

Virus dell'Epatite E nei molluschi bivalvi della regione Abruzzo (Italy)

F. Beikpour¹, N. Barile², G. Aprea³, E. Nerone², S. Scattolini³, D. D'Angelantonio³, I. Del Matto³, L. Cozzi^{1*}, E. Suffredini¹, S. Di Pasquale¹, G. La Rosa⁴, T. Vicenza¹

¹) Istituto Superiore di Sanità - Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Laboratorio Nazionale di Riferimento per i virus negli alimenti - Roma.

²) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" - Termoli (CB)

³) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" - Teramo

⁴) Istituto Superiore di Sanità – Dipartimento Ambiente e Salute - Roma

Keywords: Epatite E, molluschi bivalvi, cinghiali, RT-PCR

Introduzione

L'epatite E è una malattia umana acuta, spesso anitterica e autolimitante, diffusa in tutto il mondo, causata dal virus dell'epatite E (HEV), appartenente alla famiglia Hepeviridae, genere Orthohepevirus.

Quattro sono i genotipi virali più rilevanti da un punto di vista sanitario: G1 e G2, la cui circolazione è circoscritta all'uomo, e i genotipi G3 e G4, con trasmissione zoonotica, i cui *reservoir* sono costituiti da suini (maiali e cinghiali), cervi, e conigli. Le dinamiche di trasmissione dell'epatite E sono diverse in base alle aree geografiche: nei paesi in via di sviluppo i genotipi G1 e G2 hanno un'alta prevalenza e sono responsabili di casi sporadici ed epidemie a trasmissione idrica, nei paesi industrializzati prevalgono di contro i genotipi G3 e G4, e solitamente i casi sono correlati a ingestione di alimenti contaminati.

In Italia, studi di sieroprevalenza sui donatori di sangue hanno evidenziato una notevole eterogeneità dell'esposizione della popolazione a HEV con alcune aree particolarmente interessate dalla circolazione del virus nell'Italia centrale. Analogamente, studi condotti sui reflui urbani hanno rilevato con maggiore frequenza la presenza di HEV in campioni raccolti in Regioni del Centro-Sud, quali Lazio, Marche, Abruzzo e Molise.

Il progetto di Ricerca Finalizzata "Improving understanding of autochthonous Hepatitis E transmission routes: a focus on foodborne and waterborne pathways" concentra le proprie attività sulla Regione Abruzzo dove, a livello nazionale, è stata evidenziata la più elevata prevalenza di IgG anti-HEV (22.8%) [1] e dove la presenza del virus è stata rilevata nel 7.2% dei campioni di acque reflue urbane [2].

Scopo del presente lavoro è stato valutare se, in virtù dell'elevata circolazione del virus nella popolazione e della sua presenza nelle acque reflue urbane, si possa determinare uno specifico rischio di contaminazione di HEV nei molluschi bivalvi prodotti nelle aree costiere della regione Abruzzo.

Summary

Hepatitis E is a human disease caused by Hepatitis E virus (HEV). Transmission dynamics vary worldwide, with genotypes G1 and G2 restricted to humans and responsible for large waterborne outbreaks in low-income countries, and G3 and G4 zoonotic, causing the majority of sporadic cases in developed countries, often through the foodborne transmission route. Aim of this work was to investigate HEV occurrence in shellfish produced along the coastline of the region of Abruzzo (Italy), a known hotspot for HEV circulation.

Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto fra luglio 2021 e aprile 2022 mediante campionamento sistematico delle 4 aree di produzione di mitili e dei 3 banchi naturali di vongole presenti lungo la costa della Regione Abruzzo (province di Teramo, Chieti e Pescara). Campionamenti mensili sono stati condotti per tutte le aree con esclusione dei periodi di chiusura (interdizione alla raccolta) e dei periodi per i quali non era disponibile il prodotto. Complessivamente, un totale di 42 campioni sono stati inclusi nello studio (35 campioni di mitili e 7 di vongole). I campioni sono stati preparati secondo le modalità riportate nella ISO 15216-2:2019 [3]. Nel dettaglio, gli epatopancreas dei molluschi sono stati dissezionati, finemente sminuzzati e addizionati di 10 µl di virus controllo di processo (Mengovirus ceppo MC₀) per valutare l'efficienza di estrazione. Due g di omogenato sono stati quindi prelevati e incubati per 1 h con 2 ml di proteinasi K (0.1 mg/ml) a 37°C in agitazione, per permettere la digestione enzimatica del tessuto e il rilascio nella fase acquosa degli acidi nucleici. Successivamente, i campioni sono stati trattati a 60°C per 15 min e sono stati centrifugati 5 min a 3000 xg per depositare i residui più grossolani di tessuto. Infine, il sovrantante è stato raccolto, misurato e conservato a -80°C fino ad estrazione degli acidi nucleici. L' estrazione degli acidi nucleici è stata eseguita con la piattaforma semiautomatica MiniMag (bioMerieux), con buffer a base di guanidina isotiocianato e particelle di silice magnetica ed eluizione finale in 100 µl di TE buffer. Un controllo negativo di estrazione è stato incluso in ogni sessione analitica per escludere contaminazioni ambientali.

Le analisi per la rilevazione e quantificazione di HEV nei campioni sono state condotte con metodica RT (q)PCR usando ORF3 come target con primers/probe e condizioni precedentemente pubblicati [4]. Le analisi sono state condotte in duplicato su uno strumento QuantStudio 12K (Applied Biosystems). La presenza di inibitori di PCR è stata esclusa mediante analisi di un controllo esterno di amplificazione (RNA di sintesi) contenente la sequenza target della PCR.

Risultati e discussione

Nessuno dei 42 campioni di molluschi bivalvi analizzati ha evidenziato la presenza di HEV. Un elevato numero di campioni ($n=23$, 18/35 mitili e 5/7 vongole) ha posto specifiche difficoltà analitiche, in particolare in relazione al raggiungimento del criterio di accettabilità del recupero analitico (minimo 1%), richiedendo – senza successo – la ripetizione delle analisi. Di contro, i campioni che non hanno mostrato particolari caratteristiche di inibizione, sono risultati sempre conformi ai criteri di accettabilità (inibizione inferiore al 50%).

In conclusione, nonostante il virus dell'epatite E circoli ampiamente nella popolazione della regione Abruzzo, i molluschi bivalvi prodotti nelle aree costiere della regione non sembrano essere affetti da contaminazione o, tale contaminazione, dove presente, è tale da risultare inferiore ai limiti di rilevazione delle metodiche attualmente in uso.

Acknowledgments: RF-2018-12365399 "Improving understanding of autochthonous Hepatitis E transmission routes: a focus on foodborne and waterborne pathways"

Bibliografia

[1] 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, Liunbruno GM. A nationwide retrospective study on prevalence of hepatitis E virus infection in Italian blood donors. *Blood Transfus.* 2018 Sep;16(5):413-421.

[2] Iaconelli M, Bonanno Ferraro G, Mancini P, Suffredini E, Veneri C, Ciccaglione AR, Bruni R, Della Libera S, Bignami F, Brambilla M, De Medici D, Brandtner D, Schembri P, D'Amato S, La Rosa G. Nine-Year Nationwide Environmental Surveillance of Hepatitis E Virus in Urban Wastewaters in Italy (2011-2019). *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Mar 20;17(6):2059.

[3] ISO 15216-2:2019 Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 2: Method for detection.

[4] Di Pasquale S, De Santis P, La Rosa G, Di Domenico K, Iaconelli M, Micarelli G, Martini E, Bilei S, De Medici D, Suffredini E. Quantification and genetic diversity of Hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) hunted for domestic consumption in Central Italy. *Food Microbiol.* 2019 Sep;82:194-201.