



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA**

**FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA**

Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

Tesi di laurea

**INDAGINE SULLA PRESENZA DEL VIRUS  
DELL'EPATITE E NEL SUINO IN  
ALLEVAMENTI TOSCANI**

**Candidato :**

Nicola Martinelli

**Relatore:**

Prof. Francesco Tolari

**Correlatore:**

Dott.ssa Maria Luisa Carrozza

Anno Accademico 2005-2006



UNIVERSITA' DI PISA

Martinelli Nicola

Corso di Laurea in Medicina Veterinaria

## **Indagine sulla presenza del virus dell'epatite E nel suino in allevamenti toscani**

**Parole Chiave:** HEV, Suino, PCR, Zoonosi, Toscana

L'infezione da Hepatitis E Virus (HEV) nei suini e nell'uomo è stata segnalata in diversi Paesi. Nei suini, il virus causa infezioni asintomatiche, mentre nell'uomo è responsabile di epidemie di epatite nei Paesi in via di sviluppo e di casi sporadici in quelli sviluppati.

Indagini sierologiche condotte su persone a stretto contatto con suini hanno evidenziato una sieroprevalenza maggiore rispetto alla popolazione di controllo. Studi filogenetici hanno riscontrato un alto grado di omologia tra stipiti di origine umana e suina isolati nella medesima area geografica. È stato accertato il passaggio dell'infezione dal suino all'uomo attraverso l'ingestione di carni infette. Allo stato attuale delle conoscenze si pensa pertanto che il suino possa fungere da fonte di contagio per l'uomo.

In Italia, HEV è stato isolato per la prima volta dall'uomo nel 1999, mentre l'infezione nel suino è stata segnalata solo nel 2006. In questa indagine, mediante analisi di campioni fecali con la tecnica Nested RT-PCR, è stata ricercata la presenza di HEV in suini di allevamenti toscani. Nel 43% degli allevamenti esaminati è stata evidenziata la presenza del virus. Il maggior numero di campioni positivi è stato riscontrato nella classe di età compresa fra 3 e 5 mesi. Alcuni dei nostri amplificati virali sono stati sequenziati e messi a confronto con quelli disponibili in banche dati. L'analisi filogenetica ha rilevato una forte omologia con gli isolati umani e suini di origine europea.

*Key Words: HEV, Swine, PCR, Zoonosis, Tuscany*

*Hepatitis E Virus (HEV) infection of swine and man has been reported in various Countries. HEV infection in swine is asymptomatic; in humans the virus causes hepatitis E epidemics in the developing world and sporadic cases in developed Countries.*

*Seroprevalence is higher in people living in close contact with infected animals than in control population. The sequences of human and swine isolates of identical geographical origin are highly homologous. Therefore, the transmission of HEV from swine to man through ingestion of infected meat has been ascertained. Therefore it is assumed that swine may represent a source of infection for humans. In Italy, human HEV has been isolated for the first time in 1999, while the infection in the swine has been reported in 2006.*

*In this study we have investigated the presence of HEV infection in swine farms in Tuscany, by performing nested RT-PCR on fecal samples. The results indicate that the virus is present in 43% of the examined farms. The highest number of positive samples was found among piglets 3 to 5 months old. Several amplified fragments were sequenced and phylogenetic analysis was performed. The results indicate that the tuscan HEV isolates share a high degree of homology with European published human and swine HEV sequences.*

# SOMMARIO

<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
<b>CAPITOLO 1: EZIOLOGIA .....</b>	<b>7</b>
• 1.1 CLASSIFICAZIONE .....	7
• 1.2 MORFOLOGIA E PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE .....	7
• 1.3 ORGANIZZAZIONE GENOMICA .....	9
• 1.4 CICLO REPLICATIVO.....	11
• 1.5 VARIABILITÀ GENETICA.....	13
<b>CAPITOLO 2: EPATITE E NEL SUINO .....</b>	<b>15</b>
• 2.1 PATOGENESI E PATOLOGIA.....	15
• 2.2 FENOMENI IMMUNITARI .....	18
• 2.3 EPIDEMIOLOGIA.....	18
• 2.4 DIAGNOSI.....	21
<b>CAPITOLO 3: EPATITE E NELL’UOMO.....</b>	<b>23</b>
<b>CAPITOLO 4: ASPETTI ZONOTICI .....</b>	<b>28</b>

<b>CAPITOLO 5: RICERCHE PERSONALI .....</b>	<b>32</b>
• 5.1 INTRODUZIONE .....	32
• 5.2 MATERIALI E METODI .....	33
◇ 5.2.1 Raccolta dei campioni.....	33
◇ 5.2.2 Preparazione dei campioni .....	35
◇ 5.2.3 Estrazione dell'RNA virale.....	36
◇ 5.2.4 Retrotrascrizione dell'RNA virale .....	37
◇ 5.2.5 Amplificazione del cDNA .....	39
◇ 5.2.6 Corsa elettroforetica degli amplificati .....	41
◇ 5.2.7 Clonaggio dell'amplificato.....	42
◇ 5.2.8 Sequenziamento ed Analisi filogenetica .....	44
<b>CAPITOLO 6: RISULTATI.....</b>	<b>45</b>
• 6.1 NESTED RT-PCR E CLONAGGIO DEGLI INSERTI VIRALI.....	45
• 6.2 SCREENING DEI CAMPIONI .....	46
• 6.3 ANALISI FILOGENETICA .....	47
<b>CAPITOLO 7: DISCUSSIONE.....</b>	<b>51</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>53</b>
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI .....</b>	<b>54</b>
<b>SITOGRAFIA .....</b>	<b>66</b>
<b>APPENDICE .....</b>	<b>67</b>

---

## Introduzione

---

Molte malattie sono trasmesse dagli animali all'uomo, queste vengono chiamate zoonosi. La medicina veterinaria vanta una lunga storia di contributi al mantenimento e alla promozione della salute pubblica.

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

Come si legge nella presentazione della sezione di salute pubblica veterinaria dell'OMS "La salute umana è inestricabilmente legata alla salute e alla produzione animale. Questo legame tra uomo, popolazioni animali e ambiente, è particolarmente stretto nelle regioni sottosviluppate dove gli animali sono mezzi di trasporto, forniscono calore, energia e nutrimento. Sia nei Paesi sviluppati che in quelli in via di sviluppo, tuttavia, questo legame può portare gravi rischi per la salute pubblica con serie conseguenze economiche.

Alla luce di queste premesse abbiamo intrapreso una ricerca sull'Epatite E, una nuova zoonosi emergente.

Il virus dell'epatite E (HEV) è la principale causa di epatiti acute sporadiche nei paesi in via di sviluppo, dove può essere responsabile anche di epidemie che insorgono attraverso la contaminazione delle sorgenti idriche (Khuroo M.S., 1980). L'epatite E fu riconosciuta come patologia distinta solo nel 1980 in India, durante una epidemia di epatite conseguente a contaminazione idrica. I test diagnostici escludono che si trattasse di una epidemia da epatite A, e quindi si ipotizzò la presenza di un nuovo virus (Khuroo M.S., 1980). Questa nuova malattia fu denominata epatite trasmessa per via enterica non A, non-B (ET-NANBH). La prima evidenza della presenza di un nuovo virus si ebbe nel 1983, con gli studi di Balayan, che trasmise l'infezione ad un volontario immune nei confronti del virus all'epatite A attraverso la somministrazione di un estratto fecale di un paziente infetto. Nelle feci del volontario furono messe in

evidenza, mediante microscopia elettronica, particelle virali sferiche di 27-30nm che inoculate per via intravenosa in una scimmia causarono un'epatite acuta (Balayan M.S. *et al.*, 1983). Nel 1990 Reyes isolò un frammento di cDNA del nuovo virus che fu chiamato virus dell'epatite E (HEV) (Reyes G.R. *et al.*, 1990) e successivamente fu sequenziato l'intero genoma (Tam A.W. *et al.*, 1991). Per quanto riguarda la presenza del virus negli animali, questo è stato isolato per la prima volta dal suino nel 1997 (Meng X.J. *et al.*, 1997), nel 2001 dal pollo (Haqshenas G. *et al.*, 2001), successivamente dal cinghiale, dalla mangusta e dal cervo (Nakamura M. *et al.*, 2006; Takahashi K. *et al.*, 2004) ed anche dal cavallo (Saad *et al.*, 2005).

In capre, pecore, bovini, ratti, gatti e cani, sono stati rilevati anticorpi anti-HEV, ma il virus non è mai stato isolato. Fino ad ora non è ancora stato chiarito il ruolo epidemiologico che gli animali possono svolgere nell'infezione dell'uomo. Casi di epatite E umana sono stati attribuiti ad ingestione di carne infetta ed al contatto con suini infetti (Takahashi K. *et al.*, 2004; Pina S. *et al.*, 2000). Data la stretta correlazione genetica tra stipiti di origine umana e suina, si è ipotizzato che il suino potrebbe essere il serbatoio animale più importante del virus (Erker J.C. *et al.*, 1999; Hsieh S.J. *et al.*, 1999; Meng X.J. *et al.*, 1997, 1998a; Tolari *et al.*, 2006). In Italia sono presenti oltre 12 milioni di suini ed il consumo pro capite annuo di carne suina si aggira intorno a 38 Kg (ANAS NOTIZIE Anno 2006 numero 3). In Toscana sono presenti di oltre 200.000 capi (dati ISTAT 2003) con allevamenti in parte di tipo intensivo e in parte familiare.

La presenza del virus anche nel nostro Paese è stata accertata ed attualmente le ricerche sono condotte prevalentemente nelle zone a consistente patrimonio suinicolo del Nord Italia. Per studiare le caratteristiche genetiche degli isolati virali e per meglio chiarire il ruolo del suino nell'infezione umana è importante avere a disposizione isolati virali da diverse aree geografiche. A questo scopo è stata intrapresa una indagine anche in allevamenti suini toscani.

---

# Capitolo 1: Eziologia

---

---

## ➤ 1.1 Classificazione

Il virus dell'epatite E per le sue similitudini morfologiche e di organizzazione genomica con i virus appartenenti alla famiglia *Caliciviridae* era stato provvisoriamente inserito in questa famiglia, nel genere "Hepatitis E-like viruses". Lo studio più approfondito del suo genoma mediante sequenziamento ha portato all'inserimento di HEV nella nuova famiglia *Hepeviridae*, genere *Hepevirus* (Berke T. *et al.*, 2000; Green K.Y. *et al.*, 2000).

---

## ➤ 1.2 Morfologia e proprietà fisico-chimiche

HEV è un virus a RNA a singolo filamento a polarità positiva. Il virione è privo di envelope, e presenta un diametro di circa 30-34nm. Al microscopio elettronico i virioni appaiono come particelle sferiche a simmetria icosaedrica (Harrison T.J. *et al.*, 1999; Purcell R.H *et al.*, 1996). Morfologicamente, HEV è simile al virus Norwalk, un membro del genere *Calicivirus*.

I virioni hanno una densità di flottazione di 1.29g/cm<sub>3</sub> in tartrato di potassio/glicerolo e un coefficiente di sedimentazione di 183S in gradiente neutro di saccarosio, il capsido vuoto di 165S nelle stesse condizioni (Bradley D.W., 1992).

La resistenza di HEV al calore è stata recentemente testata in uno studio di Emerson dal quale emerge che HEV, a temperatura di 60°C per 60 minuti, può mantenere un'infettività di circa il 20%, mentre a temperatura di 56°C per 1 ora persiste una infettività residua di circa il 50% (Emerson S.U. *et al.*, 2005).

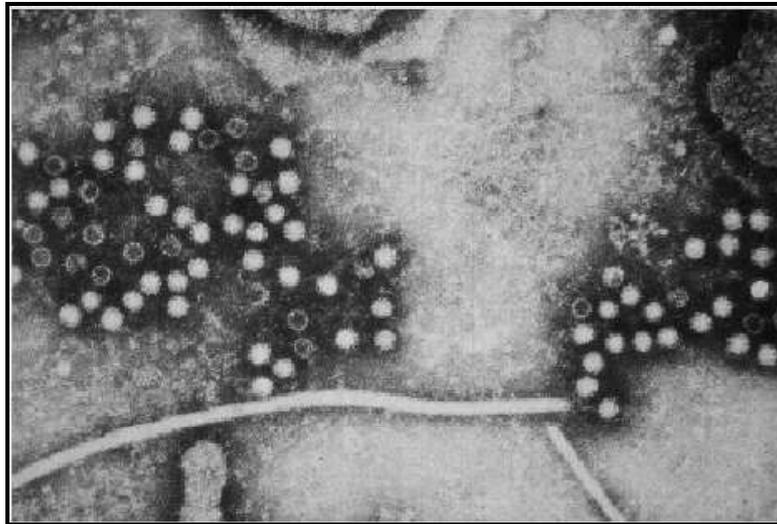


Figura 1.1: aggregati di particelle di HEV con anticorpi specifici, in campione di feci di un paziente (Foto CDC, USA)

---

### ► 1.3 Organizzazione genomica

Il genoma di HEV è una molecola di RNA poliadenilato positivo a singolo filamento lunga circa 7.5 kb. In posizione 5' è presente una regione non codificante di 27-35 nucleotidi che presenta un cap all'estremità 5' (Lazizi Y.K. *et al.*, 1999). A questa seguono tre regioni codificanti, parzialmente sovrapposte, denominate ORF1, ORF2, ORF3. All'estremità 3' è presente una regione terminale non codificante poliadenilata di 39-72 nucleotidi (Wang Y. *et al.*, 2000). Un'altra regione non codificante è contigua ad ORF 2 e termina con una coda di 150-200 adenosine. ORF1 è la regione codificante più estesa delle tre, circa 5100bp, questa codifica per proteine non strutturali e termina con una coda di 150-200 adenosine.

In ORF1 sono stati identificati motivi caratteristici di varie proteine virali: 1) una metil transferasi; 2) una sequenza di funzione sconosciuta denominata dominio Y in analogia a quella ritrovata in altri virus; 3) una cisteina proteasi simile alla papaina; 4) una regione ricca in proline che contiene una regione ipervariabile; 5) un dominio X a funzione sconosciuta; 6) una elicasi; 7) una RNA polimerasi RNA dipendente (Koonin E.V. *et al.*, 1992).

ORF2 codifica per la maggiore proteina capsidica virale, composta da 660 aminoacidi. In vitro, in cellule animali, è espressa in tre forme: una di 78kDa denominata pORF2, una di 82kDa e una di 86kDa; quest'ultime sono glicosilate e denominate rispettivamente gORF2 e ggORF2. La glicosilazione avviene nel reticolo endoplasmatico. I siti di glicosilazione sono tre residui di asparagina in posizione 137, 310 e 562. La forma non glicosilata sembra essere il vero precursore della proteina capsidica di HEV in quanto la glicosilazione non è fondamentale nel processo di replicazione virale e le proteine glicosilate sono instabili (Torresi J. *et al.*, 1999).

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

ORF3 codifica per una proteina di 123 aminoacidi che viene espressa all'interno della cellula. In particolare si tratta di una fosfoproteina che segrega con il citoscheletro nella partizione subcellulare (Zafrullah M. *et al.*, 1997). Recenti studi hanno dimostrato che la proteina codificata da ORF3 interagisce con la proteina non glicosilata da ORF2 suggerendo un suo possibile ruolo nei processi di assemblaggio del virione . ORF3 potrebbe anche intervenire in processi di modulazione dell'espressione genetica cellulare interagendo con diverse proteine cellulari (Tyagi S. *et al.*, 2002).

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

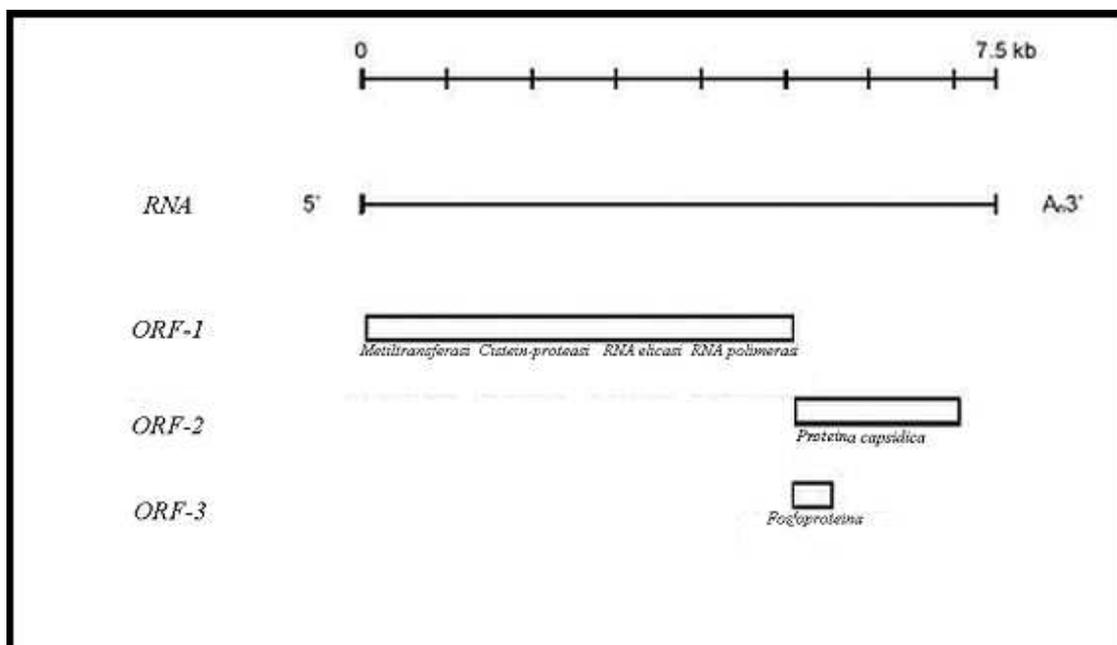


Figura 1.2 : organizzazione genomica di HEV

---

## ► 1.4 Ciclo replicativo

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

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

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

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

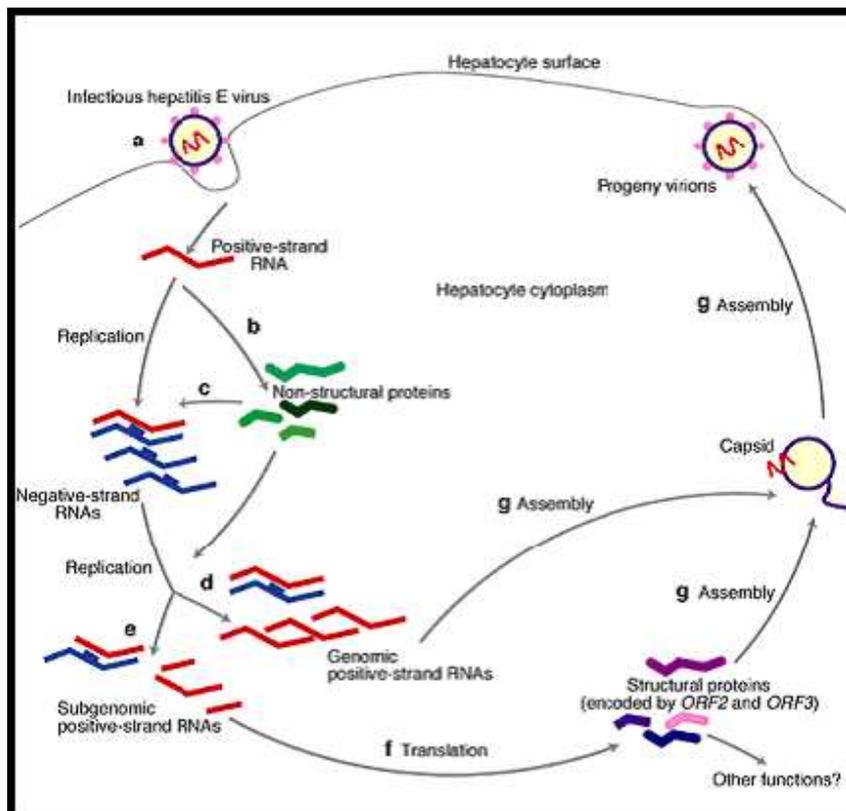


Figura 1.3: modello proposto per la replicazione di HEV, da <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/99001337h.htm> (Shahid Jameel).

---

## ➤ 1.5 Variabilità genetica

Complete e parziali sequenze nucleotidiche sono state determinate da vari isolati di HEV. La prima sequenza genomica completa fu ottenuta da un virus implicato in un'epidemia di epatite E in Burma (Reyes G.R. *et al.*, 1990; Tam A.W *et al.*, 1991). Diversi isolati virali, asiatici e africani, mostrarono una identità nucleotidica maggiore del 90% con lo stipite Burma. La prima importante variabilità genetica del virus fu dimostrata sequenziando un isolato virale messicano, che mostrò meno del 77% di identità nucleotidica con gli isolati precedenti (Huang C.C. *et al.*, 1992). Nel 1997 negli Stati Uniti fu ottenuto il primo isolato di origine suina (Meng X.J. *et al.*, 1997) ed un isolato da un caso umano di epatite E sporadica (Kwo P.Y. *et al.*, 1997). Questi ultimi due isolati mostrarono un'elevata omologia nucleotidica tra loro e risultarono divergenti rispetto agli isolati Burma e Messicano, rispettivamente del 75% e del 78% (Schlauder G.G. *et al.*, 1998). Particolare divergenza nucleotidica con tutti gli isolati precedenti mostrò la sequenza ottenuta da uno stipite di HEV isolato in Cina da sei pazienti con epatite E acuta (Wang Y. *et al.*, 1999).

Negli ultimi anni sono stati studiati diversi isolati virali di HEV di origine umana ed animale e sebbene sia riconosciuto un solo sierotipo, i diversi isolati di HEV presentano una spiccata variabilità genetica. Attualmente HEV è suddiviso in quattro genotipi, rappresentati rispettivamente dall'isolato Burma, dall'isolato Messicano, da quelli Statunitensi e da quello Cinese.

Il genotipo I comprende isolati umani asiatici, africani e spagnoli, recentemente questo genotipo è stato isolato anche dal suino in Cambogia (Caron M. *et al.*, 2006). Il genotipo II presenta una limitata variabilità e comprende principalmente isolati umani messicani. Il genotipo III ha un'ampia variabilità e comprende stipiti umani statunitensi, giapponesi, ed europei isolati da persone che non avevano viaggiato in

zone endemiche; in questo genotipo è raggruppata la maggior parte degli isolati animali. Il genotipo IV comprende isolati asiatici umani ed animali. Gli isolati di origine suina sono geneticamente omologhi agli isolati umani provenienti dalla stessa area geografica. Recentemente su base filogenetica è stata proposta una ulteriore suddivisione dei 4 genotipi in 24 sottotipi (Lu L. *et al.*, 2005).

Nel 2001 in Nord America è stato isolato un virus responsabile di epato e splenomegalia nel pollo che si è dimostrato geneticamente correlato, ma distinto dagli altri stipiti di HEV, mostrando solamente il 50% di omologia nucleotidica con altri isolati umani ed animali (Haqshenas G. *et al.*, 2001).

---

## Capitolo 2: Epatite E nel suino

---

---

### ► 2.1 Patogenesi e Patologia

La trasmissione dell'infezione nel suino è stata ottenuta sperimentalmente per inoculazione intravenosa e per via orale somministrando sospensioni fecali infette (Kasorndorkbua C. *et al.*, 2004). In condizioni naturali la trasmissione oro-fecale sembra essere quella principale. Non è stata ottenuta la trasmissione dell'infezione mediante estratti di tonsille e secrezioni nasali (Kasorndorkbua C. *et al.*, 2004); la trasmissione iatrogena mediante aghi da un soggetto all'altro non sembra avere importanza, infatti la scarsa quantità di sangue che rimane nell'ago dopo l'iniezione e la breve durata della viremia fanno sì che non vengano veicolate abbastanza particelle virali per trasmettere l'infezione (Kasorndorkbua C. *et al.*, 2004). I tessuti nei quali HEV si replica precocemente e più a lungo, da 3 a 27 giorni p.i. (*post infection*), sono fegato, intestino tenue, colon e linfonodi (Halbur *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001). Il fatto che in corso d'infezione sperimentale l'RNA virale sia presente nelle feci prima che nella bile ed in quantità 10 volte maggiore rispetto a quest'ultima hanno fatto ipotizzare che, una volta penetrato per via orale e prima d'indurre viremia, il virus replichi nell'intestino. Successivamente raggiunge il fegato tramite la vena porta, replica nel citoplasma degli epatociti e viene rilasciato nella bile e nel sangue. Sperimentalmente la viremia compare da 5 a 14 giorni dopo l'inoculazione intravenosa e si protrae per 1 - 2 settimane in alcuni casi con fasi di intermittenza

(Kasorndorkbua C *et al.*,2004). L'escrezione virale con le feci inizia circa una settimana post infezione e dura per 3-4 settimane (Meng X.J. *et al.*,1998). La sierconversione si ha a 2 settimane p.i. (Meng X-J *et al.*,1998).

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

Le uniche alterazioni patologiche rilevate macroscopicamente durante l'infezione da HEV, dal settimo al cinquantacinquesimo giorno post infezione, erano un medio-moderato ingrossamento dei linfonodi mesenterici ed epatici. Microscopicamente è stata osservata una epatite linfoplasmocitaria multifocale caratterizzata dalla presenza di modesti infiltrati sinusoidali e periportali e di limitate aree focali, a distribuzione irregolare, di vacuolizzazione e necrosi epatocellulare (Meng X.J. *et al.*, 1997; Meng *et al.*, 1998; Marcato P.S. e Perillo A., 2000; Halbur P.G. *et al.*, 2001 ; Williams T.P.E *et al.*, 2001). E' stato osservato che gli stipti di origine umana inoculati nel suino determinano alterazioni istologiche più marcate rispetto a quelle ottenute con stipti di origine suina ( Halbur P.G. *et al.*, 2001). HEV non risulta patogeno per le scrofe gravide e non interferisce con lo sviluppo fetale (Kasorndorkbua *et al.*, 2003). Alcuni Autori ritengono che HEV, di per sé scarsamente patogeno, possa agire in sinergia con altri agenti virali come ad esempio il circovirus suino tipo 2 (PCV2)(Ellis *et al.*, 2004).

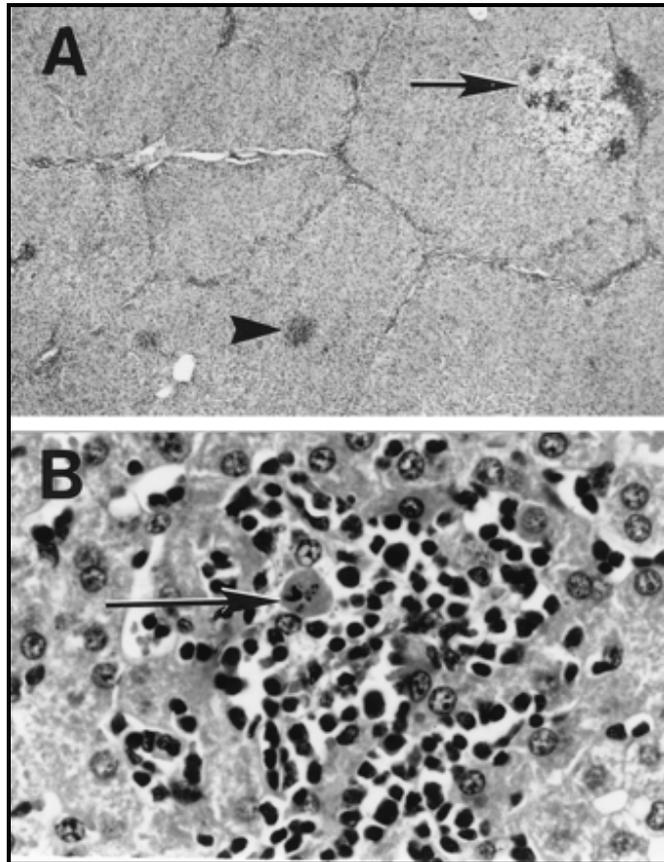


Figura 3.1: sezioni di fegato di suinetto infettatosi naturalmente.

(A; ingr. x10) Epatite multifocale linfoplasmocitaria e necrotizzante con aree focali a distribuzione irregolare di vacuolizzazione ed ingrossamento epatocellulare (freccia) e *foci* di necrosi (punta di freccia) con infiltrati linfoplasmocitari sinusoidali e periportali.

(B; ingr. x400) Focolai di necrosi epatocitaria (freccia) e infiammazione linfoplasmocitaria.

Colorazione ematossilina/eosina.

Da Meng X.J. *et al.*, 1997

---

## ➤ 2.2 *Fenomeni immunitari*

Suinetti nati da scrofe sieropositive acquisiscono la immunità passiva tramite le IgG del latte e questa persiste fino a circa 9 settimane di vita. I suinetti vengono a contatto con il virus precocemente, ma possono infettarsi solo quando viene meno l'immunità passiva, e sieroconvertono in 1-2 settimane dall'infezione (Meng X.J. *et al.*, 1997). Il picco anticorpale si ha verso i 4 mesi di età e gli animali restano altamente sieropositivi fino a 5-6 mesi di vita, quando le IgG cominciano lentamente a decrescere (Meng X.J. *et al.*, 1997; Hsieh S.Y. *et al.*, 1999; Williams T.P.E. *et al.*, 2001; Yoo D. *et al.*, 2001). A seguito di infezione sperimentale si osserva che le prime immunoglobuline a comparire sono prevalentemente della classe IgM, seguite dopo una settimana circa da un innalzamento delle IgG. Le IgM decrescono poi rapidamente nel giro di 1-2 settimane mentre le IgG continuano a salire per alcune settimane.

---

## ➤ 2.3 *Epidemiologia*

L'infezione da HEV nel suino è diffusa sia nei Paesi industrializzati, sia nei Paesi in via di sviluppo (Huang *et al.*, 2002; Meng XJ *et al.*., 2002).

Dopo la prima identificazione avvenuta nel 1997, diversi stipiti di HEV di origine suina sono stati isolati in Nord America, Asia, Europa, Nuova Zelanda, Australia, Messico e Brasile (Clayson *et al.*, 1995; Chandler J.D. *et al.*, 1999; Pina S. *et al.*, 2000; Garkavenko O. *et al.*, 2001; van der Poel W.H. *et al.*, 2002; Yoo D. *et al.*, 2001;

Pei Y., Yoo D., 2002; Choi I.S. *et al.*, 2003; Clemente-Casares P. *et al.*, 2003; Takahashi K. *et al.*, 2003; Banks M. *et al.*, 2004a; Wibawa I.D. *et al.*, 2004). Tali isolati appartengono al genotipo III o IV e dimostrano un'elevata variabilità genetica in relazione all'area geografica di provenienza. In particolare, i ceppi suini isolati nei Paesi industrializzati sono spesso correlati geneticamente ai ceppi coinvolti in episodi di malattia nell'uomo in cui la fonte d'infezione era sconosciuta (Meng X.J. *et al.*, 1997; Engle R.E. *et al.*, 2002; Haqshenas G. *et al.*, 2002; Choi I.S. *et al.*, 2003; Nishizawa T. *et al.*, 2003; Takahashi M. *et al.*, 2003; Banks M. *et al.*, 2004). Recentemente, un isolato dal suino in Cambogia è risultato appartenere al genotipo I (Caron M. *et al.*, 2006).

Nei Paesi dove il virus è stato identificato e sono stati effettuati studi sierologici, la maggior parte dei suini di età superiore ai 3-4 mesi risulta avere anticorpi anti-HEV (Clayson E.T. *et al.*, 1995; Meng X.J. *et al.*, 1997; Chandler J.D. *et al.*, 1999; Hsieh S.Y. *et al.*, 1999; Pina S. *et al.*, 2000; Garkavenko O. *et al.*, 2001; Yoo D. *et al.*, 2001; Meng X.J. *et al.*, 2002; Choi I.S. *et al.*, 2003; Clemente-Casares P. *et al.*, 2003; Takahashi K. *et al.*, 2003; Takahashi M. *et al.*, 2003; van der Poel W.H. *et al.*, 2002; Banks M. *et al.*, 2004a; Wibawa I.D. *et al.*, 2004).

La sieroprevalenza varia sensibilmente in funzione dell'area geografica e dell'età dei soggetti: i suinetti sotto i due mesi sono in genere sieronegativi o debolmente sieropositivi, mentre nei soggetti di età superiore ai 3 mesi la sieroprevalenza può superare l'80%. Indagini sierologiche hanno rilevato tassi di sieroprevalenza del 91-100% in USA e Nuova Zelanda, del 60% in Australia e Canada, del 30% in Cina, del 25% in Olanda, del 75% in Spagna e del 65-80% nel Regno Unito.

PAESE	RISULTATI	RIFERIMENTI
Messico	- 81% sieroprevalenza nei suini.	Cooper K. Et <i>et al.</i> , 2004
Spagna	- 13,7% sieroprevalenza nei suini.	Clemente-Casares P. <i>et al.</i> , 2003
Lao PDR	- 51,2%(300/586) sieroprevalenza nei suini al macello.	Blacksell S.D. <i>et al.</i> , 2006
India orientale	- 42,9% sieroprevalenza nei suini. - 4,6% presenza di RNA virale nel siero (Genotipo 4). - 4,4-6,9% sieroprevalenza nei bovini. - 54,6-74,4% sieroprevalenza nei suini. - 2,1-21,5% sieroprevalenza nei roditori. - 10/44 (22,7%) sieroprevalenza nei cani. - 0% sieroprevalenza nelle capre.	Arankalle V.A. <i>et al.</i> , 2002  Arankalle V.A. <i>et al.</i> , 2001
Giappone	- 55% sieroprevalenza nei suini.	Takahashi M. <i>et al.</i> , 2005
Cina	- 78,8% sieroprevalenza nei suini. - 6,3% sieroprevalenza nei bovini. - 0% sieroprevalenza nelle capre. - 1,9% di sieri di suini positivi per RNA di HEV (Genotipo 4).	Wang Y.C. <i>et al.</i> , 2002
Olanda	- 22% degli allevamenti suini testati positivi per HEV-RNA da pool di feci.	van der Poel W.H. <i>et al.</i> , 2002
Regno Unito	- 85,5% sieroprevalenza nei suini.	Banks M. <i>et al.</i> , 2004
Germania	- 23,5% sieroprevalenza nei suini.	Banks M. <i>et al.</i> , 2004
Svezia	- 58% sieroprevalenza nei suini.	Banks M. <i>et al.</i> , 2004
North Carolina U.S.	- 34,5% sieroprevalenza nei suini.	Withers M.R. <i>et al.</i> , 2002
Indonesia	- 71% sieroprevalenza nei suini. - HEV-RNA in suino di 2 mesi 2 (Genotipo 4).	Wibawa I.D. <i>et al.</i> , 2004
Australia	- 30% sieroprevalenza nei suini.	Chandler J.D. <i>et al.</i> , 1999
Brasile	- 24,3% sieroprevalenza nei suini. - 100% sieroprevalenza in suini di 7 giorni. - 97,3% sieroprevalenza in suini di 25 settimane.	Vitral C.L. <i>et al.</i> , 2005
Sud Corea	- 2.3% di prevalenza di RNA di HEV in 128 suini. - 15% di sieroprevalenza nei suini. - 0% di sieroprevalenza nei suini di età inferiore ad 1 mese. - 6% di sieroprevalenza nei suini di 2 mesi d'età. - 10% di sieroprevalenza nei suini di 3 mesi d'età. - 36% di sieroprevalenza nei suini di 4 mesi d'età. - 25% di sieroprevalenza nei suini di età compresa tra 5 e 7 mesi.	Choi I.S. <i>et al.</i> , 2003
Stati Uniti	- 35%(34/96) dei suini testati di età compresa tra 2 e 4 mesi positivi per HEV RNA. - 54%(20/37) degli allevamenti testati positivi per HEV RNA in siero o feci.	Huang F.F. <i>et al.</i> , 2002
Nuova Zelanda	- 91%(20/22) degli allevamenti suini positivi per anticorpi anti-HEV.	Garkavenko O. <i>et al.</i> , 2001
Canada	- 59,4%(594/998) sieroprevalenza nei suini.	Yoo D. <i>et al.</i> , 2001
Nepal	- 6,3%(3/47) sieri o feci di suini positivi per HEV RNA. - 32,7%(18/55) sieroprevalenza nei suini.	Clayson E.T. <i>et al.</i> , 1995
Taiwan	- 37%(102/275) sieroprevalenza nei suini.	Hsieh S.Y. <i>et al.</i> , 1999

Tabella 2.1: studi sulla presenza di HEV: ricerca del genoma virale con PCR e anticorpi anti-HEV nel suino ed in altre specie animali.

---

## 2.4 Diagnosi

HEV non è coltivabile in vitro, i tentativi di isolamento fatti su cellule di uomo e di scimmia sono stati infruttuosi (Emerson S.U. *et al.*, 2004). Per la diagnosi diretta si utilizzano tecniche biomolecolari, microscopia elettronica e la ricerca degli antigeni virali. Per la diagnosi indiretta si utilizzano tecniche sierologiche immunoenzimatiche. La microscopia elettronica, su campioni di feci, è oggi poco usata per la scarsa sensibilità e la ricerca diretta del virus viene generalmente effettuata identificando il genoma virale in campioni di feci, di siero o di tessuti mediante RT-PCR; generalmente si tratta di una *nested* RT-PCR per aumentare la sensibilità del test. Il test viene eseguito su campioni di feci di suini di età compresa fra i 3 ed i 5 mesi. Per accertare l'identità degli amplificati questi vengono sottoposti a sequenziamento, verificando se le sequenze corrispondono a quelle attese. Recentemente, è stata sviluppata una *Real Time* PCR che permette di quantificare la carica virale nel campione ed aumenta notevolmente rapidità, sensibilità e specificità del test (Orru G. *et al.*, 2004).

Per la ricerca del virus nei tessuti vengono utilizzati campioni di fegato e cistifellea ed in secondo ordine porzioni di intestino e linfonodi (Yazaki Y. *et al.*, 2003). Su questi tessuti è anche possibile eseguire l'ibridazione in situ e l'immunoistochimica. Queste tecniche permettono la localizzazione del virus all'interno dei tessuti e delle cellule infette e sono un valido strumento per mettere in relazione presenza del virus e lesioni ed individuare i siti di replicazione virale (Haqshenas G. *et al.*, 2002; Choi C. e Chae C., 2003). La ricerca del virus in tessuti ed organi ed in particolare nel fegato, ha importanza per valutare il rischio legato agli alimenti destinati al consumo umano, ma porta anche un contributo notevole alla comprensione della patogenesi dell'infezione (Choi C. e Chae C., 2003).

Come visto in precedenza, gli stipiti di origine suina sono geneticamente ed antigenicamente correlati a quelli di origine umana ed in letteratura è ampiamente documentato come alcuni epitopi, codificati da ORF2, siano molto simili negli isolati virali provenienti da diverse specie animali (Engle R.E. *et al.*, 2002; Haqshenas G. *et al.*, 2002; Huang F.F. *et al.*, 2002; Meng X.J. *et al.*, 2002; Choi I.S. *et al.*, 2003; Wang L. e Zhuang H., 2004). Questo fatto determina una eguale efficienza nella ricerca di anticorpi anti-HEV mediante antigeni capsidici derivati da virus umani e suini; inoltre permette la preparazione di test immunoenzimatici con antigeni capsidici provenienti da diversi isolati per la ricerca di anticorpi anche in specie diverse.

Per la diagnosi sierologica si utilizzano metodiche ELISA e meno frequentemente il Western blot. Sono stati messi a punto test che utilizzano antigeni ricombinanti derivati da stipiti di origine suina, ma sono utilizzati anche kit diagnostici per la diagnosi nell'uomo a base di antigeni derivati da ceppi umani. In questo caso viene sostituito l'anticorpo coniugato anti IgG umane con un coniugato anti IgG suine (Meng X.J. *et al.*, 2002). Con i test sierologici siamo in grado di quantificare la risposta anticorpale in IgM ed IgG. Le IgM prevalgono nell'infezione acuta, mentre le IgG indicano che l'infezione è avvenuta diverso tempo prima.

---

## Capitolo 3: Epatite E nell'uomo

---

L'infezione da HEV è prevalentemente diffusa nei Paesi tropicali e sub-tropicali (Aggarwal R. e Krawczynski K., 2000; Meng X.J. *et al.*, 1997; Emerson S.U. e Purcell R.H., 2003).

In queste aree si manifesta generalmente con episodi epidemici, talvolta protratti, che coinvolgono fasce molto ampie di popolazione, ma con incidenza maggiore nella popolazione adulta. I tassi di attacco variano dall' 1% al 15% (Aggarwal R. e Krawczynski K., 2000). Nella maggior parte delle aree endemiche la sieroprevalenza è di circa il 5% nei bambini sotto i 10 anni e può raggiungere il 10-40% negli adulti sopra i 25 anni (Aggarwal R. e Krawczynski K., 2000; Emerson S.U. e Purcell R.H., 2003).

Le epidemie sono in genere associate al consumo di acqua contaminata, ed avvengono frequentemente in concomitanza con forti piogge e inondazioni. La trasmissione interumana sembra essere rara, con tassi d'attacco secondario all'interno dei nuclei familiari inferiori al 5% .

L'infezione da HEV è presente anche in molti Paesi industrializzati; in USA, Giappone ed Europa sono sempre più spesso segnalati casi sporadici di malattia in soggetti che non risulta abbiano viaggiato nei paesi endemici (Meng X.J. *et al.*, 1997; Zanetti A.R. *et al.*, 1999; van der Poel W.H. *et al.*, 2001; Choi I.S. *et al.*, 2003; Clemente-Casares P. *et al.*, 2003; Emerson S.U. e Purcell R.H., 2003; Emerson S.U. *et al.*, 2004).

I ceppi isolati in tali episodi sono geneticamente diversi da quelli isolati in altre aree geografiche, facendo supporre che questi casi di malattia siano ascrivibili a virus presenti in quel particolare territorio.

Diversi studi hanno inoltre rilevato sieroprevalenze variabili dal 5% al 20% in popolazioni sane di diversi paesi industrializzati, facendo supporre che le infezioni

subcliniche siano abbastanza frequenti (Meng X.J. *et al.*, 1997; Emerson S.U. e Purcell R.H., 2003; Pei Y. e Yoo D., 2002; Aggarwal R. e Krawczynski K., 2000). Le migliori condizioni igieniche di tali Paesi non consentono il verificarsi degli episodi epidemici che si osservano nei Paesi in via di sviluppo e pertanto la malattia si manifesta solo in forma sporadica. I meccanismi di trasmissione nei casi sporadici di infezione non sono sempre chiari; oltre all'ingestione di acque e alimenti contaminati e al contatto diretto, è dimostrato che l'infezione si trasmette verticalmente dalla madre al feto, mentre non ci sono evidenze di trasmissione sessuale. La possibilità d'infezione attraverso emoderivati o la pratica dell'emodialisi è stata documentata, ma non è ancora chiara la sua importanza (Fabrizi F. *et al.*, 1997). La trasmissione dagli animali all'uomo, in base alle attuali conoscenze, è considerata possibile. I rischi possono derivare per contagio diretto o indiretto con animali infetti e per ingestione di alimenti contaminati. Tra le possibili vie di trasmissione va anche considerata la pratica dello xenotrapianto.

In Italia, il virus dell'HEV è responsabile di circa il 10% delle epatiti virali non A, non B, non C (Zanetti A.R. *et al.*, 1999). La maggior parte dei casi di malattia è stata segnalata in viaggiatori provenienti da Paesi in via di sviluppo. Nel 1999 una nuova variante di HEV è stata isolata nelle feci di un paziente. Questo stipite presentava un omologia nucleotidica dell'86% con isolati statunitensi, dell'80% e dell'92% rispettivamente con isolati messicani e asiatici. Dato che il paziente non aveva viaggiato né era venuto a contatto con individui di ritorno da zone endemiche, questo stipite è stato considerato originario del territorio italiano (Zanetti A.R. *et al.*, 1999).

La presenza di anticorpi anti-HEV è stata rilevata in persone provenienti da diverse regioni del nostro Paese, con prevalenze che oscillano dall'1% al 5% (Gessoni G. e Manoni F., 1996; Cacopardo B. *et al.*, 1997; Fabrizio F. *et al.*, 1997; De Donno A. *et al.*, 2003; Grieco A. *et al.*, 2001). I valori di sieropositività più elevati sono stati riscontrati in emodializzati, tossicodipendenti e persone positive ad altri marcatori di

epatiti virali post-trasfusionali. La prevalenza è più elevata nelle regioni dell'Italia meridionale e questo fenomeno viene spiegato con la maggiore vicinanza di tali regioni alle aree endemiche, con l'elevato flusso migratorio da tali zone e con l'abitudine diffusa in queste regioni di ingerire molluschi crudi (Zanetti A.R. *et al.*, 1999).

Nell'uomo, la forma clinica più comune è quella acuta itterica, caratterizzata da una fase prodromica di pochi giorni nella quale si manifestano sintomi generici simil-influenzali: febbre, tremori, dolori articolari, anoressia, astenia, nausea, vomito, dolori addominali, diarrea ed un temporaneo rash cutaneo. Dopo pochi giorni si assiste alla comparsa di ittero, emissione di urine di colore scuro e di feci ipocoliche. Successivamente alla comparsa dell'ittero la febbre e gli altri sintomi prodromici tendono a regredire. Le indagini di laboratorio evidenziano bilirubinuria, bilirubinemia (principalmente coniugata), elevazione degli enzimi epatici. Con il regredire dei sintomi, che in genere perdurano da 1 a 4 settimane, i valori ematochimici tornano gradualmente alla normalità. L'epatite E è una malattia a carattere acuto e non porta mai alla cirrosi, in alcuni pazienti si può tuttavia osservare una forma protratta di malattia caratterizzata da colestasi, ittero persistente ed intenso prurito. La prognosi è comunque favorevole e la malattia e l'ittero tendono a risolversi in 2-6 mesi. Una piccola porzione di pazienti può sviluppare insufficienza epatica fulminante o subacuta con esito talvolta infausto. Molti pazienti, d'altro canto, presentano solo sintomi simil influenzali e in questi casi il coinvolgimento epatico è evidenziabile solo con le indagini di laboratorio. Durante gli episodi epidemici è stata riscontrata una letalità variabile tra lo 0,07% e il 2%. Le donne gravide, in particolare nel secondo e terzo trimestre di gravidanza, sviluppano una malattia molto più, grave con tassi di letalità che oscillano tra il 15% e il 25%. Secondo alcuni Autori, la particolare suscettibilità delle donne gravide alle prostaglandine ed ai leucotrieni, mediatori chimici presumibilmente coinvolti nella patogenesi delle epatiti fulminanti,

potrebbe spiegare la gravità della malattia in queste pazienti. Sono frequenti anche aborti, nascite premature e mortalità neonatale.

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

Sono in fase di sperimentazione vaccini prodotti con antigeni ricombinati. Un vaccino sperimentale ricombinante che utilizza ORF 2 è risultato in grado di proteggere i macachi dalla malattia ma non dall'infezione (Tsarev S.A. *et al.*, 1997). Un nuovo e promettente vaccino orale è stato ottenuto sfruttando la capacità della proteina capsidica di HEV di autoassemblarsi in vitro quando viene espressa in cellule di insetto, formando delle pseudo-particelle virali prive di acido nucleico. Tali particelle sono risultate protettive per le scimmie senza bisogno di utilizzare adiuvanti (Li T.C. *et al.*, 2004).

In mancanza quindi di una profilassi vaccinale, riveste particolare importanza la profilassi igienico-sanitaria soprattutto nei casi epidemici; questa si basa sulla sanificazione dell'acqua e sull'eliminazione delle contaminazioni fecali dell'acqua da bere e del cibo. Data la provata trasmissione del virus attraverso l'assunzione di fegato di animali infetti si dovrebbe evitare di consumare carne cruda o poco cotta. Da evitare anche il consumo di molluschi marini crudi.

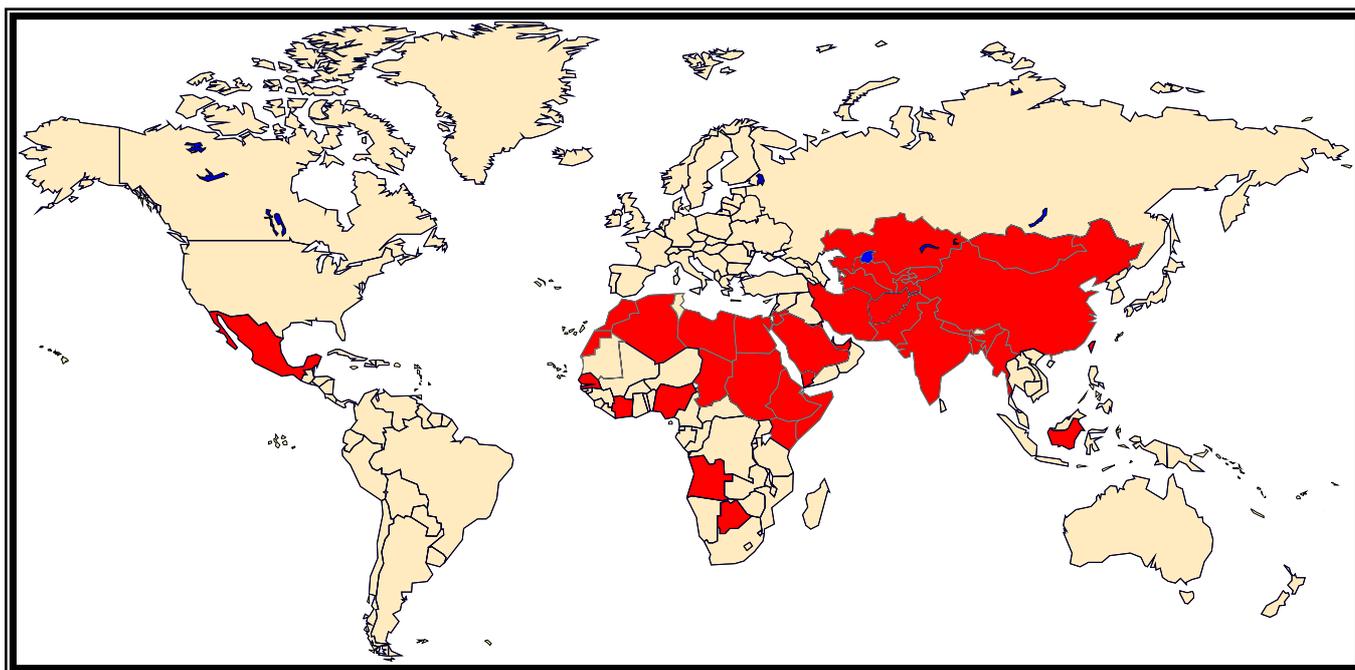


Figura 3.1: distribuzione geografica dell'infezione epidemica da HEV nell'uomo.

Da [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov) .

---

## Capitolo 4: Aspetti zoonotici

---

Le caratteristiche epidemiologiche dell'epatite E hanno fatto sorgere l'ipotesi che non soltanto l'uomo ma anche una o più specie animali possano costituire una riserva per il virus.

Numerosi studi hanno supportato questa ipotesi dimostrando che HEV è capace di infettare sperimentalmente numerose specie di animali, che anticorpi anti-HEV sono presenti in molte specie di animali domestici e selvatici, che virus molto simili ad HEV umano sono presenti in alcune specie animali e che la trasmissione da alcuni di questi animali all'uomo può avvenire tramite ingestione di carni infette crude o poco cotte.

La trasmissione interspecie è stata dimostrata sperimentalmente: uno stipite americano di HEV umano è stato trasmesso al suino ed uno stipite di origine suina è risultato infettante per le scimmie (*Macaca mulatta*) e per gli scimpanzé (*Pan troglodytes*) (Meng X.J. *et al.*, 1998a). Questi due stipiti appartengono entrambi al genotipo 3, mentre tentativi di infettare il suino con isolati umani appartenenti al genotipo 1 sono falliti (Meng X.J. *et al.*, 1998b).

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

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

Anticorpi anti-HEV sono stati trovati in suini, cinghiali, bovini, pecore, capre, polli, bufali, cervi, ratti, topi, gatti e scimmie, facendo sorgere il sospetto che alcuni animali possano fungere da riserva dell'infezione anche nelle aree non endemiche (Favorov M.O. *et al.*, 2000; He J. *et al.*, 2002; Sonoda H. *et al.*, 2004; Wang Y.C. *et al.*, 2002). Anche se inizialmente tali positività potevano essere correlate ad una cross-reattività con un virus simile ad HEV, il successivo isolamento del virus in alcune specie animali ha dimostrato che era in causa lo stesso virus che infetta l'uomo.

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

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

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

Il virus è stato poi isolato anche in altre specie animali: cinghiali, cervi Sika e manguste (He J. *et al.*, 2002; Nakamura M. *et al.*, 2006; Sonoda H. *et al.*, 2004; Tei S.

*et al.*, 2003). La contemporanea presenza di HEV e di bassi livelli di IgG anti-HEV nei ratti fa pensare che in questi animali la viremia possa persistere per un certo periodo di tempo dopo la comparsa degli anticorpi, contribuendo alla diffusione del virus nell'ambiente; studi su ratti (*Rattus norvegicus*) catturati in diverse regioni degli Stati Uniti hanno messo in evidenza elevate sieroprevalenze (Lazizi Y.K. *et al.*, 1999).

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

Un ulteriore supporto all'ipotesi che vede il suino quale probabile serbatoio d'infezione per l'uomo è venuto da studi sieroepidemiologici condotti in USA, Taiwan, Moldova e Grecia. In questi studi sono state osservate sieropositività nei confronti di HEV significativamente più elevate in persone professionalmente esposte al contatto con suini rispetto a popolazioni di controllo. La presenza di anticorpi anti-HEV in allevatori di suini del Nord Carolina è risultata di 4,5 volte superiore rispetto a quella in altre categorie professionali (Withers M.R. *et al.*, 2002). Sempre negli Stati Uniti, Meng e coll. hanno rilevato che il 26% dei veterinari è sieropositivo per HEV contro il 18% dei normali donatori di sangue (Meg X.J. *et al.*, 2002). A Taiwan e in Moldova rispettivamente il 26,7% ed il 51,1% delle persone che lavorano a contatto con suini possiedono anticorpi anti-HEV, contro l'8% ed il 24,5% delle rispettive popolazioni di controllo (Hsieh S.Y. *et al.*, 1999; Drobeniuc J. *et al.*, 2001). In Grecia è stato rilevato che il 40% degli allevatori di suini ed il 22,2% dei macellatori sono sieropositivi per HEV, contro il 15,7% dei normali donatori di sangue (Siochu A. *et al.*, 2004).

Evidenze dirette della trasmissione del virus dagli animali all'uomo sono state riportate in Giappone dove casi di malattia sono stati associati al consumo, poche settimane prima dell'inizio dei sintomi, di carni crude di cinghiale e cervo Sika. In

particolare in uno studio effettuato in Giappone, 4 persone che avevano mangiato carne cruda di un cervo Sika hanno sviluppato un'epatite acuta. Queste persone presentavano anticorpi anti-HEV ed inoltre il virus è stato anche svelato tramite PCR nel siero dei pazienti ed in un pezzo di carne di cervo congelata. Analisi filogenetiche hanno dimostrato un'omologia nucleotidica del 100% tra gli isolati umani e animali, indicando che la carne infetta era stata la fonte comune di contagio (Tei S. *et al.*, 2003).

Gli studi virologici ed epidemiologici condotti in questi ultimi anni hanno dimostrato come l'epatite E può essere considerata una nuova zoonosi. Il virus sembra avere nella specie suina il principale serbatoio animale ed è certo che l'infezione può essere acquisita per via alimentare attraverso il consumo di prodotti carnei contaminati poco cotti. Va inoltre ricordata la possibilità di contaminazione crociata tra prodotti carnei crudi ed altri alimenti pronti per il consumo ed il possibile rischio di diffusione del virus nell'ambiente con i reflui di allevamenti suinicoli, con conseguente possibile contaminazione delle acque potabili, di balneazione e ad uso irriguo con contaminazione dei vegetali. Come avviene per il virus dell'epatite A, l'inquinamento delle acque può portare alla contaminazione di molluschi eduli lamellibranchi filtratori. Un'altra possibile modalità di infezione è il contatto diretto con gli animali; in questo le categorie professionali a rischio sono allevatori, operai agricoli e veterinari che possono venire a contatto con suini nel periodo di viremia e di escrezione del virus nelle feci. Infine, la scoperta del virus HEV suino ha creato un ulteriore problema per le prospettive della pratica degli xenotrapianti. Tale pratica nell'uomo è stata suggerita come possibile soluzione alla carenza di organi, tuttavia la possibilità di trasmissione di patogeni dall'animale donatore desta preoccupazione.

---

## Capitolo 5: Ricerche Personali

---

---

### ► 5.1 Introduzione

Il notevole interesse che negli ultimi anni hanno suscitato le nuove conoscenze sulla epidemiologia delle infezioni da HEV nell'uomo e negli animali è stato il motivo che ci ha spinto ad intraprendere una indagine con lo scopo di ricercare la presenza della infezione anche in allevamenti suini toscani. HEV non è coltivabile su colture cellulari, e pertanto la sua presenza nei campioni deve essere evidenziata con metodiche che svelino i suoi antigeni o il suo genoma. Nella nostra indagine abbiamo optato per la messa in evidenza della presenza dell'RNA virale mediante PCR. Tale tecnica ha raggiunto ottimi livelli di sensibilità, i costi si sono notevolmente ridotti ed in letteratura era già segnalata la sua applicazione per la ricerca di HEV. La PCR permette anche un ulteriore studio delle caratteristiche genetiche degli amplificati virali attraverso il loro confronto con quelli di altri isolati ottenuti da diverse specie animali e in diverse aree geografiche.

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

---

## ➤ *5.2 Materiali e metodi*

---

### ◇ *5.2.1 Raccolta dei campioni*

Vengono prelevati 45 campioni fecali collettivi in 7 allevamenti dislocati nelle province di Massa-Carrara, Lucca, Pisa e Pistoia (vedi tabella 5.1). I campioni collettivi, costituiti da porzioni di feci, sono prelevati in diversi punti all'interno dei box di stabulazione; ogni box contiene suini di età omogenea, variabile da 1 mese ad oltre 9 mesi (vedi tabella 6.1). Per ciascun campione viene riempito un barattolo sterile con tappo a vite da 100 ml. I campioni vengono trasportati al laboratorio di virologia del Dipartimento di Patologia Animale dell'Università di Pisa entro le 24 ore e congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al processamento. La distribuzione dei campioni per allevamento è riportata nella tabella 5.1.

Allevamento	caratteristiche	N° capi	N° CAMPIONI
A	Intensivo a ciclo chiuso	Circa 1500	22
B	A conduzione familiare, ciclo chiuso	Circa 60	5
C	A conduzione familiare, ciclo chiuso	Circa 70	2
D	A conduzione familiare, ciclo chiuso	Circa 30	3
E	Intensivo a ciclo chiuso	Oltre 2000	6
F	Intensivo a ciclo chiuso	Circa 1000	6
H	A conduzione familiare, a ciclo aperto	Circa 30	1
Totale	7		45

Tabella 5.1: distribuzione dei campioni provenienti dagli allevamenti toscani

---

### ◇ 5.2.2 Preparazione dei campioni

Dopo lo scongelamento, una aliquota fecale di circa 1-3 g viene sottoposta a chiarificazione al 10% P/V in PBS 1X pH 7.2 sterile in un tubo Falcon da 50 ml. Per favorire l'omogeneizzazione, al campione sono aggiunte sfere di vetro sterili di 2 mm di diametro; tutto il contenuto della provetta viene sottoposto a un vigoroso mescolamento mediante *vortex* per circa 2 minuti.

La provetta è quindi centrifugata a 4°C a 3000 rpm (*revolutions per minute*) per 1 ora. Il sovrnatante contenente le particelle virali è trasferito in provette sterili e centrifugato per 10' a 14000 rpm. Il sovrnatante è trasferito in *ependorf* sterili da 1.5 ml ed utilizzato per l'estrazione dell'RNA virale.

---

### ◇ 5.2.3 Estrazione dell'RNA virale

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

Sono aggiunti 140 µl della sospensione fecale a 560 µl di *buffer* AVL, il quale fornisce le condizioni altamente denaturanti fondamentali per la lisi del capsido virale e per l'inattivazione delle RNasi. Nel *buffer* AVL è presente un RNA *carrier* che rende più affine il legame dell'RNA virale alla membrana e limita una possibile degradazione dovuta ad attività RNasica residua. Dopo aver agitato mediante *vortex* la soluzione per 15 secondi, questa è lasciata per 10 minuti a temperatura ambiente per completare la lisi. Sono quindi aggiunti 560 µl di etanolo assoluto per favorire il legame dell'RNA con la membrana. La soluzione è caricata sulle colonne e centrifugata per 1 minuto a 8000 rpm per permettere all'RNA di legarsi alla membrana. Dopo aver scartato il filtrato, sono effettuati un primo lavaggio con 500 µl di *buffer* AW1 e una centrifugazione di 1 minuto a 8000 rpm. Seguono un secondo lavaggio con *buffer* AW2 (500 µl) e una centrifugazione di 3 minuti a 14000 rpm. Il filtrato è scartato ogni volta. L'RNA virale è eluito dalla colonna con 60 µl di *buffer* AVE, una soluzione acquosa priva di RNasi. Il *buffer* è fatto agire per 1 minuto a temperatura ambiente; segue una centrifugazione della colonna di 1 minuto a 8000 rpm per recuperare infine il filtrato.

---

#### ◇ 5.2.4 Retrotrascrizione dell'RNA virale

Cinque  $\mu\text{l}$  della soluzione contenente l'RNA sono retrotrascritti utilizzando l'enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (M-MLV RT), Sigma<sup>®</sup>, seguendo il protocollo fornito dalla ditta. M-MLV RT è un enzima estratto dal virus *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) in grado, come tutte le trascrittasi inverse, di sintetizzare DNA a doppio filamento a partire da RNA a singolo filamento. Per iniziare la reazione di retrotrascrizione, l'enzima necessita di un *primer*, che può essere a "strategia specifica" (il primer antisenso o *reverse* costruito per l'amplificazione) oppure *random* (un *primer* consistente di 6-9 nucleotidi che si lega in maniera aspecifica alla sequenza di RNA).

La procedura seguita prevede la preparazione di due miscele di reagenti, la prima contenente il campione con l'RNA, il *primer reverse* 3157 ed una miscela di desossinucleotidi dNTPs (*mix* RNA) e la seconda contenente l'enzima trascrittasi inversa ed un inibitore delle RNasi (*mix* RT; vedi tabella 5.2).

MIX RNA		MIX RT	
dNTPs	1 $\mu\text{l}$	<i>Buffer</i> 10x	2 $\mu\text{l}$
3157	1 $\mu\text{l}$	RT	1 $\mu\text{l}$
RNA	5 $\mu\text{l}$	Inibitore RNasi	0.5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	3 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O	6.5 $\mu\text{l}$
V. totale	10 $\mu\text{l}$	V. totale	10 $\mu\text{l}$

Tabella 5.2: quantità di reagenti per la reazione di RT di un singolo campione

La *mix* RNA è incubata per 10 minuti a 70°C per eliminare tutte le strutture secondarie presenti nell'RNA, le quali potrebbero impedire una fedele retrotrascrizione, e mantenuta a 4°C. È quindi aggiunta la *mix* RT per arrivare ad un volume totale di 20 µl. La miscela è incubata per 10 minuti a temperatura ambiente e poi trasferita nel termocicizzatore a 37°C per 50 minuti (temperatura a cui lavora l'enzima RT), per permettere la retrotrascrizione dell'RNA virale. L'enzima M-MLV RT è quindi inattivato mediante incubazione per 10 minuti a 94°C.

---

### ◇ 5.2.5 Amplificazione del cDNA

Il cDNA, ottenuto in seguito a retrotrascrizione, è utilizzato come stampo per le reazioni di amplificazione (PCR e *nested* PCR). Per la reazione a catena della polimerasi è utilizzato “HotStarTaq PCR kit” (Qiagen<sup>®</sup>), che include una DNA polimerasi “*hot start*”, stabile a temperatura ambiente ed attivata solo alle alte temperature. Questa peculiarità tecnica è molto utile in quanto impedisce la formazione di prodotti aspecifici già a temperatura ambiente, potenzialmente risultanti dal non corretto appaiamento dei *primer*, o di dimeri di *primer*. Questa DNA polimerasi si attiva incubandola a 95°C per 15 minuti. I *primer* vengono utilizzati alla concentrazione finale di 0.3 µM, mentre il magnesio a 1.5 mM (già presente nel *buffer*).

I *primer* della PCR sono chiamati 3156 e 3157 (Meng X.J. *et al.*, 1997), mentre quelli della *nested* 3158 e 3159 (Meng X.J. *et al.*, 1997). Tutti i *primer* sono localizzati nella regione ORF 2 di HEV. La prima PCR genera un frammento di 727 bp (*base pairs*), mentre la seconda uno di 347 bp.

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

Tabella 5.3: *primer* utilizzati nelle reazioni di PCR (Y = C o T; M = A o C).

Tutti e quattro i *primer* sono degenerati in modo da poter amplificare diversi stipiti del virus. Come controllo positivo è utilizzato RNA virale estratto da feci umane, gentilmente fornito dalla Dottoressa Luisa Romanò dell'Università di Milano.

Di seguito vengono elencati i reagenti per singolo campione (tabella 5.4) ed i cicli delle due reazioni di PCR.

1 <sup>a</sup> PCR		2 <sup>a</sup> PCR (nested)	
Buffer 10x	5 µl	Buffer 10x	5 µl
dNTPs 10 mM	1 µl	dNTPs 10 mM	1 µl
3156	0.75 µl	3158	0.75 µl
3157	0.75 µl	3159	0.75 µl
cDNA	5 µl	templato	3 µl
Taq	0.5 µl	Taq	0.5 µl
H <sub>2</sub> O	37 µl	H <sub>2</sub> O	39 µl
Vtot	50 µl	Vtot	50 µl

Tabella 5.4: quantità di reagenti per le reazioni di PCR per singolo campione

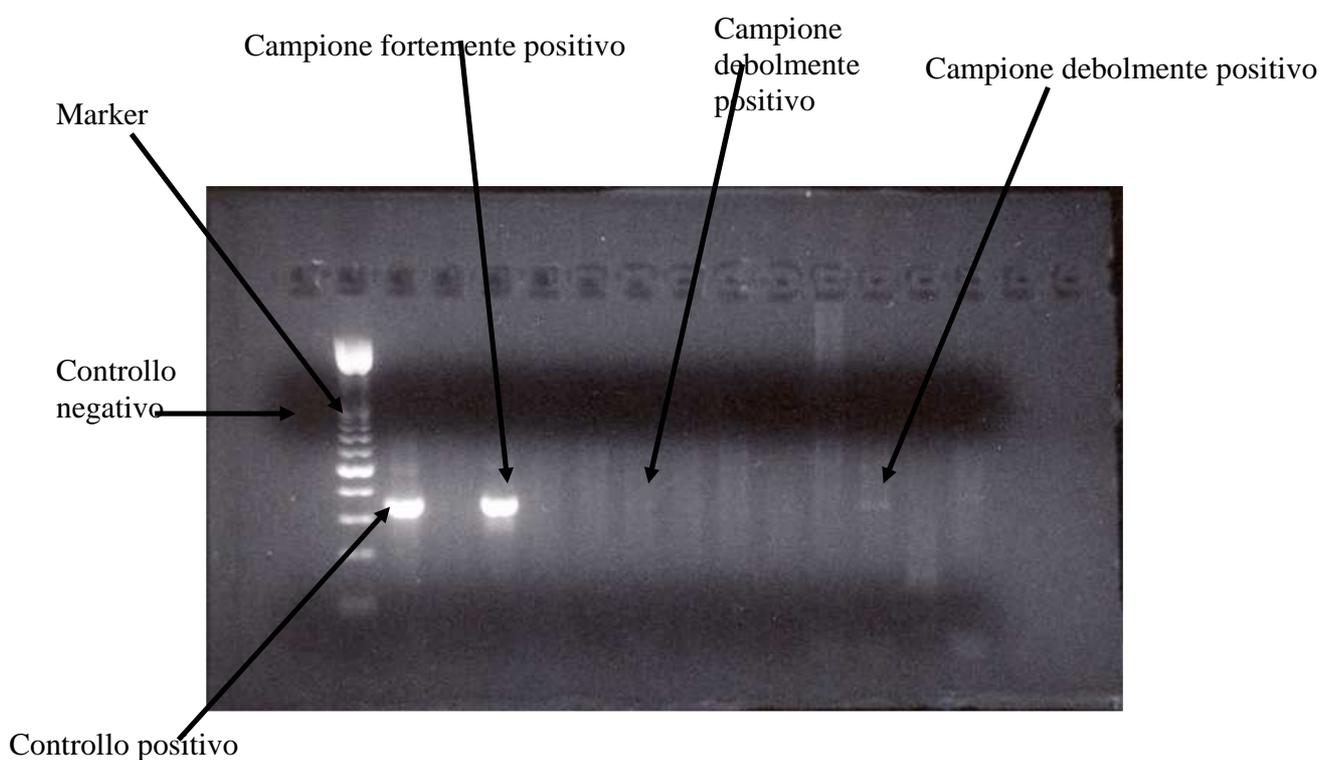
Cicli della prima PCR		
Temperatura e tempo		
95°C	15 minuti	
94°C	30 secondi	40 cicli
60°C	30 secondi	
72°C	1 minuto	
72°C	10 minuti	
4°C	∞	

Cicli della seconda PCR		
Temperatura e tempo		
95°C	15 minuti	
94°C	30 secondi	40 cicli
55°C	30 secondi	
72°C	1 minuto	
72°C	10 minuti	
4°C	∞	

---

### ◇ 5.2.6 Corsa elettroforetica degli amplificati

Per verificare la presenza dell'amplificato è effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% di un'aliquota di 10 µl del prodotto della *nested* PCR. Il gel è preparato aggiungendo 6 g di agarosio in polvere a 300 ml di Tris Borato EDTA 1X (TBE 1X). Prima della polimerizzazione sono aggiunti 12.5 µl di bromuro di etidio (10 mg/ml). Ciascun campione è preparato aggiungendo 2 µl di *loading buffer* 6X a 10 µl di amplificato. La stima delle dimensioni dell'amplificato è valutata caricando in un pozzetto 3 µl del "Marker XIII 50 bp" (Roche®). La corsa è condotta a 110 V per circa 1 ora. Le bande sono visualizzate mediante esposizione a raggi UV. Nella figura seguente è riportata una foto di un gel con alcuni campioni positivi.



---

### ◇ 5.2.7 Clonaggio dell'amplificato

La banda della corretta lunghezza (347 bp), corrispondente al segmento amplificato atteso, è escissa dal gel. Il cDNA è recuperato con “MiniElute Gel Extraction Kit” (Qiagen®) seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Il kit prevede un'eluizione finale in 10 µl consentendo di concentrare il DNA estratto. La banda tagliata è messa in una provetta e pesata. Seguono l'aggiunta di 3 volumi di buffer QG (100 µl per 100 mg di gel) e un'incubazione a 50°C per 10 minuti. Al termine è aggiunto 1 volume di isopropanolo e la soluzione è trasferita in una colonna contenente una membrana in grado di legare il DNA. Sono effettuati due lavaggi: il primo con 500 µl di buffer QG (per eliminare ogni traccia di agarosio) ed il secondo con 750 µl di buffer PE. Tutte le centrifugazioni sono effettuate a 13000 rpm per 1 minuto ed ogni volta il filtrato è scartato. L'eluizione finale è effettuata in 10 µl di buffer EB.

Un'aliquota di 1 µl di DNA recuperato è sottoposto a campo elettroforetico a voltaggio costante (100 V per circa 1 ora) su gel di agarosio al 2% per valutarne approssimativamente la quantità.

Il frammento amplificato è clonato nel vettore TOPO2.1 con il *kit* “TOPO TA Cloning” (Invitrogen). L'inserimento del frammento è permesso dall'utilizzo della soluzione di 6

μl totali costituita da 2 μl di DNA, 1 μl di *Salt Solution*, 1μl di *TOPO vector* e 2 μl di acqua deionizzata sterile. Segue un'incubazione della soluzione a temperatura ambiente per 5 minuti. Dopo un passaggio in ghiaccio, è seguito il protocollo di trasformazione rapida fornito dal *kit*. Quattro μl della *mix* sono aggiunti a cellule Top 10F' chimicamente competenti. Quest'ultime sono incubate in ghiaccio per 5 minuti; al termine 50 μl di cellule trasformate sono distribuiti su piastre Petri contenenti LB agar 1.5%, ampicillina 50 μg/ml e 40 μl X-gal 40 mg/ml. Le piastre sono incubate a 37°C *overnight*. Le colonie che hanno incorporato l'inserto sono di colore bianco, mentre quelle che non lo hanno incorporato di colore blu (*screening* bianco/blu).

Alcune delle colonie bianche sono trapiantate in 6 ml di LB brodo contenente ampicillina 50 μg/ml ed incubate a 37°C *overnight*. A crescita batterica completata, la coltura è centrifugata per raccogliere il *pellet* di cellule batteriche contenenti il vettore di interesse.

L'estrazione del DNA plasmidico è effettuata con "QIAprep<sup>®</sup> Miniprep kit" (Qiagen) seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Il *pellet* batterico è risospeso in 250 μl di *buffer* P1. Sono aggiunti 250 μl di *buffer* P2 (per lisare le cellule batteriche) e 350 μl di *buffer* N3 (per neutralizzare l'eccessiva alcalinità del *buffer* P2). La soluzione è poi centrifugata a 13000 rpm per 10 minuti ed il surnatante, contenente il DNA plasmidico, è trasferito in una colonna contenente una membrana in grado di legare il DNA. Il tutto è centrifugato a 13000 rpm per 30 secondi. Quindi è eseguito un lavaggio con 750 μl di *buffer* PE. L'eluizione finale è effettuata in 50 μl di *buffer* EB.

La presenza dell'inserto nel plasmide è verificata mediante reazione di *nested* PCR con il protocollo descritto in precedenza, utilizzando i *primer* 3158 e 3159 e 1 μl di DNA plasmidico come stampo.

---

### ◇ 5.2.8 Sequenziamento ed Analisi filogenetica

L'analisi filogenetica è effettuata su un frammento di 300 bp del gene ORF 2 di HEV utilizzato anche in altri studi (Meng XJ *et al.*, 1997; Banks M. *et al.*, 2004; Tolari F. *et al.*, 2006), per confrontare tra loro isolati virali.

Da circa 500 ng di DNA plasmidico è ottenuto un *pellet* secco che spedito alla ditta BMR (Università di Padova) è stato sequenziato.

Le sequenze ottenute sono allineate con il programma "Bioedit" (versione 7.0.5.2, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) utilizzando l'algoritmo "ClustalW".

L'analisi filogenetica è effettuata con il pacchetto di programmi PHYLIP (versione 3.6) utilizzando NEIGHBOR. I valori di *bootstrapping* (500 ripetizioni) sono calcolati con *software* SEQBOOT e CONSENSE. Gli alberi filogenetici sono ottenuti con il programma Treeview. Per la rappresentazione dell'albero tramite un filogramma è utilizzato come *outgroup* il virus HEV aviario.

Le sequenze sottoposte agli studi filogenetici sono sette: quattro provenienti dall'allevamento A, due dall'allevamento E ed una dall'allevamento C, chiamate rispettivamente HEV17S, HEV18S, HEV19S, HEV22S, HEVE3, HEVE4 e HEVC1.

---

## Capitolo 6: Risultati

---

---

### ➤ 6.1 *Nested RT-PCR e Clonaggio degli inserti virali*

Per verificare il corretto funzionamento dei protocolli, sono amplificati alcuni controlli positivi. Il protocollo di Nested RT-PCR descritto in Materiali e Metodi si dimostra in grado di amplificare frammenti virali della dimensione attesa ed è quindi applicato agli RNA estratti dai campioni fecali.

Il protocollo utilizzato prevede il clonaggio del frammento in un vettore TOPO2.

Il protocollo di trasformazione veloce si dimostra molto efficace producendo diverse decine di colonie bianche. Tre colonie per ogni amplificato sono state fatte crescere in terreno liquido LB. Lo *screening* delle colonie, effettuato mediante PCR, dimostra che tutte le colonie selezionate hanno incorporato il frammento di interesse.

## ▶ 6.2 Screening dei Campioni

I campioni fecali risultati positivi alla RT-Nested PCR sono 11 su 45 (24,4%), provenienti da 3 dei 7 allevamenti controllati (42,8%).

Sono positivi 7 campioni su 22 dell'allevamento A (31,8%), 3 su 6 dell'E (50%) e 1 su 2 del C (50%).

Il maggior numero di soggetti positivi è rilevato nella classe di età 3-5 mesi (vedi tabella 6.2).

<b>Classe di età</b>	<b>Numero di campioni</b>	<b>Campioni positivi</b>	<b>%</b>
<i>&lt; 2 mesi</i>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>2-3 mesi</i>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>30</b>
<i>3-5 mesi</i>	<b>20</b>	<b>8</b>	<b>40</b>
<i>6-9 mesi</i>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>&gt;9 mesi</i>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Tabella 6.1: risultati per classe di età.

<b>Classe di età</b>	<b>Numero di campioni</b>	<b>di Campioni positivi</b>	<b>%</b>
<i>&lt; 2 mesi</i>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>2-3 mesi</i>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>50</b>
<i>3-5 mesi</i>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>67</b>
<i>6-9 mesi</i>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>&gt;9 mesi</i>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Totale</b>	<b>30</b>	<b>11</b>	<b>37</b>

Tabella 6.2: risultati per classe di età negli allevamenti positivi.

---

## 6.3 Analisi Filogenetica

Gli amplificati sequenziati sono 9 sugli 11 ottenuti.

Una colonia per ogni amplificato è sequenziata sui due filamenti.

Le sequenze di due amplificati contengono ambiguità che non ne permettono l'utilizzo per l'analisi filogenetica.

La variabilità genetica delle sette sequenze ottenute risulta limitata, soprattutto quella delle sequenze provenienti dallo stesso allevamento. Nella tabella 6.3 è riportata la matrice delle distanze per le sequenze analizzate, ottenuta dividendo il numero di sostituzioni per la lunghezza della sequenza. Le differenze ottenute oscillano dall'0,006% al 25,38%, derivanti rispettivamente dal confronto tra le sequenze HEV19S e HEV22S, e tra HEVE3 e HEV19S.

	<b>HEV19S</b>	<b>HEV22S</b>	<b>HEV18S</b>	<b>HEV17S</b>	<b>HEVE3</b>	<b>HEVE4</b>	<b>HEVC1</b>
<b>HEV19S</b>	<b>0.0000</b>	0.0067	0.0101	0.0134	0.2538	0.2060	0.1860
<b>HEV22S</b>	0.0067	<b>0.0000</b>	0.0101	0.0134	0.2485	0.2012	0.1814
<b>HEV18S</b>	0.0101	0.0101	<b>0.0000</b>	0.0101	0.2485	0.2012	0.1814
<b>HEV17S</b>	0.0134	0.0134	0.0101	<b>0.0000</b>	0.2438	0.1883	0.1773
<b>HEVE3</b>	0.2538	0.2485	0.2485	0.2438	<b>0.0000</b>	0.0714	0.1448
<b>HEVE4</b>	0.2060	0.2012	0.2012	0.1883	0.0714	<b>0.0000</b>	0.0863
<b>HEVC1</b>	0.1860	0.1814	0.1814	0.1773	0.1448	0.0863	<b>0.0000</b>

Tabella 6.3: matrice delle distanze delle sequenze HEV19S, HEV22S, HEV18S, HEV17S, HEVE3, HEVE4 e HEVC1.

Le differenze nella sequenza aminoacidica risultano basse; nello specifico, di un aminoacido su cento tra le quattro sequenze derivanti dall'allevamento A e sette su cento tra le due sequenze dell'allevamento E. La percentuale di uguaglianza tra tutte e sette le sequenze aminoacidiche è dell'80%.

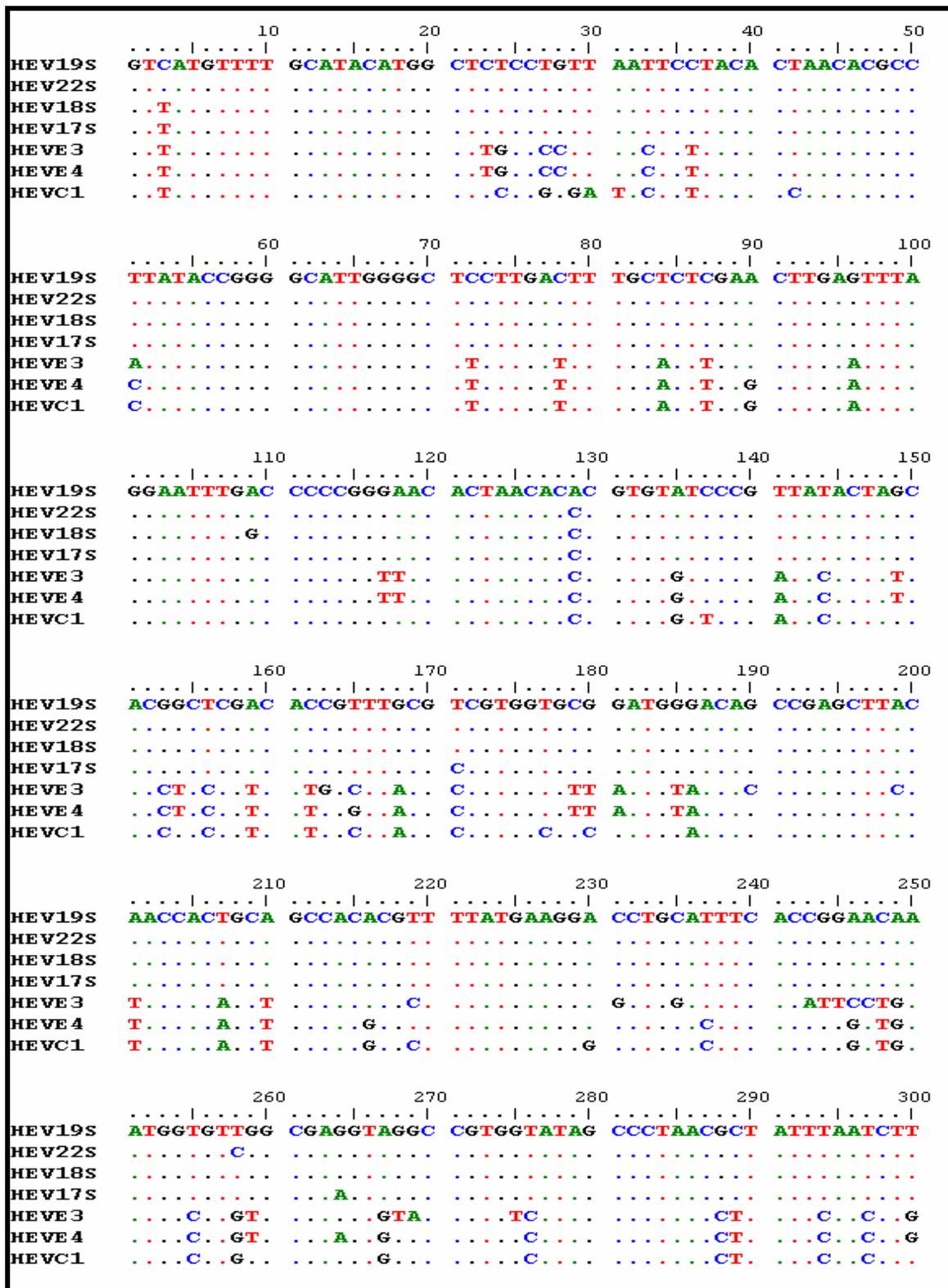


Figura 6.2: allineamento delle sequenze nucleotidiche HEVE3, HEVE4, HEVC1, HEV19s, HEV22s, HEV18s e HEV17s.

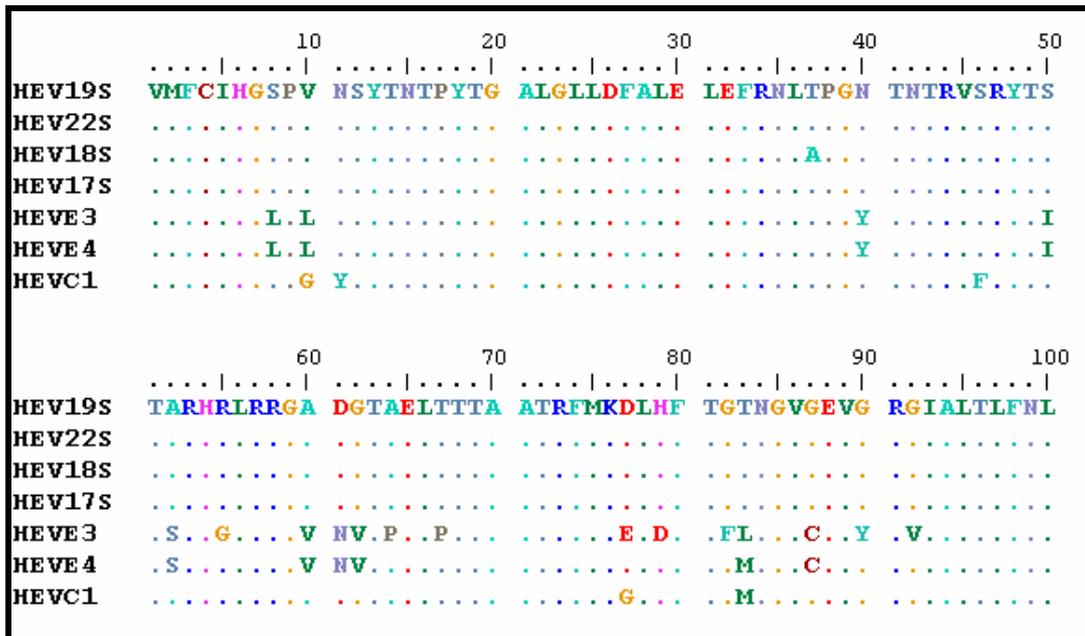


Figura 6.3: allineamento delle sequenze aminoacidiche HEVE3, HEVE4, HEVC1, HEV19s, HEV22s, HEV18s e HEV17s.

Le nostre sequenze sono confrontate con sequenze di origine suina e ed umana di varia provenienza geografica ed appartenenti ai diversi genotipi; con esse è ottenuto un albero filogenetico.

L'albero filogenetico evidenzia che tutte e sette le sequenze appartengono al genotipo III e che sono molto vicine ad altri isolati europei sia umani che suini.

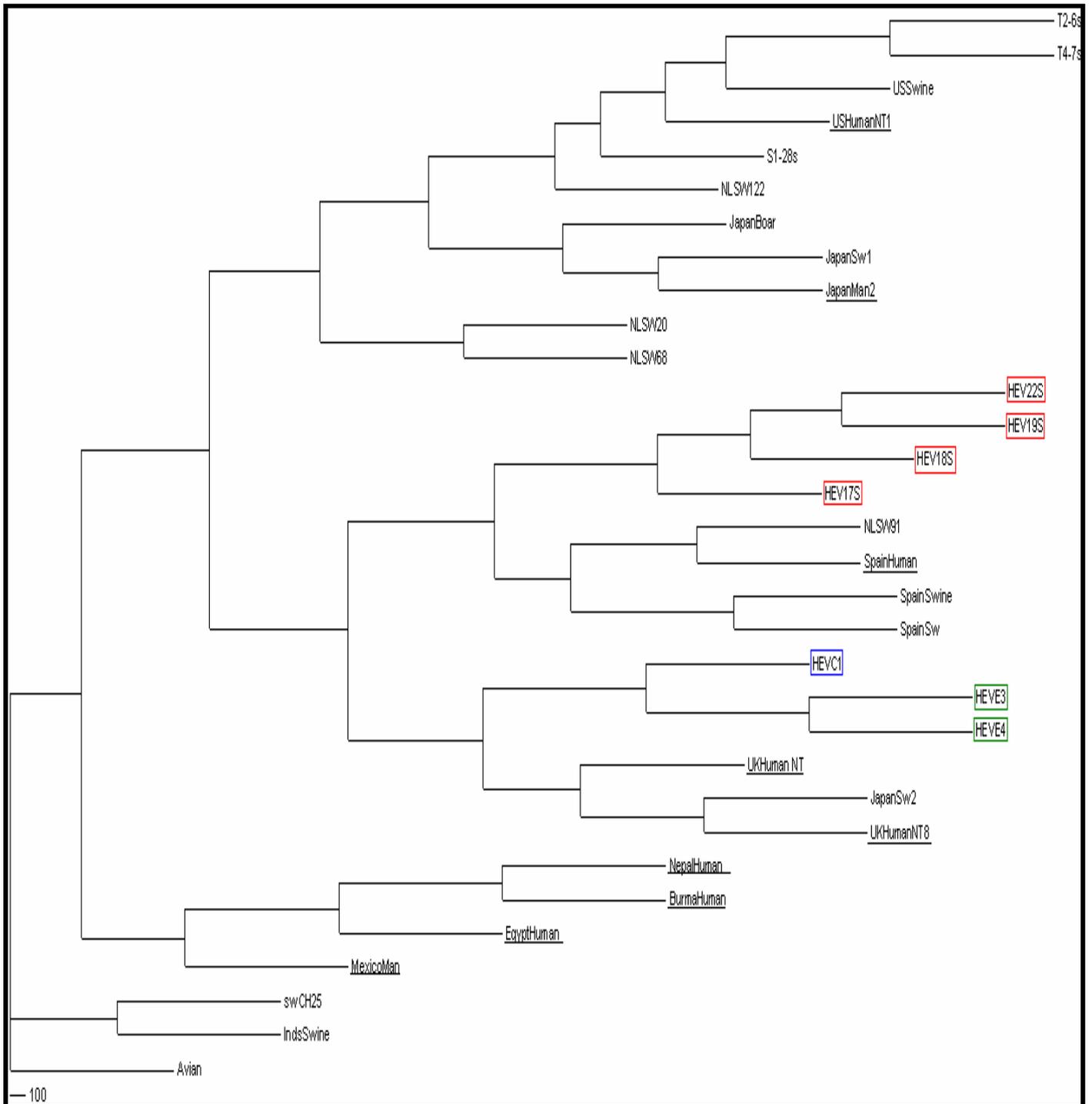


Figura 6.4: albero filogenetico di isolati di HEV di origine umana e suina

---

## Capitolo 7: Discussione

---

Il virus dell'epatite E non crea problemi alla produzione suinicola, in quanto l'infezione in questi animali è generalmente asintomatica; l'importanza della sua presenza negli allevamenti è legata soprattutto al rischio di trasmissione all'uomo.

Nei paesi industrializzati molti dei casi di epatite E umana sono riscontrati in persone di ritorno da zone endemiche. Ma un numero crescente di casi si osserva attualmente anche in persone che non hanno viaggiato in tali zone. In questi casi, può risultare difficile risalire alla fonte d'infezione, ma il sospetto che siano presenti in natura serbatoi animali di HEV, responsabili del contagio all'uomo, è attualmente abbastanza fondato. Recentemente, uno studio su casi umani di epatite E acuta, effettuato in Francia, evidenzia che solo il 13% dei pazienti ha soggiornato in Paesi dove l'infezione è endemica, concludendo che nella maggior parte dei casi l'infezione viene contratta all'interno del Paese (Peron J.M. *et al.*, 2006).

Gli animali sospettati di avere un ruolo di diffusori del virus sono principalmente suino e roditori. Studi effettuati in diversi Paesi, sviluppati e non, riportano un'alta sieroprevalenza tra i roditori, ma fino ad ora il virus non è ancora stato isolato da questi animali.

Numerosi sono invece gli isolati di origine suina identificati in molti Paesi. Studi filogenetici riportano una forte omologia tra isolati suini ed umani della stessa regione geografica (Tolari F. *et al.*, 2006).

Il presente studio, in accordo con quelli effettuati in altri Paesi (Banks M. *et al.*, 2004; Meng X.J. *et al.*, 1997; van der Poel WHM *et al.*, 2001), indica che le infezioni da HEV sono abbastanza frequenti anche negli allevamenti suini toscani.

Il nostro risultato, seppur basato su indagini preliminari effettuate su un numero contenuto di allevamenti, rileva una percentuale di allevamenti positivi piuttosto alta (43%) in analogia con le ricerche effettuate negli Stati Uniti da Huang e collaboratori, i quali hanno evidenziato la presenza del genoma virale nel 54% degli allevamenti esaminati. Nei Paesi europei ricerche estensive sono state condotte solo in Olanda e Gran Bretagna dove le percentuali di allevamenti infetti sono rispettivamente del 22% e del 15% .

Il fatto che gli allevamenti risultati positivi sono due di tipo intensivo, mentre uno ha un numero limitato di capi, ci può suggerire che l'infezione sia diffusa anche nei piccoli allevamenti di tipo familiare.

Anche in questa indagine si è accertato che la classe di età che presenta la più alta percentuale di positività al virus è quella che va dai 3 ai 5 mesi. Questo dato indica che probabilmente il virus circola costantemente e che i suinetti contraggono l'infezione precocemente quando si abbassa l'immunità passiva.

Gli stipiti da noi identificati appartengono al genotipo III, quello maggiormente responsabile di casi sporadici di epatite E umana nei Paesi sviluppati come Stati Uniti, Spagna e Giappone.

Gli amplificati ottenuti nella nostra indagine sono simili a quelli di origine suina ed umana ottenuti in diversi Paesi europei. In particolare risultano molto vicini alle sequenze suine olandesi, a quelle suine ed umane spagnole ed a quelle umane britanniche, tutte appartenenti al genotipo III.

Ulteriori indagini saranno necessarie per chiarire l'importanza che gli stipiti di HEV di origine suina possono avere nell'insorgenza dei casi di infezione nell'uomo, le modalità di trasmissione più frequenti, compreso il consumo di carni suine, l'eventuale ruolo di altre specie animali come serbatoio del virus.

---

---

## *Ringraziamenti*

*Ringrazio il Prof. Francesco Tolari per l'opportunità che mi ha concesso e per l'aiuto nella stesura del testo. Persone indispensabili nel lavoro svolto sono il Dott. Livio Del Chiaro che mi ha aperto le porte del laboratorio, e la Dott.ssa Chiara Dell'Amico per l'aiuto e i tanti suggerimenti. Per la disponibilità sempre dimostrata nei miei confronti ringrazio la Dott.ssa Maria Luisa Carozza e il Dott. Maurizio Mazzei.*

*Per l'aiuto nella raccolta dei campioni ringrazio il Dott. Angelo Bogazzi, il Dott. Picciolli e i veterinari dell'area A dell'ASL 12 di Viareggio.*

*Come non menzionare i miei compagni di corso, Federico, Andrea, Gaetano, Elisa, Eleonora, Elena, Valentina, Vanessa, Ziad, Fabiana, Giulia, Marcella, Alice, Sara, Francesca, Elisa e tutti gli altri, che, anche se non sono direttamente coinvolti in questa tesi, sicuramente hanno avuto un ruolo importante in tutti questi anni di studio a Pisa.*

*Non sarei mai arrivato fin qui senza il continuo appoggio della mia famiglia.*

*Un ringraziamento particolare va al mio cervello, che è riuscito a portarmi fino a questo punto, speriamo che non molli !*

---

## *Riferimenti Bibliografici*

---

Aggarwal R., Krawczynski K.

Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research.  
*Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2000 Jan;15(1):9-20.

Arankalle V.A., Joshi M.V., Kulkarni A.M., Gandhe S.S., Chobe L.P., Rautmare S.S.,  
Mishra A.C., Padbidri V.S.

Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species.  
*Journal of Viral Hepatitis*. 2001 May;8(3):223-7.

Balayan M.S., Andjaparidze A.G., Savinskaya S.S., Ketiladze E.S., Braginsky D.M.,  
Savinov A.P., Poleschuk V.F.

Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route.  
*Intervirology*. 1983;20(1):23-31.

Banks M., Heath G.S., Grierson S.S., King D.P., Gresham A., Girones R., Widen F.,  
Harrison T.J.

Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom.  
*The Veterinary Record*. 2004a Feb 21;154(8):223-7.

Banks M, Bendall R, Grierson S, Heath G, Mitchell J, Dalton H.

Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom.  
*Emerging Infectious Disease*. 2004b May;10(5):953-5.

Berke T., Matson D.O.

Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E  
virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis.  
*Archives of Virology*. 2000;145(7):1421-36.

Blacksell S.D., Myint K.S., Khounsy S., Phruaravanh M., Mammen M.P. Jr, Day N.P.,  
Newton P.N.

Prevalence of hepatitis E virus antibodies in pigs: implications for human infections in  
village-based subsistence pig farming in the Lao PDR.  
*Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006 Aug 17;

Bradley D.W.

Hepatitis E: epidemiology, aetiology and molecular biology.

*Review of Medical Virology*, 1992, 2:19-28.

Cacopardo B., Russo R., Preiser W., Benanti F., Brancati G., Nunnari A.

Acute hepatitis E in Catania (eastern Sicily) 1980-1994. The role of hepatitis E virus.

*Infection*. 1997 Sep-Oct;25(5):313-6.

Caron M., Enouf V., Than S.C., Dellamonica L., Buisson Y., Nicand E.

Identification of genotype 1 hepatitis e virus in samples from swine in Cambodia.

*Journal of Clinical Microbiology*. 2006 Sep;44(9):3440-2.

Chandler J.D., Riddell M.A., Li F., Love R.J., Anderson D.A.

Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds.

*Veterinary Microbiology*. 1999 Aug 16;68(1-2):95-105.

Choi C., Chae C.

Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization.

*Journal of Hepatology*. 2003 Jun;38(6):827-32.

Choi I.S., Kwon H.J., Shin N.R., Yoo H.S.

Identification of swine hepatitis E virus (HEV) and prevalence of anti-HEV antibodies in swine and human populations in Korea.

*Journal of Clinical Microbiology*. 2003 Aug;41(8):3602-8.

Clayson E.T., Innis B.L., Myint K.S., Narupiti S., Vaughn D.W., Giri S., Ranabhat P., Shrestha M.P.

Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal.

*The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995 Sep;53(3):228-32.

Clemente-Casares P., Pina S., Buti M., Jardi R., Martin M., Bofill-Mas S., Girones R.

Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries.

*Emerging Infectious Disease*. 2003 Apr;9(4):448-54

Cooper K., Huang F.F., Batista L., Rayo C.D., Bezanilla J.C., Toth T.E., Meng X.J.

Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations.

*Journal of Clinical Microbiology*, 2005 Apr.; 43 (4): 1684-1688

De Donno A., Chironna M., Craca R., Paiano A., Zizza A., Guido M., Carrozzini F., Germinario C., Gabutti G.

Anti-HEV seroprevalence in the area of Lecce.

*Annali di Igiene*. 2003 May-Jun;15(3):199-205.

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.

Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine.

*Journal of Infectious Disease*. 2001 Dec 15;184(12):1594-7.

Ellis J., Clark E., Haines D., West K., Krakowka S., Kennedy S., Allan G.M.

Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field

*Veterinary Microbiology*. 2004; 98: 159-163.

Emerson S.U., Purcell R.H.

Hepatitis E virus.

*Reviews in medical virology*. 2003 May-Jun;13(3):145-54.

Emerson S.U., Nguyen H., Graff J., Stephany D.A., Brockington A., Purcell R.H.

In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein.

*Journal of Virology*. 2004 May;78(9):4838-46.

Emerson S.U., Arankalle V.A., Purcell R.H.

Thermal Stability of Hepatitis E Virus .

*The Journal of Infectious Diseases* 2005; 192(5): 930-933.

Engle R.E., Yu C., Emerson S.U., Meng X.J., Purcell R.H.

Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay.

*Journal of Clinical Microbiology*. 2002 Dec;40(12):4576-80.

Erker, J.C., Desai, S.M., Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Mushahwar, I.K.

A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques.

*Journal of General Virology*. 1999; 80: 681–690.

Fabrizi F., Lunghi G., Bacchini G., Corti M., Pagano A., Locatelli F.

Hepatitis E virus infection in haemodialysis patients: a seroepidemiological survey.

*Nephrology, dialysis, transplantation*. 1997 Jan;12(1):133-6.

Favorov M.O., Kosoy M.Y., Tsarev S.A., Childs J.E., Margolis H.S.  
Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States.  
*The Journal of Infectious Disease*. 2000 Feb;181(2):449-55.

Garkavenko O., Obriadina A., Meng X.J., Anderson D.A., Benard H.J., Schroeder B.A.,  
Khudyakov Y.E., Fields H.A., Croxson M.C.  
Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand.  
*Journal of Medical Virology*. 2001 Nov;65(3):525-9.

Gessoni G., Manoni F.  
Hepatitis E virus infection in north-east Italy: serological study in the open population  
and groups at risk.  
*Journal of Viral Hepatology*. 1996 Jul;3(4):197-202.

Graff J., Nguyen H., Yu C., Elkins W.R., St Claire M., Purcell R.H., Emerson S.U.  
The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and  
encodes a protein required for infection of macaques.  
*Journal of Virology*. 2005 Jun.;79(11):6680-9.

Green KY , Ando T , Balayan MS , Berke T , Clarke IN , Estes MK , Matson DO ,  
Nakata S , Neill JD , Studdert MJ , Thiel HJ . 2000  
Taxonomy of the Caliciviruses .

Grieco A., Miele L., Gasbarrini G., Grillo R.  
Sporadic HEV hepatitis in Italy.  
*Gut*. 2001 Apr;48(4):580.

Halbur P.G., Kasorndorkbua C., Gilbert C., Guenette D., Potters M.B., Purcell R.H.,  
Emerson S.U., Toth T.E., Meng X.J.  
Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a  
pig and a human.  
*Journal of Clinical Microbiology*. 2001 Mar.;39 (3): 918-923.

Haqshenas G., Shivaprasad H.L., Woolcock P.R., Read D.H., Meng X.J.  
Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E  
virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States.  
*Journal of General Virology*. 2001 Oct;82(Pt 10):2449-62.

Haqshenas G., Huang F.F., Fenaux M., Guenette D.K., Pierson F.W., Larsen C.T., Shivaprasad H.L., Toth T.E., Meng X.J.

The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus.

*Journal of General Virology*. 2002 Sep;83(Pt 9):2201-9.

Harrison T.J.

Hepatitis E virus - an update.

*Liver*. 1999, 19(3):171-176.

He J., Innis B.L., Shrestha M.P., Clayson E.T., Scott R.M., Linthicum K.J., Musser G.G., Gigliotti S.C., Binn L.N., Kuschner R.A., Vaughn D.W.

Evidence that rodents are a reservoir of hepatitis E virus for humans in Nepal.

*Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40:4493-8.

Hsieh S.Y., Meng X.J., Wu Y.H., Liu S.T., Tam A.W., Lin D.Y., Liaw Y.F.

Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus.

*Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37: 3828-3834

Huang C.C., Nguyen D., Fernandez J., Yun K.Y., Fry K.E., Bradley D.W., Tam A.W., Reyes G.R.

Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV).

*Virology*. 1992 Dec;191(2):550-8.

Huang F.F., Haqshenas G., Shivaprasad H.L., Guenette D.K., Woolcock P.R., Larsen C.T., Pierson F.W., Elvinger F., Toth T.E., Meng X.J.

Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis e virus from chickens in the United States.

*Journal of Clinical Microbiology*. 2002 Nov;40(11):4197-202.

Jameel S.

Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus.

*Expert Reviews in Molecular Medicine*. 1999 Dec 6;1999:1-16.

Khuroo M.S.

Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type.

*American Journal of Medicine*. 1980 Jun;68(6):818-24.

Kasorndorkbua C., Thacker B.J., Halbur P.G., Guenette D.K., Buitenwerf R.M., Royer R.L., Meng X.J.

Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus.

*Canadian Journal of Veterinary Research*. 2003; 67: 303-306.

Kasorndorkbua C., Guenette D.K., Huang F.F., Thomas P.J., Meng X.J., Halbur P.G.

Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs

*Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2004; 42 (11): 5047-5052.

Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A., Rozanov M.N., Reyes G.R., Bradley D.W.  
Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*. 1992 Sep 1;89(17):8259-63.

Kwo P.Y., Schlauder G.G., Carpenter H.A., Murphy P.J., Rosenblatt J.E., Dawson G.J., Mast E.E., Krawczynski K., Balan V.

Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States.

*Mayo Clinic proceedings*. 1997 Dec;72(12):1133-6.

Lazizi Y.K., Meng X.J., Purcell R.H., Emerson S.U.

Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped

*Journal of Virology*. October 1999; 73 (10): 8848-8850.

Lazizi Y.K., Fine J.B., ELM J., Glass G.E., Higa H., Diwan A., Gibbs C.J., Meng X.J., Emerson S.U., Purcell R.H.

Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States.

*American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999 ; 6 (12): 331-335.

Li T.C., Suzaki Y., Ami Y., Dhole T.N., Miyamura T., Takeda N.

Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles.

*Vaccine*. 2004 Jan 2;22(3-4):370-7.

Lu L, Li C, Hagedorn CH.

Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis.

*Reviews in medical virology*. 2006 Jan-Feb;16(1):5-36.

Marcato P.S., Perillo A .

Le epatiti virali nel suino e una nuova zoonosi, l'epatite E suina.

*Atti XXVI meeting annuale della società italiana di patologia ed allevamento dei suini.* 2000; 163-171.

Meng X.J., Purcell R.H., Halbur P.G., Lehman J.R., Webb D.M., Tsareva T.S., Haynes J.S., Thacker B.J., Emerson S.U.

A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997; 94: 9860–9865.

Meng X.J., Halbur P.G., Shpiro M.S., Govindarajan S., Bruna J.D., Mushahwar I.K., Purcell R.H., Emerson S.U.

Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus.

*Journal of Virology* . 1998a Dec;72(12):9714-21.

Meng X.J., Halbur P.G., Haynes J.S., Tsareva T.S., Bruna J.D., Royer R.L., Purcell R.H., Emerson S.U.

Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus( swine HEV), but not with human strains of HEV.

*Archives of Virology*, 1998b; 143: 1405-1415.

Meng X.J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D.K., Toth T.E., Engle R.E., Emerson S.U., Purcell R.H.

Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and others country .

*Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40: 117-222.

Nakamura M., Takahashi K., Taira K., Taira M., Ohno A., Sakugawa H., Arai M., Mishiro S.

Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence.

*Hepatology Research.* 2006 Mar;34(3):137-40.

Nishizawa T., Takahashi M., Mizuo H., Miyajima H., Gotanda Y., Okamoto H.

Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99 % identity over the entire genome.

*Journal of General Virology.* 2003 May;84(Pt 5):1245-51.

Orru G., Masia G., Orru G., Romano L., Piras V., Coppola R.C.  
Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR.

*Journal Virological Methods*. 2004 Jun 15;118(2):77-82.

Panda S.K., Ansari I.H., Durgapal H., Agrawal S., Jameel S.  
The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious.

*Journal of Virology*, 2000; 74: 2430-2437.

Pei Y., Yoo D.

Genetic characterization and sequence heterogeneity of a canadian isolate of Swine hepatitis E virus.

*Journal of Clinical Microbiology*. 2002 Nov;40(11):4021-9.

Peron J.M., Mansuy J.M., Poirson H., Bureau C., Dupuis E., Alric L., Izopet J., Vinel J.P.

Hepatitis E is an autochthonous disease in industrialized countries. Analysis of 23 patients in South-West France over a 13-month period and comparison with hepatitis A.

*Gastroenterologie Clinique et Biologique*. 2006 May;30(5):757-62.

Pina S., Buti M., Cotrina M., Piella J. and Girones J. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain.

*Journal of Hepatology*. 2000; 33: 826–833.

Purcell R.H., Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M.

Hepatitis E virus.

*Fields Virology*, 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, Lippincott - Raven, 1996:2831-2843.

Reyes G.R., Purdy M.A., Kim J.P., Luk K.C., Young L.M., Fry K.E., Bradley D.W.

Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis.

*Science*. 1990 247, 1335–1339.

Ropp S.L., Tam A.W., Beames B., Purdy M., Frey T.K.

Expression of the hepatitis E virus ORF1.

*Archives of Virology*. 2000;145(7):1321-37.

Saad M.D., Hussein A.H., Bashandy M.M., Earhart K.C., Fryauff D.J., Younan M., Mohamed A.H.

Detection of hepatitis E virus infection in work horses in Egypt, 2005 (published only in DDBJ/EMBL/GenBank databases, accession AY963777–80).

Schlauder G.G., Dawson G.J., Erker J.C., Kwo P.Y., Knigge M.F., Smalley D.L., Rosenblatt J.E., Desai S.M., Mushahwar I.K.

The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States.

*Journal of General Virology*. 1998 Oct;79(Pt 10):2563.

Sehgal D., Thomas S., Chakraborty M., Jameel S.

Expression and processing of the Hepatitis E virus ORF1 nonstructural polyprotein.

*Virology Journal*. 2006 May 26;3:38.

Siochu A., Froesner G., Tassis P.D., Kyriakis C.S., Alexopoulos C., Kyriakis S.C.

First report of the prevalence of anti-hepatitis E virus (anti-HEV) IgG in blood serum of blood donors, slaughtermen and swine farmer in Greece.

*Proceedings of the 18<sup>th</sup> IPVS congress*, 2004, Hamburg, Germany; vol. 1, 367.

Sonoda H., Abe M., Sugimoto T., Sato Y., Bando M., Fukui E., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Okamoto H.

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.

*Clinical Microbiology*. 2004 Nov;42(11):5371-4.

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

*Virology*. 1991 Nov;185(1):120-31.

Takahashi M., Nishizawa T., Miyajima H., Gotanda Y., Iita T., Tsuda F., Okamoto H.

Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus.

*Journal of General Virology*. 2003 Apr;84(Pt 4):851-62.

Takahashi K., Kang J.H., Ohnishi S., Hino K., Miyakawa H., Miyakawa Y., Maekubo H., Mishiro S.

Full-length sequences of six hepatitis E virus isolates of genotypes III and IV from patients with sporadic acute or fulminant hepatitis in Japan.

*Intervirology*. 2003;46(5):308-18.

Takahashi K., Kitajima N., Abe N., Mishiro S.

Complete or nearcomplete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer.

*Virology* 2004;330:501–5.

Tolari F., Del Chiaro L., Card R., Mazzei M., Bandecchi P., Banks M.

Phylogenetic study of viral isolates of Swine and human hepatitis e virus.

*Veterinary Research Communications*. 2006 Aug;30 Suppl 1:273-6.

Torresi J., Li F., Locarnini S.A., Anderson D.A.

Only the non-glycosylated fraction of hepatitis E virus capsid (open reading frame 2) protein is stable in mammalian cells.

*Journal of General Virology*. 1999; 80, 1185–1188.

Tsarev S.A., Tsareva T.S., Emerson S.U., Govindarajan S., Shapiro M., Gerin J.L., Purcell R.H.

Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge.

*Vaccine*. 1997 Dec;15(17-18):1834-8.

Tyagi S., Korkaya H., Zafrullah M., Jameel S., La S.K.

The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2

*Journal of Biological Chemistry*. 2002 June 21; Vol. 277, Issue 25, 22759-22767,

van der Poel W.H., Verschoor F., van der Heide R., Herrera M.I., Vivo A., Kooreman M., de Roda Husman A.M.

Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands.

*Emerging Infectious Disease*. 2001 Nov-Dec;7(6):970-6.

Wang L., Zhuang H.

Hepatitis E: an overview and recent advances in vaccine research.

*World Journal of Gastroenterology*. 2004 Aug 1;10(15):2157-62.

Wang Y.C., Ling R., Erker J.C., Zhang H., Li H., Desai S.,

Mushahwar I.K., Harrison T.J.

A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis.

*Journal of General Virology* . 1999, 80, 169–177.

- Wang Y.C., Zhang H., Ling R., Li H., Harrison T.J.  
The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3.  
*Journal of General Virology*. 2000 Jul;81(Pt 7):1675-86.
- Wang Y.C., Zhang H.Y., Xia N.S., Peng G., Lan H.Y., Zhuang H., Zhu Y.H., Li S.W., Tian K.G., Gu W.J., Lin J.X., Wu X., Li H.M., Harrison T.J.  
Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China.  
*Journal of Medical Virology*. 2002 Aug;67(4):516-21.
- Wibawa I.D., Muljono D.H., Mulyanto, Suryadarma I.G., Tsuda F., Takahashi M., Nishizawa T., Okamoto H.  
Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among apparently healthy humans and pigs in Bali, Indonesia: Identification of a pig infected with a genotype 4 hepatitis E virus.  
*Journal of Medical Virology*. 2004 May;73(1):38-44.
- Williams T.P.E., Kasorndorkbua C., Halbur P.G., Haqshenas G., Guenette D.K., Toth T.E., Meng X.J.  
Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model.  
*Journal of Clinical Microbiology*. 2001 Sept, p. 3040-3046, Vol. 39, No. 9
- Withers M.R., Correa M.T., Morrow M., Stebbins M.E., Seriwatana J., Webster W.D., Boak M.B., Vaughn D.W.  
Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids.  
*American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002 Apr;66(4):384-8.
- Yazaki Y., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Sasaki N., Gotanda Y., Okamoto H.  
Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food.  
*Journal of General Virology*. 2003 Sep;84(Pt 9):2351-7.
- Yoo D., Willson P., Pei Y., Hayes M.A., Deckert A., Dewey C.E., Friendship R.M., Yoon Y., Gottschalk M., Yason C., Giulivi A.  
Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus.  
*Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2001 Nov;8(6):1213-9.

Zafrullah M., Ozdener M.H., Panda S.K., Jameel S.

The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton.

*Virology*. 1997, 71:9045-9053

Zanetti A.R., Schlauder G.G., Romano L., Tanzi E., Fabris P., Dawson G.J., Mushahwar I.K.

Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy.

*Journal of Medical Virology*. 1999 Apr;57(4):356-60.

---

## Sitografia

---

- [www.istat.it](http://www.istat.it) Istituto Nazionale di Statistica.
- [www.anas.it](http://www.anas.it) Associazione Nazionale Allevatori Suini.
- [www.cdc.gov/hepatitis](http://www.cdc.gov/hepatitis) U.S. Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie.
- [www.who.int](http://www.who.int) World Health Organization.

---

## Appendice

---

Numeri di accesso per la figura 6.4 :

Avian: AY043166 (HEV Aviario); MexicoMan:M74506 (genotipo II, umano, Messico); UKHuman NT: AJ879569 (UK Human Non-Travel Associated); UKHumanNT8: AJ879574 (UK Human Non-Travel Associated); NLSW122: AF336299 (genotipo III, suino, Olanda); NLSW91: AY032759 (genotipo III, suino, Olanda); NLSW20: AF336290 (genotipo III, suino, olanda); NLSW68: AY032756 (genotipo III, suino, Olanda); SpainSw: DQ141121 (genotipo 3, suino, Spagna); SpainSwine: AF195063 (genotipo III, suino, Spagna); SpainHuman: AF195061 (genotipo III, umano, Spagna); JapanBoar: AB189070 (genotipo III, cinghiale, Giappone); JapanMan2: AB154830 (genotipo III , umano, Giappone); JapanSw1: AB177376 (genotipo III, suino, Giappone); JapanSw2: AB094232 (genotipo III, suino, Giappone); IndsSwine: AB124818 (genotipo IV, suino, Indonesia); USHumanNT1: AF060668 (genotipo III, umano, USA); USSwine: AF082843 (genotipo III, suino, USA); BurmaHuman: M73218 (genotipo I, umano, Birmania); EgyptHuman: AF051351 (genotipo I, umano, Egitto); NepalHuman: AF051830 (genotipo I, umano, Nepal); swCH25: AY594199 (genotipo III, suino, Cina); T2-6s: AY858892 (genotipo III, suino, Thailandia); S1-28s: AY858903 (genotipo III, suino, Messico); T4-7s: AY858901 (genotipo III, suino, Thailandia).