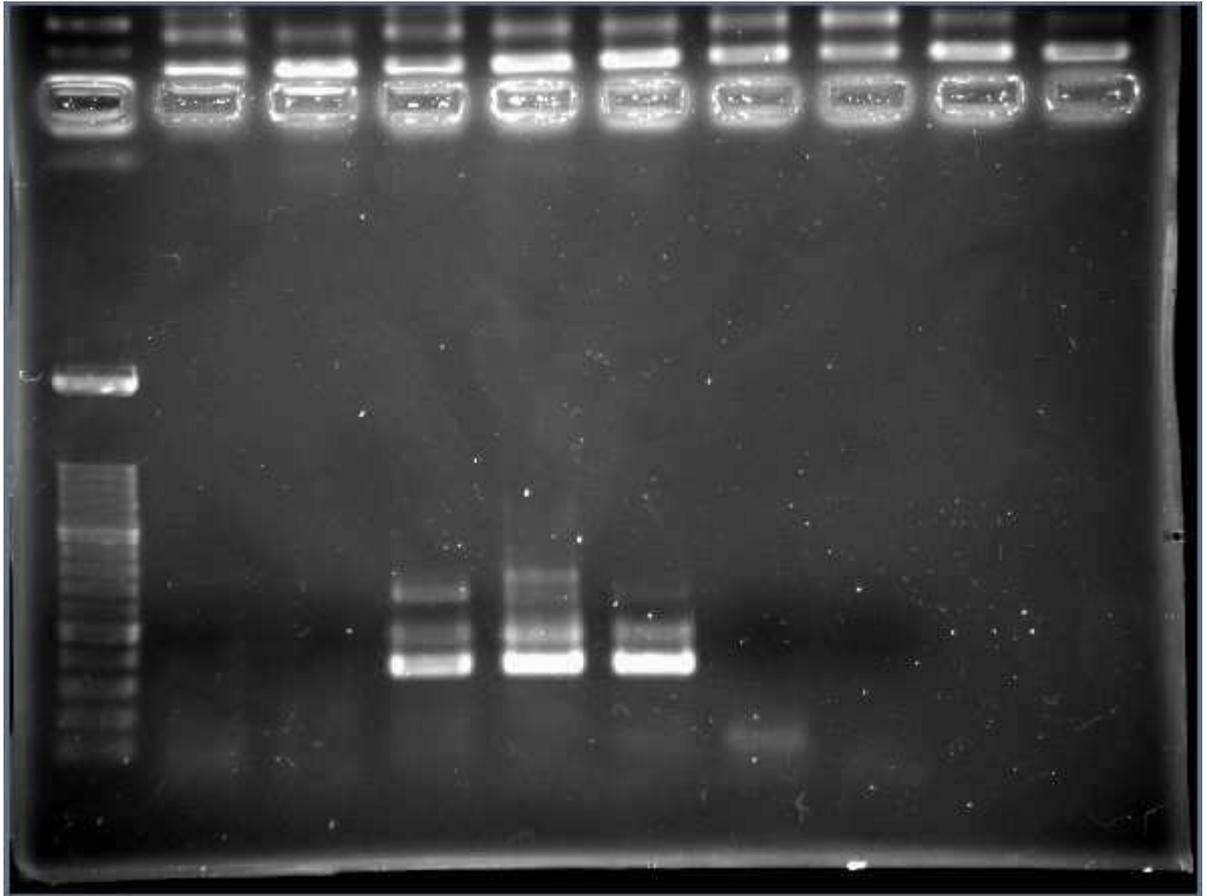
I campioni dell'allevamento F2 sono risultati positivi 1 su 3;

I campioni degli allevamenti F3 sono risultati positivi 18 su 20;(Tab.4)

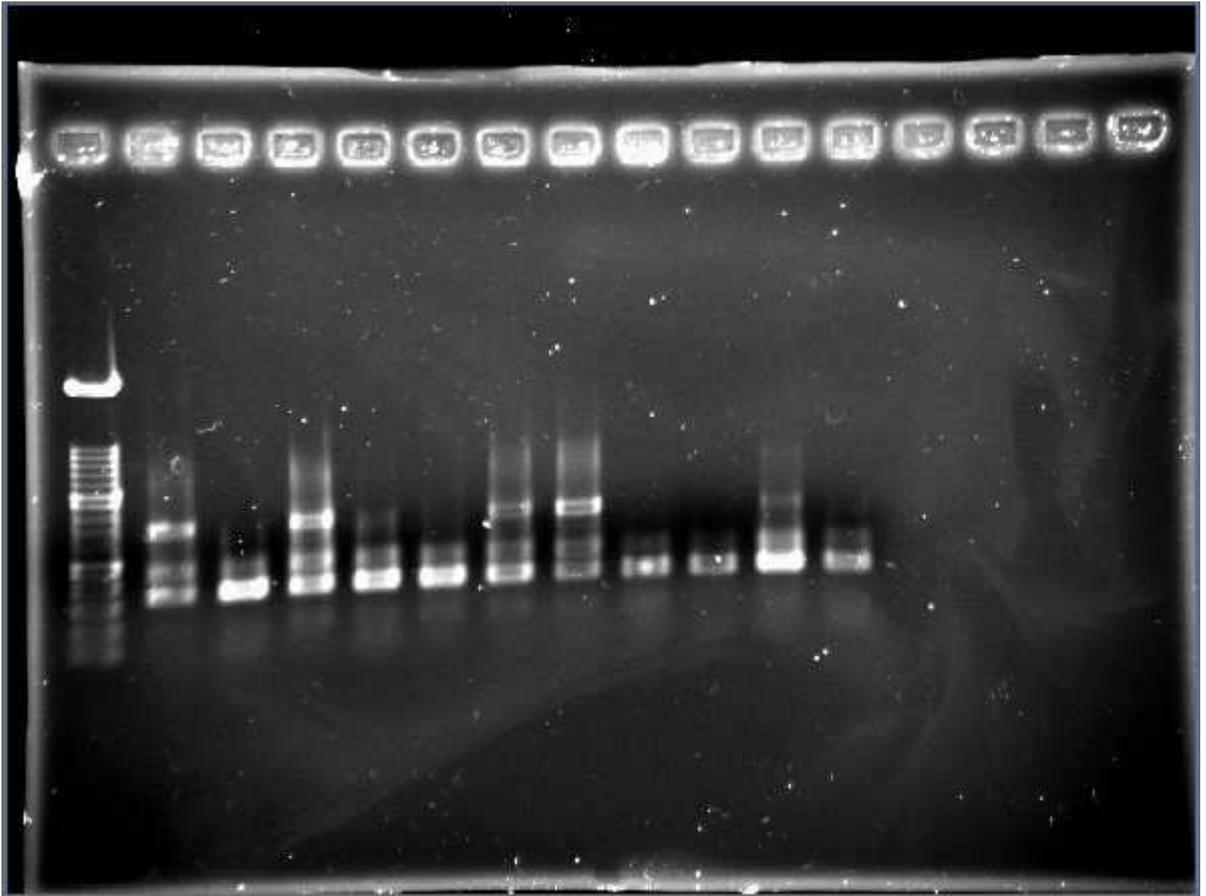
I campioni dell'allevamento F 4 sono risultati positivi 12 su 20;

I campioni dell'allevamento N1 sono risultati positivi 3 su 3 (Tab.1);

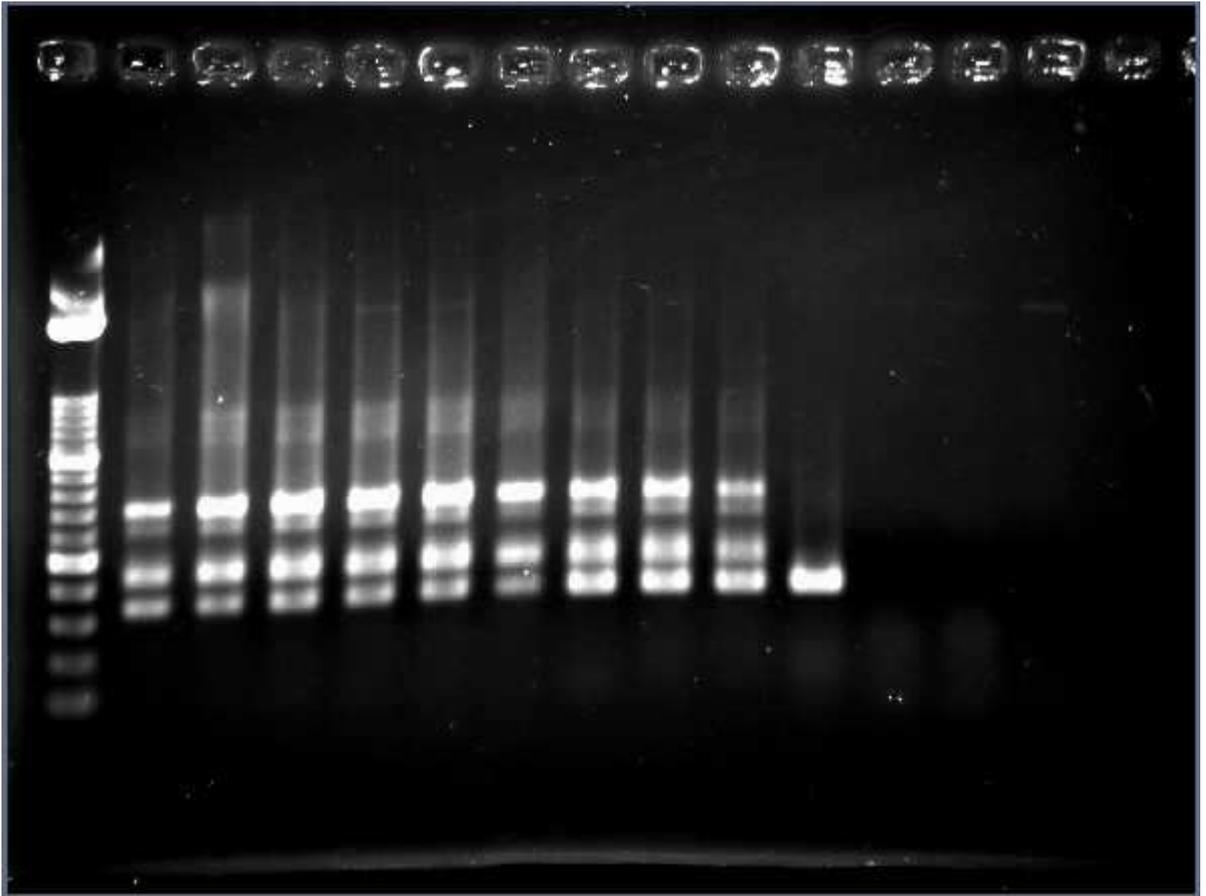
I campioni dell'allevamento di Potenza, sono risultati positivi 20 su 20 (Tab. 2-3)



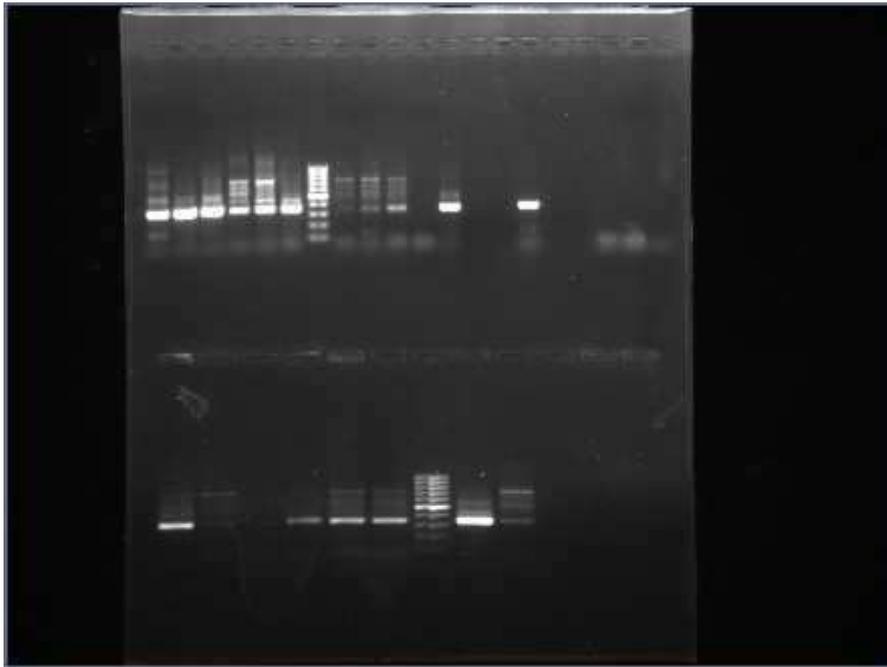
Tab 1 Migrazione in gel di agarosio dei prodotti della PCR eseguita sui campioni di N1



Tab 2 Migrazione in gel di agarosio dei prodotti della PCR eseguita sui campioni di P1



Tab 3 Migrazione in gel di agarosio dei prodotti della PCR eseguita sui campioni di P2



Tab.4 Migrazione in gel di agarosio dei prodotti della PCR eseguita sui campioni di F3

Allevamento	POSITIVI	NEGATIVI	TOTALE ANALIZZATI	Prevalenza (n° positivi/totale)	Età Media animali analizzati
B1(Benevento)	0	3	3	0	6-8 mesi
B2(Benevento)	2	1	3	66.6%	3 mesi
B3(Benevento)	0	3	3	0	5 mesi
B4(Benevento)	2	1	3	66.6%	4 mesi
N1(Napoli)	3	0	3	100%	3-4 mesi
F1(Foggia)	2	1	3	66.6%	3-4 mesi
F2(Foggia)	1	2	3	33.3%	3-4 mesi
F3(Foggia)	18	2	20	90%	3-5 mesi
F4(Foggia)	12	8	20	60%	3-5 mesi
P1(Potenza)	20	0	20	100%	3-5 mesi
P2(Potenza)	20	0	20	100%	3-5 mesi
TOTALE 11	80	21	101		

Tab.5 Caratteristiche e prevalenza degli allevamenti analizzati.

Su 101 campioni sono risultati positivi 80 , quindi la percentuale di positività è stata del 79,2% dei campioni testati.

Tra novembre 2008 e giugno del 2009 sono stati prelevati 101 campioni di feci da 11 allevamenti e da un macello a cui convergono tutti gli allevamenti analizzati.

Nella prima fase della ricerca si è scelto di analizzare pool di feci prelevati all'interno di gabbie in cui erano presenti un numero esiguo di maiali, con lo scopo di effettuare una prima indagine per valutare la presenza di genoma del virus di HEV negli allevamenti della Campania.

L'RNA totale è stato estratto da 101 pool di feci ed analizzato mediante diagnostica molecolare, utilizzando il protocollo descritto da Huang et al. 2002.

L'RNA è stato retro trascritto utilizzando un oligo specifico che appaia all'interno dell'ORF2 del virus dell'HEV, che codifica per la proteina capsidica.

Il cDNA ottenuto, DNA monocatenario complementare all'RNA, è stato quindi amplificato mediante due successive PCR.

Una prima PCR è stata condotta utilizzando il cDNA come stampo e la coppia di primers 3156 e 3157 che amplificano una regione all'interno della ORF2. Per poter amplificare l'eventuale prodotto di DNA ottenuto dalla prima PCR si è proceduto ad una seconda PCR, detta Nested-PCR. Si è utilizzato come stampo il prodotto della prima PCR e una seconda coppia di primer 3158-3159, interna al primo prodotto di PCR, amplificando un frammento di DNA. I campioni in cui è stata identificata una banda di DNA delle dimensioni attese sono considerati positivi per la presenza di RNA virale di HEV.

I risultati ottenuti dall'analisi dei pool fecali hanno mostrato una prevalenza che variava dallo 0 al 100%. Sebbene i risultati ottenuti fossero poco significativi perché riferiti ad un esiguo numero di campioni, hanno comunque evidenziato la presenza di HEV in suini con

un'età compresa tra 3 e 8 mesi e hanno evidenziato per la prima volta la circolazione del virus all'interno di allevamento del sud Italia.

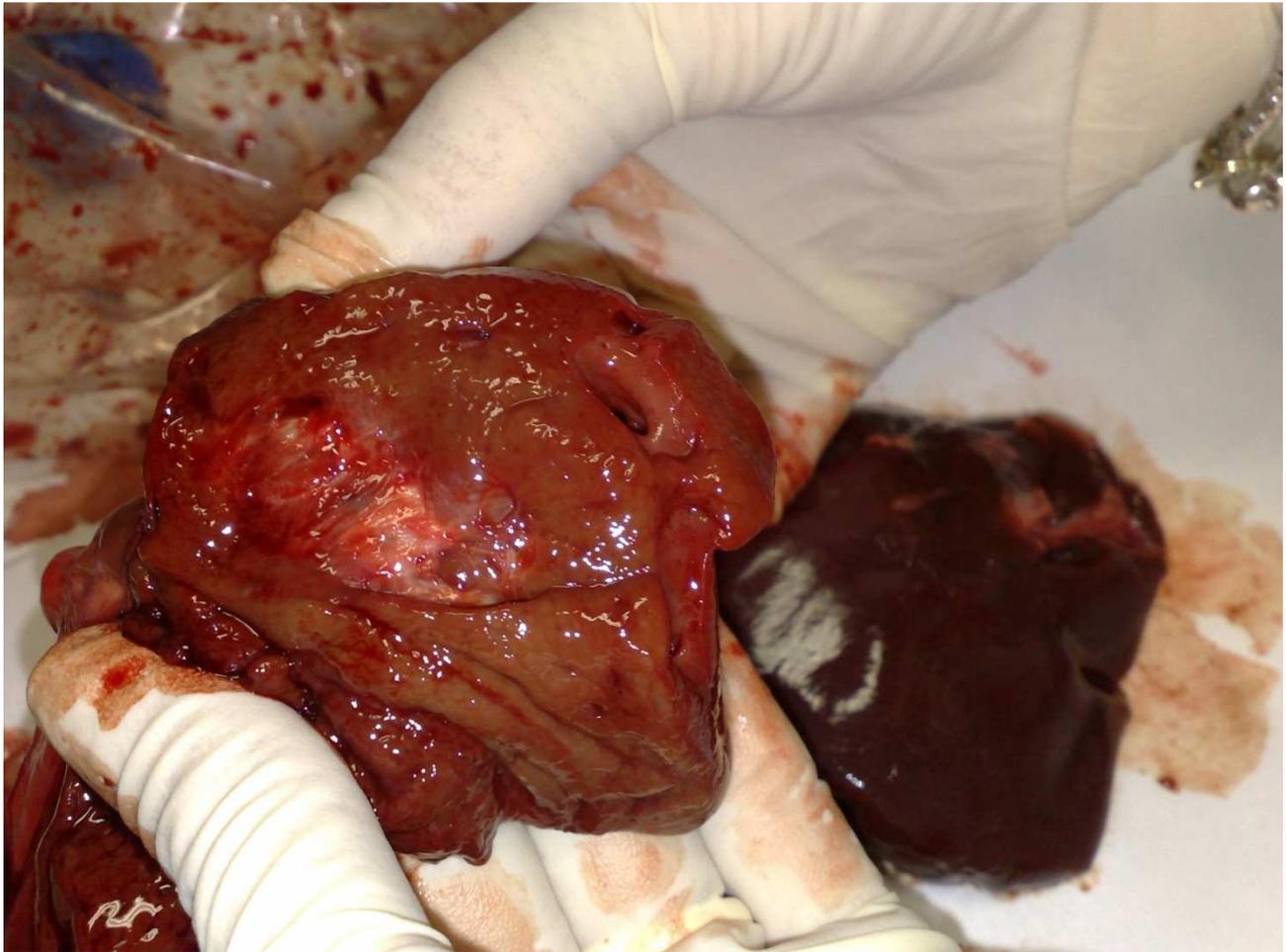
Nella seconda parte dello studio abbiamo raccolto da un allevamento di Foggia che aveva presentato una prevalenza alta del virus, 10 campioni di fegato e 20 campioni di siero.

Risultati fegati analizzati

Dell'allevamento F3 sono inoltre stati analizzati 10 fegati; i positivi sono stati 3. Presentando una prevalenza del 30%.

Nella foto sottostante è raffigurato uno dei fegati analizzati nel momento del prelievo del campione. Due

su tre dei fegati analizzati positivi al virus dell'HEV
anche lesioni di tipo degenerativo.



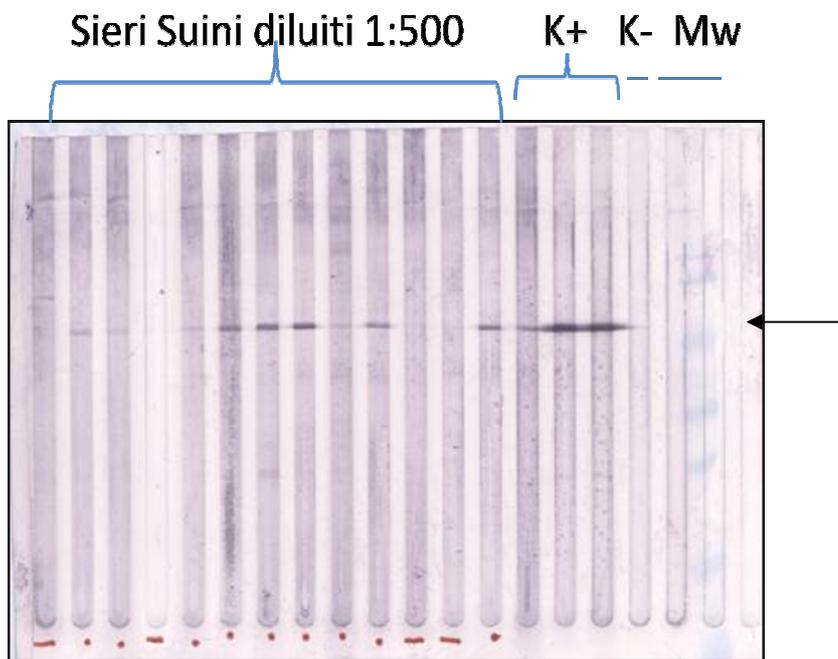
Fegato trovato positivo all'HEV.

Dalla foto si evincono anche lesioni riconducibili ad un evidente quadro anatomopatologico di degenerazione grassa.

Ricerca di anticorpi anti-HEV in sieri suini

La presenza di anticorpi contro HEV nei sieri analizzati in questo studio, provenienti da 13 animali adulti , è stata valutata mediante Western Blotting, utilizzando come antigene la proteina capsidica VP1 di HEV (come descritto in Materiali e Metodi).

Lo screening è stato effettuato su 13 sieri suini ed ha evidenziato una prevalenza del 69.2% (9 positivi su 13 analizzati). Infatti, i sieri hanno riconosciuto in modo specifico una singola banda proteica del peso molecolare atteso per la proteina ricombinante VP1 (55KDa). Nella foto sottostante è mostrato il Western Blot rappresentativo. Come controlli, sono stati utilizzati un siero policlonale di suino contenente anticorpi anti-HEV (controllo positivo= K+) e un siero negativo (K-) proveniente da un animale SPF (specific pathogen free).



Analisi mediante Western Blot per la ricerca di anticorpi anti-HEV nei sieri suini.

La freccia indica la banda corrispondente alla proteina capsidica VP1 ricombinante di HEV.

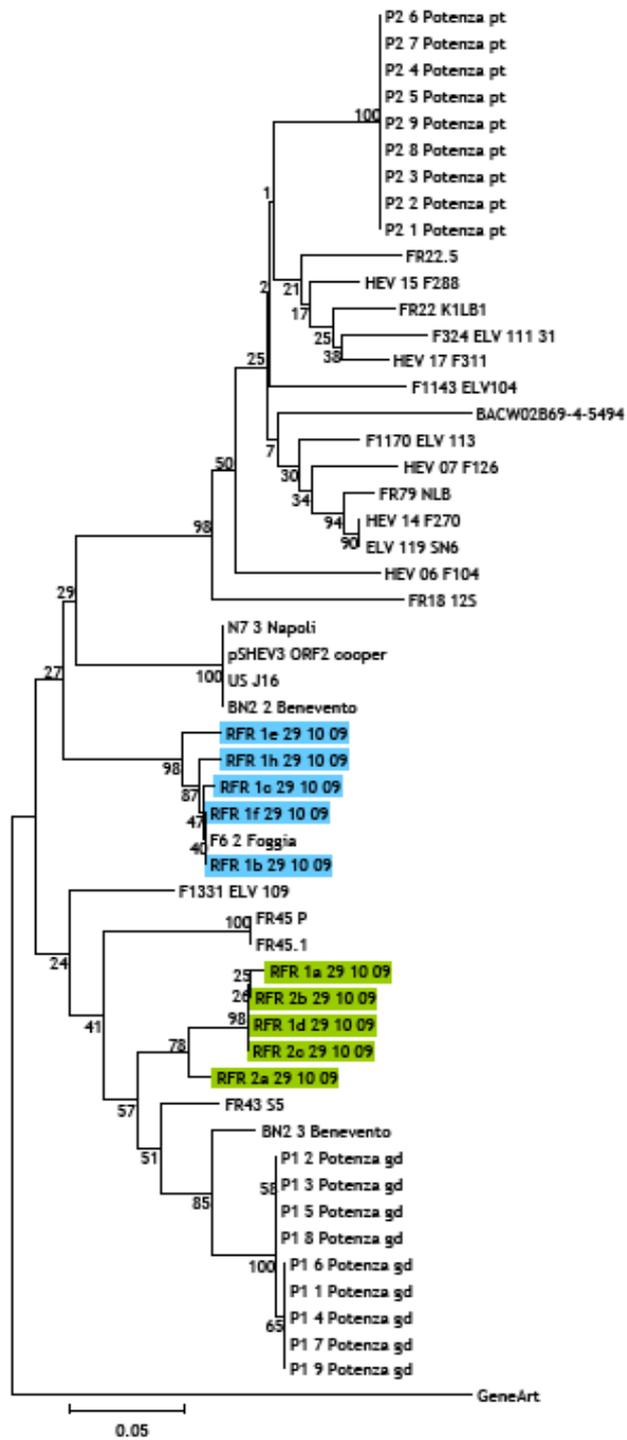
SEQUENZIAMENTO

ED ANALISI FILOGENETICA

I campioni risultati positivi all'analisi PCR sono stati sottoposti a sequenziamento nucleotidico impiegando gli oligonucleotidi 3158/3159, così come descritto in Materiali e Metodi. I risultati ottenuti sono stati quindi confrontati con sequenze di ceppi di riferimento, suini ed umani, presenti in banche dati (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

L'analisi ottenuta ha confermato la presenza del genoma di HEV suino appartenente al genotipo 3, il più diffuso tra la popolazione umana e suina nei paesi industrializzati. In particolare, i ceppi identificati in questo studio, molti dei quali identici tra loro appartengono a 4 cluster differenti, dimostrando che durante il periodo di campionamento diversi ceppi virali circolavano contemporaneamente all'interno dei vari allevamenti analizzati. Inoltre il confronto tra le sequenze ottenute in questo studio e le sequenze depositate in banca dati (NCBI), ha dimostrato una

stretta correlazione tra i ceppi di HEV identificati e
ceppi di origine suina ed umana circolanti in Francia e
USA (Tab.6).



Tab.6 Albero filogenetico basato sulla sequenza di ORF2, dei ceppi di HEV di campo, riscontrati nelle feci di suini degli allevamenti campionati (Il programma utilizzato per la

costruzione dell'albero èMEGA 4.0.2).

CAPITOLO 9: **DISCUSSIONE DEI RISULTATI E CONCLUSIONI**

Questo studio è il primo condotto nelle zone del sud Italia e, così come in precedenti studi svolti in alcuni allevamenti del nord Italia, conferma la presenza del virus negli allevamenti suinicoli italiani.

Queste ricerche sono importanti al fine di valutare i potenziali rischi di trasmissione del virus HEV all'uomo, sia attraverso il contatto diretto con i suini che per ingestione di carne suina contaminata poco cotta. Vanno infatti considerati i potenziali rischi di trasmissione alimentare alla luce di recenti epidemie o casi sporadici di HEV correlati al consumo di carne di cinghiale, cervo e maiale cruda o poco cotta, come segnalato negli ultimi anni in Giappone ed altri paesi orientali.

Non esistono informazioni utili, infatti, sulla prevalenza del virus in alimenti destinati all'uomo in Italia, anche se in altri Paesi sono stati effettuati

campionamenti a tale scopo ed il virus è stato rinvenuto in campioni di fegato(Yazaki et al., 2003).

I risultati ottenuti dall'analisi dei pool fecali hanno mostrato una prevalenza che variava dallo 0 al 100%. Sebbene i risultati ottenuti fossero poco significativi perché riferiti ad un esiguo numero di campioni, hanno comunque evidenziato la presenza di HEV in suini con un'età compresa tra 3 ad 8 mesi e hanno evidenziato per la prima volta la circolazione del virus all'interno di allevamenti del sud Italia. Il maggior numero di positività per i campioni fecali è stato rilevato nella fascia d'età tra i 3-5 mesi, con una prevalenza del 79,2% e ciò è in linea con quanto riscontrato in altri lavori. In aggiunta, il tasso di prevalenza più basso riscontrato nei campioni di fegato, solo il 30%, rispetto alle feci, può essere spiegato ipotizzando che il virus presenti una distribuzione differenziale all'interno del fegato, e che probabilmente il campionamento non sia stato sempre rappresentativo dell'intero organo, dovendo utilizzare per ragioni metodologiche solo 30-

50 mg, a differenza di quanto avviene per altre matrici come per le feci.

Per quanto riguarda invece le lesioni degenerative macroscopicamente evidenti riscontrate nei fegati analizzati, non possono essere indicative di nulla, visto il numero esiguo di campioni analizzati; tuttavia sarebbero necessarie ulteriori valutazioni del potenziale ruolo di HEV come fattore predisponente o condizionante l'insorgenza di sindromi ad eziologia multipla, come già si è osservato in precedenti lavori nel pollo.

In questo studio tutti i suini apparivano clinicamente sani, in linea con i dati presentati in letteratura, i quali sostengono che l'infezione è asintomatica. Il dato di apatogenicità del virus non esclude, però, la possibilità di una sua evoluzione in forma cliniche di malattia, in analogia a quanto è accaduto per il PCV2 (Porcine Circo Virus 2).

Dal punto di vista filogenetico tutti i ceppi identificati in questo studio appartengono al genotipo 3, e

complessivamente mostrano un'elevata identità nucleotidica.

Questi ceppi Italiani presentano un'identità nucleotidica maggiore con ceppi suini ed umani appartenenti allo stesso genotipo ma provenienti da differenti aree geografiche.

In questo studio è stato inoltre valutata la presenza di anticorpi contro HEV nei sieri dei suini impiegati per l'indagine. Come antigene è stata utilizzata la proteina capsidica VP1 di HEV, codificata dall'ORF 2, che è oggi ritenuta la regione più importante ai fini della risposta anticorpale, essendo l'unico costituente accertato del capsido virale. Lo screening ha evidenziato una sieroprevalenza di circa il 69,2%. Complessivamente, anche questo risultato conferma la diffusa circolazione del virus nella popolazione suina degli allevamenti italiani, che negli animali adulti raggiunge una prevalenza ancora più elevata.

In conclusione i dati ottenuti nel corso del lavoro portano a ritenere che, in Italia l'infezione da virus

dell'epatite E sia estremamente diffusa e i dati presenti in questo lavoro sono in linea anche con i dati di prevalenza di HEV riscontrati in altri paesi europei.

Se si accetta la possibilità di trasmissione zoonotica dell'infezione da virus dell'epatite E, 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 all'uomo.

Nel loro complesso, i dati ottenuti inducono a concludere che in Italia, come in altri Paesi a suinicoltura avanzata, l'infezione da virus dell'epatite E è estremamente diffusa sia in termini di allevamenti interessati (prevalenza di aziende infette) sia per quanto riguarda la proporzione di capi infetti (prevalenza individuale). Sembra inoltre che i suini possano essere recettivi a qualsiasi età; questa osservazione potrebbe essere spiegata con il fatto che la durata dell'infezione è in realtà più lunga di quanto inizialmente ipotizzato oppure con il fatto che

l'immunità attiva non è proteggente verso nuove infezioni o che i suini si possano re-infettare con ceppi differenti circolanti sullo stesso territorio, magari introdotti in allevamento con le rimonte.

L'osservazione che i suini vivi esaminati negli studi condotti precedentemente da altri autori (Martelli et al,2008) apparissero clinicamente sani e il fatto che non sia stata evidenziata un'associazione tra la presenza di HEV e patologie microscopicamente evidenti, confermerebbe l'ipotesi che l'infezione da HEV evolva, nei suini, 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 inviati al macello, inseriti nella filiera produttiva e rappresentano così una potenziale fonte di infezione per l'uomo.

Per quanto riguarda la filogenesi e l'epidemiologia molecolare di HEV, i ceppi virali fino ad oggi evidenziati in Italia, sono tutti

risultati appartenere al genotipo 3. A tale genotipo appartengono (ad oggi) tutti i ceppi di HEV responsabili di infezione nel suino e dei casi umani autoctoni segnalati nei Paesi industrializzati. I ceppi messi in evidenza sono caratterizzati da elevati gradi di identità nucleotidica rispettivamente, tra loro e con altri ceppi di origine suina e umana evidenziati in Europa negli ultimi anni.

Questa osservazione da un lato conferma la capacità dei ceppi di HEV di diversa origine di formare *clusters* geografici, con differenze spesso marcate tra continenti diversi o paesi lontani e dall'altro rappresenta una conferma indiretta della possibilità di trasmissione di ceppi di HEV dal suino all'uomo (Martelli, Di Bartolo, Caprioli, Ruggeri, Ostanello; 2008).

Benché la presenza e l'elevata prevalenza dell'infezione da HEV negli allevamenti e nei suini domestici e selvatici italiani sia stata ampiamente dimostrata, restano ancora da approfondire i potenziali pericoli per l'uomo. In particolare, i rischi per la salute

umana sarebbero da ricondurre a due ambiti distinti: il contatto professionale con animali vivi o con le loro carcasse e l'esposizione al virus in ambito domestico.

Relativamente al primo punto, i rischi riguarderebbero quelle categorie professionali (allevatori, personale addetto agli animali, macellatori e veterinari) che possono venire in contatto con i suini nel periodo di viremia e di escrezione fecale del virus. Per tali categorie, non è poi da escludere la possibilità d'infezione per via indiretta attraverso il contatto con strumenti e attrezzi da lavoro contaminati dalle feci degli animali.

Per quanto riguarda invece il secondo punto, occorre prendere in considerazione la possibilità di infezione attraverso la manipolazione o il consumo di prodotti di origine suina. In considerazione delle non elevate resistenze del virus alle temperature di cottura, appare tuttavia più probabile che il

rischio maggiore di infezione sia rappresentato 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. Altro rischio potenziale è rappresentato dalla diffusione di nuove abitudini alimentari che prevedono il consumo di prodotti crudi di origine animale (es. sashimi, sushi, ecc.). Altra possibile fonte di infezione da HEV potrebbe essere rappresentata dalla contaminazione attraverso i reflui zootecnici delle acque potabili, di quelle usate per l'irrigazione di verdure e frutta, o per l'allevamento di molluschi eduli. L'ultima riflessione è quella relativa al potenziale impatto dell'infezione da HEV sul comparto suinicolo italiano. Se da una parte, infatti, non sono mai stati documentati

nel suino episodi di malattia riconducibili all'infezione da HEV ed è ancora poco nota l'eventuale possibilità di copartecipazione

di questo virus nel determinismo di sindromi a eziologia multifattoriale, dall'altra occorre considerare alcuni scenari potenzialmente in grado di causare un danno diretto o indiretto

all'economia del settore. È infatti nota l'elevata capacità di mutazione dei virus a RNA e, non potendosi escludere modificazioni genomiche in grado di causare un aumento di virulenza e di patogenicità, l'elevata prevalenza evidenziata pone gli allevamenti in una condizione di potenziale rischio.

Da qui la necessità di meglio valutare, anche nel contesto italiano, l'epidemiologia dell'infezione e i fattori di rischio aziendali.

Altro argomento importante è quello relativo al potenziale zoonosico di HEV. Alla luce delle conoscenze fino a oggi acquisite, tale eventualità, sia pur provata, sembra relativamente

remota e legata ad abitudini alimentari particolari o a condizioni igienicosanitarie scadenti. Tuttavia, trattandosi di una zoonosi che coinvolge gli aspetti relativi alla sicurezza alimentare, la drammatica esperienza con la BSE, l'influenza aviaria e il virus dell'influenza suina H1N1, dovrebbe far riflettere sulla necessità di ottenere solide basi informative e decisionali non solo per realizzare la valutazione e la gestione del rischio, ma anche per consentirne una corretta comunicazione. Tutto ciò rispettando una logica di tutela delle produzioni e del consumatore. (Martelli, Di Bartolo, Caprioli, Ruggeri, Ostanello; 2008)

Nei Paesi industrializzati, gli ambiti di intervento sono quelli correlati alla trasmissione di tipo alimentare e alla gestione del rapporto uomo-animale. La cottura degli alimenti rappresenta un ottimo fattore di prevenzione, in particolare

per gli organi quali il fegato, in cui la carica virale può essere elevata. Tuttavia, non potendosi escludere la possibilità di contaminazioni crociate di alimenti consumati crudi (ad es. verdure), occorre rispettare le buone pratiche di manipolazione, conservazione e preparazione degli alimenti. Anche la prevenzione della trasmissione per contatto diretto è basata sul rispetto delle normali precauzioni di tipo igienico (corretta gestione degli escrementi, igiene personale) e sull'utilizzo di opportuni dispositivi di protezione individuale in ambito professionale (ad es. mascherine e guanti).

La profilassi indiretta è stata attualmente impiegata solo per l'uomo. La somministrazione di sieri iperimmuni contenenti anticorpi specifici durante la malattia clinica non ha tuttavia sortito risultati apprezzabili, quindi la profilassi vaccinale sembrerebbe l'unica forma di profilassi indiretta applicabile nei confronti di HEV nel caso in cui dei vaccini si rendessero disponibili.

Nel suino, dove la patologia è apparentemente asintomatica, le misure di profilassi avrebbero senso solo nella misura in cui fossero in grado di ridurre il pericolo di esposizione e di trasmissione dell'infezione all'uomo (Martelli, Di Bartolo, Caprioli, Ruggeri, Ostanello; 2008).

In conclusione, l'ampia diffusione dell'infezione da HEV riscontrata anche negli allevamenti suini italiani indica la necessità di condurre studi e ricerche 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 dell'infezione per l'uomo e le possibili implicazioni per la salute pubblica.

C'è quindi da un lato una forte esigenza di mettere a fuoco attraverso un'integrazione di programmi di sorveglianza umana veterinaria, l'emergenza di eventuali focolai di casi collegati a trasmissione zoonotica e/o alimentare, dall'altro la necessità di approfondire gli studi e la ricerca finalizzata alla

conoscenza del virus e del suo ciclo biologico, e alla messa a punto di sistemi diagnostici di laboratorio di primo e secondo livello per consentire l'acquisizione di dati consolidati diagnostico-epidemiologici sia negli allevamenti che durante le varie fasi della filiera produttiva dell'alimento.

BIBLIOGRAFIA

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

Aggarwal, R. and S. R. Naik. 1994. *Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread.* J Hepatol. 21:718-23.

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. Jameel. 2008. *Hepatitis E vaccine.* Hepatol Int. 2:308–315. 

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

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.

Alini D. *EPATITE VIRALE E (HEV): IL RISCHIO ZOOTONICO*, Webzine Sanità Pubblica Veterinaria: Numero 46, Febbraio 2008.

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., 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., 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. Viral Hepat. 8:223-7.

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

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., 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. 1997. Epidemiology of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat.* 4: 155-65.

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., 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.

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.

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

Bradley DW. Hepatitis E virus. In: Webster RG and Granoff A, eds. *Encyclopedia of Virology*, London, Academic Press Ltd, 1994:580-586.

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.

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, L Di Bartolo, F. M. Ruggeri, L. Del Chiaro, and F. Tolari. 2007. Detection of hepatitis E virus in Italian pig herds. *Vet Res.* 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.

Casas, M., S. Pina, N. de Deus, B. Peralta, M. Martin, and J. Segales. 2009. Pigs orally inoculated with swine hepatitis E virus are able to infect contact sentinels. *Vet Microbiol.* 138:78–84. 

Castellini L. – *Identificazione e caratterizzazione del virus dell'epatite E in suini al macello, nella provincia di Bologna. Tesi specializzazione in microbiologia e virologia, 2009. Università degli studi di Roma "La Sapienza".*

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

Chang, Y., L. Wang, J. Geng, Y. Zhu, H. Fu, F. Ren, L. Li, X. Wang, and H. Zhuang. 2009. Zoonotic risk of hepatitis E virus (HEV): A study of HEV infection in animals and humans in suburbs of Beijing. *Hepatol Res.* In press.

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.

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

Croci, De Medici, Fiore.2001. *Virus enterici veicolati da alimenti. Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti.* De Felip G.,2001 

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. Croxson, 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.

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

de Deus, N., C. Seminati, S. Pina, E. Mateu, M. Martin, and J. Segales. 2006. *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 Deus, N., B. Peralta, S. Pina, A. Allepuz, E. Mateu, D. Vidal, F. Ruiz-Fons, M. Martin, C. Gortazar, and J. Segales. 2007. *Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain.* *Vet Microbiol.* 129:163-70.

De Silva, A. N., A. K. Muddu, J. P. Iredale, N. Sheron, S. L 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., F. Martelli, N. Inglese, M. Pourshaban, A. Caprioli, F. Ostanello, F.M. Ruggeri. 2008. *Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy.* *Vet Microb.* 132:47-55. 

Domingo, E., C. Escarmis, N. Sevilla, A. Moya, S. F. Elena, J. Quer, L. 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.

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

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

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

Emerson, S. D. and R. H. Purcell. 2007. *Hepatitis E.* Pediatr Infect Dis J. 26:1147-8.

Emerson S.U., Nguyen H., Graff J., Stephany D. A., Brockington A., Purcell R. H. (2004). *In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein.* J. Virol., 78, 4838-4846.

Engle, R. E., C. Yu, S. D. 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.

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, 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.

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. 

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.

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

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 realtime 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.

Hamid, S. S., M. Atiq, F. Shehzad, A. Yasmeeen, T. Nissa, A. Salam, A. Siddiqui and W. Jafri. 2002. *Hepatitis E virus superinfection in patients with chronic liver disease.* Hepatology. 36:474-478.

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. 2006. *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. 2007. *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.

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.

Jiang, X., Huang, P.W., Zhong, W.M., Farkas, T., Cubitt, D.W., Matson, D.O., 1999. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods.* 83:145-154.

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.*

Kaba, M., B. Davoust, J. L. Marie', M. Barthelet, M. Henry, C. Tamalet, D. Raoult, and P. Colson. 2009. *Frequent Transmission of Hepatitis E Virus Among Piglets in Farms in Southern France. J Med Virol. 81:1750–1759.* 

Kasomdorkbua, 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.*

Kasomdorkbua, 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.*

Kasomdorkbua, 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.*

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 USA. 89:8259-63.

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. 2003. *Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus.* Hepatol Res. 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.

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.

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

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

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. 

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., Di Bartolo I., Caprioli A., Ruggeri F.M., Ostanello F.; *L'epatite E negli animali e nell'uomo. N° 4 Maggio 2008 ANIMALI DA REDDITO*

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.

Martinelli N. - *Indagine sulla presenza del virus dell'epatite E nel suino in allevamenti Toscani. Tesi laurea in di medicina Veterinaria 2006 - Università di Pisa.*

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. *Hepatol 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.

McCreary, C., F. Martelli, S. Grierson, F. Ostanello, A. Nevel, and M. Banks. 2008. Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and

its presence in slurry stores in the United Kingdom. Vet Rec. 163: 261-265. 

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 USA 94:9860-5. 

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., 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. 

Meng, X. J. 2009. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. Vet Microbiol. In press. 

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., and H. Okamoto. 2002. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin. Microbiol. 40:3209-18.*

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. Monfollano, 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., 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, 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.

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.

Norder, H., L. Sundqvist, L. Magnusson, S. Østergaard Breum, M. Löfdahl, L. E. Larsen, C. K. Hjulsager, L. Magnius, B. E. Böttiger, F. Widén. 2009. Endemic hepatitis E in two Nordic countries. *Eurosurveillance.* Vol 14.

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. 2007. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 127(2): 216-218. 

Orrù, 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., D. Thakral, and S. Rehman. 2007. *Hepatitis E virus.* Rev Med Virol 17:151-80. 

Pavia, M., E. Iiritano, M. A. Veratti, and L 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.

Pieri A. - *Ruolo del suino nella tossinfezione dell'infezione all'uomo, studio della prevalenza aree rurali della Bolivia. Tesi dottorato in epidemiologia e controllo delle zoonosi, 2008. Università di Bologna.*

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.*

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.*

Preiss, J. C., A. Plentz, E. Engeimann, 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.*

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. F. Cadranel, M. Boulière, P. Halfon, D. Ouzan, H. Rifflet, P. Carencio, A. Harafa, Bertrand JJ, A. Boutrouille, P. Muller, J. Igual, A. Decoppet, M. Eloit, and N. Pavio. 2007. *Possible zoonotic*

transmission of Hepatitis E from pet pig to its owner. Emerging Infectious Diseases. 13:1094-1096.

Renou, C., X. Moreau, A. Pariente, J. F. Cadranel, E. Meringe, T. Morin, X. Causse, J. L. Payen, J. Izopet, E. Nicand, M. Boulière, G. Penaranda, J. Hardwigsen, R. Gerolami, J. M. Peron, and N. Pavio. 2008. *A national survey of acute hepatitis E in France. Aliment Pharmacol Ther. 27:1086-1093.* 

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.*

Reuter, G., D. Fodor, P. Forgach, A. Katai, and G. Szucs. 2009. *Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. J Clin Virol. 44:277-281.*

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

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. Bouwknecht, 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.

Rutjes, S. A., W. J. Lodder, F. Lodder-Verschoor, H. H.J.L. van den Berg, H. Vennema, E. Duizer, M. Koopmans, and A. M. de Roda Husman. 2009. *Sources of Hepatitis E Virus Genotype 3 in the Netherlands.* Emerg Infect Dis.15:381-387. 

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.

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. 10;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. Sulai, 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.

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. P., 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.*

Salmaso S., Tozzi A. - *Epidemiologia delle tossinfezioni alimentari. Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti.* De Felip G, 2001. 

Stroffolini, T., M. Menchinelli, V. Dambruoso, 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, 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. 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, 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.

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.

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, 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.

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.

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, K. Takahashi, and S. Mishiro. 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*. 362:371-3.

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.

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., 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 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.

Vasickova, P., I. Psikal, F. Widen, R. Smitalova, J. Bendova, I. Pavlik, and P. Kralik. 2009. Detection and genetic characterisation of Hepatitis E virus in Czech pig production herds. *Res Vet Science.* 87:143–148.

Vishwanathan. *Infectious Hepatitis in Delhi (1955-1956).* *Indian Journal of Medical Research* 45, 49-58. 1957.

Vitral, 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.

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.

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. Kasomdorkbua, 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.*

Worm, H. C., H. Wurzer, and G. Frosner. 1998. *Sporadic hepatitis E in Austria. N Engl J Med. 339: 554-5.*

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., 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.

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.

Il simbolo “” indica gli articoli e i testi consultati direttamente.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il prof. Santoro per essermi stato accanto ed avermi spronato a dare sempre il meglio dando esempio di grande coraggio e dimostrando, nonostante le difficoltà di questo difficile momento, di essere un professore impeccabile ed un amico sempre disponibile.

Ringrazio la prof.ssa Cortesi per avermi sostenuto in questo difficile periodo e per essermi stata vicina nell'esperienza all'estero, per i consigli sempre disponibili e per l'affetto e la stima mostratemi in questi anni di dottorato.

Ringrazio la Dott.ssa Nicole Paviò per aver creduto in me, dandomi la possibilità di vivere un'esperienza unica professionale ed umana.

Ringrazio, in particolar modo, il dottor Franco Maria Ruggeri senza il quale non avrei mai potuto continuare la ricerca iniziata in Francia. Il suo ruolo è stato fondamentale, lo ringrazio per l'aiuto ricevuto, per la disponibilità, i preziosi consigli, il sostegno, la fiducia concordatami e per la contagiosa passione che trasmette per il suo lavoro.

Ringrazio la dott.ssa Ilari Di Bartolo che mi ha permesso in questi mesi di crescere professionalmente, la ringrazio per l'infinita pazienza, per l'amicizia, per la disponibilità, per l'insostituibile e fondamentale collaborazione, per la correzione del testo ed i consigli che mi hanno permesso di portare a termine questo lavoro.

Ringrazio i colleghi ed amici dell'ISS: la dott.ssa Eleonora Ponterio, la dott.ssa Marina Monini, la dott.ssa Laura Castellini, il dottor Albero Biasin, un tim collaborativo impeccabile. Li ringrazio per avermi accettato sin dal primo momento con infinito affetto, per la collaborazione e l'amicizia dimostratami.

Ringrazio gli amici di sempre, elementi fondamentali della mia vita, Daniela, Fabiana, Salvatore, Clelia, Massimiliano, Imma, Sante e ringrazio Raffaele, Nicola e gli amici del dipartimento di Ispezione, che mi hanno sostenuto nei momenti di difficoltà aiutandomi ognuno a proprio modo.

Ringrazio il dottor. Salvatore Ferrante e il dottor. Antonio Chianese per la raccolta dei campioni e ringrazio tutti coloro che vi hanno collaborato.

Ringrazio gli amici di Parigi, la dott.ssa Gaetana Di Liberto, Alessio Bernasconi, Corinne Champilou, Marie Quinty, Matthieu Chaumien, per essermi stati vicini ed avermi aiutata sempre in ogni momento.

Ringrazio i miei genitori e Francesco per avermi sostenuto ed incoraggiato a seguire sempre le mie passioni.

*Ma soprattutto ringrazio la prof.ssa **Teresa Sarli**, a cui dedico questo mio lavoro; questo dottorato è stato un dono solo per avermi concesso la possibilità di conoscere ed avere nella mia vita, anche se per breve tempo, una persona speciale ed unica come lei. La ringrazio per essermi stata sempre vicina, incoraggiandomi nelle difficoltà e spronandomi a dare sempre il meglio; la ringrazio per i bellissimoi ricordi insieme, per gli infiniti sorrisi, per i rimproveri, per gli insegnamenti professionali, e per gli indimenticabili consigli di professoressa, di amica, di madre che porterò gelosamente dentro di me per tutta la vita. Grazie*