

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**



TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

IN

BIOLOGIA, PATOLOGIA E IGIENE AMBIENTALE IN
MEDICINA VETERINARIA

XXIV CICLO – 2008-2011

**PREVALENZA DEL VIRUS DELL'EPATITE E IN CINGHIALI
SELVATICI (SUS SCROFA) NELLA REGIONE DEL LAZIO -
ITALIA**

TUTOR
CHIAR.MO PROF. UGO PAGNINI

DOTTORANDA
DOTT.SSA.. SIMONA SASSO

COORDINATORE
CHIAR.MO PROF. GIUSEPPE PAINO

*“Voi avrete tribolazione nel mondo,
ma abbiate fiducia;
Io ho vinto il mondo!”*

Giov.16:33

INDICE

ABSTRACT	pag. 1
INTRODUZIONE	pag. 3
CENNI DI BIOLOGIA DELLA SPECIE	pag. 6
Posizione Tassonomica	pag. 6
Distribuzione	pag. 8
Morfologia e abitudini	pag. 9
Formula dentaria	pag.11
Comportamento	pag.14
Biologia riproduttiva	pag.15
Dieta e regime alimentare	pag.17
Habitat	pag.18
EPATITE E	pag.20
Caratteristiche molecolari	pag.20
Genotipi e sottotipi	pag.20
Caratteristiche cliniche	pag.22
Decorso clinico	pag.24
Diagnosi	pag.25

<i>Test IgG,IgA,IgM anti-HEV</i>	pag.25
<i>Test per antigene HEV</i>	pag.26
<i>Test di Biologia Molecolare</i>	pag.27
Modalità di trasmissione	pag.27
<i>Trasmissione attraverso l'acqua</i>	pag.28
<i>Zoonosi di origine alimentare</i>	pag.28
<i>Trasmissione ematica</i>	pag.30
<i>Trasmissione parenterale</i>	pag.31
Controllo e prevenzione	pag.31
<i>Misure sanitarie</i>	pag.31
<i>Immunoprofilassi</i>	pag.32
<i>Vaccino</i>	pag.32
MATERIALI E METODI	pag. 34
Area di studio	pag. 34
Metodologia	pag. 35
Percorso organizzativo e campionamento	pag.35
Organi campionati	pag.36
Campioni esaminati nella stagione venatoria 2010-2011	pag.38
Popolazione umana a rischio: campionamento e preparazione del campione	pag.39
Esami sierologici	pag. 40
<i>Elisa indiretta per l'identificazione di anticorpi verso l'Epatite E</i>	pag. 40

Esami di biologia Molecolare	pag.41
<i>Estrazione dell'RNA</i>	pag.41
<i>Rna reverse transcription e prima reazione di PCR</i>	pag.42
<i>Nested PCR</i>	pag.43
<i>Elettroforesi in gel di Agarosio ed escissione da gel</i>	pag.44
<i>Sequenziamento ed analisi filogenetica</i>	pag.44
Analisi statistica	pag.45
RISULTATI	pag. 46
Esami sierologici	pag. 46
Esami di Biologia molecolare	pag. 48
Risultati sierologici e di biologia molecolare nella popolazione umana a rischio	pag.49
Analisi statistica	pag.50
Sequenziamento ed analisi filogenetica	pag.53
DISCUSSIONE	pag. 57
CONCLUSIONI	pag. 65
BIBLIOGRAFIA	pag. 66

ABSTRACT

L'epatite E è una delle principali cause di epatite virale acuta nei paesi tropicali e subtropicali a causa di un piccolo virus ad RNA, il virus dell'epatite E (HEV). Negli ultimi anni, un crescente numero di infezioni autoctone umane che coinvolgono HEV genotipi 3 e 4 sono stati segnalati nei paesi industrializzati. Il genotipo 3 è il principale tipo di HEV che circola nel suino, ed è anche riportato in sporadici casi descritti. Sebbene, ceppi di HEV suini siano stati rilevati in allevamenti suini in molti paesi europei, solo poche informazioni sono attualmente disponibili circa la circolazione e la prevalenza di HEV in cinghiali selvatici in Italia. Il cinghiale (*Sus scrofa*) è ampiamente diffuso nelle montagne dell'Appennino in centro e sud Italia. Questo animale selvatico può lasciare il suo habitat naturale per entrare in contatto con animali domestici. Per questo motivo, è una fonte potenziale di malattie infettive, non solo per gli animali (selvatici e domestici), ma anche per l'uomo. In questo studio, abbiamo ricercato la presenza di HEV in una popolazione di cinghiali in Italia. La prevalenza di infezione da HEV è stata determinata in 228 cinghiali (*Sus scrofa*) raccolti durante la stagione venatoria 2010-2011 nella regione del Lazio in Italia centrale. Una indagine sierologica è stata effettuata utilizzando un test ELISA commerciale validato per l'uso in cinghiali selvatici per rilevare gli anticorpi anti-HEV.

In 166 su 228 (72%) sieri di cinghiale sono stati riscontrati anticorpi per HEV in base al cut-off descritto per umano (COV). Tuttavia, la stima della sieroprevalenza calcolata basandosi sul cut off previsto per il suino o per il cinghiale, è risultata del 64% (146/228) e 40% (92/228) rispettivamente. La

differenza con il COV specifico per il suino potrebbe essere stata causata dalla natura emolitica dei sieri di cinghiale.

Parenchima epatico è stato inoltre raccolto, e RNA di HEV è stato rilevato mediante una RT-Nested PCR, amplificando un frammento della ORF2. Cinquantaquattro dei 164 campioni di cinghiale testati (33%) sono risultati positivi per HEV RNA. Inoltre sono stati analizzati anche 20 campioni di siero e sangue umano.

La siero prevalenza riscontrata in questi campioni è stata del 25% (5/20) confermata dalla positività della RT- nested PCR per tutti e 5 i campioni.

I prodotti della PCR positivi, sono stati escissi da gel di agarosio e purificati utilizzando un kit di estrazione da Gel QIAquick seguendo le istruzioni del produttore. E' stata effettuata infine la caratterizzazione genetica dei ceppi identificati dai cinghiali selvatici e dai campioni umani mediante sequenziamento e allineamento. L'analisi filogenetica sulle sequenze nucleotidiche di 16 amplificati di cinghiale e 5 umani ha indicato che tutti i ceppi appartenevano al genotipo 3.

INTRODUZIONE

L' Epatite E è una malattia virale umana con caratteristiche cliniche e morfologiche dell' epatite acuta. L'infezione rappresenta una preoccupazione importante per la salute pubblica in molti paesi in via di sviluppo, dove è trasmessa principalmente attraverso la via oro-fecale ed attraverso l'acqua contaminata ed il cibo (Emerson e Purcell, 2003) ed è spesso responsabile di focolai epidemici. Nelle persone più colpite, il decorso della malattia è mite, tranne che per le donne incinte in cui la mortalità raggiunge il 20% (Aggarwal e Krawczynski, 2000). L'agente eziologico della malattia è il virus dell'epatite E (HEV), un piccolo virus a RNA privo di envelope appartenente al genere Hepevirus all'interno della famiglia di Hepeviridae (Mayo, 2004). HEV isolati finora sono stati classificati in quattro principali genotipi. La maggior parte delle infezioni che si verificano in Asia e in Africa è causata da genotipo 1, mentre il genotipo 2 prevale in Messico e in Nigeria (Emerson e Purcell, 2003). Il Genotipo 3 prevale negli USA e in Europa, mentre il genotipo 4 è distribuito principalmente in Cina, Taiwan, Giappone, Indonesia e Vietnam (Hsieh et al., 1999; Banks et al., 2004; Zheng et al., 2006). Anche se, l'epatite E è una malattia sporadica in paesi con condizioni di buona salute, il tasso di siero-prevalenza tra individui sani può essere piuttosto elevato (Emerson e Purcell, 2003). Il primo ceppo animale di HEV è stato caratterizzato nei suini negli Stati Uniti nel 1997 (Meng et al., 1997). Da questo momento in poi, diversi altri ceppi sono stati descritti nei suini in tutto il mondo, quasi tutti appartenenti ai genotipi 3 e 4 (Lu et al., 2006). In particolare, i ceppi suini hanno omologie di sequenza alte con ceppi autoctoni umani, suggerendo che i suini possono rappresentare un serbatoio dell'infezione e che una

trasmissione zoonotica dell' HEV può giocare un ruolo rilevante nei paesi industrializzati (Meng et al., 1998; Zanetti et al., 1999; Van Der Poel et al., 2001; Clemente Casares et al., 2003; Buti et al., 2004). A questo proposito, numerosi studi hanno riportato che nelle persone che lavorano a contatto con suini come allevatori, i veterinari e gli operatori nella catena di macellazione, il tasso di siero-prevalenza di HEV può essere superiore a quello riportato nel normale controllo delle popolazioni (Hsieh et al., 1999; Drobeniuc et al., 2001; Meng et al., 2002; Withers et al., 2002). Ad oggi, sono stati condotti studi per valutare la presenza di HEV in cinghiali o maiali selvatici in Australia (Chandler et al., 1999) e Giappone (Matsuda et al., 2003; Yazaki et al., 2003; Sonoda et al., 2004; Takahashi et al., 2004; Tamada et al., 2004; Li et al., 2005; Masuda et al., 2005; Nishizawa et al., 2005). Tuttavia, lo studio in Australia è stato eseguito su maiali selvatici, mentre l'inchiesta giapponese interessata due cinghiali sottospecie *Sus scrofa leucomyxtas* e *Sus scrofa riukiuanus* (Watanobe et al., 1999) che sono presenti in quel paese ma sono filogeneticamente differenti da cinghiali sottospecie europea. A nostra conoscenza, minime informazioni sulla circolazione e la prevalenza di HEV in cinghiali europei è attualmente disponibile (de Deus et al., 2007b), nonostante numerose relazioni hanno già confermato una vasta circolazione di HEV tra i maiali domestici in molti paesi europei (Pina et al., 2000; Van Der Poel et al., 2001; Clemente Casares et al., 2003; Banks et al., 2004a; Fernandez-Barredo et al., 2006; de Deus et al., 2007a; Caprioli et al., 2007). La popolazione del cinghiale selvatico (*Sus scrofa*) è ampiamente distribuita in diverse parti del mondo. Il ruolo svolto dal cinghiale come serbatoio di molte malattie infettive ed infestive lo porta ad essere considerato una possibile fonte d'infezione per il suino domestico, per altri animali domestici e non in ultimo per l'uomo; è per questo motivo che da molti anni diverse indagini epidemiologiche sono

state condotte nella popolazione del cinghiale in Europa e nel resto del mondo.

Tuttavia le ricerche sull'ecopatologia del Cinghiale (*Sus scrofa*) in Europa hanno raramente interessato popolazioni presenti nel centro Italia.

Obiettivo di questo studio è stato quello di condurre un'indagine finalizzata a valutare la prevalenza virale ed anticorpale dell' HEV in una popolazione di cinghiali nell'Italia centrale ed inoltre a valutare la correlazione genetica tra virus rilevati nei suini italiani con altri ceppi circolanti in Europa. Anticorpi anti-HEV nel siero sono stati rilevati attraverso un kit ELISA . Inoltre, l'RNA virale è stato determinato nel fegato ed inoltre una caratterizzazione genetica dei ceppi identificati di HEV è stata eseguita contro sequenze esistenti di origine umana, suina e cinghiale.

CENNI DI BIOLOGIA DELLA SPECIE

Posizione Tassonomica

Classe: **Mammalia**

Superordine: **Ungulata**

Ordine: **Artiodactyla**

Sottordine: **Suiformes**

Famiglia: **Suidae**

Sottofamiglia: **Suinae**

Genere: **Sus**

Specie: **Sus scrofa** (fig. 1)

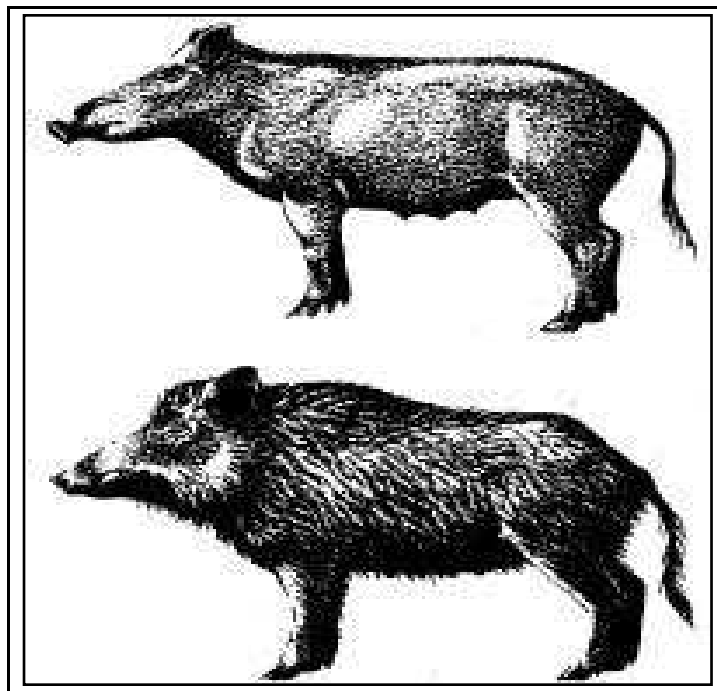


Figura 1: Sus Scrofa

Il cinghiale appartiene al superordine degli Ungulati nel quale troviamo anche i cervidi ed i bovidi. Caratteristica del superordine è quella di avere le ultime falangi degli arti ricoperte da unghie a forma di zoccolo. Il cinghiale è l'unico animale selvatico italiano appartenente alla famiglia dei suidi, nella quale troviamo anche il suo omologo domestico: il suino. Entrambi i suidi appartengono al genere *Sus* ed alla specie *Sus scrofa*. L'appartenenza alla stessa specie è verificata dal tradizionale sistema di discriminazione che definisce due specie diverse tra loro quando il frutto del loro accoppiamento è sterile. Tale sterilità non si verifica nei prodotti dell'incrocio tra suino domestico e cinghiale. Se invece si considera come discriminante il numero dei cromosomi le due specie presentano un differenza: trentotto cromosomi il suino domestico e trentasei il cinghiale.

La specie cinghiale presente in Italia è stata suddivisa in tre sottospecie: il cinghiale Maremmano (*Sus scrofa majori*); il cinghiale centroeuropeo (*Sus scrofa scrofa*); il cinghiale sardo (*Sus scrofa meridionalis*). Alla luce di alcuni studi sul polimorfismo enzimatico tale suddivisione risulta alquanto discutibile e complicata da alcuni fattori legati all'intervento umano quali l'incrocio delle popolazioni selvatiche con i conspecifici domestici, allevati allo stato brado, e con forme e sottospecie che si sono evolute in aree geografiche differenti e che sono state introdotte dall'uomo per scopi venatori.

Il solo cinghiale sardo sembrerebbe una sottospecie distinta dalle altre due e tanto simile al suino domestico da far supporre che derivi da progenitori inselvaticati. Da alcuni recenti studi sulla morfologia dei cinghiali è stato tuttavia possibile identificare popolazioni morfologicamente diverse tra loro che potrebbero essere il risultato di un adattamento ad ambienti diversi. Tali differenze hanno delineato una realtà nazionale composta da "ecotipi" di cinghiale adattati ai diversi ecosistemi.

In Italia è stata segnalata un'ulteriore sottospecie, *Sus scrofa raiseri*, che in seguito a migrazioni naturali dalla Slovenia sarebbe presente in Friuli; questa sottospecie, però, non è ufficialmente riconosciuta (Apollonio et al., 1988). Infine, poiché gli incroci tra maiale e cinghiale non sono sterili, si ritiene che cinghiale e maiale non siano geneticamente isolate e che, quindi, appartengano alla stessa specie (Marsan et al., 2000).

Distribuzione

Tra gli Ungulati selvatici il cinghiale è la specie con uno degli areali originari più vasti; esso, infatti, si estende dall'Europa all'Asia centrale e meridionale ed all'Africa settentrionale.

Attualmente, sebbene in seguito a immissioni accidentali o vere introduzioni, è presente anche negli Stati Uniti, in Australia e in Nuova Zelanda.

Per quanto riguarda la situazione in Italia, la specie è distribuita, senza soluzione di continuità, dalla Valle d'Aosta, attraverso le Alpi occidentali e gli Appennini, sino alla Calabria; è presente anche in Sardegna ed in Sicilia come frutto di immissioni assai recenti e, con modalità più frammentarie e discontinue, in alcune zone prealpine, appenniniche e di media montagna di Lombardia, Veneto, Trentino, Friuli Venezia Giulia, Toscana, Umbria, Lazio, Campania, Abruzzo, in natura, in aree protette "Parchi Naturali" e in aziende faunistiche a scopo venatorio.

E' stimabile la presenza complessiva di non meno di 300-500.000 cinghiali sull'intero territorio nazionale (Pedrotti et al., 2001).

Morfologia e abitudini

La struttura morfologica del cinghiale è frutto dell'evoluzione in ambiente forestale ricco di sottobosco: treno anteriore massiccio, corporatura schiacciata lateralmente, zampe corte, con le anteriori più lunghe delle posteriori, assolutamente funzionali alla corsa. La testa può arrivare a più di un terzo della lunghezza totale dell'animale ed è caratterizzata da un grosso cranio con orbite sospinte indietro ed una cresta occipitale pronunciata in seguito ad un maggior sviluppo della parte facciale rispetto a quella frontale. L'abitudine di grufolare, cioè cercare il cibo nel suolo usando il grugno per rivoltare il terreno, è reso possibile da grossi fasci di muscoli nucali inseriti nella cresta occipitale, dall'attività della "ghiandola rostrale", che è collegata al tegumento del grugno con la funzione di lubrificarlo e umidificarlo per attenuare gli effetti dovuti allo sfregamento con il terreno, e da molteplici terminazioni sensoriali che rendono particolarmente sensibile l'olfatto dell'animale. Molto importante è anche l'osso del grugno, un disco osseo collegato con la porzione facciale per mezzo di cartilagini, che rappresenta un adattamento allo scavo.

La pelle del cinghiale è molto spessa, soprattutto nella regione delle spalle, del collo e della parte alta dei fianchi e poco vascolarizzata per proteggere l'animale da ferite, infezioni e morsi.

La pelliccia è composta da setole (pelo di giarra), internamente cave ed inserite nella pelle in senso obliquo, con orientamento diretto indietro e in basso, per minimizzare la resistenza durante la corsa e facilitare lo scorrimento della pioggia, da pelo di borra e da una fitta lanuggine (borra, sottopelo) trasparente che si forma intorno alle setole all'approssimarsi dell'inverno.

Il cinghiale ha due mute all'anno, una estiva ed una invernale, e la colorazione del mantello, che ha comunque una certa variabilità individuale, permette di individuare tre classi d'età (Massei e Toso, 1993):

STRIATI: mantello, tipico dei nuovi nati fino a circa 4 mesi di vita, caratterizzato da striature longitudinali brune e chiare;

ROSSI: mantello rossiccio caratteristico degli animali fino a 12 mesi che viene mantenuto fino alla primavera successiva a quella della nascita;

NERI: mantello che, per aumento della melanina, presenta colorazione variabile a seconda della stagione e dell'età (indica comunque animali più vecchi di un anno) e passa dal marrone/nero al grigio bruno/nero.

Il dimorfismo sessuale negli adulti è abbastanza evidente: le femmine hanno canini meno sviluppati e poco visibili, una testa più lunga e affilata, con minore stop frontale ed una differenza tra treno anteriore e posteriore meno accentuata; inoltre, in primavera-estate, quelle che hanno partorito mostrano mammelle ingrossate e molto evidenti. Per quanto riguarda i maschi essi hanno dimensioni corporee maggiori (150-200 kg contro gli 80-150 Kg delle femmine) e portano in posizione ventrale, sul pene, un ciuffo di peli, chiamato "pennello".

Si tratta di animali notturni, attivi soprattutto all'alba e al crepuscolo, che, seppur non prettamente stanziali, rimangono comunque fedeli ad un territorio ben preciso.

A causa della presenza di ectoparassiti (pulci, zecche) e delle esigenze di termoregolazione i cinghiali frequentano regolarmente gli "*insogli*", ovvero quei siti in cui possono soddisfare la loro necessità di bagnarsi di acqua e di fango; una volta essiccato il fango ingloba gli ectoparassiti che vengono successivamente allontanati dalla cute per strofinamento su alberi o pietre, i cosiddetti "*grattato*".

Formula dentaria

Si tratta di un animale difiodonte poiché, come nell'uomo e negli onnivori in genere, la dentatura evolve in due processi: dentizione primaria o da latte e dentizione secondaria o definitiva che comincia a svilupparsi tra i 9 e i 12 mesi per completarsi intorno al terzo anno, quando compare il terzo molare definitivo.

Poiché la dentizione segue tempi molto precisi si può definire con sufficiente precisione l'età di ogni animale almeno fino ai tre anni (Boitani e Mattei, 1991) (fig. 2).

Al momento della nascita la dentatura del cinghiale è formata da 4 incisivi e 4 canini da latte ai quali si aggiungeranno 8 incisivi e 12 premolari da latte che verranno poi sostituiti dai denti definitivi.

Ogni emi arcata di un animale adulto è così composta:

- 3 **incisivi**; quelli inferiori, rivolti in avanti, permettono di rovesciare le zolle durante la ricerca di alimenti ipogei e, in sincronia con quelli superiori, formano uno strumento per “snocciolare-sgusciare-sbucciare”;
- 1 **canino** a crescita continua e regolare; quelli inferiori si chiamano “zanne” mentre quelli superiori “coti” ed assieme costituiscono gli organi di difesa-offesa;
- 4 **premolari** e 3 **molari** che vengono utilizzati per tranciare e sminuzzare il cibo.

La formula dentaria del cinghiale risulta pertanto 3I/3I, 1C/1C, 4P/4P, 3M/3M per un totale di 44 denti (fig 3).

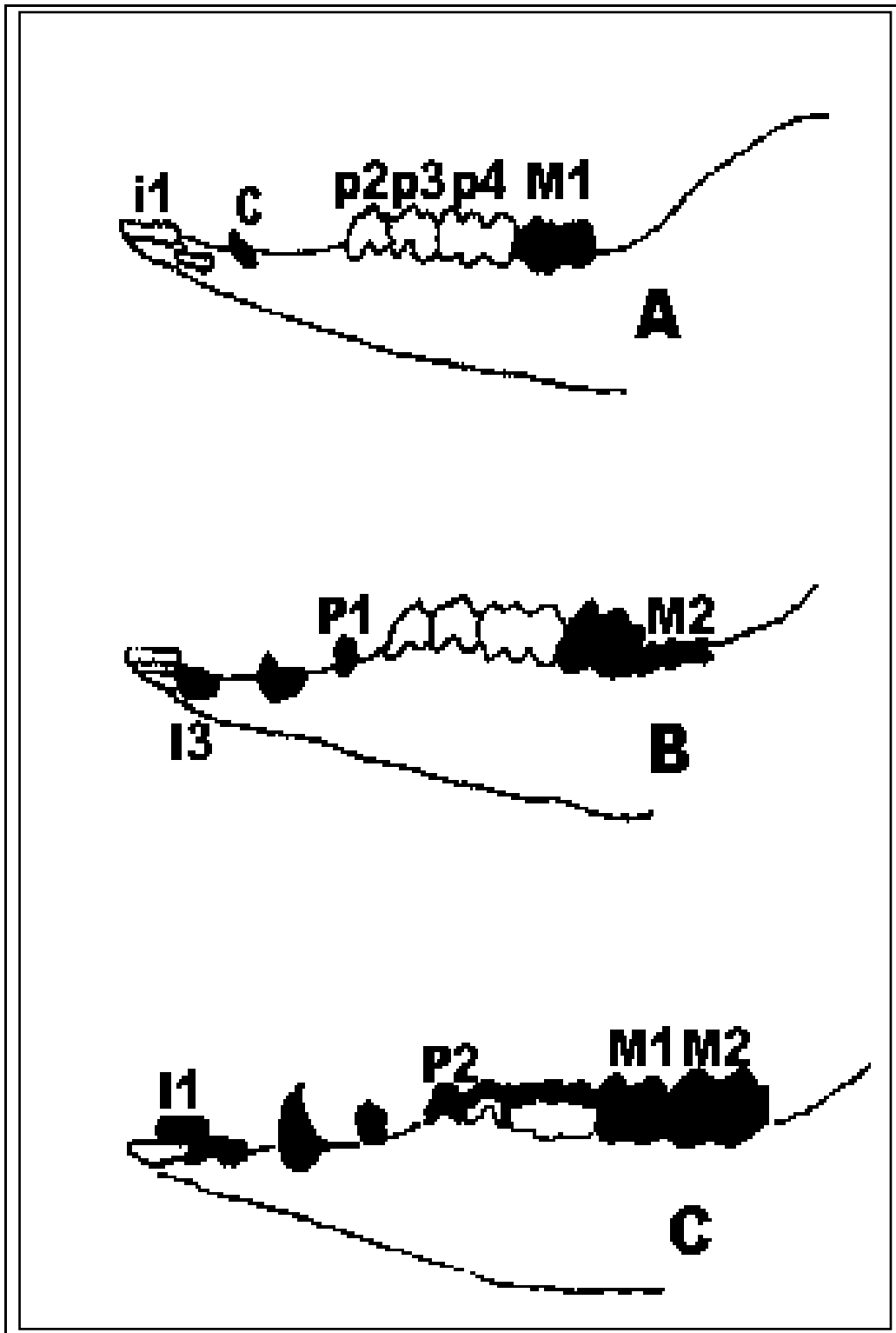


Figura 2. Schema mandibole: *A*: tra sei mesi ed un anno; *B*: un anno; *C*: un anno e mezzo

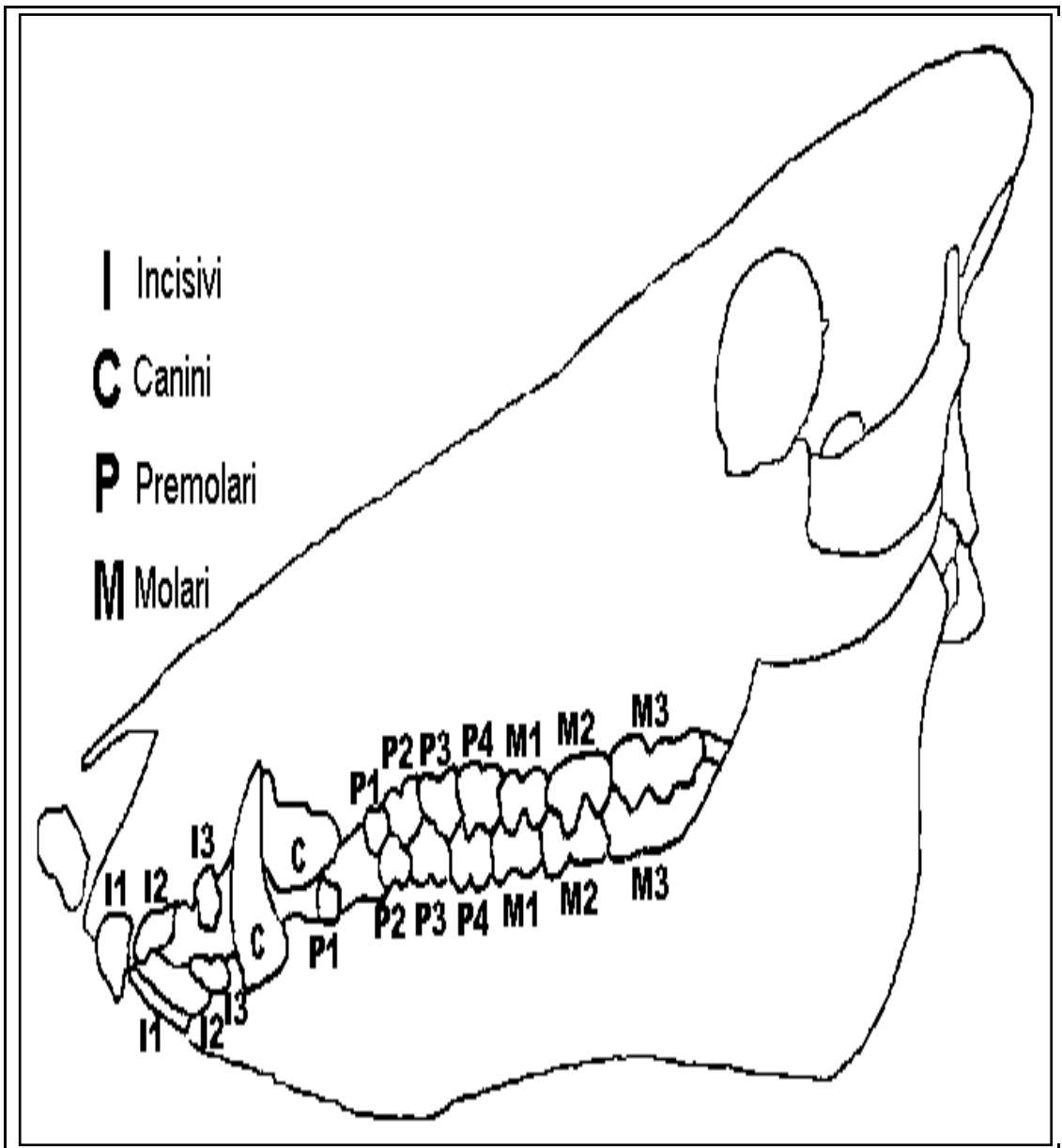


Figura 3. Schema dentizione

Comportamento

La struttura sociale di base di una popolazione di cinghiale è il gruppo matriarcale, formato da più nuclei familiari, ovvero dalle femmine ed i loro piccoli. L'associazione di più scrofe è molto comune perché rappresenta un comportamento anti-predatorio; i piccoli, infatti, vengono difesi da più femmine adulte, riducendo così la possibilità per i predatori di attaccare con successo (fig. 4).



Figura 4: Combattimento fra cinghiali

Talvolta, nel gruppo possono essere presenti anche i nati dell'anno precedente (Dardaillon, 1984) i quali si allontanano dalle femmine intorno ai due anni d'età per condurre una vita solitaria o per formare associazioni temporanee.

Generalmente i maschi adulti conducono una vita solitaria, ma può capitare di osservarli accompagnati da un maschio più giovane. Avendo abitudini crepuscolari e notturne, la vista è poco sviluppata mentre i sensi dell'udito e dell'olfatto sono molto efficienti; quest'ultimo in particolare gioca un ruolo molto importante nella vita sociale del cinghiale, poiché, grazie ai segnali odorosi emessi, questi animali possono avvertire gli altri individui della propria presenza, ritrovare la via per ritornare nel proprio territorio, quando si allontanano per ricercare il cibo e riconoscere l'età, il sesso e pure lo stato fisiologico, anche a distanza di tempo, di altri cinghiali che sono transitati sul luogo.

Biologia riproduttiva

Il comportamento sociale del gruppo varia all'avvicinarsi del periodo degli amori che è indicativamente compreso tra ottobre e gennaio raggiungendo l'apice a dicembre.

In questo momento particolare, il gruppo, al quale fanno ritorno i maschi solitari, si scinde in due gruppi dei quali uno è formato dalle femmine con prole più cresciuta e l'altro dai giovani maschi di 1 o 2 anni. All'interno del gruppo le femmine raggiungono l'estro contemporaneamente grazie all'azione di determinati feromoni emessi dall'individuo dominante: in questo modo viene garantita la simultaneità dei parti e, conseguentemente, una maggiore coesione del branco.

Nel periodo dell'accoppiamento i maschi hanno una saliva che, contenendo sostanze chimiche costituite da ormoni sessuali, conferisce al loro alito un odore molto forte che ha la funzione di richiamare le femmine. I maschi, prima del periodo degli amori, accumulano sui fianchi uno strato di grasso, con funzioni di riserva energetica, per superare questo periodo nonostante la ridotta alimentazione, e di protezione dai colpi inferti con le zanne da altri maschi, durante le lotte per il possesso delle femmine. A differenza del suo conspecifico domestico, l'attività riproduttiva del cinghiale segue una certa stagionalità ed è positivamente correlata ai fattori climatici ed alla disponibilità trofica. In particolare, in annate in cui gli alimenti alla base della sua dieta sono abbondantemente presenti si possono avere due picchi: uno in gennaio/febbraio, l'altro in agosto/settembre. Dopo circa 16 settimane di gestazione, pochi giorni prima delle nascite, che solitamente sono distribuite su quasi tutti i mesi dell'anno con un picco nei mesi primaverili e soprattutto in maggio, le femmine gravide si allontanano dal gruppo che rimane così costituito dalle femmine non feconde e da quelle che non hanno raggiunto la maturità sessuale. Questa nei maschi viene raggiunta a circa 10 mesi, mentre nelle femmine tra l'ottavo e il diciottesimo mese (Mauget et al., 1979). Prima del parto ogni femmina scava un avvallamento che imbottisce di frasche e altro materiale vegetale per creare una tana che dovrà ospitare i cuccioli in numero variabile da 2 a 10, in relazione allo sviluppo ponderale della femmina. Nei giorni immediatamente successivi alle nascite le scrofe rimangono con i piccoli nella tana 2/3 settimane, riducendo al minimo i loro spostamenti, e successivamente, dopo circa un mese, si riuniscono al gruppo di femmine dal quale si erano precedentemente separate. Di tutto il periodo riproduttivo il momento più delicato è quello del parto a causa di un elevato tasso di mortalità infantile (15% nel primo trimestre, 50-75% nel primo anno) dovuto

a predazione e fattori climatici (Jeziński, 1977); nonostante ciò l'incremento riproduttivo è, al massimo, del 100-150% sul totale che si traduce in 2/3 piccoli per ogni femmina di qualsiasi età; in realtà di solito l'incremento è più basso e molto variabile da popolazione a popolazione e di anno in anno.

Dieta e regime alimentare

Il cinghiale ha uno spettro alimentare molto ampio ed è quindi classificato come onnivoro.

Il cinghiale è l'unico Ungulato selvatico italiano non ruminante; infatti, possiede un vero e proprio stomaco ghiandolare, senza le altre tre cavità funzionalmente deputate al deposito e/o alla predigestione di materiale vegetale ingerito dall'animale. Questo si traduce in una maggiore difficoltà a digerire la cellulosa rispetto agli ungulati ruminanti.

La sua dieta varia in relazione alle risorse trofiche offerte dai vari ambienti ed è in genere rappresentata per il 90% da alimenti di origine vegetale e per una minima parte (circa il 10%) da cibo animale (Genov, 1981).

Nella dieta autunno-invernale prevalgono castagne, ghiande, fagge, radici, tuberi ed altri vegetali mentre, in primavera-estate, sono le foglie, i fusti e le gemme a costituire la componente principale. Durante l'anno la parte di origine animale che entra nella dieta è un elemento essenziale ed è rappresentata da Invertebrati, quali Anellidi, Molluschi, Crostacei, Insetti, e da Vertebrati, come Pesci, Anfibi, Rettili, Uccelli, Micromammiferi.

In primavera ed estate, quando la disponibilità alimentare del bosco si riduce fino ad esaurirsi, il cinghiale si alimenta anche a spese delle coltivazioni dove può trovare alimenti di elevato valore nutritivo in grande quantità e molto

concentrati nello spazio; in questo modo la specie ottimizza il bilancio tra energia spesa nella ricerca del cibo e energia assunta con l'attività di alimentazione.

Le coltivazioni più danneggiate sono frumento, mais, patate ed uva, ma anche i medicaia e i prati stabili vengono visitati frequentemente.

Le richieste energetiche giornaliere, inoltre, non sembrano variare in relazione al sesso bensì in relazione all'età, allo stato fisiologico e al periodo dell'anno.

Secondo uno studio effettuato in Polonia analizzando 192 stomaci di cinghiale (Genov, 1981), tra i vegetali gli alimenti più importanti sono risultati le ghiande, le patate, i cereali coltivati e l'erba, mentre tra gli alimenti di origine animale i principali sono stati le carogne e gli insetti dannosi alle coltivazioni. Nello stesso studio sono anche state evidenziate variazioni stagionali della dieta del cinghiale, in particolare le piante coltivate vengono utilizzate al momento della semina e prima del raccolto, i frutti selvatici soprattutto in autunno al momento della massima disponibilità negli ambienti naturali e gli alimenti di origine animale principalmente in primavera.

Habitat

Il cinghiale è in grado di adattarsi a diversi ambienti, anche estremamente diversi tra loro, accumulati però da disponibilità di cibo, da una buona copertura vegetale tale da fornire un rifugio sicuro e dalla presenza di acqua, elemento essenziale per la specie soprattutto per i bagni di fango.

Le dimensioni dell'home range variano a seconda della stagione e delle caratteristiche ambientali biologiche della specie (disponibilità alimentare, attività venatoria, sesso ed età degli individui); inoltre tale territorio non viene

utilizzato omogeneamente dal cinghiale ma vengono selezionate solo le aree più adatte alle proprie esigenze di vita (Boitani et al., 2003). Questo ungulato predilige le aree caratterizzate da una buona copertura arborea con un ricco sottobosco, come boschi decidui dominati dal genere *Quercus*, alternate a cespuglieti. Il problema legato a questa tipologia ambientale è che difficilmente riesce a sostenere grandi popolazioni per l'intero ciclo stagionale anche, o soprattutto, in seguito alla sua drastica riduzione ad opera dell'uomo. Come risposta, quindi, in particolare durante il periodo estivo che coincide con la diminuzione delle risorse naturali parallelamente all'aumento della disponibilità dei prodotti coltivati, i cinghiali per il foraggiamento utilizzano le zone agricole adiacenti ai boschi nei quali invece trascorrono la maggior parte delle ore di inattività.

Questi animali inoltre rispondono alle modificazioni ambientali legate al naturale andamento stagionale affrontando movimenti stagionali: in estate occupano i territori ad altitudini maggiori mentre in inverno, se si verificano abbondanti nevicate e lunghi periodi di gelo, scendono a quote minori. La distribuzione geografica di questa specie sembra quindi limitata da situazioni culturali estreme con totale assenza di zone boscate, anche di estensione limitata, indispensabili come zone di rifugio o dalla presenza di inverni molto rigidi con un elevato numero di giorni con forte innevamento durante i quali il terreno gela impedendo loro di procurarsi il cibo necessario e mettendo quindi a rischio la vita soprattutto dei più giovani e dei più vecchi.

EPATITE E

Caratteristiche molecolari

HEV è l'unico membro del genere *Hepevirus* della famiglia dei *Hepeviridae* (Emerson et al., 2004). È una piccola e rotonda particella di 27–34 nm priva di envelope con un genoma circa 7.2 kb di lunghezza che consiste in un monofilamento di RNA a polarità positiva (fig.5). Il genoma contiene dei frammenti non tradotti e tre frammenti open reading detti ORF (Tam et al., 1991) Attualmente ci sono circa 1.600 sequenze HEV disponibile presso la International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC, precedentemente noto come EMBL/DDBJ/GenBank), e il numero di sequenze HEV è in rapida crescita (Shin-I et al., 2007). L'Orf1 è una poliproteina non strutturale contenente domini con metiltransferasi, RNA elicasi ed RNA replicasi, importanti per la replicazione virale. La proteina Orf2 è costituita da tre domini lineari e forme omodimere che giscono come capsomeri e formano il capsido virale. La proteina Orf3 è invece necessaria per la replicazione dell'Hev nell'ospite, ma non in vitro; ha effetti pleiotropici sul pathway della cellula ospite e gioca un ruolo nella fuoriuscita del virus dalle cellule infettate.

Genotipi e sottotipi

Sequenze di HEV sono state classificate in quattro genotipi, vale a dire, genotipi 1, 2, 3 e 4 (Schlauder e Mushahwar, 2001). Il genotipo 1 di HEV è costituito da ceppi epidemici presenti nei paesi in via di sviluppo dell' Asia e dell' Africa; il genotipo 2 è stato trovato in Messico e in Africa; il genotipo 3 è

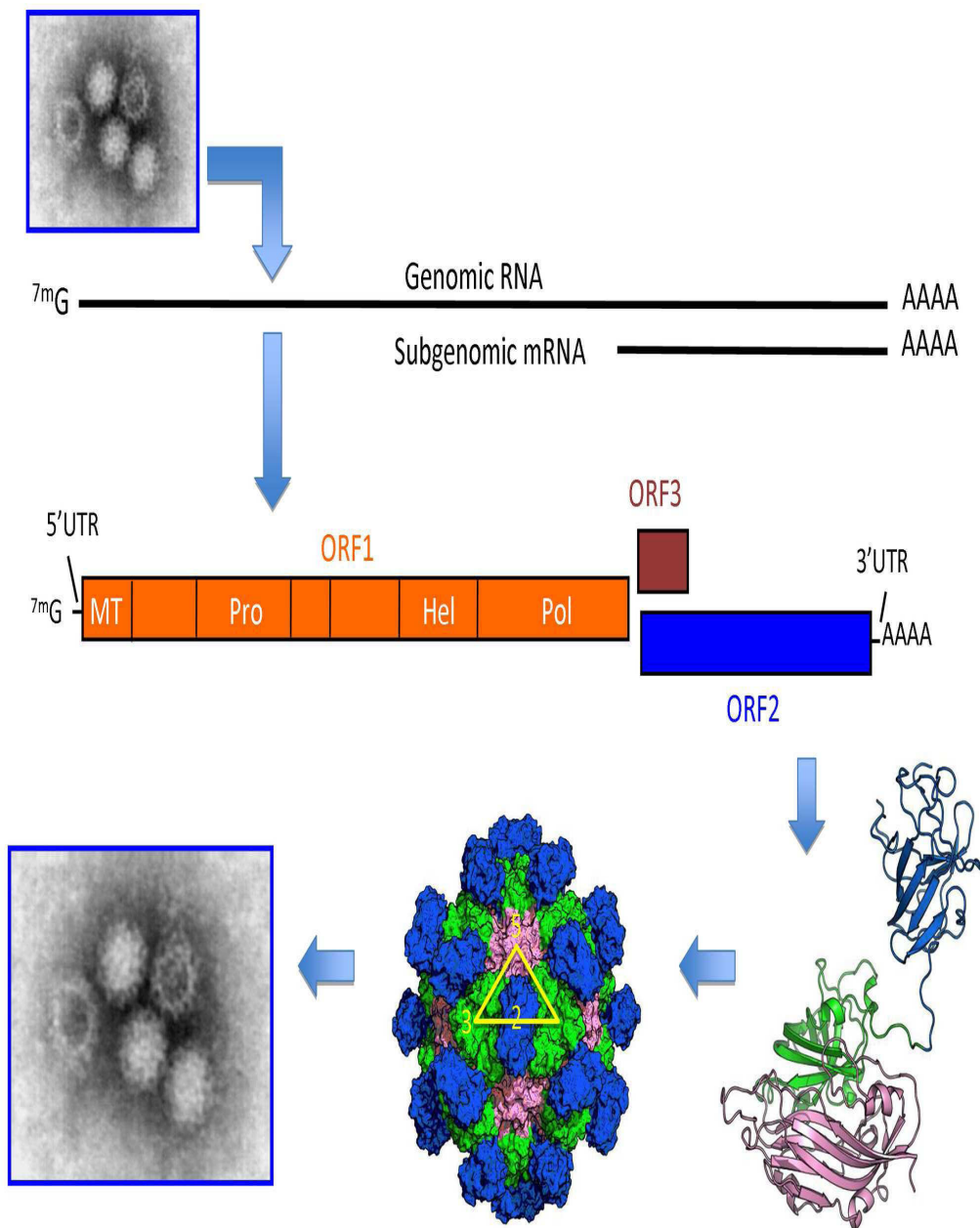


Figura 5. Il virus dell'epatite E e il suo genoma. (Aggarwal R., 2011)

ampiamente diffuso in tutto il mondo ed è stato isolato da casi sporadici di infezione acuta da HEV in maiali nel Regno Unito, diversi paesi europei e in Giappone. Il genotipo 4 si trova principalmente in Asia ceppi di paesi e comprende ceppi suini e umani (Meng et al., 1998; Schlauder e Mushahwar, 2001; Lu et al., 2006; Lorenzo et al., 2007; Okamoto, 2007). Un nuovo ceppo di HEV che è stato isolato dal pollo con una sindrome di epatite e splenomegalia è stato proposto come nuovo genotipo 5 (Haqshenas et al., 2001; Huang et al., 2004). Il genotipo 1 è classificato in cinque sottotipi, 1a, 1b, 1C, d 1 e 1e. Il genotipo 2 è classificato in due sottotipi, 2a e 2b. I Genotipo 3 e 4 sono molto diversi e sono divisi in dieci, 3a, 3b, 3C, 3d, 3e, 3f, 3G, 3h, 3i e 3j e sette sottotipi 4a, 4b, 4C, 4D, 4e, 4f e 4G, rispettivamente (Lu et al., 2006) (fig.6). Questi genotipi e sottotipi sono utili a comprendere i fenomeni epidemiologici come la diffusione geografica del virus (Norder et al., 2004).

Caratteristiche cliniche

I sintomi tipici dell'epatite includono l'ittero, urine scure, anoressia, ingrossamento del fegato , elevati livelli di ALT, dolori addominali accompagnata da nausea, vomito e febbre (Smith, 2001). La malattia può variare nella gravità da subclinica a fulminante durante la gravidanza dove il tasso di mortalità si avvicina a 15-20%. Comuni complicazioni durante la gravidanza possono includere la morte della madre e del feto, aborto, parto prematuro o la morte di un bambino nato vivo subito dopo la nascita (Smith, 2001). Studi dell'istologia epatica in 11 pazienti con epatite E acuta (Peron et al., 2007) hanno mostrato lesioni epatiche acute in tutti i casi con attività necro-infiammatoria marcata in nove pazienti. In uno studio comparativo dei

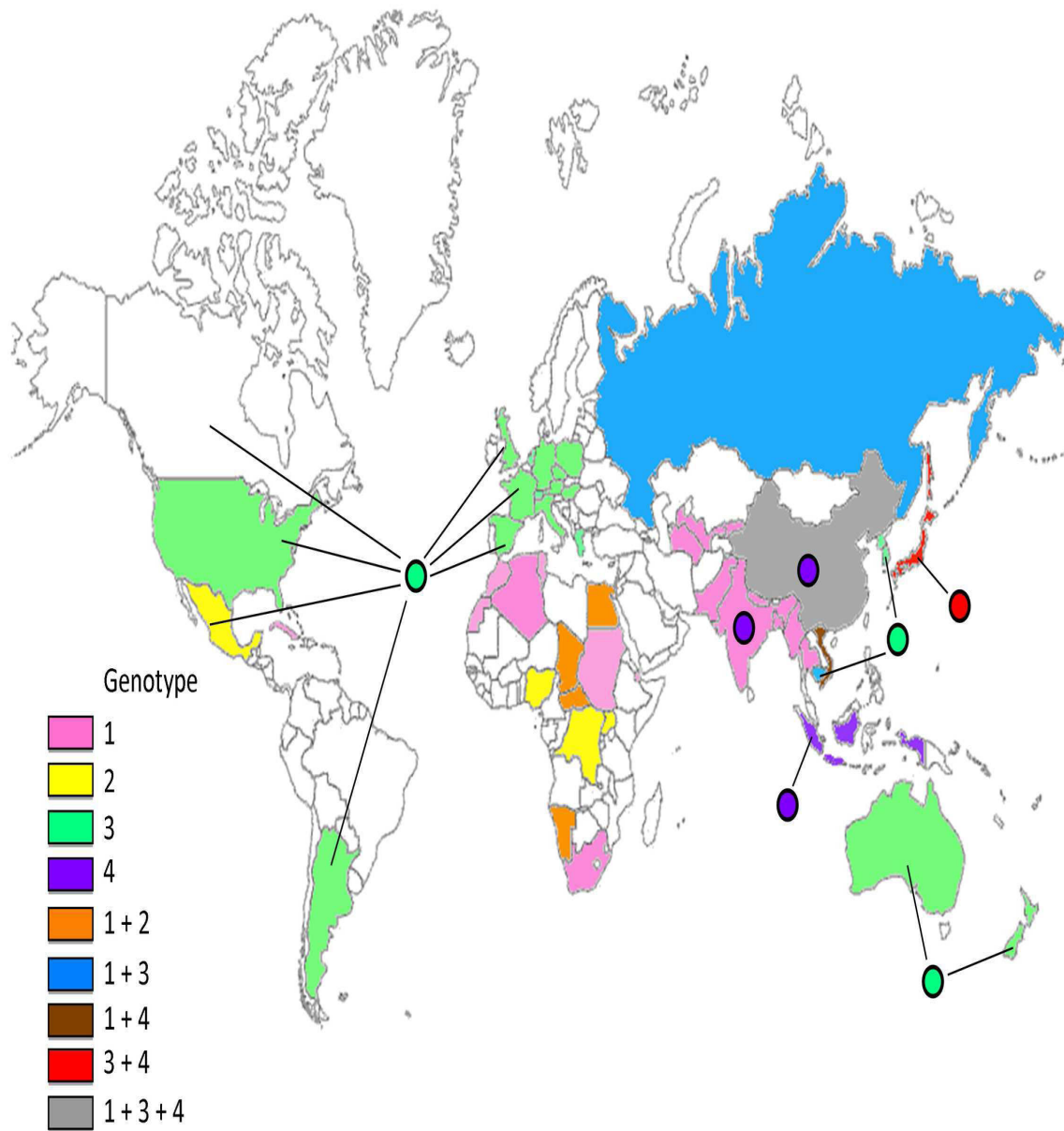


Figura 6. Distribuzione dei genotipi di HEV in isolati virali ottenuti da esseri umani e animali (prevalentemente suini). La figura è basata sui dati di Okamoto, 2007.

segni clinici di un'infezione acuta causata dal genotipo HEV 3 e 4 in Giappone (Ohnishi et al., 2006), è stato osservato che i pazienti infettati con il genotipo 4 avevano livelli ALT significativamente. Pazienti con infezione con genotipo 4 tendevano ad avere i sintomi clinici più gravi rispetto a quelli con infezione da genotipo 3.

Decorso clinico

La nostra conoscenza sull'inizio del decorso clinico e sierologico di un'infezione di HEV è basata su studi di infezione sperimentale di scimmie cynomolgus (Tsarev et al., 1992). In questo esperimento il periodo di incubazione è risultato essere di breve durata con una media di 24 giorni. L'Rna virale, primo indicatore di infezione iniziale, è stato ritrovato in feci e bile a partire dai giorni 6 e 7, rispettivamente. Tutti i campioni della bile raccolti tra il 7° ed il 41° giorno sono risultati positivi per HEV. Risultati simili sono stati osservati anche per i campioni fecali. Per quanto riguarda il siero, invece, il virus viene rilevato a partire dal 9° giorno e raggiunge l'apice tra il 14° ed il 23° giorno per poi sparire definitivamente verso il 28° giorno. Siero anti-HEV IgG è apparso il giorno 27 al culmine della elevazione ALT. Per quanto riguarda invece la risposta immunitaria questa è segnata da un aumento iniziale delle IgM anti-HEV e IgA anti-HEV a partire dal 6° giorno e rilevabili per più di 6 mesi, dopo segue la risposta delle IgG a partire dal 9° giorno che persistono per periodi molto più lunghi (oltre 8 anni). In esperimenti condotti su primati non umani infettati sperimentalmente, il virus si osserva nel siero, bile e feci prima dell'aumento delle aminotransferasi; il primo riscontro di antigeni anti-HEV negli epatociti è intorno al 7° giorno dopo infezione seguito da una rapida diffusione a circa il 70-90% degli

epatociti. Sembra che il virus dell'HEV, come gli altri virus dell'epatite, non è direttamente citopatico, e i danni a livello epatico sono il risultato della risposta immunitaria.

Diagnosi

Test sierologici e di biologia molecolare sono stati sviluppati per scopi epidemiologici e diagnostici. Test sierologici sono stati progettati per il rilevamento di anticorpi HEV (IgA, IgM e IgG) e i test di biologia molecolare furono usati per rilevare la presenza del virus nel siero, bile e/o feci. Queste analisi hanno reso più semplice il differenziare le infezioni recenti e/o in corso da quelle remote e ha permesso al clinico di compiere meno errori diagnostici basati sulla caratterizzazione sierologica incompleta.

Test IgG, IgA, IgM anti-HEV

I primi test sierologici hanno utilizzato una varietà di fonti di antigene di HEV da diversi ceppi di HEV. Tra questi peptidi sintetici (Dawson et al, 1992; Coursaget et al., 1994; Favorov et al., 1994), proteine espresse da entrambe le regioni, strutturali e non strutturali, codificate dall' ORF 2 e 3 dell' HEV [Dawson et al, 1992; Orafo et al, 1992; Anderson et al., 1999]. Per quanto riguarda i test IgG attualmente sono presenti due saggi in tutto il mondo. Questi sono la Abbott immunoglobulina G Assay (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germania) e il dosaggio IgG Genelabs (Genelabs diagnostica diagnostica, Singapore, Singapore). Entrambe le analisi sono state su un focolaio di epatite ed hanno un'adeguata sensibilità e specificità (Myint et al., 2006). Diversi test per le IgM anti-HEV home made sono stati descritti (Dawson et al, 1992; Clayson et al., 1995; Favorov et al., 1996; Seriwatana et

al., 2002; Tokita et al., 2003; Yu et al., 2003; Takahashi et al., 2005) e un dosaggio commerciale (Genelabs diagnostica). Un test ideale di IgM anti-HEV dovrebbe essere sensibile, privo di risultati falsi-positivi, e soprattutto che sia effettivamente in grado di discriminare un'infezione recente da un'infezione remota. Il Test di Onesuch (Seriwatana et al, 2002) è stato descritto in precedenza con queste caratteristiche . Questo test rileva in modo specifico le IgM anti-HEV in più del 95% dei casi di epatite acuta. Mentre per le IgA studi che hanno utilizzato questo test (Tokita et al., 2003; Takahashi et al., 2005) hanno concluso che la rilevazione di IgA anti-HEV da sola o in combinazione con IgM anti-HEV è utile per la diagnosi sierologica della epatite acuta e con maggiore specificità.

Test per antigene HEV

E' stato sviluppato un test di Elisa indiretta (Zhang et al., 2006) per la rilevazione dell'antigene HEV nel siero usando una combinazioni di anticorpi monoclonali per HEV. L'antigene per l'ELISA è stato disegnato per rilevare le proteine del capsido dei genotipi 1 e 4. L'antigene dell'HEV è stato rilevato prima dell'innalzamento dei livelli di ALT in un infezione sperimentale di scimmie. L'antigene è stato rilevato nel siero quasi contemporaneamente al rilievo dell'RNA virale nelle feci, ma persisteva per 4 settimane meno rispetto all'RNA virale. Questa analisi secondo agli autori è preziosa per la diagnosi di HEV durante il periodo finestra prima della sieroconversione.

Test di Biologia Molecolare

Il marcatore più affidabile per la diagnosi di infezione da HEV in corso è la presenza dell'RNA virale nel siero, bile e/o campioni di feci. Infatti in alcuni pazienti con infezione da HEV subclinica, la presenza dell'RNA virale può essere l'unica prova di un'infezione (Caudill et al, 1994; Clayson et al., 1995; Nicand et al., 2001; Mitsui et al., 2005). L' RNA virale viene rilevato da molti saggi di RT-PCR.L' RT-PCR è il metodo di amplificazione di elezione generalmente utilizzato per la ricerca del virus (Birkenmeyer e Mushahwar, 1991). Molti dei test home made per la ricerca dell'RNA virale sono le analisi qualitative (presenza o assenza di RNA virale in un campione biologico) o le analisi quantitative (quantità di virus in 1 ml di un campione biologico). Le analisi qualitative sono utilizzate per la rilevazione di HEV RNA e come tali sono utilizzate anche per confermare o diagnosticare un'infezione HEV in corso. Uno di questi test qualitativi utilizza primers universali (Erker et al., 1999b) che sono disegnate su sequenze conservate tra i ceppi dell'HEV Birmano, Messicano e Stati Uniti per generare amplificati all'interno di ciascuno dei tre ORFs.

Modalità di trasmissione

HEV è un patogeno principalmente trasmesso per via enterica che provoca sporadici casi di epatite acuta nei paesi industrializzati e focolai nei paesi in via di sviluppo. Ci sono quattro modalità di trasmissione documentate della trasmissione di HEV. Queste sono l'assunzione dell'acqua contaminata, consumo di carne di animali selvatici infetti come i cinghiali e cervi e animali domestici come maiali cruda o poco cotta (trasmissione di origine alimentare),

parenterale (trasmissione ematica) e trasmissione verticale da madre a figlio (trasmissione parenterale).

Trasmissione attraverso l'acqua

Durante le epidemie l'HEV è trasmessa per via oro-fecale e viene diffusa rapidamente attraverso l'acqua contaminata. Grandi epidemie si sono verificati in molti paesi tropicali e subtropicali in cui migliaia di individui svilupparono epatite acuta dopo l'ingestione di acqua contaminata. Molte indagini hanno dimostrato che l'HEV si diffonde in tutto il mondo e che i focolai di malattia si verificano in tutte le situazioni dove l'acqua è contaminata da feci. Un'epidemia ben documentata è stata studiata in Somalia (Mushahwar et al., 1993; Bile et al., 1994).

Oltre alla Somalia, molte epidemie e focolai di HEV sono avvenute. (2007)-Panda et al ha pubblicato un elenco completo che descrive il succedersi cronologico delle 10 grandi epidemie di HEV, attraverso contaminazione delle acque, che hanno avuto luogo tra il 1985 e il 2004 che coinvolgono un totale di 327.280 casi umani segnalati nel sub-continente indiano e sud-est e Asia centrale.

Zoonosi di origine alimentare

Dopo il successo sperimentale di trasmissione HEV umana ai maiali domestici (Balayan et al., 1990), è stato suggerito che l'HEV può essere considerata una zoonosi. Ulteriori prove a sostegno è stata fornita da Meng et al (1997) che ha isolato un virus suina (suina HEV) che era strettamente collegato a HEV umana. Di grande interesse, sono due relazioni

sull'individuazione e caratterizzazione di HEV in fegati di maiale venduti nei negozi di alimentari in Giappone e negli Stati Uniti. Yazaki et al (2003) testò, per verificare la presenza di RNA HEV tramite RT-PCR, confezioni di fegato di maiale crudo venduto nei negozi di alimentari nell'isola di Hokkaido in Giappone. In 7 (1,9%) su 363 confezioni era presente HEV RNA che apparteneva a entrambi i genotipi 3 o 4.. Interessante fu che 10 pazienti che avevano contratto un'epatite acuta e fulminante tra il 2001 e il 2002 in Hokkaido, 9 (90%) ha raccontato di aver consumato 8 settimane prima fegato di maiale alla griglia o poco cotta prima dell'insorgere della malattia.

Oltre ai maiali, anche per altri animali è stato dimostrato di essere suscettibili all'infezione con HEV e come tale servire come un serbatoio di HEV in natura. Questi animali sono: cinghiali, cervi, mucche, pecore, capre, cammelli, cavalli, cani, gatti, topi e mangusta (Kabrane-Lazizi et al., 1999; Favorov et al., 2000; Arankalle et al., 2001; Matsuda et al., 2003; Takahashi et al., 2004; TEI et al., 2004; Nakamura et al., 2006; Saad et al., 2007). Consumo di carne cruda o poco cotta da cervi e cinghiali è stata identificata come una fonte di infezione di HEV negli esseri umani (Matsuda et al., 2003; Sonoda et al., 2004; Takahashi et al., 2004; Tamada et al., 2004; TEI et al., 2004; Li et al., 2005). La trasmissione di HEV attraverso il cervo è stata dimostrata in una serie di casi tra i pazienti che avevano mangiato carne poco cotta di cervo (Tei et al., 2004), 6-7 settimane prima. Le sequenze nucleotidiche di RNA HEV isolate da questi pazienti erano identiche alle sequenze nucleotidiche di HEV RNA isolate dalla carne di cervo che è stata mantenuta congelata per il consumo umano.

Inoltre, Takahashi et al (2004) aveva esaminato dei cinghiali che vivevano in una foresta giapponese per HEV RNA. Tre dei sette animali erano HEV RNA positivo. Da uno di questi cinghiali aveva isolato un intero genoma di HEV che era risultato per il 99,7% identico ad uno isolato precedente (Tei et

al., 2004) in un cervo selvatico catturato nella stessa foresta ed a quello di quattro pazienti che avevano contratto l'HEV dopo aver mangiato carne cruda di cervo rinvenuti nella stessa area. Questi risultati evidenziano una trasmissione intra-specie di HEV tra i cinghiali e cervi e che entrambi gli animali possono servire come un serbatoio per l'infezione umana. Risultati simili sono stati mostrati anche da Li et al. (2005) che hanno segnalato un caso di epatite di due pazienti che avevano dichiarato di aver mangiato carne di cinghiale. Ancora una volta, questi risultati forniscono la prova diretta per la trasmissione zoonotica di origine alimentare dell'HEV da un cinghiale agli esseri umani.

Trasmissione ematica

Trasmissione indirette che sono un potenziale rischio di infezione sono le trasfusioni ematiche segnalate da molti studi in tutto il mondo. Questi studi evidenziano: un'alta prevalenza di anti-IgG HEV fra i donatori volontari di sangue nei paesi industrializzati, che indica una passata infezione subclinica (Dawson et al, 1992); rilevamento di RNA virale in un numero significativamente più grande nei pazienti multi-trasfusi rispetto ai controlli (Khuroo et al., 2004); identificazione dei soggetti viremici fra i donatori di sangue senza sintomi ma con elevati livelli di ALT (Fukuda et al., 2004); la dimostrazione di infezione subclinica in corso di HEV nello 0.1–3% dei donatori di sangue (Gotanda et al., 2007) e l'indicazione di un'infezione di HEV significativamente più alta tra i pazienti con emodialisi cronica (Lee et al., 2005).

Trasmissione Parenterale

Sebbene la trasmissione da madre a figlio tramite la via parenterale è considerata di importanza minore come via di trasmissione di HEV in paesi in via di sviluppo, sono stati segnalati numerosi casi documentati verificatisi in India (Khuroo et al., 1995; Irshad, 1997; Kumar et al., 2001, 2004; Singh et al., 2003). In uno studio in India (Kumar et al., 2001), 469 donne incinte sono state testate per la ricerca dell'RNA virale. Di queste, 28(30%) erano HEV RNA positivo. Dodici di queste 28 donne sintomatiche avevano sviluppato la malattia epatica acuta e due morirono. Le restanti 16 donne presentavano una lieve malattia sintomatica ma con recupero completo. I 26 bambini nati da madri positive HEV RNA, 26 (100%) svilupparono una forma acuta, ed in corso di infezione clinica erano HEV RNA positivi.

Controllo e Prevenzione

Ci sono almeno tre principali approcci al controllo dell'infezione da HEV. Si tratta di misure sanitarie, immunoprofilassi e misure di vaccinazione.

Misure Sanitarie

Dal momento che la principale modalità di trasmissione di HEV è per via oro-fecale, bisogna garantire l'integrità dell'approvvigionamento idrico, migliorare l'igiene personale, preparazione degli alimenti in maniera corretta ed evitare il consumo di carne e verdura cruda.

Immunoprofilassi

I primi studi di protezione individuale da un'infezione di HEV attraverso immunoprofilassi passiva non ebbero successo (Khuroo e Dar, 1992). Una singola dose di immunoglobuline di siero umano dal basso titolo non è riuscita a prevenire la trasmissione di HEV. In un altro studio (Schofield et al., 2000), gli anticorpi monoclonali di HEV erano mescolati con omologhe HEV in vitro e poi inoculati in Scimmie rhesus per determinare la loro capacità neutralizzante. Gli animali che ricevettero l'inoculo incubato con un monoclonale anti-HEV risultarono non infetti a differenza di tutti gli animali controllo che svilupparono l'epatite e siero convertirono (Schofield et al., 2003).

Questi risultati suggeriscono che sono efficaci contro l'HEV preparati di immunoglobuline. Gli anticorpi monoclonali simili a HEV sono stati prodotti e caratterizzati (Schofield et al., 2003; He et al., 2007). Al momento, questi monoclonali non sono commercialmente disponibili e non sono ancora stati testati sugli esseri umani. Tuttavia, è confortante sapere che è stata avviata la possibilità di utilizzare questi monoclonali per combattere le infezioni umane di HEV.

Vaccino

E' stato riconosciuto che la produzione di successo di un vaccino efficace di HEV è raggiungibile per l'esistenza di un solo sierotipo HEV. Questo dato ha incoraggiato gli studi preliminari di produzione di un vaccino sperimentale in diversi gruppi di ricerca che utilizzarono molti approcci scientifici riconosciuti per questo scopo. Tra loro c'erano HEV DNA ricombinante (He et al., 1997; Kamili et al., 2004; Deshmukh et al., 2007); Particelle di epatite E Virus DOI

10.1002/jmv (Niikura et al, 2002; Li et al., 2004); e proteine ricombinanti dell'HEV (Purdy et al., 1993). Gli sforzi pionieristici e persistenti degli scienziati del National Institute of Allergy e malattie infettive, Bethesda, Maryland, USA, sotto la direzione del Dr. Robert H. Purcell, culminarono nella produzione di successo di un vaccino HEV (Emerson e Purcell, 2001; Zhang et al., 2001, 2002; Purcell et al., 2003). Il vaccino nelle fasi sperimentali è stato riscontrato essere molto sicuro e di avere un' efficacia del 95,5%. Il vaccino stesso ha il potenziale di ridurre in modo significativo la trasmissione HEV in tutto il mondo fornendo immunità di lunga durata ai destinatari, soprattutto nelle aree endemiche, con frequenti focolai HEV. Il vaccino proteggerà anche i viaggiatori d'affari, turisti, personale medico e militare, missionari e diplomatici che visitano queste aree. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per valutare la durata della protezione lungo termine e, costo efficacia, nonché la tollerabilità in donne incinte e bambini (Krawczynski, 2007).

MATERIALI E METODI

Area di studio

L'area geografica selezionata per questo studio ricade in prossimità del Parco Naturale Monti Aurunci (da 41 ° 28'02 "N, 13 ° 32'21" E; a 41 ° 21'41 "N, 13 ° 44'02" E) nei territori dei Comuni di Esperia, Pico, Pontecorvo, Ausonia (provincia di Frosinone) e Campodimele, Itri (provincia di Latina).

L'eterogeneo paesaggio del Parco dei Monti Aurunci è un'area (19,374 ha) dell'ecosistema mediterraneo che costituisce l'ambiente ideale per diverse specie animali: insetti lepidotteri (Bianconera italiana, Mnemosine); uccelli migratori (rigogolo, cuculo, rondini); uccelli rapaci diurni e notturni (falco pellegrino, poiana, civetta, il gufo, barbagianni, l'assiolo e l'alocco); uccelli notturni e diurni (usignolo, succiacapre, fagiano, ecc.); piccoli rettili (lucertola comune, ramarro, serpenti: biacco, cervone, vipera); Anfibi (salamandrine dagli occhiali, tritoni, rospi); Mammiferi (faina, gatto selvatico, moscardino, ghio, lepri, alcuni esemplari di lupo, cinghiale (*Sus scrofa*); martora (*Martes martes*); tasso (*Meles meles*); volpe (*Vulpes vulpes*), chiroteri, ecc).

Questo è solo un piccolo esempio della fauna presente nella zona.

Nei dintorni del Parco Naturale Monti Aurunci sono presenti numerosi insediamenti produttivi costituiti soprattutto da piccole aziende a carattere rurale, la cui pratica principale è l'allevamento di tipo estensivo di piccoli gruppi di ovini, bovini, equini, i cui pascoli e terreni, spesso, si sovrappongono alle aree di alimentazione del cinghiale. Ciò facilita il contatto tra animali domestici e selvatici. (Magnapera C., 2011)

Metodologia

Il territorio è stato suddiviso in 6 zone: n.1 Pico, n.2 Pontecorvo, n.3 Esperia, n.4 Ausonia, n.5 Itri, n.6 Campodimele;

Ogni squadra di caccia al cinghiale è stata identificata attraverso una lettera maiuscola, da A a I.

Ad ogni squadra è stata assegnata una zona: zona 1 squadra A, zona 2 squadre E-F-G, zona 3 squadre B-C-D, zona 4 squadra D, zona 5 squadra H, zona 6 squadra I.

I serbatoi da cui provengono i cinghiali, Parco Naturale Monte Aurunci e zona 52-Pontecorvo, sono stati rispettivamente identificati con S1 e S2 (fig. 7).

Percorso organizzativo e campionamento

Nel mese di settembre 2010 sono stati organizzati incontri di informazione e formazione con i rappresentanti ATC e i capicaccia operanti nella zona, per far conoscere l'importanza del progetto e le modalità di campionamento cui attenersi per mantenere il più possibile l'asepsi; durante gli incontri sono stati distribuiti:

- schede per la raccolta dei dati segnaletici degli animali (sesso, età, peso, luogo di cattura, ecc.) (fig. 8).
- materiali per la raccolta dei campioni.



Figura 7: Area di studio - Zona 1 = Comune di Pico, Zona 2 = Comune di Pontecorvo, Zona 3 = Comune di Esperia, Zona 4 = Comune di Ausonia, Zona 5 = Comune di Itri, Zona 6 = Comune di Campodimele S1 = Serbatoio 1 – Parco Nazionale Aurunci, S2 = Serbatoio 2 – Zona 52 Pontecorvo

Organi campionati

Dopo ogni campagna di caccia, dai cinghiali, è stato prelevato, in punti specifici di raccolta, in asepsi, un campione di parenchima epatico e un campione di siero di sangue da ciascun animale. I campioni di parenchima epatico ed i sieri sono stati trasportati, congelati, al Dipartimento di Patologia e Sanità Animale sez. Malattie Infettive della Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli.

**SCHEDA SEGNALETICA
DI ABBATTIMENTO INDIVIDUALE**

(Scheda n. : _____)

Data dell'abbattimento: 20.09.06 Comune: Catolice

Località dell'abbattimento: _____

Peso approssimativo in kg: 60

Altezza approssimativa al garrese in cm: 50

Sesso: M



Età dell'individuo:

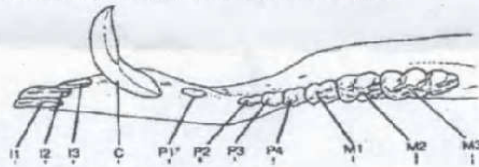
striato
 rosso
 adulto

Colore dominante:

marrone
 grigio
 nero
 altro _____

Dentatura:

indicare sul disegno con una X i denti presenti nell'esemplare abbattuto



Campioni prelevati:

sangue
 fegato
 tes. Muscolare
 linfonodi

Plurone

NOTE: _____

Figura 8: Scheda segnaletica di abbattimento individuale utilizzata per il campionamento

Campioni esaminati nella stagione venatoria 2010-2011

Sono stati esaminati in totale 228 cinghiali tra le province di Latina e Frosinone sui quali sono state eseguite le seguenti analisi:

- 228 campioni (siero), analisi sierologiche per la ricerca di anticorpi contro l'HEV;
- 164 campioni di parenchima epatico, analisi di biologia molecolare per la ricerca del virus dell'epatite E ; (Tab. 1)

CAMPIONI ESAMINATI (SUS SCROFA) STAGIONE VENATORIA 2010-2011		
	Sieri	Fegati
Analisi sierologiche	228	
Analisi Biologia Molecolare		164

Tabella 1: Campioni esaminati stagione venatoria 2010/2011

Il sesso degli animali abbattuti è stato equamente distribuito 50,8% (116) erano maschi e 46,4% (106) erano di sesso femminile (Tab. 2). Il sesso di 6 animali non era conosciuto.

Età					
	Giovane (< 1)	Subadulto (1-2)	Adulto (> 3)	Np	Totale
Maschio	9	44	63	-	116
Femmina	6	41	59	-	106
Np	-	-	-	6	6
Totale	15	85	122	6	228

Tabella 2. Sesso ed età dei 228 cinghiali abbattuti in prossimità del Parco Naturale Aurunci nel Lazio durante la stagione venatoria 2010-2011

Popolazione umana a rischio: campionamento e preparazione del campione

Sono stati raccolti, previo consenso informato, siero e sangue di 20 cacciatori che hanno partecipato alla caccia e alla raccolta del materiale per questo studio. I campioni di siero e sangue sono stati trasportati al Dipartimento di Patologia e Sanità Animale sez. Malattie Infettive della Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli. Tutti i campioni erano accompagnati da una scheda segnaletica dove era riportata età, sesso, e ruolo nella caccia (evisceratore, cacciatore semplice, veterinario).

Esami Sierologici

I sieri raccolti sono stati analizzati con un test specifico per la ricerca di anticorpi nei confronti dell'Epatite E.

Elisa Indiretta per l'identificazione di anticorpi verso l'Epatite E

MP Diagnostics HEV ELISA è un test immunoenzimatico indiretto, per campioni di siero umano, il test è stato segnalato avere una specificità complessiva del 98,8% (Hu et al., 2008). In precedenza, il test è stato utilizzato per rilevare anticorpi specifici HEV sia di origine umana che suina, confermando l'indipendenza della specie (Hu et al., 2008). Anche se questo test ELISA è specie indipendente, segnali di background possono variare tra le specie. Queste variazioni incidono notevolmente sul COV del produttore. Ecco perché nel nostro studio esamineremo le positività dei campioni sulla base dei Cut-off umano (0,25), suino (0,44), cinghiale (0,80) elaborati da Rujtes et al. (2009), ottenuti attraverso l'analisi di campioni veramente positivi e campioni veramente negativi. I pozzetti delle strisce di polistirene delle micropiastre sono rivestiti con tre antigeni ricombinanti dell'HEV che corrispondono alle regioni strutturali del Virus dell'epatite E. Siero umano o plasma, diluito nel buffer diluente, sono incubati in questi pozzetti coattati. Gli anticorpi specifici verso HEV, se presenti, si legheranno agli antigeni dell'HEV in fase solida. I pozzetti sono poi lavati accuratamente per rimuovere materiali non legato e IgG anti-umane marcate con perossidase horseradish sono aggiunte ai pozzetti. Questo anticorpo marcato verrà associato a qualsiasi complesso antigene-anticorpo precedentemente formato

mentre gli eccessi non associati vengono rimossi dal lavaggio. Una soluzione di substrato contenente 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) si aggiunge a ciascun pozzetto. La presenza di anticorpi specifici è indicata dalla presenza di un colore blu dopo l'aggiunta del substrato. La reazione termina con l'aggiunta di acido cloridrico (stop solution). L'intensità del colore viene misurata attraverso lo spettrofotometro a 450nm ed è proporzionale alla quantità di anticorpi presenti nel campione.

Esami di Biologia Molecolare

Estrazione dell'RNA

Dai campioni di fegato e dal siero umano è stato estratto l'RNA con metodica TRIzol (Invitrogen Cat. No. 15596-018) secondo la seguente metodica riportata dal produttore.

- a. Preparazione del campione: aggiungere 1 ml di TRIzol reagente per 50 – 100 mg di campione di tessuto ed omogeneizzare.
- b. Separazione di fase: incubare il campione omogeneizzato per 5 minuti a temperatura ambiente per consentire la completa dissociazione del complesso nucleoproteico. Aggiungere 0,2 ml di cloroformio per 1 ml di TRIzol utilizzato per omogeneizzazione. Richiudere la provetta in modo sicuro. Agitare il tubo vigorosamente a mano per 15 secondi. Incubare per 2-3 minuti a temperatura ambiente. Centrifugare il campione a $12.000 \times g$ per 15 minuti a 4°C. Nota: La miscela si separa in una fase di rosso

fenolcloroformio sul fondo, un'interfase e una fase acquosa incolore superiore. L'RNA rimane esclusivamente nella fase acquosa. La fase acquosa è superiore a $\sim 50\%$ del volume totale. Rimuovere la fase acquosa del campione ed inserirla in un'una nuova eppendorf.

- c. Precipitazione dell'RNA: aggiungere 0,5 ml di isopropanolo al 100% alla fase acquosa. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Centrifugare a $12.000 \times g$ per 10 minuti a 4°C Nota: l'RNA è spesso invisibile alla centrifugazione e forma un pellet di simil-gel sul lato inferiore dell'eppendorf.
- d. Lavaggio dell'RNA: eliminare il surnatante dall'eppendorf, lasciando solo il pellet di RNA. Lavare il pellet, con 1 ml di etanolo al 75%. Poi centrifugare l'eppendorf a $7500 \times g$ per 5 minuti a 4°C . Scartare il liquido di lavaggio. Lasciar asciugare all'aria il pellet di RNA.
- e. Risospensione dell'RNA: risospendere il sedimento di RNA in RNAsi free water. Incubare a bagnomaria o riscaldare il pellet risospeso a $55-60^{\circ}\text{C}$ per 10-15 minuti. Conservare l'RNA a -80°C .

RNA reverse transcription e prima reazione di PCR

La Retrotrascrizione dell'RNA e la prima PCR dei campioni è stata eseguita con il kit Superscript III One step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Cat. No. 10928-042) seguendo le istruzioni del produttore.

La mix di reazione (volume/15 μl) è stata preparata con questi quantitativi: 2X Reaction Mix 7,5 μl , Template RNA 10pg – 1 μg , Sense Primer 0.2 μM , Anti-sense 0.2 μM , RT/ Platinum Taq Mix 1 μl e RNAsi free water 3 μl .

E' stato programmato il termociclatore in modo che la sintesi del cDNA sia seguita immediatamente dalla PCR. Il ciclo termico prevede una pre-denaturazione dell'RNA e sintesi del cDNA con una prima fase di un ciclo: 45-55°C per 30 minuti e 94°C per 2 minuti; segue l'amplificazione del cDNA con 40 cicli: denaturazione a 94°C per 20 secondi, annealing a 48°C per 45 secondi ed estensione a 72° per 1 minuto e 30 secondi, il tutto seguito da una fase di estensione di un ciclo a 72°C per 5 minuti.

Per questa fase sono stati utilizzati dei primers degenerati: HEVORF2con-a1/HEVORF2con-s1 (Erker et all., 1999).

Nested PCR

Per la Nested PCR è stato utilizzato il kit della TaKaRa LA Taq (Takara Bio Inc. Cod. No. RR002M) seguendo le istruzioni del produttore. La mix di reazione è stata preparata con questi quantitativi: TaKaRa LA Taq 0,5 µl, 10x LA PCR Buffer (Mg²⁺ plus) 2,5 µl, dNTP mix 0,5 µl, Sense Primer 0,2 µM, Anti-sense 0,2 µM, Templato <1 µg.

Il ciclo termico prevedeva una fase iniziale di denaturazione a 94°C per 10 minuti seguita da 40 cicli di denaturazione a 94°C per 15 secondi, annealing a 52°C per 30 secondi e estensione a 72°C per 1 minuto, ed una fase finale di estensione a 72°C per 7 minuti.

Per questa prima fase sono stati utilizzati dei primers degenerati: HEVORF2con-a2/HEVORF2con-s2 (Erker et all., 1999).

Elettroforesi in gel di Agarosio ed escissione da Gel

Tutti i campioni ottenuti dalla Nested PCR sono stati fatti correre su gel di Agarosio all'1,5% e letti ai raggi UV. I Prodotti della Nested-PCR del peso atteso (145bp) sono stati escissi dal gel attraverso il kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Cat. No. 28704) seguendo le istruzioni del produttore.

Sequenziamento e analisi filogenetica

I nostri prodotti positivi, escissi dal gel sono stati inviati alla Primm srl Via Olgettina 58 - 20132 Milano (Italy) per il sequenziamento. Le sequenze ottenute sono state assemblate ed allineate con altre sequenze di HEV suina, umana e di cinghiale presenti in NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando il programma Clustalw2. Le sequenze di riferimento utilizzate sono: Hev/Wb/NL/2005-21 (EU526642.1), Hev/Sw/NL/2005-1026 (EU526644.1), Hev/Sw/Brazil (EF491206), Hev/Hu/NL/2002-2520 (AB385842.1), Hev/Hu/NL/2005-1169 (DQ200293.1), Hev/Hu/NL/20050756 (DQ200289.1), Hev/Hu/NL/2006-1917 (AB385852.1), Hev/Hu/NL/2005-0560 (DQ200287.1), Hev/Hu/NL/2005-5810 (AB385844.1), WbGER38 (FJ48525.1), WbGER77 (FJ48516.1), 5B/09/ITA (GQ223721.1), 22B/09/ITA (GQ223725.1), MO/9_3/06/IT (EF681107), Hev/Avian/USA (AY535004).

Analisi statistica

La sensibilità (Sn) e la specificità (Sp) dell'ELISA rispetto alla PCR (95% intervallo di confidenza) ed il highest performance index è stato calcolato mediante receiver operator characteristic (ROC) analysis curve (ROC analysis) per mezzo del software MedCalc software (Frank Schoonjans, V.7.2.1.0). I risultati sono stati espressi mediante una Curva ROC ed un grafico dot plot a differenti cut-off. L'analisi ROC permette di ottenere informazioni circa la Sn (proporzione di veri positivi diagnosticati dal test), la Sp (proporzione di veri negativi identificati dal test) (Thrusfield 2003), l'area sotto la curva ROC (AUC), che è indicativa dell'accuratezza del test ed il cut-off del test. Inoltre MedCalc fornisce un grafico a punti (dot graph), in cui le osservazioni appaiate sono riportate rispetto a due assi, che mostrano i risultati di test individuali in accordo con il valore della variabile indipendente di classificazione ed una linea orizzontale che corrisponde al valore di cut-off, che rappresenta il numero minimo di false classificazioni (positive e negative) del test. Questo valore può essere modificato per differenti motivi; in un test di screening, è opportuno scegliere un valore di cut-off con alta sensibilità ed alto valore predittivo negativo. Per confermare la malattia, i campioni positivi evidenziati dal test di screening devono essere nuovamente saggiati con un test diverso. Il secondo test necessita di un'alta specificità e di un alto valore predittivo positivo (Griner et al., 1981; Schoonjans, 2005; D.M. no. 651 27/08/1994; D.M. no.429 12/08/1997). La Sn ed Sp del test ELISA è stata calcolata con un intervallo di confidenza al 95% .

RISULTATI

Esami sierologici

I risultati ottenuti espressi in Unità di Assorbenza sono stati convertiti in positivi e negativi sulla base di tre cut-off: suino, umano e cinghiale (Rutjes et al, 2009). Come illustrato nella tabella 3, 166/228 (72%) sieri sono risultati positivi rispetto al COV umano. Per quanto riguarda il COV suino i risultati ottenuti sono stati di 146/228 (64%) sieri positivi. Mentre i risultati ottenuti utilizzando il COV del cinghiale sono stati di 96/228 (40%) sieri positivi. La differenza con il COV suino specifico può essere causata dalla natura emolitica dei sieri di cinghiale. La prevalenza della patologia indagata non è risultata diversa tra maschi e femmine di cinghiale, infatti, sulla base del test esatto di Fisher non vi è alcuna associazione significativa con il sesso degli animali positivi (tabella 3).

HEV ELISA	<i>N. positivi per sesso differente</i>				<i>N. positivi per classe di età</i>			
	N. Positivi/totali studiati	Maschi	Femmine	NK	<1	1-2	>2	NK
Cut off suino (0,44)	146/228	72	69	5	9	49	83	5
Cut off cinghiale (0,80)	92/228	43	46	3	4	33	52	3
Cut off umano (0,25)	166/228	76	84	6	10	64	86	6
<i>NK, not Known</i>								

Tabella 3: Distribuzione di HEV tra i cinghiali di età e sesso diverso (stagione venatoria 2010-2011) ottenuta utilizzando i cut off umano, suino e di cinghiale.

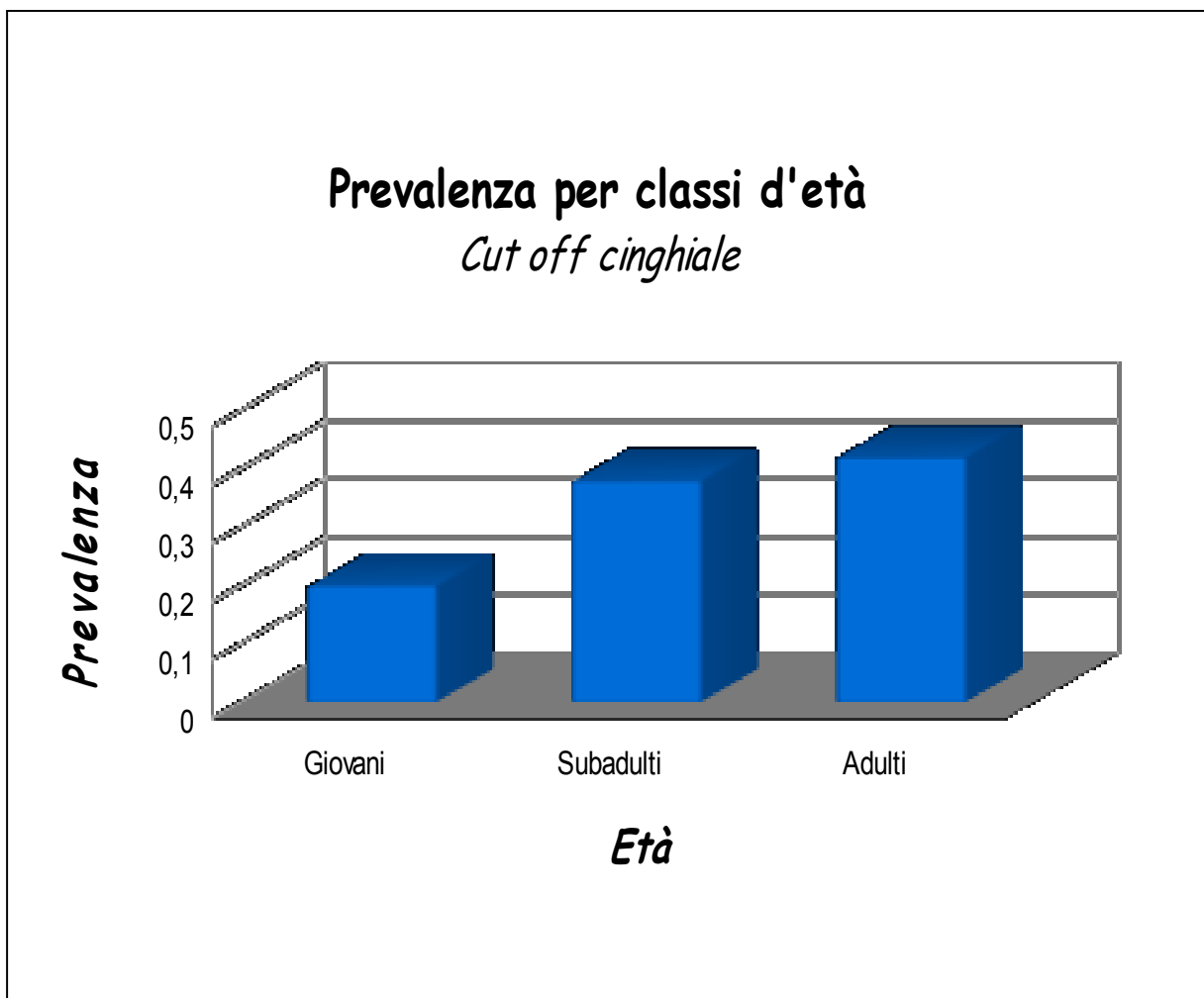


Grafico 1: Prevalenza di HEV in base alle tre classi di età

E' stata, quindi, calcolata, la prevalenza di HEV (soggetti ammalati/soggetti totali) rispetto alle classi d'età cioè: adulti (oltre 24 mesi); subadulti (da 13 a 24 mesi) e giovani (da 0 a 12 mesi).

La prevalenza per le tre classi di età, calcolata sulla base dei risultati ottenuti dal cut-off del cinghiale (grafico 1) aumentava con un trend significativo in funzione dell'età.

Esami di biologia molecolare

I risultati ottenuti dalla RT- Nested PCR effettuata su campioni di parenchima epatico hanno permesso di identificare 54 positivi su 164 soggetti esaminati (33%). I tassi di prevalenza determinati su tutta la popolazione in base alle diverse età e sesso sono riportati nella tabella 4. Nessuna differenza statisticamente significativa nella prevalenza di HEV è stata rilevata tra maschi e femmine.

HEV	<i>N. positivi per sesso differente</i>				<i>N. positivi per classe di età</i>			
	N. Positivi/totali studiati	Maschi	Femmine	NK	<1	1-2	>2	NK
RT-Nested PCR	54/164	25	27	2	8	12	32	3
<i>NK, not Known</i>								

Tabella 4: Distribuzione di HEV tra i cinghiali di età e sesso diverso (stagione venatoria 2010-2011) per RT-Nested PCR

Dall'analisi dei dati relativi alla prevalenza dell'infezione da HEV rispetto alle classi di età si evince un aumento della prevalenza con un trend significativo rispetto alle tre classi di età (grafico 2).

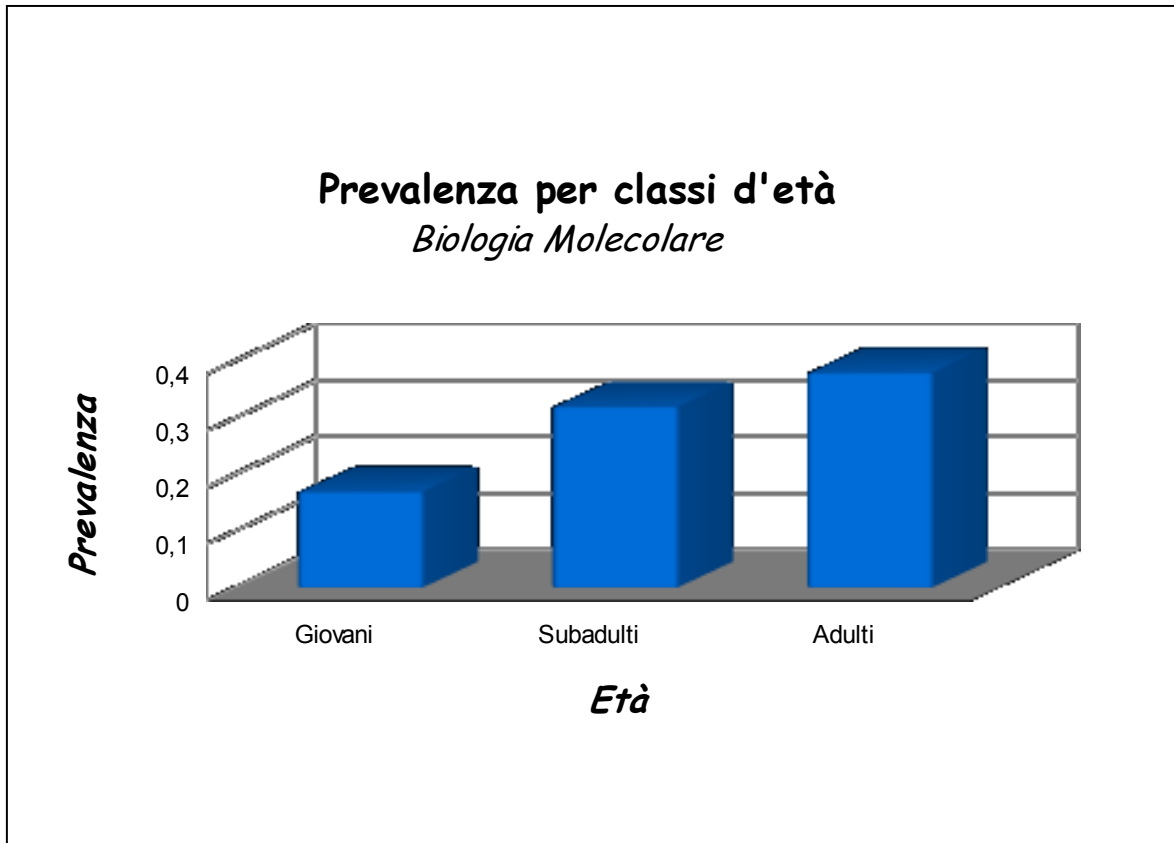


Grafico 2: Prevalenza di HEV in base alle tre classi di età

Risultati sierologici e di biologia molecolare nella popolazione umana a rischio

Per i campioni umani, il test ELISA (MPB) da noi utilizzato è stato segnalato avere una specificità complessiva del 98,8% (Hu et al., 2008). In precedenza, il test è stato utilizzato per rilevare anticorpi specifici HEV di origine umana e maiale (s. scrofa domestica), confermando l'indipendenza della specie (Hu et al., 2008). I risultati ottenuti hanno evidenziato una positività di 5/20 (25%)

campioni di siero. Inoltre i risultati della RT- Nested PCR effettuati sugli stessi sieri sono risultati positivi e confermano la positività della sierologia.

Analisi statistica

I risultati delle analisi sierologiche e di biologia molecolare sono stati elaborati mediante analisi della curva ROC. Come rilevabile in fig. 9, la Sn del test ELISA è risultata del 96,4% (C.I. 95%, 87,4 – 99,5%) e la Sp del 44,5% (C.I. 95%, 37,0 – 52,2%) per un cut-off di 0,393 OD con un PI di 140,9.

Il dot blot in cui le osservazioni appaiate sono riportate rispetto a due assi, che mostrano i risultati dell'analisi sierologica (ELISA) in accordo con il valore della variabile indipendente di classificazione (Nested RT-PCR) ed una linea orizzontale che corrisponde al valore di cut-off, che rappresenta il numero minimo di false classificazioni (positive e negative) del test è illustrato in fig 10; i campioni negativi alla biologia molecolare sono mostrati come PCR= 0, i campioni positivi alla biologia molecolare sono mostrati come PCR=1 e la linea orizzontale situata a 0,393 OD rappresenta la linea di demarcazione per Sn (96,4%) e Sp (44,5%) calcolata dall'analisi ROC.

I valori di Sn e Sp del test ELISA a diversi valori di cut-off ottenuti dall'analisi della curva ROC sono riportati nella tabella 5. Come illustrato, il cut-off di 0,393 OD fornisce il punteggio più alto combinando i valori di Sn e Sp.

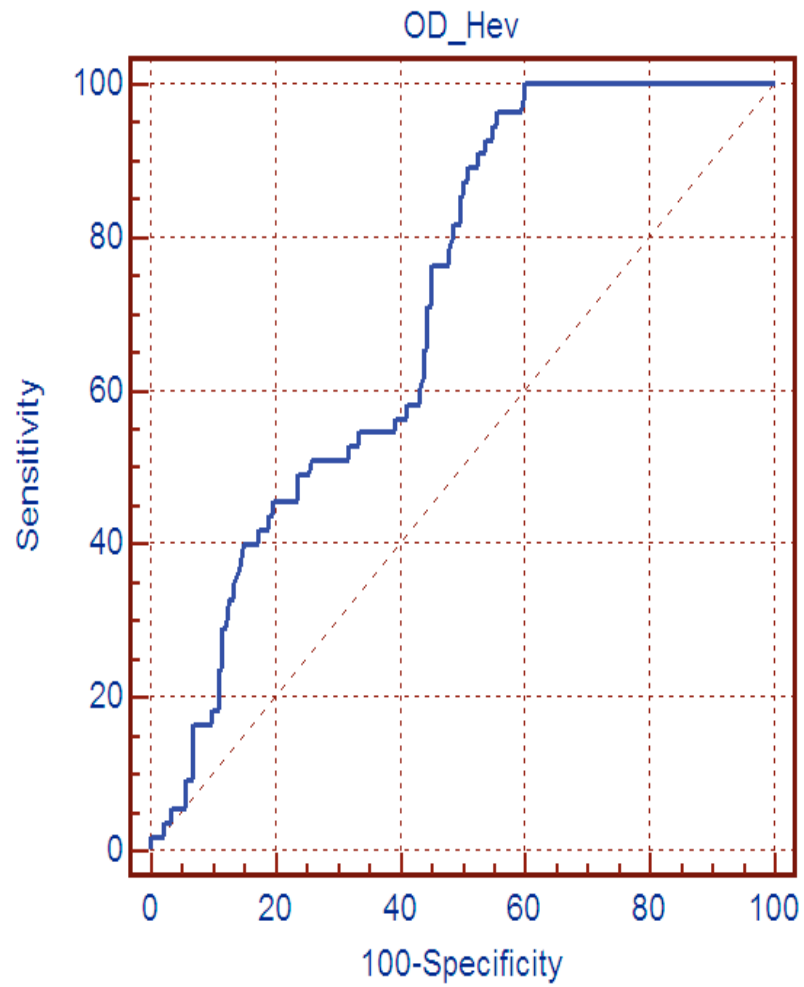


Figura 9: Risultati di sensibilità (%) e specificità (%) per vari valori di cut-off del test Elisa per rilevare anticorpi anti-HEV SP utilizzando l'RT-Nested PCR come variabile di classificazione.

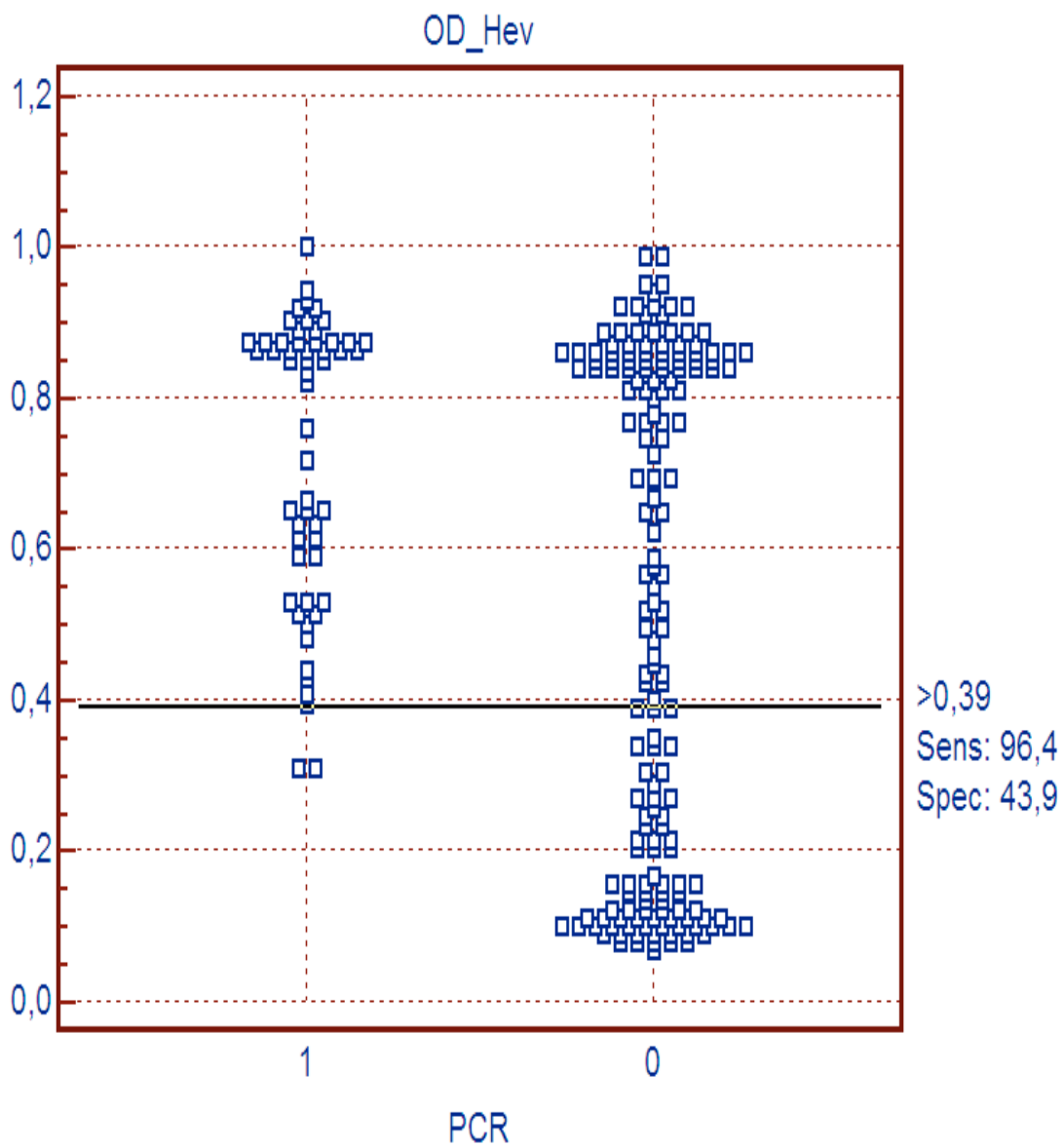


Figura 10: Diagramma Dot per il test ELISA relativo ai risultati del test di Biologia Molecolare. Ogni quadrato rappresenta il risultato di un solo campione. La linea orizzontale a 0,39 OD è il valore di cut-off determinato dall'analisi della curva ROC.

<i>Cut off</i>	<i>% Sn</i>	<i>95% C.I.</i>	<i>% Sp</i>	<i>95% C.I.</i>	<i>+LR</i>	<i>-LR</i>	<i>PI</i>
0,35	96,4	87,4- 99,5	42,8	35,3- 50,5	1,68	0,09	139,2
0,389	96,4	87,4- 99,5	43,4	35,9- 51,1	1,70	0,08	139,8
0,39	96,4	87,4- 99,5	43,9	36,4- 51,7	1,72	0,08	140,03
0,393	96,4	87,4- 99,5	44,5	37,0- 52,2	1,74	0,08	140,9
0,395	94,5	84,9- 98,8	44,5	37,0- 52,2	1,70	0,12	139
0,401	94,5	84,9- 98,8	45,1	37,5- 52,8	1,72	0,12	139,6

Tabella 5: Sensibilità (Sn) e specificità (Sp) del test ELISA a valori diversi di cut-off calcolati attraverso la curva ROC.

Sequenziamento ed Analisi filogenetica

La regione ORF2 (bp 148) amplificata dall' RT- Nested PCR è stata sequenziata per un totale di 16 campioni di cinghiale e 5 campioni umani. Purtroppo, non è stato possibile sequenziare tutti i campioni a causa della ridotta quantità di DNA in alcuni amplificati. Le sequenze ottenute sono state confrontate ed allineate (fig.11) con sequenze fornite dal database NCBI che rappresentano ceppi HEV umani e suini e di cinghiale ed un ceppo aviare in circolazione in tutto il mondo (fig.12) attraverso il programma ClustalW2. Le percentuali d'identificazione mostrate in tabella 6 mostrano una percentuale di identificazione che va dal 70-98% rispetto al ceppo Hev/Wb/NL/2005-21, sia per le sequenze dei cinghiali che per quelle umane. Percentuali d'identificazione significative (70-97%) si sono avute anche tra i nostri sequenziati ed i ceppi Hev/Hu/NL/2005-1169 e Hev/Hu/NL/2005-0756. In un solo caso si è ottenuta un'identificazione pari al 100% di un nostro ceppo

% d'IDENTIFICAZIONE

umano (Hu/Hev/Na1/IT2011) ed un altro ceppo umano Olandese.

ISOLATI																					
	Wb/Hev/Na01/IT2011	Wb/Hev/Na02/IT2011	Wb/Hev/Na03/IT2011	Wb/Hev/Na04/IT2011	Wb/Hev/Na05/IT2011	Wb/Hev/Na06/IT2011	Wb/Hev/Na07/IT2011	Wb/Hev/Na08/IT2011	Wb/Hev/Na09/IT2011	Wb/Hev/Na10/IT2011	Wb/Hev/Na11/IT2011	Wb/Hev/Na12/IT2011	Wb/Hev/Na13/IT2011	Wb/Hev/Na14/IT2011	Wb/Hev/Na15/IT2011	Wb/Hev/Na16/IT2011	Hu/Hev/Na01/IT2011	Hu/Hev/Na02/IT2011	Hu/Hev/Na03/IT2011	Hu/Hev/Na04/IT2011	Hu/Hev/Na05/IT2011
Hev/Wb/NL/2005-21	93	50	53	90	36	96	97	95	97	95	96	70	70	68	74	66	98	98	97	97	97
Hev/Sw/Brazil	88	93	92	85	91	89	89	90	86	86	87	88	87	90	85	90	84	87	86	90	89
Hev/Hu/NL/2002-2520	49	55	53	52	36	65	63	63	71	70	68	75	68	68	90	66	68	70	69	70	96
Hev/Hu/NL/2005-1169	94	56	53	58	35	95	64	94	96	94	69	94	68	92	74	96	94	97	96	96	96
Hev/Hu/NL/2005-0756	51	57	57	88	37	93	92	93	95	93	93	93	70	69	71	94	95	96	96	96	95
Hev/Hu/NL/2006-1917	48	56	53	58	36	66	64	64	72	71	95	75	90	68	74	66	67	70	69	71	97
Hev/Hu/NL/2005-1026	48	53	53	58	35	66	64	72	71	71	75	70	68	74	66	69	68	70	69	71	97
Hev/Hu/NL/2005-0560	48	54	46	97	39	62	59	70	66	64	70	64	63	68	57	64	62	65	66	66	92
WbGER38	52	55	53	91	35	93	91	93	95	93	93	93	90	92	90	95	95	96	96	96	95
Hev/Hu/NL/2005-5810	51	56	52	56	36	65	63	63	71	70	68	74	67	67	73	96	100	66	69	76	70
WbGER77	44	50	53	52	46	59	59	69	68	66	70	66	64	68	68	63	62	65	62	67	92
5B/09/ITA	94	56	46	92	46	74	97	90	82	90	91	90	81	89	86	72	96	92	91	91	92
22B/09/ITA	92	56	43	90	43	70	91	90	83	88	90	89	78	87	84	70	95	91	90	90	90
MO/9_3/06/ITA	64	64	47	62	62	79	79	79	80	80	80	83	80	79	78	75	82	79	79	80	82
Hev/Avian/USA	54	56	55	53	54	51	56	55	51	53	50	50	51	52	56	55	55	54	50	50	50

Tabella 6: Percentuali d'identificazione con ceppi presenti in banca dati ed usati come riferimento

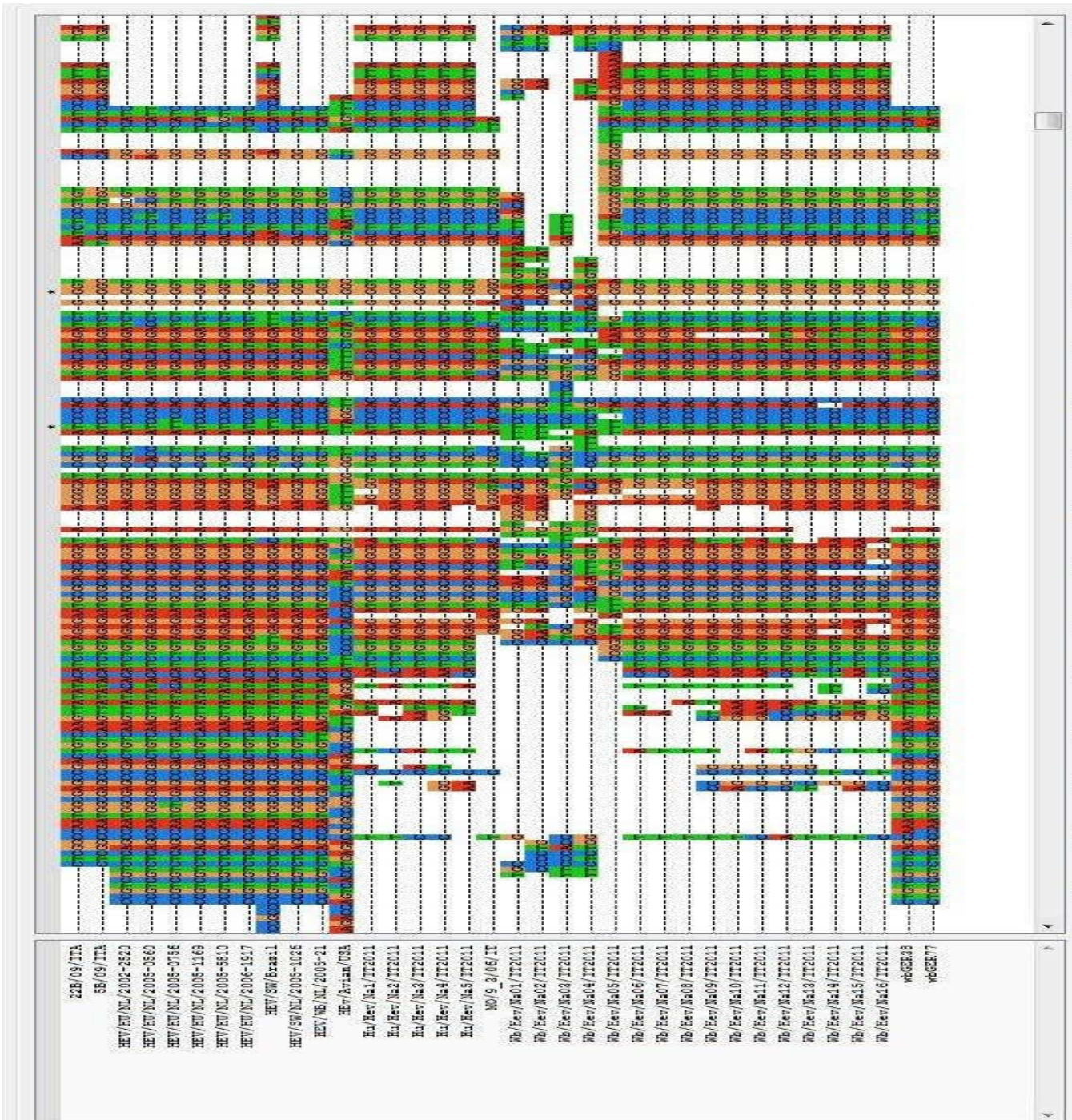


Figura 11: Programma di allineamento Clustal W2

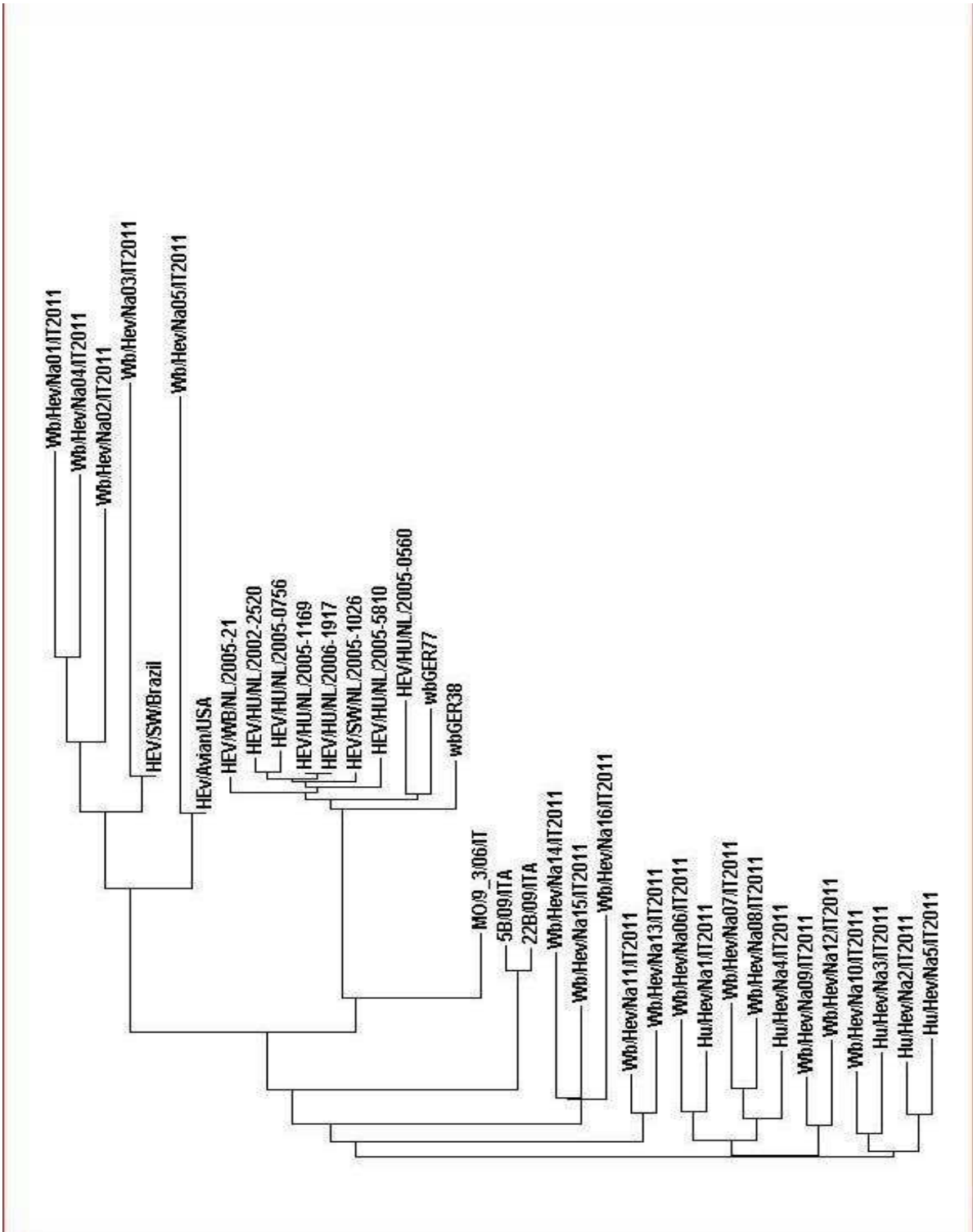


Figura 12: Albero filogenetico basato sulla sequenza nucleotidica 148bp del gene ORF2 dell'HEV

DISCUSSIONE

Il monitoraggio dello stato di salute della nostra fauna selvatica è, come ormai dimostrato dalle decennali iniziative ed esperienze del settore in Piemonte, Trentino, Toscana ed Emilia Romagna, un elemento fondamentale per una corretta gestione del patrimonio faunistico, degli ecosistemi naturali e non ultimo della salute umana. Questa iniziativa assume ancor più rilievo se si considera che è da individuarsi come un intervento pioniere all'interno del quadro della gestione faunistica dell'Italia Centrale. Tale situazione è ancora più rafforzata dal fatto che sul territorio provinciale sono presenti aree naturali protette notevolmente estese che presentano come elementi fondanti dei loro compiti istituzionali la gestione e la ricostituzione dell'antico patrimonio faunistico dell'Appennino Centrale.

Un corretto approccio a tale gestione presuppone una definizione di come si debba concepire “lo stato di salute” degli animali selvatici immessi a scopo venatorio o di quelli che vivono in libertà negli ambienti naturali della Provincia; appare sufficientemente ovvio che non si possa e debba considerare lo stato di salute degli animali selvatici in libertà alla stregua di quello degli animali zootecnici o di affezione.

Negli animali selvatici, infatti, lo stato di salute non è facilmente osservabile né sufficientemente definibile con l'esame clinico, sia pur con un'attenta osservazione a distanza; d'altra parte il singolo soggetto ammalato non assume grande importanza sotto il profilo pratico per l'economia dell'ambiente, a meno che esso mostri evidenti segni di malattia contagiosa e diffusiva, che per altro è doveroso confermare con l'esame necroscopico.

Questo studio rappresenta la prima relazione sulla presenza di HEV in cinghiali nell'Italia Centrale e conferma che l'Epatite E circola attivamente

nelle popolazioni del cinghiale europeo (s. scrofa scrofa) (de Deus et al, 2007) e non solo nella sottospecie dei lignaggi asiatici (s. scrofa leucomysta e s. scrofa riukiuanus) (Kitajima et al., 2004; Sonoda et al., 2004; Masuda et al., 2005). I nostri risultati confermano inoltre che i cinghiali, insieme con i maiali domestici, possono rappresentare un importante serbatoio animale di infezione.

Prime testimonianze di ungulati selvatici come serbatoi di HEV per gli esseri umani sono stati segnalati come conseguenza di alcuni casi negli esseri umani in Giappone, dopo il consumo di carne di cervo crudo o poco cotto e carne di cinghiale (Li et al., 2005; Tei et al., 2003). Pertanto, la rilevanza del cinghiale come un potenziale serbatoio di HEV sia per gli animali domestici che per gli esseri umani è fonte di crescente preoccupazione. Inoltre, analisi sierologiche hanno evidenziato alti tassi di siero-prevalenza nel maiale domestico in Spagna (Seminati et al., 2008). Quindi, la possibilità del cinghiale, di venire esposto a contagio da HEV è piuttosto elevata, come segnalato peraltro per altre malattie, condivise tra Suini domestici e selvatici (Ruiz-Fons et al., 2008). Studi condotti sull'infezione da HEV nei cinghiali ad oggi sono limitati al Giappone, Australia, Olanda, Germania, Spagna ed un unico lavoro condotto in Italia (Chandler et al., 1999; Martelli et al., 2008; Sonoda et al., 2004; Takahashi et al., 2004; Rutjes et al., 2009; de Deus et al., 2007b; Schielke et al., 2009).

La siero prevalenza da noi riscontrata utilizzando il cut-off indicato dal produttore del test ELISA utilizzato è risultata del 64%, quindi significativamente più elevata rispetto a quella segnalata per suini selvatici in Australia (25,0%), per cinghiali in Giappone (9.0–27.1%) (Chandler et al., 1999; Michitaka et al., 2007; Sonoda et al., 2004), per i cinghiali in Spagna (40,0%) e in Olanda (28%)(Rutjes et al., 2009; de Deus et al., 2007b).

Questa differenza potrebbe essere dovuta a più fattori: quali un campionamento più numeroso nel nostro studio (228 soggetti) rispetto agli altri studi in letteratura o alle diverse caratteristiche dei tests ELISA, infatti è da considerare che il test utilizzato nel presente studio permette la rilevazione di tutte e tre le classi immunoglobuliniche (IgG, IgM ed IgA) (Hu et al., 2008). I nostri dati hanno evidenziato che la prevalenza dell'infezione da HEV non è risultata diversa tra maschi e femmine di cinghiale, infatti, sulla base del test esatto di Fisher non vi era alcuna associazione significativa con il sesso degli animali positivi. La prevalenza rispetto alle tre classi di età, invece, aumentava con un trend significativo in funzione dell'età. Questo dato, differisce da quanto precedentemente rilevato da altri autori (Di Bartolo et al, 2011; De Deus et al, 2007b) e può essere riconducibile al comportamento sociale della specie. I cinghiali, infatti, avendo un comportamento sociale matriarcale, formato da più nuclei familiari, ovvero dalle femmine con i loro piccoli e talvolta, con i nati dell'anno precedente, vivono all'interno del gruppo materno fino ad un anno di età, dopodiché durante i periodi più critici, quando il cibo scarseggia, si ha una fase di dispersione che porta ad un aumento dei contatti con altri conspecifici e all'utilizzo di nuove porzioni di territorio. A questa dispersione dei soggetti sul territorio è associata una condizione di stress con conseguente abbassamento delle difese immunitarie e conseguente aumento delle possibilità di trasmissione orizzontale di questa patologia.

Il risultato delle analisi molecolari per la ricerca di HEV RNA, seppur eseguite su di un numero minore di campioni (164) rispetto alle analisi sierologiche, ha evidenziato una prevalenza del 33%.

Questa prevalenza è generalmente superiore a quella riportata in altri studi molecolari condotti nel cinghiale, infatti, Sonoda et al (2004) hanno osservato

una prevalenza del 2,4% in un campione di 41 animali in uno studio condotto in Giappone, mentre Nishizawa et al (2005) hanno rilevato una prevalenza del 2,3% in 89 cinghiali nello stesso territorio, infine, Martelli et al (2008), nel corso dell'unica indagine precedentemente condotta nella popolazione di cinghiali selvatici in Italia, hanno riscontrato una prevalenza del 25% in 88 campioni di cinghiali in Emilia Romagna. D'altra parte, Kitajima et al (2004) in uno studio condotto in Giappone hanno riportato una prevalenza superiore (42,8%), ma è da rilevare che questo studio è stato condotto su di un campione estremamente ridotto di animali (sette).

La maggiore prevalenza di infezione da HEV rilevata nel nostro studio, potrebbe indicare una superiore circolazione di HEV nella popolazione oggetto di indagine, anche se differenze dovute al tipo di campione ed alla metodica PCR utilizzata non possono essere escluse.

Inoltre, le differenze nella prevalenza dell'infezione da HEV potrebbero essere anche legate ad una diversa infettività dei ceppi HEV o a differenze nella biologia ed ecologia delle popolazioni di cinghiale considerate (genetica degli animali, densità della popolazione, caratteristiche ambientali, ecc).

Anche in corso di analisi molecolari, mentre non è stata rilevata associazione tra prevalenza di infezione e sesso, si è invece rilevato un andamento crescente della prevalenza nelle tre classi di età considerate, questo ad avvalorare i risultati già ottenuti nella sierologia. Questi dati sono in contrasto con i risultati della maggior parte degli studi condotti su specie suina domestica, che indicano che l'infezione principalmente si verifica negli animali di 3-5 mesi di età, ha una durata breve ed è generalmente auto limitante (Meng et al., 1997, 1998).

Queste differenze potrebbero suggerire che l'infezione nei cinghiali può diventare cronica, eventualmente sostenuta da un'immunità non

completamente protettiva, o che c'è una continua re-infezione favorita da un'immunità di breve durata. Questi risultati, insieme con il fatto che i cinghiali esaminati sono apparsi clinicamente sani, ci lascia sollevare l'ipotesi che anche nei cinghiali, come nei maiali domestici (Meng et al., 1998), l'infezione da HEV possa decorrere in maniera sub-clinica. Ulteriori studi saranno necessari per valutare meglio gli effetti dinamici, clinici e patologici dell'infezione nei cinghiali.

Nel presente studio, l'analisi della curva ROC è stata utilizzata per valutare il test ELISA per la ricerca di anticorpi anti-HEV, determinare il cut-off che offra il più alto indice di prestazioni e di compararne sensibilità e specificità con la biologia molecolare. La curva ROC è utilizzata per confrontare la complessa capacità discriminante di un test diagnostico in gruppi di animali al di sopra del range di tutti i possibili valori di cut-off (Fosgate et al., 2003). Curve ROC possono anche essere utilizzate per confrontare prestazioni di diagnostica di laboratorio o di due o più test diagnostici (Griner et al., 1981). Un test con nessuna capacità discriminante avrebbe un'area sotto la curva di 0,50. Un test perfetto avrebbe un'area di 1.0. Questo indicherebbe che c'è una separazione completa dei risultati dei test per gli animali infetti e non infetti (Fosgate et al., 2003). Il valore ottimale di cut-off per il test ELISA che offre il più alto 'indice di prestazioni' (somma di Sn e Sp) è stato determinato dall'analisi della curva ROC. Il risultato dai noi ottenuto per la Sn del test ELISA è risultata essere di 96,4% (C.I. 95%, 87,4 – 99,5%) con un valore di Sp pari a 44,5% (C.I. 95%, 37,0 – 52,2%) per un cut-off di 0,393 OD, con un PI di 140,9. Tale valore di cut-off è significativamente differente dai valori di cut-off calcolati da Rutjes et al (2009) per il cinghiale, ma simile al valore di cut-off riportato per il maiale dalla ditta produttrice, seppur con valori di Sn ed Sp profondamente diversi.

I nostri risultati hanno dimostrato che su 228 campioni di siero esaminati con test ELISA, 166 (72%) sono risultati positivi per anticorpi anti HEV, mentre i risultati della biologia molecolare hanno mostrato che solo il 33% (54/164) dei cinghiali hanno presentato HEV RNA nel loro fegato. Questa discrepanza tra sierologia e biologia molecolare non indica che il test ELISA è migliore o peggiore della biologia molecolare. La sierologia è una misura di esposizione storica, che può o non può essere correlata strettamente alla carica infettante al momento del campionamento. La sierologia aiuta a identificare la popolazione infetta, ma non è utile per determinare lo stato di infezione di singoli animali. Tuttavia, la negatività di alcuni campioni alla biologia molecolare per la ricerca dell'HEV RNA in una popolazione o un individuo, non garantisce che questi non siano dei portatori. Infatti come dimostrato in uno studio condotto da Di Bartolo et al. (2011) risultati differenti possono essere ottenuti dalle analisi molecolari condotte su differenti matrici tissutali ottenute dai medesimi soggetti.

Pertanto, nel nostro studio, i maggiori risultati sierologici ottenuti, considerati apparentemente come “falsi positivi” rispetto alla bassa positività della biologia molecolare, in realtà potrebbero rappresentare la reale distribuzione delle infezioni non rilevate dal test RT-Nested PCR.

Una delle finalità del presente studio è stata di valutare la prevalenza dell'infezione da HEV nella popolazione umana a rischio. Pertanto sono stati esaminati, previo consenso informato, sia mediante sierologia che attraverso tests di biologia molecolare 20 campioni di siero e sangue umano appartenenti a cacciatori ed evisceratori che hanno collaborato allo studio. La siero prevalenza ottenuta è risultata del 25%, tale dato è stato confermato successivamente anche dalla biologia molecolare.

La regione ORF2 (bp 148) amplificata dalla RT- Nested PCR è stata

sequenziata in un totale di 16 campioni di cinghiale e 5 campioni umani.

L'analisi filogenetica dei ceppi di HEV identificati in questo studio ha dimostrato che i ceppi identificati nel cinghiale ed i ceppi identificati nell'uomo sono geneticamente vicini sia a ceppi umani che a ceppi suini precedentemente segnalati in Europa ma considerevolmente differenti da ceppi di suini circolanti in Brasile. Tale dato è coerente con quanto precedentemente dimostrato in altri studi, che hanno dimostrato che ceppi HEV umani e suini provenienti da una stessa zona geografica (Europa) sono più spesso strettamente correlati rispetto a ceppi con una stessa origine identificati in aree distanti (Van Der Poel et al., 2001). Un dato interessante è stato il riscontro di una elevata similitudine riscontrata tra i ceppi di HEV di cinghiale riscontrati in questo studio e ceppi di HEV identificati in *Sus scrofa* var. *domesticus*, che potrebbero essere legati alla circolazione inter-specie di HEV. Alcune testimonianze di trasmissione inter-specie di HEV si sono accumulate negli ultimi 10 anni. Sonoda et al (2004) ha riferito che sequenze di HEV di cinghiali giapponesi erano correlate con quelli provenienti da esseri umani e maiali domestici, mostrando l' 82.9–93.9% d'identità. Studi successivi condotti nello stesso paese hanno mostrato il 99,7% di similitudine di interi genomi di HEV tra isolati in cinghiali e cervi, suggerendo pertanto la possibilità di trasmissione inter-specie (Takahashi et al., 2004). È anche noto che il HEV del maiale domestico è in grado di infettare altre specie, quali lo scimpanzè (*Pan troglodytes*) e la scimmia rhesus (*Macaca mulatta*) (Meng et al., 1998) e ciò fortemente sostiene ulteriormente il potenziale di trasmissione interspecifica del virus. Ed è proprio questo potenziale di trasmissione interspecifica che ovviamente può determinare coinvolgimento dell'uomo, potenziale peraltro dimostrato in uno studio di Schielke et al., (2009) in cui un elevato grado di omologia tra una sequenza nucleotidica di HEV cinghiale ed

una sequenza umana suggeriva un collegamento diretto tra entrambi. Questi risultati, insieme con l'osservazione che infezione da HEV può essere sub-clinica e può essere presente anche negli animali in un'età in cui comunemente vengono cacciati per essere scopi alimentari, sono di preoccupazione per il possibile rischio di trasmissione di HEV agli esseri umani. A tale riguardo, la presenza del 33% di campioni di fegato positivi ad HEV implica che questi organi di cinghiale possano rappresentare un rischio per la trasmissione zoonotica. Anche se non sono stati ottenuti dati circa la contaminazione di altri organi o carne, non può essere completamente escluso che durante il processo di macellazione possa esistere una cross-contaminazione con altre parti commestibili della carcassa. In sintesi, i risultati indicano che i cinghiali possono essere un importante serbatoio per HEV in Italia, in possesso di un rischio significativo per l'infezione di HEV per gli esseri umani. Questo rischio è evidente per i cacciatori, che possono essere infettati durante la dissezione dei cinghiali.

CONCLUSIONI

Il nostro studio ha evidenziato che i Cinghiali possono essere portatori di agenti patogeni quali l'Epatite E. Questo ha due implicazioni. In primo luogo, come agenti che possono contaminare la stessa carcassa, ed è questo l'aspetto principale che deve essere considerato dai cacciatori, che manipolano le carcasse in condizioni igieniche minime. Inoltre, la manipolazione e la preparazione domestica di carne di cinghiale cruda prima del trattamento di cottura, può portare alla contaminazione crociata degli altri alimenti. Anche l'abitudine locale di utilizzare carne di maiale e cinghiale per la produzione domestica di salsicce stagionate può aumentare il rischio di contaminazione. Alla luce di questo, è consigliabile l'uso di carne di cinghiale ben cotta.

In secondo luogo, l'abitudine di allevamento dei suini domestici all'aperto, nelle zone a stretto contatto con i cinghiali, può aumentare il rischio di trasmissione di questi patogeni tra i due gruppi.

BIBLIOGRAFIA

- Aggarwal R., Krawczynski K., 2000. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 9–20.
- Aggarwal R, Jameel S. Hepatitis E *Hepatology.* 2011 Sep 19.
- Arankalle VA, Joshi MV, Kulkarni AM, Gandhe SS, Chobe LP, Rautmare SS, Mishra AC, Padbidri VS. 2001. Prevalence of antihepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hep* 8:223–227
- Banks, M., Bendall, R., Grierson, S., Heath, G., Mitchell, J., Dalton, 2004a. Human and porcine Hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 953–955.
- Apollonio M., Randi E., Toso S., (1988) – The sistematics of wild boar (*Sus scrofa* L.). In Italy. *Boll. Zool.*,3:213-221.
- Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, Djumalieva DL, Karas FR. 1990. Brief report: Experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol* 32:58–59.
- Banks, M., Heath, G.S., Grierson, S.S., King, D.P., Gresham, A., Girones, R., Widen, F., Harrison, T.J., 2004b. Evidence for the presence of Hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 154, 223–227.
- Bile K, Isse A, Mohamud O, Allebeck P, Nilsson L, Norder H, Mushahwar IK, Magnus LO. 1994. Contrasting roles of rivers and wells as sources of drinking water on attack and fatality rates in a hepatitis E epidemic in Somalia. *Am J Tropic Med Hyg* 51:466– 474.

- Birkenmeyer L, Mushahwar IK. 1991. DNA probe amplification methods. *J Virol Methods* 35:117–126.
- Boitani L., Lovari S., Vigna Taglianti I A. (2003) – Fauna d'Italia, Mammalia III, Carnivora, Artiodactyla. Calderini Bologna
- Boitani L., Mattei L. 1991 - Determinazione dell'età del cinghiale in base alla formula dentaria. *Atti II° Conv. Naz. Biol. Selv. Suppl. Ric. Biol. XIX*: 789-793.
- Buti, M., Clemente-Casares, P., Jordi, R., Formiga-Cruz, M., Schaper, M., Valdes, A., Rodriguez-Frias, F., Esteban, R., Girones, R., 2004. Sporadic cases of acute autochthonous Hepatitis E in Spain. *J. Hepatol.* 41, 126–131.
- Caprioli, A., Martelli, F., Ostanello, F., Di Bartolo, I., Ruggeri, F., Del Chiaro, L., Tolari, F. Detection of Hepatitis E Virus (HEV) in Italian pig herds. *Vet. Rec.* 2007 Sep 22;161(12):422-3
- Caudill JD, Malik IA, Tsarev SA. 1994. Evidence for human hepatitis E virus (HEV) infection without acute antibody response. *Am J Trop Med Hyg* 51:201.
- Chandler, J.D., Riddell, M.A., Li, F., Love, R.J., Anderson, D.A., 1999. Serological evidence for swine Hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet. Microbiol.* 68, 95–105
- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jordi, R., Martin, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 448–454.
- Clayson ET, Myint KS, Snitbhan R, Vaughn DW, Innis BL, Chan L, Cheung P, Shretha MP. 1995. Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J Infect Dis* 172:927– 933.

- Coursaget P, Depril N, Buisson Y, Molinie C, Roue R. 1994. Hepatitis type E in a French population: Detection of anti-HEV by a synthetic peptide-based enzyme-linked immuno-sorbent assay. *Res Virol* 145:51–57.
- Dardaillon M.,(1984) - Le Sanglier et le milieu Camarguais: dynamique co-adaptative. These de Doctorat de 3eme Cycle, Universite Strasbourg, 161 pp.
- Dawson GJ, Chau KH, Cabal CM, Yarbough PO, Reyes GR, Mushahwar IK. 1992. Solid-phase enzyme-linked immunoassay for hepatitis E virus utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. *J Virol Methods* 38:175–186.
- Decreto del Ministero della Sanita` 12 agosto 1997. no. 429. Regolamento recante modificazioni al DM 2 luglio 1992 no. 453 cosi` come modificato dal Decreto ministeriale 31 maggio 1995 no. 292 concernente il piano nazionale per la eradicazione della brucellosi negli allevamenti ovini e caprini, al decreto ministeriale 27 agosto 1994, no. 651 concernente il piano nazionale per la eradicazione e della brucellosi negli allevamenti bovini e al Decreto Ministeriale 2 maggio 1996, no. 358, concernente il piano nazionale di eradicazione della leucosi bovina enzootica negli allevamenti bovini e bufalini. G.U.R.I. no. 292 del 12 agosto 1997.
- Decreto Ministeriale 27 agosto 1994, no. 651. Regolamento concernente il Piano Nazionale per la eradicazione della Brucellosi negli allevamenti bovini. G.U.R.I. 26.11.1994, no. 277
- de Deus, N., Seminati, C., Pina, S., Mateu, E., Martin, M., Segales, J., 2007. 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, 105–114.

- de Deus, N., Peralta, B., Pina, S., Allepuz, A., Mateu, E., Vidal, D., Ruiz-Fons, F., Marti´n, M., Gorta´zar, C., Segales, J., 2007b. Prevalence of Hepatitis E virus in European Wild boars. In: Proc. Second European Wildlife Disease Association Student Workshop, 26–29 April, pp. 24–25.
- Deshmukh TM, Lole KS, Tripathy AS, Arankalle VA. 2007. Immunogenicity of candidate hepatitis E virus DNA vaccine expressing complete and truncated ORF2 in mice. *Vaccine* 25:4350–4360.
- Ilaria Di Bartolo , Eleonora Ponterio , Laura Castellini , Fabio Ostanello ,Franco Maria Ruggeri Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy, *Veterinary Microbiology* 149 (2011) 330–338
- Drobeniuc, J., Favorov, M.O., Shapiro, C.N., Bell, B.P., Mast, E.E., Dadu, A., Culver, D., Iarovoi, P., Robertson, B.H., Margolis, H.S., 2001. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J. Infect. Dis.* 184, 1594–1597.
- Emerson, S.U., Purcell, R.H., 2003. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 13, 145–154.
- Emerson SU, Anderson D, Arankalle A, Meng XJ, Purdy M, Schlauder GG, Tsarev SA. 2004a. Virus taxonomy VIIIth report of the ICTV. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Hepevirus*. London: Elsevier/Academic Press. pp 851–853.

- Erker, J.C., Desai, S.M., Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Mushahwar, I.K., 1999. A Hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J. Gen. Virol.* 80, 681–690.
- Favorov MO, Khudyakov YE, Fields HA, Khudyakov NS, Padhye N, Alter MJ, Mast E, Polish L, Yashina TL, Yarasheva DM, et al. 1994. Enzyme immunoassay for the detection of antibody to hepatitis E virus based on synthetic peptides. *J Virol Methods* 46:237–250.
- Favorov MO, Khudyakov YE, Mast EE, Yeshina TL, Shapiro CN, Khudyakova NS, Jue DL, Onischenko GG, Margolis HS, Fields HA. 1996. IgM and IgG antibodies to hepatitis E virus (HEV) detected by an enzyme immunoassay based on an HEV- specific artificial recombinant mosaic protein. *J Med Virol* 50:50–58.
- Favorov MO, Kosoy MY, Tsarev SA, Childs JE, Margolis HS. 2000. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J Infect Dis* 181:449–455.
- Fernandez-Barredo, S., Galiana, C., Garcia, A., Vega, S., Gomez, M.T., Perez-Gracia, M.T., 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, 462–465.
- Fosgate, G.T., Adesiyun, A.A., Hird, D.W., Johnson, W.O., Hietala, S.K., Schurig, G.G., Ryan, J., 2003. Estimation of receiver-operating characteristic curves to determine accuracy of a competitive enzyme linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of *Brucella* infection

- in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle. *Am. J. Vet. Res.* 64, 57–64.
- Fukuda S, Sunaga J, Saito N, Fujimura K, Itoh Y, Sasaki M, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. 2004. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among Japanese blood donors: Identification of three blood donors infected with a genotype 3 hepatitis E virus. *J Med Virol* 73:554–561.
 - Genov P. V., G. Massei. 1991- Valutazione dell'usura dei molari come metodo di determinazione dell'eta in diverse popolazioni di cinghiale. In: M. Spagnesi e S. Toso (eds.), *Atti del II Convegno Nazionale dei Biologi della selvaggina*, Suppl. *Ric. Biol. Selvaggina*, XIX: 697-698. gestione, prelievo venatorio e potenzialita delle popolazioni di ungulati in Italia. *Biol. Cons. Fauna* 109.
 - Griner, P.F., Mayewski, R.J., Mushlin, A.I., Greenland, P., 1981. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications. *Ann. Intern. Med.* 94, 557–592.
 - Gotanda Y, Iwata A, Ohnuma H, Yoshikawa A, Mizoguchi H, Endo K, Okamoto H. 2007. Ongoing subclinical infection of hepatitis E virus among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan. *J Med Virol* 79:734–742.
 - Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, Read DH, Meng XJ. 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* 82:2449–2462.

- He J, Hoffman SL, Hayes CG. 1997. DNA inoculation with a plasmid vector carrying the hepatitis E viral structural protein gene induces immune response in mice. *Vaccine* 15:357–362.
- He J, Kuschner RA, Dewar V, Voet P, Asher LV, Vaughn DW. 2007. Characterization of monoclonal antibodies to hepatitis E virus (HEV) capsid protein and identification of binding activity. *J Biomed Sci* 14:555–563.
- Huang FF, Sun ZF, Emerson SU, Purcell RH, Shivaprasad HL, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ. 2004. Determination and analysis of the complete genome sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol* 85:1609–1618.
- Hsieh, S.Y., Meng, X.J., Wu, Y.H., Liu, S.T., Tam, A.W., Lin, D.Y., Liaw, Y.F., 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, 3828–3834.
- Hu, W., Lu, Y., Precidso, N.A., Chen, H.Y., Howard, T., Anderson, D., Guan, M., 2008. Double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis virus-specific antibodies in human or swine sera. *Clin. Vacc. Immunol.* 15, 1151–1157.
- Irshad M. 1997. Hepatitis E virus: A global view of its seroepidemiology and transmission pattern. *Trop Gastroenterol* 18:45–49.
- Jezierski W, 1977 – Longevity and mortality rate in a population of Wild Boar. *Acta Teriol.* 22:337-348
- Kabrane-Lazizi Y, Fine JB, Glass GE, Higa H, Diwan A, Gibbs CJ, Meng XJ, Emerson SU, Purcell RH. 1999. Evidence for widespread

infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 61:331–335.

- Kamili S, Spelbring J, Carson D, Krawczynski K. 2004. Protective efficacy of hepatitis E virus DNA vaccine administered by gene gun in the cynomolgus macaque model of infection. *J Infect Dis* 189:258–264.
- Khuroo MS, Kamili S, Yattoo GN. 2004. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusion in an endemic area. *J Gastroenterol Hepatol* 19:778–784.
- Kitajima, N., Takahashi, K., Abe, N., Mishiro, S., 2004. HEV infection in wild boars in Japan. *Kanzo* 45, 557.
- Krawczynski K. 2007. Hepatitis E virus vaccine—Ready for prime time? *N Engl J Med* 356:949–951.
- Kumar RM, Uduman S, Rana S, Kochiyil JK, Usmani A, Thomas L. 2001. Seroprevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus in the United Arab Emirates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 100:9–15.
- Lee CK, Chau TN, Lin W, Tsoi WC, Lai ST, Lin CK. 2005. Prevention of transfusion—Transmitted hepatitis E by donor-initiated self exclusion. *Transfus Med* 15:133–135.
- Li, T.C., Chijiwa, K., Sera, N., Ishibashi, T., Etoh, Y., Shinohara, Y., Kurata, Y., Ispida, M., Sakamoto, S., Takeda, N., Miyamura, T., 2005. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1958–1960.
- Lorenzo FR, Tsatsralt-Od B, Ganbat S, Takahashi M, Okamoto H. 2007. Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from farm pigs in Mongolia. *J Med Virol* 79:1128–1137.

- Lu, L., Li, C., Hagedorn, C.H., 2006. Phylogenetic analysis of global Hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* 16, 5–36.
- Magnapera C. Prevalenza e antibiotico resistenza dei ceppi di Salmonella isolati nel cinghiale (Sus Scrofa) in una zona della regione Lazio. Tesi di Laurea in Medicina Veterinaria 2010/2011
- Marsan A., Schenone L., Spanò' S., (2000) – Il Cinghiale in Liguria. Seconda edizione. Regione Liguria – Microart's, Recco.
- Martelli, F., Caprioli, A., Zengarini, M., Marata, A., Fiegna, C., Di Bartolo, I., Ruggeri, F.M., Delogu, M., Ostanello, F., 2008. Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (Sus scrofa scrofa) population in Italy. *Vet. Microbiol.* 126, 74–81
- Massei G. e Toso S.,(1993) .- Biologia e Gestione del Cinghiale. Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Documenti tecnici, 5.
- Masuda, J.I., Yano, K., Tamada, Y., Takii, Y., Ito, M., Omagari, K., Kohno, S., 2005. Acute Hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepatology Res.* 31, 178–183.
- Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K., Mishiro, S., 2003. Severe Hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* 188, 944.
- Mauget R.,(1979) –Mise en evidence, par captures-recaptures et radiotracking, du domaine vital ches le sanglier (Sus scrofa L.) en foret de Chize. *Biol. of Behaviour*, 1:25-41 *Medica* – 16(1):12- 21.
- Mayo, M.A., 2004. Changes to virus taxonomy. *Arch. Virol.* 150, 189–198.

- Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., Haynes, J.S., Thacker, B.J., Emerson, S.U., 1997. A novel virus in swine is closely related to the human Hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9860–9865.
- Meng, X.J., Halbur, P.G., Shapiro, M.S., Govindarajan, S., Bruna, J.D., Mushahwar, I.K., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 1998. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine Hepatitis E virus. *J. Virol.* 72, 9714–9721.
- Michitaka, K., Takahashi, K., Furukawa, S., Inoue, G., Hiasa, Y., Horiike, N., Onji, M., Abe, N., Mishiro, S., 2007. Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan. *Hepatology Res.* 37, 214–220.
- Mitsui T, Tsukamoto Y, Suzuki S, Yamazaki C, Masuko K, Tsuda F, Takahashi M, Tsatstral-Od B, Nishizawa T, Okamoto H. 2005. Serological and molecular studies on subclinical hepatitis E virus infection using periodic serum samples obtained from healthy individuals. *J Med Virol* 76:526–533.
- Mushahwar IK, Dawson GJ, Bile KM, Magnius LO. 1993. Serological studies of an enterically transmitted non-A. Non-B hepatitis in Somalia. *J Med Virol* 40:218–221.
- Myint KS, Endy TP, Gibbons RV, Laras K, Mammen MP, Sedyaningsih ER, Seriwatana J, Glass JS, Narupiti S, Corwin AL. 2006. Evaluation of diagnostic assays for hepatitis E virus in outbreak settings. *J Clin Microbiol* 44:1581–1583.
- Nakamura M, Takahashi K, Taira K, Taira M, Ohno A, Sakugawa H, Arai M, Mishiro S. 2006. Hepatitis E virus infection in wild mongooses

- of Okinawa, Japan. Demonstration of anti-HEV antibodies and a full genome nucleotide sequence. *Hepatol Res* 34:137–140.
- Nicand E, Grandadam M, Teyssou R, Rey JL, Buisson Y. 2001. Viremia and fecal shedding of hepatitis E virus in symptom-free carriers. *Lancet* 357:68–69.
 - Niikura M, Takamura S, Kim G, Kawai S, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Li TC, Takeda N, Yasutomi Y. 2002. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology*:273–280.
 - Nishizawa, T., Takahashi, M., Endo, K., Fujiwara, S., Sakuma, N., Kawazuma, F., Sakamoto, H., Sato, Y., Bando, M., Okamoto, H., 2005. Analysis of the full-length genome of Hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J. Gen. Virol.* 86, 3321–3326.
 - Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. 2004. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes. *Intervirology* 47:289–309.
 - Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 2007;127:216-28.
 - Ohnishi S, Kang JH, Maekubo H, Arakawa T, Karino Y, Toyota J, Takahashi K, Mishiro S. 2006. Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan. *Hepatol Res* 36:301–307.
 - Panda SK, Thakral D, Rehman S. 2007. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 17:151–180.

- Pedrotti L., Dupre E., Preatoni D., Toso S. 2001 – Banca dati ungulati
- Peron JM, Danjoux M, Kamar N, Missouri R, Poirson H, Vinel JP, Mansuy JM, Bureau C, Izopet J, Brousset P, Selves J. 2007. Liver histology in patients with sporadic acute hepatitis E: A study of 11 patients from southwest France. *Virchows Arch* 450:405–410.
- Purdy AM, McCaustland KA, Krawczynski K, Spelbring J, Reyes GR, Bradley DW. 1993. Preliminary evidence that a trypE-HEV fusion protein protect cynomolgus macaques against challenge with wildtype hepatitis E virus (HEV). *J Med Virol* 41:90–94.
- Ruiz-Fons, F., Segale's, J., Gorta'zar, C., 2008. A review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamics and reservoir ro^ le. *Vet. J.* 176, 158–169.
- Rutjes S.A., F. Lodder-Verschoora, W.J. Loddera, J. van der Giessena, H. Reesinkb, M. Bouwknegta, A.M. de Roda Husmana Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands *Journal of Virological Methods* 168 (2010) 197–206
- SaadMD,Hussein HA, BashandyMM,Kamel HH,Earhart KC, Fryauf DJ, Younan M, Mohamed AH. 2007. Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. *Infect Genet Evol* 7:368–373.
- Schielke Anika, Katja Sachs , Michael Lierz, Bernd Appel, Andreas Jansen and Reimar Johne, Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain *Virology Journal* 2009, 6:58
- Schlauder GG, Mushahwar IK. 2001. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol* 65:282–292.

- Schofield DJ, Glamann J, Emerson SU, Purcell RH. 2000. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J Virol* 74:5548–5555.
- Schofield DJ, Purcell RH, Nguyen HT, Emerson SU. 2003. Monoclonal antibodies that neutralize HEV recognize an antigenic site of the carboxy terminus of an ORF2 protein. *Vaccine* 22:257–267.
- Schoonjans, F., 2005. Receiver operator characteristics (ROC) curve analysis. *MedCalc Statistics for biomedical sciences. Software Manual.*
- Seminati, C., Mateu, E., Peralta, B., de Deus, N., Martin, M., 2008. Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet. J.* 175, 130–132.
- Seriwatana J, Shrestha MP, Scott RM, Tsarev SA, Vaughn DW, Myint KS, Innis BL. 2002. Clinical and epidemiological relevance of quantitating hepatitis E virus-specific immunoglobulin M. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:1072–1078.
- Shin-I T, Tanaka Y, Tateno Y, Mizokami M. 2007. Development and public release of a comprehensive hepatitis virus database. *Hepatol Res*
- Singh S, Mohanty A, Joshi YK, Deka D, Mohanty S, Panda Sk. 2003. Mother-to-child transmission of hepatitis E virus infection. *Indian J Pediat* 70:37–39.
- Smith JL. 2001. A review of hepatitis E virus. *J Food Prot* 64:572– 586.
- Sonoda, H., Abe, M., Sugimoto, T., Sato, Y., Bando, M., Fukui, E., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Okamoto, H., 2004. Prevalence of Hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J.*

Clin. Microbiol. 42, 5371–5374.

- Takahashi, K., Kitajima, N., Abe, M., Mishiro, S., 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, 501–505.
- Takahashi M, Kosakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y, Aikawa T, Nishizawa T, Okamoto H. 2005. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 43:49–56.
- Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. 1991. Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185:120–131.
- Tamada, Y., Yano, K., Yatsunami, H., Inoue, O., Mawatari, F., Ishibashi, H., 2004. Consumption of wild boar linked to cases of Hepatitis E. *J. Hepatol.* 40, 869–870.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., Mishiro, S., 2003. Zoonotic transmission of Hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362, 371–373.
- Tei S, Kitajima N, Ohara S, Inou Y, Miki M, Yamatani T, Yamabe H, Mishiro S, Kinoshita Y. 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.
- Thrusfield, M., 2003. Diagnostic testing. In: Thrusfield, M. (Ed.), *Veterinary Epidemiology*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, ISBN: 0632048514.

- Tokita H, Harada H, Gotanda Y, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. 2003. Molecular and serological characterization of sporadic acute hepatitis E in a Japanese patient infected with a genotype 3 hepatitis E virus in 1993. *J Gen Virol* 84:421–427.
- Tsarev SA, Emerson SU, Reyes GR, Tsareva TS, Legters LJ, Malik IA, Iqbal M, Purcell RH. 1992. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:559–563.
- Van Der Poel, W.H., Verschoor, F., Van Der Heide, R., Herrera, M.I., Vivo, A., Kooreman, M., De Roda Husman, A.M., 2001. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 970–976
- Watanobe, T., Okumura, N., Ishiguro, N., Nakano, M., Matsui, A., Sahara, M., Komatsu, M., 1999. Genetic relationship and distribution of the Japanese wild boar (*Sus Scrofa leucomystax*) and Ryukyu wild boars (*Sus Scrofa riukiuanus*) analysed by mitochondrial DNA. *Mol. Ecol.* 8, 1509–1512.
- Withers, M.R., Correa, M.T., Morrow, M., Stebbins, M.E., Seriwatana, J., Webster, W.D., Boak, M.B., Vaughn, D.W., 2002. Antibody levels to Hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 384–388.
- Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y., Okamoto, H., 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, 2351–2357.

- Yu C, Engle RE, Bryan JP, Emerson SU, Purcell RH. 2003. Detection of immunoglobulin M antibodies to hepatitis E virus by class specific capture enzyme immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:579–586.
- Zanetti, A.R., Schlauder, G.G., Romano` , L., Tanzi, E., Fabris, P., Dawson, G.J., Mushahwar, I.K., 1999. Identification of a novel variant of Hepatitis E virus in Italy. *J. Med. Virol.* 57, 356–360.
- Zhang F, Li X, Li Z, Harrison TJ, Chong H, Qiao S, Huang W, Zhang H, Zhuang H, Wang Y. 2006. Detection of hepatitis E antigen as a novel marker for the diagnosis of hepatitis E. *J Med Virol* 78:1441–1448.
- Zheng, Y., Shengxiang, G., Zhang, J., Guo, Q., Hon Ng, M., Wang, F., Xia, N., Jiang, Q., 2006. Swine as a principal reservoir of Hepatitis E virus that infects Humans in Eastern China. *J. Infect. Dis.* 193, 1643–1649.