

EPATITE E NEL MONDO ANIMALE

Luca De Sabato, Ilaria Di Bartolo

*Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Introduzione

Il virus dell'Epatite E (*Hepatitis E Virus*, HEV) è un virus a trasmissione oro-fecale che causa nell'uomo un'epatite acuta. In Italia e in Europa, il genotipo 3 è il più comune nei casi di malattia nell'uomo e nei serbatoi animali (suino, cinghiale, cervo). La via alimentare è la principale via di trasmissione. Casi di Epatite E sono stati causati dal consumo di salsicce di fegato di suino o cinghiale, in cui era presente il virus, consumati crudi o poco cotti. L'attività svolta all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) si è rivolta principalmente alla ricerca di HEV nel serbatoio animale e alla caratterizzazione molecolare dei ceppi circolanti per valutarne il potenziale zoonotico.

HEV-3 è stato identificato in tutti i punti della filiera di produzione del suino, dall'allevamento al punto vendita, con prevalenze elevate negli allevamenti anche in animali prossimi alla macellazione. I sieri e le feci prelevati da conigli da compagnia e da allevamento sono risultati negativi per la presenza di HEV ma positivi per anticorpi anti-HEV, confermando l'esposizione al virus.

Il virus circola anche nei selvatici. È stato identificato con prevalenze elevate in due popolazioni di cinghiali del centro e sud dell'Italia, evidenziando la circolazione di nuove varianti virali molto vicine a ceppi identificati nell'uomo. Inoltre, l'analisi degli anticorpi IgG anti-HEV ha evidenziato l'esposizione al virus in una popolazione di cervi da una zona dell'Italia centrale.

Per valutare la circolazione del genotipo zoonotico e di altri virus della famiglia *Hepeviridae*, il genoma del virus è stato ricercato anche nei topi e nei ratti. La ricerca del virus è stata effettuata nel contenuto intestinale e nel fegato di ratti e topi catturati all'interno di alcuni allevamenti suini. Un ratto è risultato positivo per un ceppo HEV-3 che era identico al ceppo circolante nei suini dello stesso allevamento. Inoltre, un secondo ratto era positivo per un ceppo di un'altra specie di HEV: HEV-C, il cui potenziale zoonotico non è ancora chiaro. I risultati ottenuti evidenziano il ruolo dei roditori di potenziali vettori per la diffusione del virus negli allevamenti suini.

Virus dell'Epatite E

Il virus dell'HEV è un virus a RNA con un genoma a singolo filamento positivo lungo circa 7,2 kb. HEV appartiene alla famiglia *Hepeviridae*, nel genere *Orthohepevirus* che è suddiviso in 4 specie (*Orthohepevirus A-D*). Gli *Orthohepevirus A* sono classificati in 8 genotipi, i genotipi HEV-1 e HEV-2 infettano esclusivamente l'uomo, mentre HEV-3, HEV-4 e HEV-7 sono gli unici che presentano un potenziale zoonotico, infatti sono stati rilevati nell'uomo e nei suini, nei cinghiali, nei cervidi, mentre il genotipo HEV-7 è stato descritto nei dromedari. I genotipi HEV-5 e HEV-6 sono stati descritti esclusivamente nei cinghiali in Asia. Infine, il genotipo HEV-8, è stato rilevato nei cammelli in Asia (1).

HEV-1 e HEV-2 hanno un ciclo interumano, causano epidemie nei Paesi in via di sviluppo legate alle cattive condizioni sanitarie. In Europa e negli Stati Uniti il genotipo HEV-3 è il più

comune, mentre HEV-4 circola principalmente in Asia. Sia HEV-3 che HEV-4 sono zoonotici e i principali serbatoi sono suini, cinghiali e cervi. Ceppi vicini ma in un *lineage* separato dal genotipo HEV-3 sono stati rilevati nei conigli e nominati rHEV. Vari studi di infezioni sperimentali hanno dimostrato che ceppi di rHEV sono in grado di infettare suini e primati non umani, suggerendo così il potenziale rischio di trasmissione zoonotica. In Francia, tale rischio è stato confermato dall'infezione in un paziente affetto da epatite E con un ceppo rHEV.

Gli *Orthohepevirus C*, altra specie della famiglia *Hepeviridae*, sono suddivisi in HEV-C1 che infetta roditori ed eulipotifli (topo muschiato) e HEV-C2 che infetta il furetto e il visone. La trasmissione zoonotica dei ceppi appartenenti a questa specie è ancora dibattuta. Suini e scimmie non sono suscettibili all'infezione con ceppi di HEV-C1 di ratto come evidenziato da studi di infezioni sperimentali. Tuttavia, due studi hanno riportato la presenza di anticorpi diretti contro HEV-C1 nei lavoratori forestali in Germania e la presenza di IgG e IgM diretti contro HEV-C1 nei sieri di pazienti che presentavano un'epatite acuta, suggerendo che potessero essere stati infettati da ceppi di HEV-C1.

In Europa, il genotipo HEV-3 è quello più comune ed è considerato un patogeno emergente come confermato dal crescente numero di casi descritti negli ultimi 10 anni. In Europa la via di trasmissione più comune è quella alimentare.

Il serbatoio animale principale di HEV-3 è il suino e gli alimenti di origine suina in particolare quelli prodotti con il fegato sono considerati il principale veicolo di trasmissione dell'infezione all'uomo se consumati crudi o poco cotti.

Un altro importante serbatoio del virus sono alcuni selvatici, in particolare i cinghiali da cui si ipotizza possa aver avuto origine il virus poi trasmesso al suino.

In Europa, la sieroprevalenza registrata nella popolazione generale o nei donatori di sangue è molto variabile, compresa tra il 6,1% e il 52,5%, dato in parte giustificato da approcci metodologici diversi ma anche dall'esistenza di alcune zone iper-endemiche. Tali aree, descritte anche in Italia, come Abruzzo (22,8%) e Sardegna (19,9%) (2), sembrano associate alle abitudini alimentari del luogo come il consumo di salsicce di fegato di maiale fresche e/o di cinghiale.

A oggi, non esistono sistemi efficienti di crescita *in vitro* del virus la cui classificazione si basa sull'analisi delle sequenze genomiche. In base alla variabilità genetica riscontrata tra i ceppi di HEV i genotipi sono stati ulteriormente distinti in sottotipi o varianti genetiche. I ceppi HEV-3 sono classificati in 12 sottotipi (da HEV-3a - HEV-3l), circolanti diversamente nelle varie aree geografiche. HEV-3c, HEV-3e e HEV-3f sono i più comuni in Europa. HEV-3a è comune in USA. Tuttavia, con l'aumento delle sequenze prodotte, stanno aumentando il numero di sottotipi che, non essendo ancora disponibile un sistema di classificazione univoco, restano a oggi non classificati ma confermano la variabilità genetica di HEV (1).

HEV nella filiera del suino

Nel corso degli ultimi 10 anni sono stati condotti diversi studi di sorveglianza lungo la filiera di produzione del suino, con l'obiettivo di valutare la circolazione di HEV e comprendere il rischio che alimenti infetti possano arrivare al consumatore. La ricerca del virus è stata condotta mediante tecniche molecolari volte ad amplificare porzioni del genoma virale (*RiboNucleic Acid*, RNA, *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR e/o *Real-Time* RT-PCR).

Nel biennio 2012-2014, 242 campioni fecali sono stati raccolti da suini in diverse fasi di produzione (dai 5 ai 220 giorni) in otto allevamenti localizzati in tutta Italia. HEV è stato rilevato in 6 allevamenti e in 45 (18,6%) dei 242 campioni analizzati (3). Un secondo studio è stato svolto su 274 suini selezionati da 6 diverse aziende suinicole del Nord Italia, testando la presenza dell'RNA virale nelle feci. Il genoma di HEV è stato rilevato in 115 feci (42%). Tutte le aziende

sono risultate positive per HEV, con una prevalenza compresa tra il 12,8% e il 72,5%. I suini positivi per HEV sono stati rilevati in tutte le fasce d'età e le fasi di produzione (riproduttori e ingrasso), sebbene l'infezione fosse più diffusa nei soggetti svezzati che nei suini da ingrasso più anziani (42,2% contro 27,0%). Le sequenze nucleotidiche ottenute dei ceppi appartenevano al genotipo zoonotico HEV-3 (4).

La ricerca degli anticorpi diretti contro HEV è stata condotta in 48 suini di 8 mesi di età, in un macello del Nord Italia, tramite un test ELISA. La sieroprevalenza media nel gruppo di animali è risultata dell'87,0%. Dagli stessi animali sono stati inoltre raccolti campioni di bile, fegato e feci e l'RNA di HEV è stato rilevato tramite RT-PCR. La bile è la matrice con una più frequente positività (51,1%), seguita da feci (33,3%) e fegato (20,8%). Trentuno dei 48 suini (64,6%) erano positivi per l'RNA di HEV in almeno una delle matrici analizzate. La prevalenza più elevata è stata riscontrata negli animali di 3-4 mesi rispetto agli animali più adulti di 9-10 mesi (95,0% contro 42,9%). I ceppi identificati sono stati classificati nel genotipo zoonotico HEV-3 (5).

Infine, la presenza di HEV è stata valutata nelle salsicce di fegato di maiale vendute in un negozio al dettaglio a Roma. Complessivamente, il virus è stato rilevato nelle salsicce di fegato crude (10 su 45 fette, 250 mg ciascuna, 22,2%) e secche (1 su 23 fette, 4,3%). Le sequenze ottenute hanno confermato la presenza di porzioni di genoma del genotipo zoonotico HEV-3 tuttavia il ritrovamento dell'RNA virale non necessariamente corrisponde al virus vivo (6).

Questi studi hanno dimostrato che HEV-3 è presente in tutti i punti della filiera, con prevalenze elevate negli animali all'allevamento, più basse al macello ed è presente anche nei prodotti alimentari in vendita. Inoltre, i ceppi sequenziati presentavano correlazioni evolutive con ceppi virali circolanti sia nell'uomo che negli animali, confermando il ruolo del suino quale serbatoio di ceppi zoonotici.

HEV nei cinghiali

Durante la stagione venatoria 2016-2017, sono stati raccolti 92 fegati da altrettanti cinghiali (*Sus scrofa*) abbattuti in cinque comuni dell'Italia centrale (7). L'RNA di HEV è stato rilevato nel 52,2% dei campioni di fegato campionati con una prevalenza compresa nelle 5 aree tra lo 0% e 65,7%. I cinghiali positivi per HEV sono stati rilevati in tutte le aree di caccia tranne una. L'analisi filogenetica condotta sulle sequenze ha mostrato che i ceppi circolanti appartenevano al genotipo HEV-3 e ha permesso la loro classificazione nei sottotipi HEV-3c e HEV-3f. Gli animali cacciati dalla stessa squadra, lo stesso giorno e quindi presumibilmente erano appartenenti allo stesso gruppo familiare erano positivi per ceppi virali identici (identità nucleotidica pari al 100%). Il fegato è l'organo principale di replicazione del virus, quindi è l'organo preferito per la ricerca del virus. Tuttavia, l'infezione è caratterizzata da una fase viremica che potrebbe determinare la presenza del virus nel circolo sanguigno e quindi nel muscolo. Mentre la viremia è di breve durata nel suino, appare prolungata nel cinghiale. Per dimostrare l'eventuale presenza del virus nei muscoli di cinghiali, è stato eseguito uno studio di monitoraggio in due aree geografiche in cui già erano stati ritrovati animali positivi per il virus.

Il genoma del virus è stato ricercato in campioni di fegato e muscoli raccolti da 196 cinghiali (*Sus scrofa*). Venti animali (10,2%) erano positivi nei fegati, 11 dei quali erano anche positivi nei muscoli (8).

L'analisi filogenetica dei ceppi ha confermato il rilevamento del genotipo HEV-3 e i ceppi classificati nei diversi sottotipi di HEV-3: 3c, 3f, 3i. HEV è stato identificato nelle due popolazioni di cinghiali evidenziando la circolazione di nuove varianti virali molto vicine a ceppi identificati nell'uomo. La presenza del virus nel muscolo è probabilmente dovuta alla viremia, tuttavia non essendo il sangue disponibile non è stata valutata la presenza del virus. Inoltre, la presenza del

virus suggerisce un possibile rischio di infezione dovuto al consumo di carne contaminata consumata poco cotta.

Il cinghiale rappresenta un serbatoio importante del virus con un potenziale rischio per l'uomo, soprattutto nelle zone in cui si consumano prodotti a base di carne di cinghiale, inoltre, vista la vicinanza con ceppi rilevato nei suini non è da escludere un eventuale passaggio del virus in caso di contatto tra le due specie animali.

HEV nei cervi

In questo studio, è stata valutata la circolazione di HEV in una popolazione di cervi (*Cervus elaphus*) dell'Italia centrale ricercando anticorpi specifici diretti contro il virus e il genoma dell'RNA nei sieri (9). Un totale di 35 su 251 sieri di cervo sono risultati positivi per le IgG anti-HEV. L'RNA di HEV è stato rilevato in 10 dei 91 sieri esaminati. Il sequenziamento della regione capsidica del genoma virale ha confermato la presenza del genotipo HEV-3. I risultati hanno confermato quindi la circolazione del virus nella popolazione di cervi in Italia anche con viremia confermandone il ruolo di serbatoio del virus zoonotico.

HEV in conigli d'allevamento

La recente identificazione in pazienti affetti da epatite E di ceppi di rHEV, identificati nei conigli, ha evidenziato il ruolo di questa specie come possibile serbatoio del virus. Nel periodo 2013-2014, con l'obiettivo di valutare la circolazione del virus nei conigli di allevamento e d'affezione, è stato condotto uno studio sierologico per la ricerca di anticorpi anti-HEV (10). La sieroprevalenza era del 3,40% in 206 conigli di allevamento (raccolti in 7 allevamenti) e del 6,56% in 122 animali domestici. I sieri positivi per le IgG sono risultati negativi alla presenza dell'RNA virale. Solo un campione di siero di un coniglio di allevamento è risultato positivo per le IgM, ma negativo per l'RNA virale. Dagli stessi animali sono state prelevate anche le feci anch'esse negative per la presenza dell'RNA virale. I risultati hanno confermato la circolazione di HEV nelle popolazioni di conigli, in misura ridotta rispetto ai suini.

HEV nei topi e nei ratti

Topi e ratti sono anch'essi serbatoi del virus HEV ma il ruolo zoonotico è ancora dibattuto appartenendo a una specie diversa. Tuttavia, topi e ratti sono molto comuni negli allevamenti di suini in cui entrano in contatto con le feci spesso positive per HEV-3. Per tale ragione si è valutata la presenza di HEV nel contenuto intestinale e in campioni di fegato prelevati da 47 ratti (*Rattus rattus*) e 21 topi domestici (*Mus musculus*) catturati all'interno di quattro allevamenti di suini nel Nord Italia in tre dei quali erano stati precedentemente rilevati suini positivi per HEV-3 (11). Per questo, è stata valutata la presenza nei ratti e topi sia dei genotipi zoonotici HEV-3 e HEV4 che di HEV-C.

Il contenuto intestinale di due ratti è risultato positivo per l'RNA di HEV-C1 e per l'RNA HEV-3. I due ratti provenivano da due diversi allevamenti di suini positivi per HEV-3. Le analisi delle sequenze hanno confermato la presenza di ceppo di HEV-C1 e di un ceppo sottotipo HEV-3e. Il ceppo virale HEV-3e rilevato nel ratto era identico ai ceppi HEV rilevati nei suini dello

stesso allevamento suggerendo l'ingestione di feci di suino ed escludendo replicazione attiva del virus nel ratto, essendo risultati negativi i fegati. Nessun topo è risultato essere positivo.

Conclusioni

Nell'ultimo decennio il numero delle infezioni nell'uomo dovute al genotipo HEV-3 sono aumentate in tutta Europa e sono principalmente causate dal consumo di alimenti (crudi o poco cotti) di origine animale (suino, cinghiale e cervo) positivi al virus. Di recente con l'avvento di tecniche molecolari sempre più sensibili, si sono scoperti molti serbatoi animali del virus e il numero di nuove varianti virali è molto aumentato, confermando un'ampia eterogeneità dei virus della famiglia *Hepeviridae*. Alla luce della potenziale natura zoonotica di alcune specie di HEV, il ruolo dei nuovi serbatoi animali come fonte di infezione per l'uomo deve essere studiato in modo approfondito. Tali studi dovranno essere condotti *in vitro*, migliorando i sistemi di crescita del virus sulle cellule che sono ancora poco efficaci, ma anche attraverso il sequenziamento del genoma virale. Lo studio dell'evoluzione del virus e dei potenziali siti di legame alla cellula ospite aiuteranno a capire come il virus circoli nella popolazione animale e a identificare sottotipi o varianti virali che possono infettare l'uomo.

Bibliografia

1. EFSA BIONe HealthAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Fernandez Escamez PS, Herman L, Koutsoumanis K, Lindqvist R, Nørrung B, Robertson L, Ru G, Sanaa M, Simmon s M, Skandamis P, Snary E, Speybroeck N, Ter Kuile B, Threlfall J, Wahlstrom H, Di Bartolo I, Johne R, Pavio N, Rutjes S, van der Poel W, Vasickova P, Hempen M, Messens W, Rizzi V, Latronico F and Girones R, 2017. Scientific Opinion on the public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *EFSA Journal* 2017;15(7):4886-89.
2. Spada E, Pupella S, Pisani G, Bruni R, Chionne P, Madonna E, Villano U, Simeoni M, Fabi S, Marano G, Marcantonio C, Pezzotti P, Ciccaglione AR, Liumbruno GM. A nationwide retrospective study on prevalence of hepatitis E virus infection in Italian blood donors. *Blood Transfus* 2018;16(5):413-21.
3. Monini M, Di Bartolo I, Ianiro G, Angeloni G, Magistrali CF, Ostanello F, Ruggeri FM. Detection and molecular characterization of zoonotic viruses in swine fecal samples in Italian pig herds. *Arch Virol* 2015;160(10):2547-56.
4. Di Bartolo I, Martelli F, Inglese N, Pourshaban M, Caprioli A, Ostanello F, Ruggeri FM. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet Microbiol* 2008;132(1-2):47-55.
5. Di Bartolo I, Ponterio E, Castellini L, Ostanello F, Ruggeri FM. Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol* 2011;149(3-4):330-8.
6. Di Bartolo I, Angeloni G, Ponterio E, Ostanello F, Ruggeri FM. Detection of hepatitis E virus in pork liver sausages. *Int J Food Microbiol* 2015;(16)193:29-33.
7. De Sabato L, Ostanello F, De Grossi L, Marcario A, Franzetti B, Monini M, Di Bartolo I. Molecular survey of HEV infection in wild boar population in Italy. *Transbound Emerg Dis* 2018;65(6):1749-56.
8. De Sabato L, Amoroso MG, Ianiro G, Esposito C De Grossi L, Fusco G, Barone A, Martini E, Ostanello F, Di Bartolo I. (2020). Detection of hepatitis E virus in livers and muscle tissues of wild boars in Italy. *Food and Environmental Virology* 2020;12(1):1-8.

9. Di Bartolo I, Ponterio E, Angeloni G, Morandi F, Ostanello F, Nicoloso S, Ruggeri FM. Presence of hepatitis E virus in a RED Deer (*Cervus elaphus*) population in Central Italy. *Transbound Emerg Dis* 2017 Feb;64(1):137-43.
10. Di Bartolo I, De Sabato L, Marata A, Martinelli N, Magistrali CF, Monini M, Ponterio E, Ostanello F, Ruggeri FM. Serological survey of hepatitis E virus infection in farmed and pet rabbits in Italy. *Arch Virol* 2016;161(5):1343-6.
11. De Sabato L, Ianiro G, Monini M, De Lucia A, Ostanello F, Di Bartolo I. Detection of hepatitis E virus RNA in rats caught in pig farms from Northern Italy. *Zoonoses Public Health* 2020;67(1):62-69.