

Il virus dell'Epatite E: un agente di zoonosi emergente

A. Caprioli, F. Ostanello & F. Martelli

Riassunto

L'epatite E è una malattia infettiva con caratteristiche cliniche di epatite acuta. L'agente responsabile è il virus dell'epatite E (Hepatitis E Virus, HEV). La malattia costituisce un importante problema di sanità pubblica nei paesi in via di sviluppo dove in genere si presenta in forma epidemica ed è trasmessa per via oro-fecale. Negli ultimi anni, casi sporadici della malattia sono stati descritti anche in numerosi paesi industrializzati, compresa l'Italia. Nel 1997 è stato identificato il virus dell'epatite E del suino che oggi viene considerato ubiquitario nella popolazione suina mondiale. È stato evidenziato che ceppi umani e suini provenienti dalle stesse regioni geografiche presentano tra loro una spiccata analogia nucleotidica e infezioni sperimentali hanno dimostrato la possibilità di trasmissione interspecifica di ceppi umani al suino e di ceppi suini a primati non umani. Alcuni studi sieroepidemiologici, hanno inoltre rilevato che persone professionalmente esposte al contatto con suini hanno un rischio maggiore di contrarre l'infezione rispetto a normali donatori di sangue. Recentemente alcuni episodi di epatite E sono stati associati all'ingestione di carne o organi crudi di suino, cinghiale e cervo ed oggi la malattia è considerata una zoonosi emergente. Questo articolo si propone di presentare una breve sintesi delle conoscenze virologiche ed epidemiologiche sulle infezioni da HEV al fine di stimolare l'interesse verso una tematica

ancora poco considerata in ambito veterinario e che potrebbe assumere rilevanza crescente come zoonosi.

Parole chiave

Epatite E – Patologia animale – Sanità pubblica – Suino – Zoonosi.

Introduzione

L'epatite E, precedentemente conosciuta come «epatite trasmissibile per via gastroenterica non-A, non-B, non-C», è una malattia infettiva con caratteristiche cliniche di epatite acuta non soggetta a cronicizzazione. Nella maggior parte degli individui la malattia è di lieve o modesta entità, eccetto che nelle donne in gravidanza in cui la mortalità può raggiungere il 20% (1). L'agente responsabile, identificato solo nei primi anni '80, è il virus dell'epatite E (*Hepatitis E Virus*, HEV) (14). La malattia costituisce un importante problema di sanità pubblica nei paesi in via di sviluppo (Sud-est asiatico, Medio Oriente, parte dell'Africa e dell'America centro-meridionale) dove in genere si manifesta con caratteristiche epidemiche ed è trasmessa per via oro-fecale attraverso acqua o alimenti contaminati (1, 14, 58).

Fino ad alcuni anni fa, i paesi industrializzati (USA, Canada, Europa, Giappone, ecc.) erano considerati indenni da HEV e gli unici casi di malattia erano registrati in soggetti di ritorno da viaggi in zone endemiche. Negli ultimi anni, tuttavia, casi sporadici sono stati descritti sempre più spesso anche in numerosi paesi sviluppati, compresa l'Italia, in persone senza un'anamnesi

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna - Ozzano Emilia (BO) - Italia

di viaggi all'estero (1, 14, 37, 63) e studi sieropidemiologici hanno rilevato elevati valori di prevalenza di anticorpi anti-HEV, talvolta superiori al 20%, nella popolazione sana di molti Paesi un tempo considerati indenni (1, 14, 58).

In campo veterinario, fin dai primi anni '90 anticorpi anti-HEV erano stati rilevati in numerosi animali: scimmie, suini, roditori, polli, cani, gatti, bovini e ovi-caprini, sia in Paesi in via di sviluppo che industrializzati, facendo supporre che queste specie potessero essere infettate da virus HEV-like (1, 2, 14, 25, 37). In quel periodo si fece strada l'idea che esistessero serbatoi animali d'infezione per l'uomo e fu ipotizzato che alcuni dei casi sporadici di malattia riportati in letteratura potessero essere d'origine zoonosica (37).

Nel 1997 fu identificato per la prima volta il virus dell'epatite E del suino (*Swine Hepatitis E Virus*, *Swine HEV*) (37). Questo virus fu geneticamente e filogeneticamente correlato a 2 ceppi umani isolati negli USA da pazienti colpiti da epatite E e senza anamnesi di viaggi all'estero (37). Da allora, ceppi di HEV suini sono stati isolati praticamente in tutto il mondo ed è stata frequentemente osservata una spiccata analogia nucleotidica tra questi ed i ceppi umani provenienti dalle stesse regioni geografiche. Infezioni sperimentali hanno inoltre dimostrato la possibilità di trasmissione interspecifica di ceppi umani al suino e di ceppi suini a primati non umani (3, 22, 35, 36, 37, 38, 59) ed alcuni studi hanno riportato di un'elevata prevalenza anticorpale anti-HEV in soggetti professionalmente esposti al contatto con suini (12, 34, 45, 60). L'evidenza diretta della possibilità di trasmissione zoonosica dell'HEV è infine arrivata nel 2003 dal Giappone, dove alcuni casi di epatite E sono stati associati all'ingestione di carne o organi crudi di suino, cinghiale e cervo poche settimane prima dell'inizio dei sintomi (33, 51, 52, 61). Oggi la malattia è considerata una zoonosi emergente.

Caratteristiche del virus

HEV è un piccolo (27-34 nm) RNA virus a singolo filamento positivo, simmetria icosaedrica, privo di envelope (1). Il virus fu identificato per la prima volta nel 1983 e dal 1988 al 1998 fu classificato come membro della famiglia *Caliciviridae*. Studi filogenetici delle regioni non strutturali evidenziarono tuttavia sostanziali differenze rispetto ai calicivirus e per questo, fu rimosso da quella Famiglia ed è attualmente assegnato ad un nuovo genere detto *Hepevirus* (14, 58). Il genoma virale, di circa di 7,2 kb, è costituito da una corta regione non tradotta 5' (27-35 nucleotidi) seguita da 3 *open reading frames* (ORFs) e da una seconda regione non tradotta di circa 65-74 nucleotidi, con una sequenza *poly A* all'estremità 3'-terminale. ORF1 (5073-5124 nucleotidi) codifica una poliproteina non strutturale di circa 1690 amminoacidi che subisce processi proteolitici post-traduzionali ed è coinvolta nella replicazione del virus e nella processazione di proteine virali; possiede inoltre due regioni chiamate domini X e Y di funzione sconosciuta. ORF2 (1977-1980 nucleotidi) codifica per una proteina capsidica di 72 kDA formata da 660 amminoacidi, mentre ORF3 (366-369 nucleotidi) codifica per una piccola proteina di 123 amminoacidi (pORF3) espressa a livello intracellulare. Lo studio della biologia replicativa dell'HEV suggerisce che pORF3 sia in grado di associarsi al citoscheletro delle cellule epatiche fungendo da sito di ancoraggio (58). HEV non è oggi coltivabile in vitro con rese accettabili quindi, le tecniche diagnostiche e la caratterizzazione dei ceppi sono basate sull'analisi dell'RNA virale mediante tecniche biomolecolari (14). I diversi ceppi sono classificati sulla base delle regioni codificate dagli ORFs. Fino ad oggi sono stati identificati 4 maggiori genotipi virali, ma il quadro è in continua evoluzione e non esiste un consenso unanime su tale classificazione (58).

È invece universalmente riconosciuto un unico sierotipo (14, 58).

La maggior parte delle infezioni in Asia ed Africa sono causate dal genotipo 1, mentre in Messico e Nigeria prevale il genotipo 2. Nei Paesi industrializzati, dove fino a poco tempo fa l'infezione era considerata non endemica, sono stati descritti solo ceppi appartenenti ai genotipi 3 e 4 (1, 14, 15, 58, 62). Il genotipo 3 prevale in USA, mentre il 4 in Cina e a Taiwan (2, 26, 58). Alcuni isolati provenienti dall'Europa e anche dall'Italia sono stati assegnati a nuovi genotipi per la loro diversità nucleotidica, ma probabilmente potrebbero essere raggruppati insieme ai ceppi americani in un più grande ed eterogeneo gruppo (58).

Il primo ceppo animale di HEV è stato identificato e caratterizzato nelle regioni centro-occidentali degli USA nel 1997. Il virus, denominato *Swine Hepatitis E Virus* o *Swine HEV*, apparteneva al genotipo 3 e presentava un'elevata omologia con alcuni ceppi umani (37). In particolare, l'ORF2 del ceppo suino presentava il 92% di identità nucleotidica e il 97% di identità aminoacidica con 2 ceppi di HEV umani americani considerati autoctoni (ceppi US-1 e US-2); tale analogia ha consentito di ipotizzare l'appartenenza dei 2 ceppi alla medesima Famiglia e di considerare il suino un modello animale alternativo per lo studio dell'HEV umano (37). Altri ceppi di HEV suino, tutti appartenenti al genotipo 3 o 4, sono stati successivamente identificati in numerosi Paesi industrializzati e sono spesso risultati geneticamente simili ai ceppi responsabili di episodi sporadici di malattia nell'uomo (3, 5, 9, 15, 18, 23, 26, 37, 38, 41, 48, 49, 50, 57). Come i ceppi umani, anche i ceppi suini sono geneticamente piuttosto diversi tra loro da regione a regione (10, 14, 38, 49, 50, 62). Recentemente, ceppi di HEV sono stati isolati anche da roditori e da polli (24, 25). In Nepal, analisi filogenetiche degli isolati virali di origine

murina hanno dimostrato una stretta correlazione con gli stipiti di HEV di origine umana, con il 95-98% di omologia nucleotidica e il 98% di omologia aminoacidica (25). L'HEV aviare è invece geneticamente correlato ma, nettamente distinto dagli altri ceppi di HEV ed è stato associato alla sindrome epatomegalia-splenomegalia (HS) dei polli (24). Tale sindrome fu per la prima volta segnalata in Canada nel 1991 ed in seguito è stata descritta anche negli USA. La malattia è caratterizzata da un aumento di mortalità nei broiler da riproduzione e nei polli, nonché da un calo di produzione delle uova di circa il 20%. Regressione delle ovaie, accumulo di fluido in addome, aumento di volume di fegato e milza e un quadro istologico caratterizzato da necrosi ed emorragie epatiche sono le lesioni predominanti negli animali infetti (47). Sperimentalmente il virus è infettante anche per il tacchino ma, al contrario dell'HEV suino, non lo è per le scimmie (27, 47). L'identità nucleotidica dell'HEV aviare con i ceppi umani e suini è soltanto del 48-60%, anche se anticorpi specifici sono cross-reagenti nei confronti di proteine capsidiche di entrambi i virus, dimostrando la presenza di epitopi comuni (23, 24, 27, 47). Ad oggi non è chiaro se questo agente rappresenti un nuovo genotipo di HEV o se sia un parente più lontano dei virus umani e suini.

Infezioni da HEV nell'uomo

Epidemiologia

L'infezione da HEV è diffusa in prevalenza nei Paesi tropicali e sub-tropicali in via di sviluppo: gran parte dell'Asia, Nord Africa, Medio Oriente ed America centro-meridionale (1, 14, 37, 58). In queste aree si manifesta in genere con episodi epidemici che coinvolgono fasce molto ampie di popolazione e che possono essere prolungati nel tempo con tassi d'attacco variabili dall'1% al 15%

e con gli adulti più colpiti rispetto ai giovani (1). Nella maggior parte delle aree endemiche la sieroprevalenza è di circa il 5% nei bambini sotto 10 anni e tende ad aumentare con valori che raggiungono il 10-40% negli adulti sopra i 25 anni (1, 14). La maggior parte delle epidemie è stata associata al consumo di acqua contaminata, spesso in concomitanza di forti piogge o inondazioni (1, 14). La trasmissione interumana sembra essere rara, con tassi d'attacco secondario all'interno dei nuclei familiari inferiori al 5%, quindi molto più bassi rispetto a quelli dell'epatite A (50-75%). Questo potrebbe dipendere da differenze nella dose infettante, nella quantità di virus escreto con le feci, nella capacità del virus di persistere nell'ambiente (1, 14).

L'infezione da HEV è oggi ritenuta endemica anche in molti Paesi industrializzati (28, 34). In USA, Giappone ed Europa sono infatti segnalati sempre più spesso casi sporadici di malattia in soggetti che non risultano aver viaggiato all'estero (8, 10, 14, 15, 37, 48, 58, 56, 61, 63). I ceppi isolati in tali episodi sono geneticamente diversi da quelli di altre zone, facendo supporre che questi casi di malattia siano ascrivibili a virus endemici sul territorio (1, 7, 14, 26, 37, 38, 44, 58, 62). Diversi studi sieroepidemiologici hanno inoltre rilevato una notevole prevalenza anticorpale anti-HEV (5-20%) nella popolazione sana di molti Paesi industrializzati, facendo pensare ad un'elevata diffusione dell'infezione, seppur in genere a livello subclinico (1, 2, 14, 37, 41, 44, 48, 58). Probabilmente, in tali regioni, le condizioni igieniche non consentono il verificarsi degli episodi epidemici che si osservano nei Paesi in via di sviluppo e quindi la malattia si manifesta solo in forma sporadica. Le vie di trasmissione implicate nei casi sporadici di malattia non sono state ancora chiarite; oltre all'ingestione di acqua e alimenti contaminati e al contatto interpersonale, è dimostrato che l'infezione si

trasmette verticalmente dalla madre al feto, mentre non ci sono evidenze di trasmissione per via sessuale (1, 14). La possibilità d'infezione attraverso i derivati del sangue o la pratica dell'emodialisi è stata documentata, ma non è ancora chiara la sua importanza (1, 14, 17). La trasmissione zoonosica della malattia è ormai accertata (52). I rischi possono venire dal contatto diretto o indiretto con materiale infetto proveniente dagli animali colpiti, in questo caso esposte sarebbero categorie professionali quali veterinari, allevatori, macellatori, personale addetto agli animali o, dall'ingestione di alimenti infetti o contaminati per via secondaria (acqua, piante, prodotti carnei, molluschi filtratori). Tra le possibili vie di trasmissione va anche considerata la pratica dello xenotrapianto (37).

Nel complesso in Italia il virus dell'HEV sembra essere responsabile di circa il 10% delle epatiti virali non-A non-B, non-C (63). La maggior parte dei casi di malattia sono stati registrati in viaggiatori provenienti da aree in via di sviluppo considerate tradizionalmente endemiche ma, nel 1999, una nuova variante di HEV è stata identificata nelle feci di un paziente che non aveva viaggiato né era venuto a contatto con individui di ritorno da tali zone (63). Questo stipite si è rivelato geneticamente diverso dai virus isolati in altri Paesi, mostrando una relativa analogia nucleotidica solo con ceppi americani del genotipo 3 (44, 63) ed è stato quindi considerato originario del territorio italiano.

Dal punto di vista sierologico, la presenza di anticorpi anti-HEV è stata rilevata in diverse regioni nel nostro paese (4, 6, 11, 17, 19, 20, 40, 43, 46, 64), con prevalenze che oscillano tra l'1% ed il 5%. I valori di sieropositività più elevati sono stati riscontrati tra emodializzati, tossicodipendenti e persone positive ad altri marcatori di epatiti virali post-trasfusionali. È stato inoltre evidenziato un gradiente di sieropositività che va da Nord a

Sud (63). La maggiore prevalenza nel Sud del paese è probabilmente ascrivibile alla maggiore vicinanza di paesi in cui la malattia è considerata da molti anni endemica e all'elevato flusso migratorio da tali zone; alcuni Autori ritengono che anche la pratica assai diffusa al Sud di consumare molluschi crudi possa essere un fattore di rischio aggiuntivo (4).

Patogenesi

Numerose informazioni sono state ottenute infettando sperimentalmente primati non umani. L'infezione può essere eseguita per via endovenosa e per via orale; quest'ultima, che rappresenta la principale via naturale di trasmissione, richiede una carica infettante 10.000 volte maggiore rispetto alla via endovenosa (1, 14). Dopo l'ingestione il periodo d'incubazione è in genere di 4-5 settimane. Le vie e i meccanismi con cui HEV raggiunge il fegato non sono ancora stati chiariti. Una volta nel fegato, il virus replica nel citoplasma degli epatociti, si accumula nella bile ed è quindi escreto attraverso le feci. La viremia inizia quando il virus è già rilevabile nel fegato (1). Ad oggi non si conoscono siti extraepatici di replicazione e non è quindi noto se il virus che si trova nelle feci sia interamente di origine epatica o se vi sia replicazione anche nel tratto intestinale. La viremia e l'escrezione nelle feci sono rilevate prima delle alterazioni epatiche che normalmente appaiono simultaneamente alla risposta immunitaria e sono caratterizzate dall'innalzamento delle transaminasi (1). Il virus può essere ritrovato nelle feci a partire da una settimana prima dell'inizio dei sintomi e fino a 2 settimane dopo la fine della malattia. L'RNA virale è generalmente presente nel siero dei pazienti per 2 settimane dall'inizio della malattia, ma in alcuni casi, è stato osservato fino a 16 settimane dopo (1). Il meccanismo per cui si produce il danno epatico non è ancora stato chiarito,

ma è probabile che la componente immunomediata sia più rilevante del danno diretto operato dal virus, che non è considerato citopatico. Questa ipotesi è supportata dal fatto che gli infiltrati linfocitari in corso di malattia sono costituiti da linfociti citotossici o suppressor (1).

Le IgM appaiono durante le prime fasi della malattia e scompaiono nel giro di 4-5 mesi. Durante le epidemie, IgM sono state rilevate in più del 90% dei campioni di siero ottenuti da una settimana a 2 mesi dall'inizio della malattia. Le IgG compaiono poco dopo le IgM e il loro titolo aumenta durante la fase acuta e la convalescenza, rimanendo alto per 1-4 anni. La durata della persistenza delle IgG non è stata ancora determinata, ma anticorpi anti-HEV sono stati rilevati anche 14 anni post-infezione (1, 14).

Caratteristiche cliniche

L'epatite E si manifesta con diverse forme cliniche. L'epatite acuta itterica è la forma più comune ed è caratterizzata da una fase prodromica che dura pochi giorni in cui si manifestano sintomi simil-influenzali quali febbre, tremori, anoressia, nausea, vomito, dolori addominali, diarrea, dolori articolari, astenia ed un temporaneo rash cutaneo. Questi sintomi sono seguiti dopo pochi giorni da ittero con inscurimento delle urine e feci ipocoliche. Con la comparsa dell'ittero la febbre e gli altri sintomi prodromici tendono a diminuire ed a scomparire del tutto. Le indagini di laboratorio mostrano bilirubinuria, bilirubinemia (principalmente coniugata), elevazione degli enzimi epatici. Con il regredire della malattia, che in genere si autolimita e ha una durata compresa tra 1 e 4 settimane, i valori ematochimici tornano gradualmente alla normalità (1). L'epatite E è una patologia a carattere acuto che non tende mai alla cronicizzazione e alla cirrosi. In alcuni pazienti si può tuttavia avere una forma «prolungata» con

colestasi, persistenza dell'ittero e intenso prurito. In questi casi le analisi di laboratorio mostrano un marcato innalzamento della fosfatasi alcalina ed un persistere della bilirubinemia, anche dopo che i valori di transaminasi sono tornati nella norma. La prognosi è comunque favorevole e la malattia e l'ittero tendono a risolversi spontaneamente nel giro di 2-6 mesi (1, 14). Una piccola proporzione di pazienti può però sviluppare insufficienza epatica fulminante o subacuta con esito a volte infausto. Molti pazienti, d'altro canto, presentano solo sintomi simil influenzali e in questi casi il coinvolgimento epatico è riconoscibile solo con le indagini di laboratorio (1).

Durante gli episodi epidemici è stata riscontrata una letalità variabile tra lo 0,07% e il 2%, quindi leggermente superiore a quella dell'epatite A. Le donne in gravidanza, in particolare nel secondo e terzo trimestre, sviluppano una malattia più severa con prognosi riservata e valori di letalità tra il 15% e il 25%. Le possibilità di aborti, nati prematuri e morte neonatale sono inoltre elevate. Le ragioni per cui il danno epatico risulta particolarmente grave nelle donne in gravidanza sono sconosciute (1). Tali ragioni non sembrano comunque ascrivibili alle scarse condizioni di salute che si riscontrano nei Paesi in via di sviluppo in quanto, anche nei Paesi industrializzati, la letalità in questa fascia di popolazione risulta egualmente elevata.

L'infezione da HEV può anche essere del tutto asintomatica; la frequenza di queste forme non è nota, ma probabilmente supera ampiamente i casi con ittero. Nelle aree endemiche, un'elevata percentuale degli individui sieropositivi non presenta, infatti, anamnesi di epatite (1, 14).

Dal punto di vista patologico, la forma più comune è un'epatite colestatica caratterizzata istologicamente da stasi biliare canalicolare e alterazione «pseudoghiandolare» delle cellule del

parenchima con lievi alterazioni degenerative degli epatociti. In altri casi, invece, le lesioni sono simili a quelle associate ad altre forme di epatite virale acuta con alterazioni regressive disseminate degli epatociti (apoptosi, degenerazione acidofila e palloniforme di singole cellule, steatosi, necrosi locale), accentuata colestasi con o senza proliferazione di dotti biliari, ipertrofia delle cellule del Kupffer con accumulo di bile, infiammazione portale con infiltrazione di neutrofili, macrofagi e linfociti (1, 14). Attualmente, non esiste una terapia efficace e, nonostante siano in fase di studio, non sono ancora disponibili vaccini. Di fondamentale importanza è quindi la prevenzione (58).

Infezioni da HEV nel suino

Epidemiologia

L'infezione da HEV nel suino appare diffusa sia nei Paesi industrializzati, sia nei Paesi in via di sviluppo dove la malattia è considerata endemica nell'uomo da molti anni (34, 28). Dopo la prima identificazione nel 1997, diversi ceppi sono stati isolati in Nord e Centro America, Asia, Europa, Nuova Zelanda ed Australia (2, 5, 8, 9, 10, 18, 26, 37, 41, 42, 49, 50, 56, 57, 62). Tali isolati appartengono al genotipo 3 o 4 e, come per i virus umani, dimostrano un'elevata divergenza genetica e filogenetica da regione a regione. I ceppi suini isolati nei Paesi industrializzati in particolare, sono stati spesso correlati geneticamente ai ceppi coinvolti in episodi di malattia nell'uomo in cui la fonte d'infezione era sconosciuta (3, 8, 16, 23, 37, 38, 49). 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 (2, 5, 8, 9, 10, 18, 26, 34, 37, 41, 42, 49, 50, 56, 57, 62). La sieroprevalenza varia sensibilmente in funzione dell'area geografica e dell'età: i suini sotto i 2 mesi sono in genere negativi o scarsamente positivi, mentre in animali

di età superiore a 3 mesi sono state trovate sieropositività spesso superiori all'80%. La prevalenza stimata è la seguente (2, 43):

- USA e Nuova Zelanda: 91-100%
- Australia e Canada: 60%
- Cina: 30%
- Olanda: 25%
- Spagna: 75%
- Regno Unito: 65-85%
- Germania: 75-80%.

Se si accetta la possibilità di trasmissione zoonosica dell'infezione, è chiaro che all'aumentare della prevalenza negli animali, corrisponde un rischio maggiore di trasmissione per l'uomo. In questa ottica i dati sopra citati destano una certa preoccupazione. In Italia, d'altro canto, non sono al momento disponibili informazioni riguardanti la diffusione e la sieroprevalenza dell'infezione nella specie suina.

Patogenesi

Si ritiene che la via principale di trasmissione sia quella oro-fecale; non ci sono evidenze di trasmissione verticale del virus (35, 36). Sperimentalmente, è stato dimostrato il passaggio dell'infezione da animali inoculati ad animali non infettati ma tenuti a contatto con quelli inoculati, confermando la contagiosità del virus (31, 35, 36). L'infezione sperimentale per via oro-fecale è possibile, ma è difficile da riprodurre e richiede in genere esposizioni ripetute al virus; per questo motivo viene generalmente utilizzata la via endovenosa (31, 35). In analogia a quanto visto nell'uomo, non è ancora chiaro in che modo HEV, una volta penetrato nell'ospite, raggiunga il fegato né quali siano i siti iniziali di replicazione. In animali infettati sperimentalmente per via endovenosa è possibile rilevare, tramite *polymerase chain reaction* (PCR) o ibridazione *in-situ*, RNA virale in numerosi tessuti extraepatici, anche in assenza di viremia, fino a 20-27 giorni post-infezione

(p.i.). La forma replicativa del virus, a filamento negativo, oltre che nel fegato si ritrova soprattutto nel tratto intestinale e nei linfonodi (7, 59). La viremia ha una durata di circa 2 settimane mentre nelle feci è possibile ritrovare il virus fino a 3-4 settimane. La sierconversione avviene 2-3 settimane p.i. (22, 35, 36, 59). I tessuti in cui HEV replicherebbe prima e più a lungo (da 3 a 27 giorni p.i.) sono fegato, intestino tenue, colon e linfonodi (22, 59). Queste osservazioni ed il fatto che in corso d'infezione sperimentale l'RNA virale sia riscontrabile nelle feci prima che nella bile ed in quantità circa 10 volte maggiore rispetto a quest'ultima hanno fatto ipotizzare che, una volta penetrato per via oro-fecale e prima di indurre viremia, il virus replichi nell'intestino (35, 36). Le indagini virologiche effettuate sul siero e/o sulle feci di animali in allevamento hanno dimostrato che RNA di HEV è rilevabile principalmente in animali di 2-5 mesi d'età, mentre in genere animali sotto i 2 mesi e sopra i 6-8 mesi di vita sono negativi (2, 8, 10, 26, 37, 41, 42, 49, 50, 56, 62). In seguito a queste rilevazioni e poiché si ritiene che l'immunità materna duri circa 2 mesi, si ipotizza che l'infezione naturale avvenga a circa 2-3 mesi d'età (22, 29, 37). Dopo l'infezione segue la viremia, che dura circa 1-2 settimane e quindi l'escrezione del virus attraverso le feci per circa 3-4 settimane (3-5 mesi d'età), con successiva sierconversione ed eliminazione del virus ad opera del sistema immunitario (23, 26, 35, 36). L'infezione sarebbe quindi di breve durata e si autoestinguerrebbe nel giro di poche settimane (37, 61).

Dal punto di vista sierologico, l'immunità passiva materna decresce a partire da 3-4 settimane e si estingue a 8-9 settimane di vita. È raro tuttavia trovare animali sieropositivi sotto 1-2 mesi d'età, questo probabilmente a causa della sensibilità non adeguata dei test sierologici (37). Dopo l'infezione gli animali sviluppano anticorpi nei

confronti del virus montando prima una risposta anticorpale in cui prevalgono le IgM, seguite dopo una settimana circa da un innalzamento delle IgG. A questo punto le IgM decrescono rapidamente nel giro di 1-2 settimane mentre le IgG incrementano costantemente per diverse settimane. La sierconversione avviene in seguito alla fase viremica intorno ai 3-4 mesi di vita (picco anticorpale a 4 mesi) e gli animali restano altamente positivi fino a 5-6 mesi di vita, quando le IgG cominciano lentamente a decrescere (23, 26, 37, 59, 62).

Caratteristiche cliniche

Il virus non sembra essere particolarmente patogeno per il suino domestico, mentre non esistono informazioni relative ai cinghiali. Lo studio della malattia in animali naturalmente infetti o inoculati sperimentalmente ha dimostrato che HEV provoca di regola infezioni subcliniche con segni di epatite rilevabile solo a livello istologico (22, 35, 36, 37, 59); questa si caratterizza per la presenza di modesti infiltrati linfoplasmocitari multifocali sinusoidali e periportal e di limitate aree focali a distribuzione irregolare di vacuolizzazione e necrosi epatocellulare (22, 32, 35, 36, 37, 59). In alcuni casi è stata rilevata un'enterite linfoplasmocitaria ed una nefrite interstiziale multifocale linfoplasmocitaria (32). Dal punto di vista macroscopico, in animali infettati sperimentalmente è stato talvolta rilevato un ingrossamento dei linfonodi mesenterici ed epatici (22). Da rilevare che ceppi umani inoculati sperimentalmente nel suino sembrano, in genere, provocare infezioni più severe dal punto di vista delle alterazioni istologiche rispetto a quelle ottenute con i ceppi suini (22, 35).

Alcuni Autori (36, 37), hanno ipotizzato che il virus nel suino possa avere un comportamento analogo a quello dell'epatite A nell'uomo il quale è patogeno solo nei soggetti adulti e non nei giovani. Secondo questa ipotesi, nella maggior parte dei casi la malattia non si manifesterebbe

in modo clinicamente evidente in quanto la maggioranza dei suini adulti sarebbe protetta dall'infezione per aver incontrato il virus in uno stadio giovanile di vita, sviluppando così un'immunità attiva protettiva (37).

In uno studio recente, tuttavia, 12 scrofe sieronegative sono state inoculate per via endovenosa con un ceppo di HEV suino e durante il periodo della sperimentazione, non sono stati rilevati segni clinici di malattia né nelle madri né nei relativi feti. Una leggera epatite linfoistiocitaria è stata osservata in 4 delle 12 scrofe, mentre non è stato registrato alcun effetto sulla vitalità, taglia, peso alla nascita e incremento ponderale giornaliero della prole (29).

Alcuni Autori ritengono che HEV, di per sé scarsamente patogeno, possa però agire in sinergia con altri agenti virali come ad esempio il circovirus suino tipo 2 (PCV2), determinando così malattia (13). Informazioni relative a possibili strategie di controllo dell'infezione negli allevamenti suini non sono al momento disponibili, tuttavia, dal punto di vista della profilassi dell'infezione, poiché in analogia con quanto avviene nell'uomo anticorpi anti-HEV sembrano essere protettivi (58), non è da escludere che in futuro si possa pensare di utilizzare strategie di profilassi indiretta per contrastare la diffusione del virus negli allevamenti, in modo da minimizzare così i rischi per la salute umana.

Evidenze di trasmissione zoonosica

Già a partire dai primi anni '90, anticorpi anti-HEV erano stati rilevati in numerose specie animali quali scimmie, suini, roditori, polli, cani, gatti, bovini e ovi-caprini, sia in Paesi in via di sviluppo, sia industrializzati (1, 2, 14, 25, 26). Fin da allora era stato quindi avanzato il sospetto che l'HEV umano fosse in grado di infettare altre specie animali o, che esistessero in natura virus HEV simili. Nel 1990, Usamanov *et al.* (55) ottennero la trasmissione sperimentale del virus in suinetti

Large White, inoculando per via endovenosa un ceppo di HEV isolato in Asia centrale da pazienti naturalmente infetti. Successivamente, lo stesso gruppo di ricerca (54) dimostrò la possibilità di trasmissione da suinetto a suinetto della malattia senza però sequenziare e caratterizzare il ceppo utilizzato. Fin dal 1995 era stato poi osservato che in aree endemiche come il Nepal, ceppi di HEV umano potevano essere ritrovati nelle feci di suini domestici che vivevano a contatto con persone infette da HEV (9). Nel 1997, la scoperta di virus HEV-like nella specie suina e pochi anni dopo nei roditori e nei polli (24, 25, 37), portò ad ipotizzare l'esistenza di serbatoi animali endemici del virus e la possibile origine zoonosica di alcuni dei casi sporadici di malattia registrati nei Paesi industrializzati. Oggi, la capacità di HEV di effettuare il salto di specie è stata ampiamente confermata da infezioni sperimentali che hanno dimostrato la possibilità di infettare il suino con ceppi umani e i primati non umani con ceppi suini (22, 35, 36, 59). I ceppi suini in grado di infettare le scimmie appartengono fino ad ora esclusivamente al genotipo 3. Tali virus causano sostanzialmente infezioni asintomatiche ma, vista anche la notevole variabilità genetica del virus, alcuni Autori non escludono che particolari stipiti possano risultare più patogeni di altri o che, in situazioni particolari dell'ospite, anche ceppi scarsamente virulenti possano causare una malattia più o meno grave (22, 35, 36, 41). Altre importanti evidenze che supportano la possibilità di trasmissione zoonosica della malattia, sono venute dall'analisi genetica e filogenetica di ceppi suini ed umani isolati in varie regioni nel mondo. Numerosi studi hanno infatti riportato di forti analogie nucleotidiche ed aminoacidiche esistenti tra i virus suini ed umani isolati nella stessa area geografica (2, 8, 16, 23, 26, 37, 38, 41, 49, 57, 59, 62). Recentemente, un ceppo di HEV isolato da una paziente in Gran Bretagna,

ha mostrato il 100% di identità aminoacidica con 2 ceppi suini circolanti sul territorio (3). Un ulteriore supporto all'ipotesi che vede il suino quale probabile serbatoio d'infezione per l'uomo è venuto da studi sieroepidemiologici (12, 26, 34, 45, 60) condotti in USA, Taiwan, Moldova e Grecia, che hanno rilevato una prevalenza anticorpale per HEV significativamente più elevata in persone professionalmente esposte al contatto con suini (allevatori, veterinari, macellatori, addetti agli animali, commercianti) rispetto a popolazioni di controllo. In America, Meng *et al.* hanno rilevato che il 26% dei veterinari sono sieropositivi per HEV contro il 18% dei normali donatori di sangue (34). Sempre in America, Withers e coll. riportano che persone esposte al contatto con suini hanno una prevalenza di anticorpi anti-HEV 4,5 volte superiore rispetto a quello di persone non esposte al contatto con suini (60). A Taiwan (26) e in Moldova (12), 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. In Grecia, Siochu *et al.* (45) hanno 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.

Infine, l'evidenza diretta che l'uomo può infettarsi dal suino e probabilmente anche da altre specie animali è stata recentemente prodotta in Giappone, dove casi di epatite E sono stati associati epidemiologicamente all'ingestione di carne o organi crudi di suino, di cinghiale e di cervo (33, 51, 52, 61). In tutti i casi sospettati, le persone colpite riportarono di aver ingerito carne o organi animali crudi poche settimane prima dell'inizio dei sintomi. In uno di questi episodi, un ceppo di HEV geneticamente identico a quello identificato nei casi umani è stato ritrovato nella carne di cervo Sika implicata nell'epidemia ed ancora conservata

nel congelatore dei pazienti (52). Uno studio sieroepidemiologico successivo, ha confermato che l'ingestione di carne cruda di cervo andrebbe considerata tra i fattori di rischio per l'infezione (53).

Diagnosi di laboratorio

Nell'uomo

Ad oggi HEV non è coltivabile in coltura cellulare. Risultati parziali sono stati ottenuti usando cellule di polmone umano e cellule di scimmia, in particolare epatociti, ma senza ottenere rese accettabili (15). I metodi di laboratorio per la diagnosi includono quindi tecniche biomolecolari e di microscopia elettronica per l'identificazione diretta del virus e test sierologici per l'identificazione degli anticorpi anti-HEV. La diagnosi mediante microscopia elettronica, partendo da 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 o di siero mediante *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR); è spesso utilizzata una RT-PCR *nested* in modo da aumentare la sensibilità del test. Al fine di identificare il prodotto amplificato e caratterizzare il genotipo viene effettuato il sequenziamento dell'acido nucleico virale, il clonaggio o la restrizione con endonucleasi. Recentemente è stata sviluppata una *Real Time PCR* che non solo permette la quantificazione della carica virale, ma aumenta notevolmente anche la rapidità, sensibilità e specificità del test (39). La diagnosi sierologica viene effettuata generalmente con test ELISA o, meno comunemente, con il Western blot. Gli antigeni usati nei test sono proteine ricombinanti o peptidi sintetici che corrispondono ad epitopi immunodominanti delle proteine strutturali del virus ORF2 e ORF3 (14, 34). Antigeni ricombinanti derivati da ORF2 hanno in genere una superiore sensibilità e specificità.

ORF2 esprime inoltre epitopi che possono indurre anticorpi neutralizzanti e che sono maggiormente conservati all'interno dei differenti ceppi (90,5%) rispetto a quelli di ORF3 (73,5%) (58). Fino ad oggi, ORF2 o sue porzioni sono stati espressi con successo in diversi sistemi ricombinanti quali cellule procariote, lieviti, cellule animali (particolarmente utilizzate quelle d'insetto) e cellule vegetali (58).

I test sierologici sono in grado di differenziare tra IgM e IgG; la determinazione delle IgM anti-HEV è utile per la diagnosi di infezione acuta, mentre la presenza di IgG indica un'infezione non necessariamente recente. Numerosi studi effettuati in Paesi industrializzati riportano valori di prevalenza anticorpale che vanno dall'1% al 20% circa. Alcuni di questi valori appaiono elevati se comparati con la prevalenza clinica della malattia. Non è ancora del tutto chiaro perciò se l'elevata sieropositività in aree non endemiche sia dovuta ad infezioni subcliniche o anitteriche, cross-reattività sierologica con altri agenti, falsi positivi ai test sierologici, infezione subclinica con HEV suino o altri virus HEV simili o ad una combinazione di questi fattori (1, 14). Purtroppo, i test sierologici attualmente utilizzati sono spesso diversi tra loro e presentano differenti sensibilità e specificità, rendendo difficile l'interpretazione e la comparazione dei risultati riportati nei diversi studi.

Nel suino

La diagnosi nel suino viene effettuata con le stesse tecniche usate per l'uomo saggiando non solo siero e feci, ma anche tessuti e organi prelevati da animali sottoposti a macellazione o necropsia. Per la ricerca diretta del virus mediante RT-PCR è necessario esaminare campioni di suini in cui l'infezione sia ancora presente, quindi intorno ai 3-5 mesi d'età, mentre i test sierologici danno risultati positivi soprattutto in animali adulti. L'estrazione dell'acido nucleico viene effettuata

a partire da campioni di feci, siero o tessuti. Primers specifici, disegnati appositamente per i virus suini, sono oggi disponibili (28, 30). Per la ricerca dai tessuti viene in genere esaminato il fegato, visto anche il suo utilizzo in alimentazione umana e in secondo ordine il tratto intestinale o i linfonodi (61). In questo caso, oltre alla RT-PCR, è possibile utilizzare l'ibridazione in situ o l'immunoistochimica. Queste tecniche permettono la localizzazione del virus all'interno dei tessuti e delle cellule infette e sono un valido strumento per correlare il virus alle lesioni ed individuare i siti di replicazione virale (7, 21). La ricerca del virus nei tessuti ed organi, *in primis* il fegato, non ha quindi solo un'importanza per valutare il rischio zoonosico legato agli alimenti destinati al consumo umano, ma ha anche aperto nuove possibilità per comprendere la patogenesi dell'infezione (7). I virus suini sono geneticamente ed antigenicamente correlati a quelli umani ed aviari ed in letteratura è ampiamente riportato come molti epitopi, in particolare di ORF2, cross-reagiscano tra le varie specie ed i vari ceppi (8, 16, 24, 28, 34, 58). Per la diagnosi sierologica quindi, pur esistendo test che usano antigeni ricombinanti specifici per il suino, sono comunemente utilizzati anche antigeni derivati da ceppi umani, cambiando poi semplicemente l'anti-anticorpo marcato di rivelazione (34).

Conclusioni

Gli studi virologici ed epidemiologici condotti in questi ultimi anni hanno dimostrato in maniera chiara come l'epatite da HEV possa essere considerata una nuova zoonosi. Il virus sembra avere nella specie suina il principale serbatoio animale e questo suscita preoccupazioni sul piano della salute pubblica. L'infezione può essere acquisita per via alimentare attraverso il consumo di prodotti carnei contaminati (3, 33, 51, 52, 61),

ma questa eventualità, almeno nel nostro Paese, è resa poco probabile dal fatto che il virus è inattivato dai normali procedimenti di cottura e sembra inoltre essere presente soprattutto in suini con meno di 5 mesi di vita, quindi molto al di sotto dell'età di macellazione. Occorre tuttavia ricordare la possibilità di contaminazione crociata tra prodotti carnei crudi ed altri alimenti pronti per il consumo ed il rischio di diffusione del virus nell'ambiente con i reflui di allevamenti suinicoli, con conseguente possibile contaminazione dei vegetali e delle acque, sia ad uso potabile, sia di balneazione. Da considerare poi che, come per l'epatite A, l'inquinamento delle acque potrebbe portare alla contaminazione di molluschi eduli lamellibranchi filtratori, portando ulteriori rischi per la salute pubblica.

Un'altra possibile fonte d'infezione è il contatto diretto con gli animali; in questo caso a rischio sarebbero categorie professionali come allevatori, personale addetto agli animali e veterinari che possono venire in contatto con i suini nel periodo di viremia e di escrezione del virus nelle feci (12, 34, 45, 60, 61). Per tali categorie, non è poi da escludere la possibilità d'infezione per via indiretta attraverso il contatto con strumenti ed attrezzi da lavoro contaminati dalle feci degli animali infetti. La consapevolezza di tali rischi dovrebbe quindi favorire il rispetto delle procedure di igiene e biosicurezza utili a scongiurare o diminuire la possibilità d'infezione. Infine, la scoperta dell'HEV suino ha creato un ulteriore problema per le prospettive della pratica dello xenotrapianto. Tale pratica è stata suggerita come possibile soluzione per la carenza di organi a fini di trapianto, tuttavia, la possibilità di trasmissione di patogeni dall'animale donatore al ricevente desta grande preoccupazione. Virus patogeni o moderatamente patogeni per il suino possono costituire un serio rischio per l'uomo, come anche virus normalmente non patogeni per

l'animale che, in seguito allo xenotrapianto, potrebbero diventare pericolosi come risultato di un salto di specie, di ricombinazione genetica, o di adattamento ad un ospite seriamente immunocompromesso (37, 41). Per l'HEV è inoltre da considerare che i suini guariti dall'infezione potrebbero avere un fegato danneggiato, limitando così la possibilità di xenotrapianto (37).

La natura enzootica dell'infezione in numerosi paesi e l'abilità di HEV di infettare diverse specie animali destano quindi grande preoccupazione per il rischio zoonosico di trasmissione della malattia. In campo veterinario, tuttavia, sono ancora numerosi gli aspetti che richiedono approfondimento. Da un punto di vista virologico, i ceppi di HEV di origine animale studiati fino ad oggi sono ancora pochi e le relazioni genetiche ed evoluzionistiche che intercorrono tra i ceppi delle diverse specie animali e tra questi e i virus umani devono ancora essere chiarite. La storia naturale dell'infezione da HEV nel suino è ancora in parte da studiare, così come l'entità e il significato economico delle eventuali patologie associate in questa specie. Lo spettro d'ospite di HEV e dei virus correlati non è ancora stato indagato a fondo, e i casi giapponesi associati al consumo di carne di cinghiale e di cervo indicano la necessità di considerare più approfonditamente il ruolo degli animali selvatici, in primo luogo suidi e ruminanti. Nonostante l'importanza sanitaria dell'argomento, in Europa le indagini sulla presenza e la circolazione dell'HEV negli allevamenti suini o in altre specie animali sono ancora scarse (2, 10, 56). In paesi come Spagna, Olanda e UK dove sono stati condotti studi epidemiologici approfonditi è stato dimostrato che il virus circola attivamente nella popolazione suina (2, 10, 56) Se si accetta la possibilità di trasmissione zoonosica dell'infezione, è chiaro che all'aumentare della prevalenza negli animali, corrisponde un rischio maggiore di trasmissione

per l'uomo. Valutare se il virus è presente nei suini italiani ed eventualmente in altre specie domestiche o selvatiche e studiare dal punto di vista genetico ed epidemiologico tali virus è quindi il primo importante passo per capire se, anche in Italia, esiste un rischio di trasmissione zoonosica dell'HEV.

Bibliografia

1. Aggarwall R. & Krawczynski K. 2000. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol*, **15**, 9-20.
2. Banks M., Bendall R., Grierson S., Heath G., Mitchell J. & Dalton H. 2004. Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*, **10**, 953-955.
3. Banks M., Heath G.S., Grierson S.S., King D.P., Gresham A., Girones R., Widen F. & Harrison T.J. 2004. Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *Vet Rec*, **154**, 223-227.
4. Cacopardo B., Russo R., Preiser W., Benanti F., Brancati G. & Nunnari A. 1997. Acute hepatitis E in Catania (eastern Sicily) 1980-1994. The role of hepatitis E virus. *Infection*, **25**, 313-316.
5. Chandler J.D., Riddell M.A., Li F., Love R.J. & Anderson D.A. 1999. Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet Microbiol*, **68**, 95-105.
6. Chironna M., Germinario C., Lopalco P.L., Carrozzini F. & Quarto M. 2001. Prevalence of hepatitis virus infections in Kosovar refugees. *Int J Infect Dis*, **5**, 209-213.
7. Choi C. & Chae C. 2003. Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. *J Hepatol*, **38**, 827-832.
8. Choi I.S., Kwon H.J., Shin N.R. & Yoo H.S. 2003. Identification of swine hepatitis E virus (HEV) and prevalence of anti-HEV antibodies in swine and

- human populations in Korea. *J Clin Microbiol*, **41**, 3602-3608.
9. Clayson E.T., Innis B.L., Myint K.S., Narupiti S., Vaughn D.W., Giri S., Ranabhat P. & Shrestha M.P. 1995. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg*, **53**, 228-232.
 10. Clemente-Casares P., Pina S., Buti M., Jardi R., Martin M., Bofill-Mas S. & Girones R. 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis*, **9**, 448-454.
 11. De Donno A., Chironna M., Craca R., Paiano A., Zizza A., Guido M., Carrozzini F., Germinario C. & Gabutti G. 2003. Anti-HEV seroprevalence in the area of Lecce. *Ann Ig*, **15**, 199-205.
 12. Drobeniuc J., Favorov M.O., Shapiro C.N., Bell B.P., Mast E.E., Dadu A., Culver D., Iarovoi P., Robertson B.H. & Margolis H.S. 2001. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis*, **184**, 1594-1597.
 13. Ellis J., Clark E., Haines D., West K., Krakowka S., Kennedy S. & Allan G.M. 2004. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet Microbiol*, **98**, 159-163.
 14. Emerson S.U. & Purcell R.H. 2003. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol*, **13**, 145-154.
 15. Emerson S.U., Nguyen H., Graff J., Stephany D.A., Brockington A. & Purcell R.H. 2004. *In vitro* replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J Virol*, **78**, 4838-4846.
 16. Engle R.E., Yu C., Emerson S.U., Meng X.J. & Purcell R.H. 2002. Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*, **40**, 4576-4580.
 17. Fabrizi F., Lunghi G., Bacchini G., Corti M., Pagano A. & Locatelli F. 1997. Hepatitis E virus infection in haemodialysis patients, a seroepidemiological survey. *Nephrol Dial Transplant*, **12**, 133-136.
 18. Garkavenko O., Obriadina A., Meng J., Anderson D.A., Benard H.J., Schroeder B.A., Khudyakov Y.E., Fields H.A. & Croxson M.C. 2001. Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J Med Virol*, **65**, 525-529.
 19. Gessoni G. & Manoni F. 1996. Hepatitis E virus infection in north-east Italy, serological study in the open population and groups at risk. *J Viral Hepatitis*, **3**, 197-202.
 20. Grieco A., Miele L., Gasbarrini G. & Grillo R. 2001. Sporadic HEV hepatitis in Italy. *Gut*, **48**, 580.
 21. Ha S.K. & Chae C. 2004. Immunohistochemistry for the detection of swine hepatitis E virus in the liver. *J Viral Hepat*, **11**, 263-267.
 22. Halbur P.G., Kasornrorkbua C., Gilbert C., Guenette D., Potters M.B., Purcell R.H., Emerson S.U., Toth T.E. & Meng X.J. 2001. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol*, **39**, 918-923.
 23. Haqshenas G., Shivaprasad H.L., Woolcock P.R., Read D.H. & Meng X.J. 2001. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol*, **82**, 2449-2462.
 24. 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. 2002. The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J Gen Virol*, **83**, 2201-2209.
 25. 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. 2002. Evidence that rodents are a reservoir of hepatitis E virus for humans in Nepal. *J Clin Microbiol*, **40**,

- 4493-4498.
26. Hsieh S.Y., Meng X.J., Wu Y.H., Liu S.T., Tam A.W., Lin D.Y. & Liaw Y.F. 1999. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol*, **37**, 3828-3834.
 27. Huang F.F., Haqshenas G., Guenette D.K., Halbur P.G., Schommer S.K., Pierson F.W., Toth T.E. & Meng X.J. 2002. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol*, **40**, 1326-1332.
 28. Huang F.F., Sun Z.F., Emerson S.U., Purcell R.H., Shivaprasad H.L., Pierson F.W., Toth T.E. & Meng X.J. 2004. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol*, **85**, 1609-1618.
 29. Kasorndorkbua C., Halbur P.G., Thomas P.J., Guenette D.K., Toth T.E. & Meng X.J. 2002. Use of a swine bioassay and a RT-PCR assay to assess the risk of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Virol Methods*, **101**, 71-78.
 30. Kasorndorkbua C., Thacker B.J., Halbur P.G., Guenette D.K., Buitenwerf R.M., Royer R.L. & Meng X.J. 2003. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can J Vet Res*, **67**, 303-306.
 31. Kasorndorkbua C., Guenette D.K., Huang F.F., Thomas P.J., Meng X.J. & Halbur P.G. 2004. Mode of transmission of swine hepatitis E virus (HEV) in pig. *In: Proc. 18th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, 27 June-1 July, Hamburg. IPVS, Perry, Iowa, Vol. 2, 600.*
 32. Marcato P.S. & A. Perillo 2000. Le epatiti virali del suino e una nuova zoonosi, l'epatite E suina. *In: Proc. XXVI Meeting Annuale Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (SIPAS), 24-25 March, Piacenza, Italy, 163-171.*
 33. Matsuda H., Okada K., Takahashi K. & Mishiro S. 2003. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis*, **188**, 944.
 34. Meng X.J., Purcell R.H., Halbur P.G., Lehman J.R., Webb D.M., Tsareva T.S., Haynes J.S., Thacker B.J. & Emerson S.U. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 9860-9865.
 35. Meng X.J., Halbur P.G., Haynes J.S., Tsareva T.S., Bruna J.D., Royer R.L., Purcell R.H. & Emerson S.U. 1998. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol*, **143**, 1405-1415.
 36. Meng X.J., Halbur P.G., Shapiro M.S., Govindarajan S., Bruna J.D., Mushahwar I.K., Purcell R.H. & Emerson S.U. 1998. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol*, **72**, 9714-9721.
 37. Meng X.J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D.K., Toth T.E., Engle R.E., Emerson S.U. & Purcell R.H. 2002. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol*, **40**, 117-122.
 38. Nishizawa T., Takahashi M., Mizuo H., Miyajima H., Gotanda Y. & Okamoto H. 2003. Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99% identity over the entire genome. *J Gen Virol*, **84**, 1245-1251.
 39. Orru G., Masia G., Orru G., Romanò L., Piras V. & Coppola R.C. 2004. Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *J Virol Methods*, **118**, 77-82.
 40. Pavia M., Iiritano E., Veratti M.A. & Angelillo I.F. 1998. Prevalence of hepatitis E antibodies in healthy persons in southern Italy. *Infection*, **26**, 32-35.
 41. Pei Y. & Yoo D. 2002. Genetic characterization and sequence heterogeneity of a Canadian isolate of

- swine hepatitis E virus. *J Clin Microbiol*, **40**, 4021-4029.
42. Pina S., Buti M., Cotrina M., Piella J. & Girones R. 2000. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol*, **33**, 826-833.
 43. Romanò L., Tanzi E. & Zanetti A. 1999. The role of HEV in acute non-A, non-C hepatitis and the identification of a new variant HEV in Italy. *Ann Ig*, **11**, 451-459.
 44. Schlauder G.G., Desai S.M., Zanetti A.R., Tassopoulos N.C. & Mushahwar I.K. 1999. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol*, **57**, 243-251.
 45. Siochu A., Froesner G., Tassis P.D., Kyriakis C.S., Alexopoulos C. & Kyriakis S.C. 2004. First report of the prevalence of anti-hepatitis E virus (anti-HEV) IgG in blood serum of blood donors, slaughtermen and swine farmers in Greece. *In: Proc. 18th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, 27 June-1 July, Hamburg. IPVS, Perry, Iowa, Vol. 1*, 367.
 46. Stroffolini T., Menchinelli M., Dambruoso V., Menniti Ippolito F., Costantino A., Rapicetta M., Lecce R. & Taliani G. 1996. Prevalence of hepatitis E in a central Italian town at high endemicity for hepatitis C virus. *Ital J Gastroenterol*, **28**, 523-525.
 47. Sun Z.F., Larsen C.T., Huang F.F., Billam P., Pierson F.W., Toth T.E. & Meng X.J. 2004. Generation and infectivity titration of an infectious stock of avian hepatitis E virus (HEV) in chickens and cross-species infection of turkeys with avian HEV. *J Clin Microbiol*, **42**, 2658-2662.
 48. Takahashi K., Kang J.H., Ohnishi S., Hino K., Miyakawa H., Miyakawa Y., Maekubo H. & Mishiro S. 2003. 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*, **46**, 308-318.
 49. Takahashi M., Nishizawa T., Miyajima H., Gotanda Y., Iita T., Tsuda F. & Okamoto H. 2003. Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol*, **84**, 851-862.
 50. Takahashi M., Nishizawa T. & Okamoto H. 2003. Identification of a genotype III swine hepatitis E virus that was isolated from a Japanese pig born in 1990 and that is most closely related to Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol*, **40**, 869-870.
 51. Tamada Y., Yano K., Yatsushashi H., Inoue O., Mawatari F. & Ishibashi H. 2003. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol*, **38**, 827-832.
 52. Tei S., Kitajima N., Takahashi K. & Mishiro S. 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, **362**, 371-373.
 53. Tei S., Kitajima N., Ohara S., Inoue Y., Miki M., Yamatani T., Yamabe H., Mishiro S. & Kinoshita Y. 2004. Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol*, **74**, 67-70.
 54. Usmanov R.K., Balaian M.S., Dzhumaliev D.I., Alymbaeva D.B., Korolev M.B., Karas F.R., Zamiatina N.A., Berdikozhoeva S.K., Karymshakova C.H.T. & Kozhomkulov E.T. 1991. Experimental hepatitis E infection in piglets. *Vopr Virusol*, **36**, 212-216.
 55. Usmanov R.K., Balaian M.S., Kazachkov Iu A., Alymbaeva D.B., Zamiatina N.A., Dzhumaliev D.I. & Voronina O.V. 1994. Further study of experimental hepatitis E in piglets. *Vopr Virusol*, **39**, 208-212.
 56. Van der Poel W.H., Verschoor F., Van der Heide R., Herrera M.I., Vivo A., Kooreman M. & De Roda Husman A.M. 2001. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis*, **7**, 970-976.
 57. Wang L. & Zhuang H. 2004. Hepatitis E: an overview

- and recent advances in vaccine research. *World J Gastroenterol*, **10**, 2157-2162.
58. Wibawa I.D., Muljono D.H., Mulyanto, Suryadarma I.G., Tsuda F, Takahashi M., Nishizawa T. & Okamoto H. 2004. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among apparently healthy humans and pigs in Bali, Indonesia: identification of a pig infected with a genotype 4 hepatitis E virus. *J Med Virol*, **73**, 38-44.
59. Williams T.P., Kasorndorkbua C., Halbur P.G., Haqshenas G., Guenette D.K., Toth T.E. & Meng X.J. 2001. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol*, **39**, 3040-3046.
60. Withers M.R., Correa M.T., Morrow M., Stebbins M.E., Seriwatana J., Webster W.D., Boak M.B. & Vaughn D.W. 2002. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am J Trop Med Hyg*, **66**, 384-388.
61. Yazaki Y., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Sasaki N., Gotanda Y. & Okamoto H. 2003. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol*, **84**, 2351-2357.
62. 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. 2001. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin Diagn Lab Immunol*, **8**, 1213-1219.
63. Zanetti A.R. & Dawson G.J. 1994. Hepatitis type E in Italy: a seroepidemiological survey. Study Group of Hepatitis E. *J Med Virol*, **42**, 318-320.
64. Zanetti A.R., Schlauder G.G., Romano L., Tanzi E., Fabris P., Dawson G.J. & Mushahwar I.K. 1999. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol*, **57**, 356-360.