



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN MEDICINA
VETERINARIA

**EPATITE E A TRASMISSIONE ALIMENTARE:
IL RUOLO DEI SELVATICI**

Foodborne transmission of Hepatitis E:
The role of wild animals

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa SILVIA BONARDI

Laureanda:

MATILDE MARGINI

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Indice

Abstract.....	1
Introduzione	3
1. Virus dell'epatite E	5
2. Reservoir animali	11
Il suino	12
I selvatici.....	16
Il cinghiale	18
Studi svolti nel cinghiale in Italia.....	19
Studi svolti nel cinghiale all'estero.....	26
I ruminanti selvatici.....	32
Studi condotti nei ruminanti selvatici in Italia	34
Studi svolti nei ruminanti selvatici all'estero.....	35
Epidemiologia.....	40
Reservoir d'infezione nelle aree iper-endemiche.....	41
Persistenza del virus nell'ambiente	42
3. Trasmissione del virus tramite il consumo di carni	43
Principali vie di trasmissione di HEV	43

Trasmissione di HEV tramite alimenti di origine animale	46
Suini	46
Animali selvatici	49
Matrici animali per il campionamento	53
Molluschi bivalvi.....	53
4. Epatite E: patologia e aspetti clinici.....	55
Sintomatologia.....	55
Diagnosi.....	57
Terapia	58
Sieroprevalenza.....	58
5. Epatite E nel mondo	60
La situazione in Europa	61
La situazione in Italia	65
6. Prevenzione	70
Misure di controllo lungo la filiera alimentare.....	71
Discussione.....	75
Conclusioni.....	78
Bibliografia	80

Abstract

Il virus dell'epatite E (HEV) è la causa più comune di epatite virale nel mondo. Il suino domestico rappresenta il principale serbatoio animale ed è in grado di infettare l'uomo tramite il contatto diretto o tramite la via alimentare mediante il consumo di carne cruda o poco cotta. Negli ultimi anni, tuttavia, si sono verificati sempre più casi di tossinfezione alimentare causati dal consumo di carne, organi e preparati a base di carne di animali selvatici. Il principale serbatoio di HEV tra gli ungulati selvatici è il cinghiale, il cui ruolo è già stato dimostrato. Il cervo sembra anch'esso responsabile della trasmissione del virus nonostante vi siano pochi studi a riguardo e il suo ruolo rimanga quindi ancora da definire. Lo scopo di questo elaborato di tesi è quello di raccogliere i dati provenienti dagli studi eseguiti in Italia e in Europa per quanto riguarda la diffusione di HEV soprattutto in cinghiali e cervi, ma anche in altre specie appartenenti alla fauna selvatica, al fine di comprendere il ruolo epidemiologico dei selvatici nell'espansione ed evoluzione dell'epatite E e di acquisire consapevolezza circa il rischio legato al consumo della carne di selvaggina.

Hepatitis E virus (HEV) is the most common cause of viral hepatitis worldwide. Domestic swine is its main animal reservoir and is capable of infecting humans through direct contact or through food-borne transmission via the consumption of raw or undercooked meat. In recent years, however, there have been increasing cases of food poisoning caused by consumption of meat, organs and meat preparations from wild animals. The main reservoir of HEV among wild ungulates is the wild boar, whose role in the transmission of the virus has been described in literature. Deer also seems to be responsible for the transmission of the virus, although its role therefore is still to be defined because of the scarcity of studies. The main purpose of this thesis is to collect data from the studies carried out in Italy and Europe mainly regarding HEV in wild boar and deer, but also in other wildlife species, in order to understand the epidemiological role of wildlife in the expansion and evolution of hepatitis E disease and raise awareness about the risk related to consumption of game meat.

Introduzione

L'infezione da Hepatitis E virus (HEV) è considerata un problema emergente per la salute pubblica a livello mondiale ed è la causa più comune di epatite virale acuta nel mondo. Si stima, infatti, che un terzo della popolazione mondiale sia venuta a contatto col virus nell'arco della propria vita (Raji et al., 2022). La distribuzione globale dell'infezione ha andamenti epidemiologici distinti basati su fattori socioeconomici ed ecologici (Istituto Superiore di Sanità, 2019).

Nonostante i dati allarmanti, gli alti tassi di sieroprevalenza e la costante crescita di casi, la consapevolezza della malattia è ancora scarsa. Il controllo routinario della patologia è scarsamente condotto all'interno degli ospedali e per questo l'epatite E rimane sottodiagnosticata (Raji et al., 2022).

Si conoscono otto genotipi e diversi sottotipi del virus HEV che differiscono tra loro per distribuzione geografica, ospiti e pattern di infezione (Istituto Superiore di Sanità, 2014). I genotipi 1, 2, 3 e 4 sono quelli che più frequentemente infettano l'uomo (Aslan, 2020). La maggior parte delle infezioni autoctone in aree non endemiche sono causate da HEV appartenente al genotipo 3 che, insieme al genotipo 4, è zoonotico e ha un'alta prevalenza in alcune specie animali tra cui il suino, che ne rappresenta il principale reservoir (Istituto Superiore di Sanità, 2014). Il contatto con specie a rischio e il consumo delle loro carni crude o poco cotte rappresenta, quindi, un potenziale pericolo per la trasmissione di HEV (Meng, 2011). L'esclusione della carne e degli organi degli animali infetti al macello durante l'esame ispettivo è resa difficile dal fatto che, nella maggioranza dei casi, essi non sviluppano sintomi di epatite infettiva (Masotti et al., 2020). I genotipi 1 e 2, invece, infettano solo gli esseri umani e vengono trasmessi principalmente per via oro-fecale tramite il consumo di acqua contaminata (Porea et al., 2017).

Negli ultimi anni si sta indagando più a fondo il ruolo degli animali selvatici, in particolar modo il cinghiale e il cervo, come serbatoi d'infezione (Meng, 2011). In Europa, il consumo di carne di ungulati selvatici va da 0,08 kg pro capite in

Polonia e Portogallo a 5,7 kg pro capite in Francia, ma nei nuclei famigliari di cacciatori del Nord Italia può raggiungere i 4 kg pro capite (Arnaboldi et al., 2021).

Pertanto, l'obiettivo di questo elaborato è quello di raccogliere i dati provenienti dagli studi condotti sulle popolazioni di cinghiali e cervi per la ricerca di HEV, capire il loro ruolo come possibili reservoir d'infezione e inquadrare la situazione epidemiologica attuale.

1. Virus dell'epatite E

Il virus dell'epatite E (HEV) è il quinto dei virus responsabili di affezioni epatiche conosciuti (dopo A, B, C e D) ed è la causa più comune di epatite virale acuta nel mondo (Raji et al., 2022). È responsabile di oltre il 50% dei casi di epatite acuta nei paesi endemici (Lapa et al., 2015).

HEV è un piccolo virus a RNA positivo a singolo filamento di circa 7,2 kb. Il suo capsidico è icosaedrico e privo di envelope (Lapa et al., 2015). I virioni sono particelle sferiche del diametro di 27-34 nm e presentano protrusioni prominenti sulla loro superficie (Aggarwal, 2011). Studi recenti hanno dimostrato che le particelle virali circolanti nel sangue e nel mezzo di coltura possono anche essere allocate all'interno della membrana delle cellule ospiti rimanendo infettanti. Esse non trasportano antigeni virali sulla superficie e sono resistenti agli anticorpi neutralizzanti. Questo comportamento è simile a quello del virus dell'epatite A, un altro virus epatotropo non correlato filogeneticamente ad HEV. Le particelle avvolte sono denominate virioni "quasi-envelope" o eHEV e l'involucro, probabilmente, riduce la capacità di attaccare le cellule e quindi il rischio di infezione, oltre ad influenzare la stabilità della particella virale (EFSA, 2017).

Il virus HEV è stato scoperto per la prima volta nel 1983 tramite l'utilizzo della microscopia elettronica da Balayan, che stava indagando sull'eziologia di un focolaio di epatite non-A e non-B verificatosi in un accampamento dell'esercito sovietico in Afghanistan. Lo stesso Balayan ingerì un estratto di nove feci raccolte da pazienti con epatite per indagarne la trasmissione interumana. Egli sviluppò sintomatologia tipica dopo 36 giorni dall'ingestione e particelle virali sferiche della misura di 27-30 nm furono identificate nei suoi campioni di feci prelevati al giorno 28, 43, 44 e 45 dopo l'inoculazione. Questa fu la prima descrizione del virione. Poco dopo il virus è stato rilevato in campioni ematici di pazienti che furono coinvolti, anni prima, in una grande epidemia di epatite a New Delhi tra il 1955 e il 1956 (si trattò di un'indagine retrospettiva) (Lapa et al., 2015).

Il virus venne chiamato virus dell'epatite E a causa della sua via di trasmissione "Enterica" e per la sua capacità di causare "Epidemie" (Lapa et al., 2015). Il virus cresce con difficoltà in vitro, per cui le informazioni disponibili sulla caratterizzazione dei ceppi sono state principalmente ottenute studiando l'RNA virale con tecniche biomolecolari (Istituto Superiore di Sanità, 2019)

L'attuale sistema di classificazione della famiglia *Hepeviridae* suddivisa nei suoi due generi, con le relative specie e genotipi, è quello proposto da Smith et al. (Smith et al., 2014). Il virus dell'epatite E appartiene al genere *Orthohepevirus* della famiglia *Hepeviridae* (Di Bartolo et al., 2017). A questa famiglia appartengono due generi: oltre all'*Orthohepevirus*, che infetta mammiferi e specie aviarie, vi è il genere *Piscihepevirus* che infetta le trote (Figura 1). I ceppi HEV identificati finora appartengono al genere *Orthohepevirus* che si divide in quattro specie: A, B, C e D (Figura 2). Ulteriori nuove sequenze sono state individuate ma non ancora assegnate ad una specie. La specie A include il virus dell'epatite E umano nonché quello dei suini, cinghiali, cervi, manguste e cammelli. La specie B comprende il virus infettante i polli, la specie C quello infettante ratti, toporagni, furetti e visoni, mentre alla specie D appartiene HEV di pipistrello. Molto probabilmente nuove sequenze verranno descritte in futuro (EFSA, 2017; Raji et al., 2022).

Il genoma di HEV è formato da una corta regione non tradotta 5' (27-35 nucleotidi) seguita da tre open reading frame (ORFs) e da una seconda regione non tradotta di 65-74 nucleotidi, con una sequenza poly A all'estremità 3'-terminale. ORF1 codifica una poliproteina non strutturale di circa 1690 amminoacidi coinvolta nella replicazione del virus e nella processazione di proteine virali. ORF2 codifica per una proteina di 123 amminoacidi espressa a livello intracellulare (Caprioli et al., 2005), nonché per la principale proteina del capsido virale (di 660 amminoacidi) (Aggarwal, 2011; EFSA, 2017). Diversi studi suggeriscono che ORF3 sia in grado di associarsi alle cellule fungendo da punto di ancoraggio (Caprioli et al., 2005) e codificando per una piccola fosfoproteina che sembra avere un ruolo importante nella replicazione e regolazione della risposta dell'ospite all'infezione da HEV (Aggarwal, 2011; Smith et al., 2014). Recentemente è stato scoperto anche

ORF4, appartenente unicamente al genotipo 1, il quale ha un ruolo nel funzionamento dell'RNA polimerasi (Aslan, 2020).

Dalle analisi di sequenza genomica sono stati riconosciuti 8 genotipi appartenenti ad HEV (Orthohepevirus A) (Arnaboldi et al., 2021). I genotipi 1 e 2 sono a trasmissione interumana, mentre i genotipi 3 e 4 hanno una diffusione più ampia e sono zoonotici in quanto infettano sia gli esseri umani che varie specie di mammiferi domestici e selvatici. Per questi ultimi due genotipi è stata dimostrata la trasmissione interspecie (Scotto et al., 2013; Smith et al., 2014). Recentemente sono stati identificati i genotipi da 5 a 8, caratterizzati da minore rilevanza per quanto riguarda la salute pubblica. HEV 5 e 6 sono stati isolati nei cinghiali, in Giappone, mentre HEV 7 e 8 sono stati identificati rispettivamente nei dromedari e nei cammelli. Anche se sono stati descritti casi singoli di infezioni umane da questi genotipi, la loro rilevanza epidemiologica per l'uomo è ancora sconosciuta. Il virus HEV del ratto (C-1 Rat HEV) differisce ampiamente dagli otto genotipi conosciuti e si presume che non sia in grado di infettare l'uomo anche se saranno necessari ulteriori studi per confermare la sua non trasmissibilità agli esseri umani (Horvatits et al., 2019).

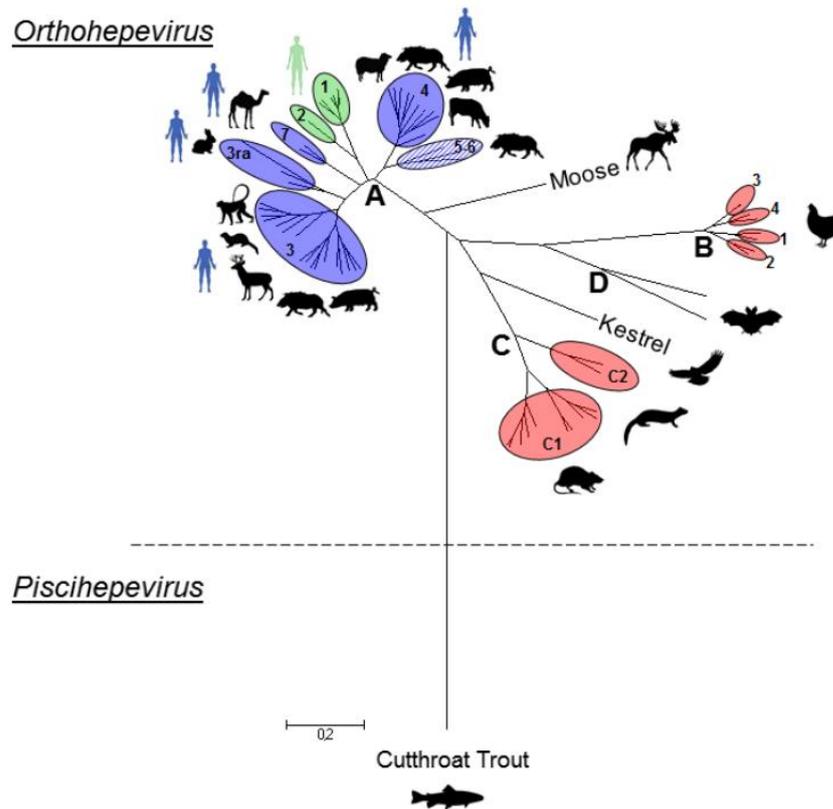


Figura 1: Albero filogenetico della famiglia *Hepeviridae* suddiviso nei due generi *Orthohepevirus* e *Piscihepevirus* (EFSA, 2017)

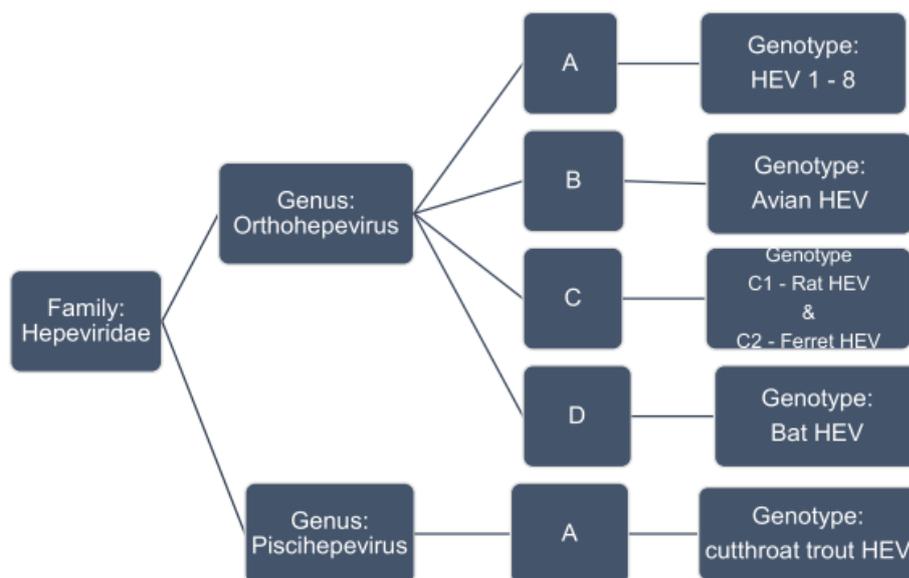


Figura 2: Famiglia *Hepeviridae* suddivisa nei due generi e classificazione corrente dell'Hepatitis E Virus (Raji et al., 2022)

All'interno del genotipo 1 sono stati riconosciuti sei sottotipi (1a - f), con differente prevalenza a seconda dell'area geografica. I sottotipi appartenenti al genotipo 2 sono esclusivamente umani e se ne conoscono due: il sottotipo 2a e il sottotipo 2b. Il genotipo 3 è stato identificato per la prima volta negli Stati Uniti in casi umani di epatite E ed è attualmente diffuso in tutto il mondo (presenta dieci sottotipi 3a - j). In Europa rappresenta il genotipo più diffuso. Il genotipo 4 ha anch'esso diversi sottotipi: 4a - i. Vi sono tuttavia altre sequenze non ancora assegnate con chiarezza ad alcun sottotipo (EFSA, 2017; Lapa et al., 2015)

Attualmente, sono disponibili numerosi metodi per la tipizzazione, la sottotipizzazione e la tracciabilità di HEV ma nessuno di essi è standardizzato. La recente definizione di sottotipi e lo sviluppo dello strumento web "HEVnet" per la tipizzazione, rappresentano dei passi in avanti verso l'armonizzazione. Restano da stabilire i limiti che permettano di definire due ceppi "omologhi" tra loro (EFSA, 2017).

La variabilità genetica, la costante evoluzione del virus e la presenza di numerosi ceppi sia nell'uomo che negli animali, contribuiscono alla sua diffusione e all'espansione degli animali serbatoio d'infezione (Arnaboldi et al., 2021).

Gli isolati aviari di HEV sono geneticamente distinti, presentano un genoma più corto (6,6 kb) e hanno solo il 50% circa di omologia con i virus isolati dai mammiferi. Appartengono alla specie B del genere Orthohepevirus (Figura 2). HEV aviario è responsabile di malattie del fegato e della milza nei polli e può infettare altre specie di uccelli, come i tacchini (Aggarwal, 2011).

Come già riportato, al genere Orthohepevirus, specie D, appartiene HEV di pipistrello (BatHEV), il quale possiede un'identità del 57,4-64,8% con HEV. Recentemente è stato rilevato BatHEV da pipistrelli di numerosi paesi; tuttavia si hanno ancora poche informazioni riguardo la sua distribuzione globale. In uno studio condotto in Giappone da Kobayashi et al. (2018), sono stati raccolti i campioni fecali di 81 pipistrelli per la ricerca dell'RNA virale (mediante Real Time PCR). E' emersa positività per numerosi ceppi di BatHEV, suggerendo che il virus

potrebbe presentare un'ampia distribuzione geografica che riguarda diverse specie di pipistrelli. Per indagare il potenziale zoonotico di questo stipite virale, sono tuttavia necessari ulteriori studi.

2. Reservoir animali

L'esistenza di un serbatoio animale è emersa a seguito del rilevamento di un'elevata prevalenza di anticorpi anti-HEV in varie specie animali e dall'isolamento di sequenze genomiche di HEV in suini delle regioni iperendemiche (Scotto et al., 2013). Fin dai primi anni '90, infatti, furono rilevati anticorpi in scimmie, suini, roditori, polli, cani, gatti, bovini e ovi-caprini, sia in paesi in via di sviluppo che industrializzati, facendo supporre che potessero essere specie infette da virus HEV-like. Si iniziò a pensare che esistessero serbatoi animali d'infezione per l'uomo e si ipotizzò che alcuni casi di epatite E potessero essere di origine zoonosica (Caprioli et al., 2005).

Il più grande progresso a seguito della scoperta del virus HEV negli anni '80 da Balayan, fu proprio la scoperta di un parente stretto, chiamato "virus dell'epatite E suina", diffusa tra i suini negli USA. Questo era geneticamente distante dai due gruppi genetici di HEV precedentemente riconosciuti. Nello stesso periodo alcuni casi umani di epatite E furono identificati in gruppi di indigeni negli USA e le sequenze genomiche di questi isolati, si rivelarono simili all'HEV suino. Questa scoperta funse da stimolo per svolgere studi sulla presenza di HEV in diverse specie animali e all'interno della popolazione umana mondiale, che portarono alla scoperta di un'effettiva trasmissione zoonotica del virus finora insospettata (Aggarwal, 2011).

Il suino domestico è il principale serbatoio animale di HEV. Anticorpi anti-HEV sono stati rilevati anche in altre specie, tra cui cinghiali, cervi, alci, ratti, cani, gatti, manguste, bovini, ovini, caprini, specie aviarie, conigli, pipistrelli ed equini. Tuttavia, molte di queste specie sono portatrici di ceppi del virus non correlati all'infezione zoonotica (EFSA, 2017). Recentemente sono stati descritti nell'uomo ceppi di HEV provenienti dal coniglio geneticamente simili a HEV3. Un altro ipotetico caso di zoonosi è stato correlato ad HEV di cammello a seguito del consumo di carne e latte. Non è ancora stata dimostrata la trasmissione all'uomo di HEV da furetti, ratti, pipistrelli, uccelli o trote (Lhomme et al., 2016).

Il suino

Nel 1995 furono rilevati anticorpi anti-HEV e l'RNA virale da suini domestici in Nepal, sebbene l'identità del virus non fosse ancora nota (Meng, 2011). Nel 1997 negli Stati Uniti fu identificato per la prima volta il virus dell'epatite E del suino (Swine Hepatitis E Virus, Swine HEV). Da allora, ceppi di HEV suini vennero isolati in tutto il mondo ed è stata rilevata spiccata analogia nucleotidica tra questi ed i ceppi umani provenienti dalle stesse zone geografiche. Infezioni sperimentali hanno poi dimostrato la capacità di trasmissione interspecifica ed alcuni studi hanno riportato una sieroprevalenza anticorpale elevata in soggetti professionalmente esposti al contatto con suini (Caprioli et al., 2005). In seguito, l'infezione da HEV è stata identificata nei suini in tutte le parti del mondo (Figura 3) (Aggarwal, 2011).

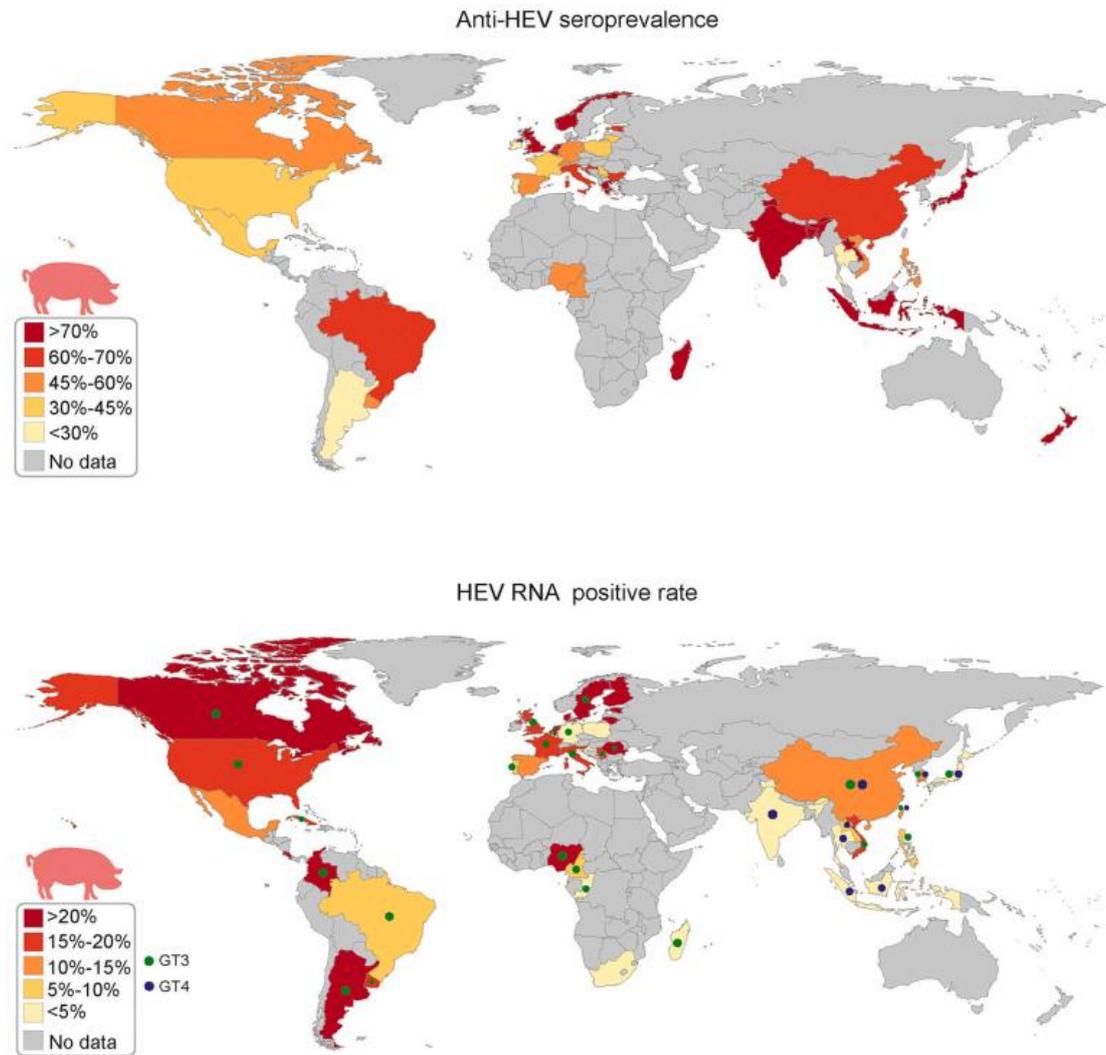


Figura 3: Sieroprevalenza di anticorpi anti-HEV e tasso di positività per HEV RNA all'interno della popolazione suina mondiale (Li et al., 2022)

Il suino domestico rappresenta un importante serbatoio animale per la zoonosi da HEV3 e HEV4. La sieroprevalenza (IgG nel sangue) riscontrata negli allevamenti suini è generalmente elevata, compresa tra il 23% e il 100% (Spahr et al., 2018). Si attesta che, a livello mondiale, circa il 60% dei suini venga in contatto con HEV almeno una volta nel corso della vita e che il 13% di essi sia infetto (sulla base del rilevamento dell'RNA virale) (Li et al., 2022).

L'infezione nei suini si presenta precocemente nel corso della vita, intorno ai 2-4 mesi d'età, ed è associata a viremia transitoria che termina in 1-2 settimane, escrezione virale per 3-7 settimane e sieroconversione, in assenza di segni clinici

(Aggarwal, 2011; Meng, 2011). L'infezione è dunque subclinica, nonostante sia stata rilevata una lieve epatite transitoria a seguito di infezione sperimentale (EFSA, 2017), e non vengono rilevate lesioni macroscopiche al fegato o in altri tessuti, sebbene siano invece presenti lesioni microscopiche di epatite (epatite linfoplasmocitica multifocale e periportale con lieve necrosi epatocellulare focale). La via di trasmissione principale nei suini è di tipo oro-fecale poiché grandi quantità di virus infettante sono state rilevate nelle feci dei suini infetti. Un'altra via d'infezione è rappresentata dal contatto diretto con gli infetti o dall'ingestione di mangimi e acqua contaminati dalle feci. Ulteriori vie d'infezione non si possono ancora escludere (Meng, 2011). Da uno studio condotto in sei paesi europei (Repubblica Ceca, Italia, Paesi Bassi, Spagna, Portogallo e Regno Unito), il virus è stato rilevato con una prevalenza compresa tra l'8 e il 30% nei suinetti, tra il 20 e il 44% nei magroncelli/magroni e tra l'8 e il 73% nei grassi. Questi dati suggeriscono che i suini da ingrasso potrebbero essere infetti al momento del loro arrivo al macello (Pavio et al., 2017). Il tasso di sieroprevalenza anticorpale anti-HEV, aumenta all'aumentare dell'età dei suini. Secondo una stima basata su studi condotti in diverse aree del mondo, la sieroprevalenza si aggira intorno al 42% nei suini da zero a quattro mesi, al 49% nei suini tra i cinque e gli otto mesi, al 66% nei suini di oltre nove mesi d'età. Al contrario, è stato osservato che il tasso di positività all'RNA virale decresce nel verso opposto: 17% nei suini tra zero e quattro mesi, 10% nei suini tra cinque e otto mesi e 6% nei suini oltre i nove mesi d'età (Li et al., 2022).

In uno studio condotto in Finlandia in cui sono stati testati 11 allevamenti suini, è stato osservato che i suinetti diventavano positivi all'HEV a 3-8 settimane dopo lo svezzamento e, nel momento in cui venivano trasferiti negli allevamenti da ingrasso, quasi tutti gli animali risultavano aver contratto l'infezione (96,6%) (EFSA, 2017).

Negli anni 2009-2010 è stata condotta un'indagine in Francia nella quale è stata valutata la sieroprevalenza per HEV nei suini da macello e la prevalenza del virus all'interno dei loro fegati. Sono stati testati 6.565 sieri e 3.715 fegati campionati casualmente da 186 allevamenti di tutto il paese. La sieroprevalenza a livello di allevamento era del 65%, mentre al macello il 31% dei suini presentava anticorpi

anti-HEV. La prevalenza dei fegati RNA positivi era del 4% ed il 24% degli allevamenti presentava almeno un suino il cui fegato era positivo alla ricerca dell'RNA virale. La maggior parte degli isolati apparteneva al genotipo 3 sottotipo f, mentre alcuni appartenevano ai sottotipi c ed e. Nel 2012, in Inghilterra, è stata condotta un'indagine nazionale che riguardava diversi agenti patogeni. Tra questi è stata valutata la sieroprevalenza per HEV, il suo tasso di infezione e l'isolamento virale da siero e contenuto cecale di 629 suini al macello. La prevalenza anticorpale negli allevamenti era del 92,8% e l'RNA virale è stato rilevato nel 15% dei campioni di contenuto cecale e nel 3% dei campioni di siero al macello (i casi nei quali la ricerca del virus è stata riscontrata in entrambe le matrici era del 2%). In altri studi minori la sieroprevalenza variava tra il 27% (in suini riproduttori irlandesi nel 2010-2011) e il 94% (in vecchi campioni di siero suino conservati nei macelli italiani) (EFSA, 2017).

Gli isolati di HEV suino appartengono ai genotipi 3 e 4 e, di questi, il genotipo predominante in una determinata area geografica è lo stesso che predomina all'interno della popolazione umana di quell'area. Gli isolati di HEV suini provenienti da USA, Taiwan, Spagna e Giappone hanno mostrato maggiore somiglianza genetica con gli isolati di HEV umano di queste regioni rispetto a quella dimostrata con altri stipti di HEV suino e umano isolati dal resto del mondo. Al contrario, in India, dove la malattia nell'uomo è altamente endemica, gli isolati di HEV suino, secondo uno studio condotto nel 2002, appartenevano al genotipo 4, mentre all'interno della popolazione umana circolava il genotipo 1. A dimostrazione della prevalente restrizione al genere umano, i genotipi 1 e 2 non sono ancora stati isolati in modo scientificamente dimostrabile da animali che non appartengano alla categoria dei primati (Aggarwal, 2011).

Tramite studi sperimentali, è stato dimostrato che HEV di genotipo 3 isolato da uomo e suino è in grado di attraversare barriere specie-specifiche ed infettare rispettivamente suini non infetti e animali primati. È stato anche dimostrato che suini non infetti inoculati sperimentalmente con un HEV umano appartenente al genotipo 3 e un HEV umano di genotipo 4 si infettano rapidamente con viremia e sierconversione nel giro di due settimane dall'inoculazione. Questo suggerisce che i genotipi 3 e 4 umani si sono già adattati al suino e probabilmente è da

questa specie che originano. Inoltre, il genotipo 4 presente all'interno della popolazione di suini in India è stato sperimentalmente trasmesso ai primati. Tuttavia, l'inoculazione di ceppi epidemici di HEV1 e HEV2 in animali diversi da primati non ha portato alla trasmissione dell'infezione, indicando che questi ceppi hanno uno spettro d'ospite più limitato (Aggarwal, 2011; Meng, 2011).

I selvatici

La popolazione di ungulati selvatici sta aumentando in Italia e, più in generale, a livello europeo, con un conseguente aumento dei tassi di abbattimento e di disponibilità delle loro carni. In Italia le specie che vengono principalmente cacciate sono il cinghiale (*Sus scrofa*), il cervo (*Cervus elaphus Linnaeus*) e il capriolo (*Capreolus capreolus*) e la loro disponibilità è aumentata nell'ultimo decennio. Il consumo di queste carni pro-capite è basso, in media 0,1-0,3 kg/anno, ma in alcune regioni sale a 1-4 kg/anno. Il Regolamento della Commissione Europea N° 853/2004 è il quadro normativo di riferimento per quanto riguarda l'igiene delle carni di ungulati selvatici oggetto di caccia. Una volta che la carcassa arriva allo stabilimento autorizzato per la lavorazione della selvaggina, essa viene ispezionata da un veterinario che, se necessario, può decidere che vengano eseguite determinate analisi. Tuttavia, i cacciatori che destinano la carne di selvaggina all'autoconsumo o che ne vendono piccoli quantitativi direttamente al consumatore finale o alla ristorazione locale non sono soggetti a queste norme, anche se la tracciabilità deve comunque essere rispettata in caso di cessione a terzi.

In Italia, come numero di capi abbattuti tra gli ungulati selvatici, predomina il cinghiale, seguito dal capriolo, dal camoscio alpino, dal cervo e dal daino. Il cinghiale contribuisce all'80% della disponibilità totale di carne di ungulati selvatici. Solo nelle Alpi orientali il suo contributo è meno importante di quello del capriolo e del cervo. Il cinghiale è l'unica fonte di carne di selvaggina consumata nelle regioni meridionali dell'Italia, mentre il cervo e il capriolo sono consumati nelle regioni settentrionali. Questi ultimi, però, si stanno espandendo verso i territori del Sud Italia e quindi, con forte probabilità, nel prossimo futuro il consumo delle loro carni aumenterà anche in questi territori. Visto l'aumento del numero di ungulati selvatici

sul territorio italiano, con il conseguente aumento del numero di capi abbattuti, le loro carni avranno molto probabilmente una distribuzione sempre più ampia, con l'obbligo di applicazione delle norme previste dal Regolamento CE 853/2004 (Ramanzin et al., 2010).

La prima evidenza della possibile trasmissione zoonotica di HEV da animali selvatici è osservata in casi di infezione umana correlata al consumo di carne di cervo Sika (*Cervus nippon*) e di cinghiale. Oltre agli animali domestici, le specie selvatiche che vivono nelle vicinanze dell'uomo potrebbero fungere da serbatoio per nuovi ceppi di HEV trasmissibili al consumatore. Le informazioni a riguardo sono ancora scarse e per questo sono necessari ulteriori studi per la ricerca e la classificazione di HEV nei selvatici (Di Bartolo et al., 2017).

La sieroprevalenza per HEV nelle specie selvatiche in Italia varia a seconda delle aree geografiche. Uno studio recente ha rilevato valori del 13,9% per il cervo e del 10,2% per il cinghiale, perciò inferiore a quella riscontrata nei suini allevati nel Nord Italia, dove arriva fino al 92,6% negli animali di 9-10 mesi. I valori inferiori riscontrati negli animali selvatici potrebbero essere dovuti ad una minore densità di popolazione poiché l'infezione viene trasmessa per via oro-fecale. Inoltre, i cervi presentano anche un comportamento sociale diverso da quello dei suini e per buona parte dell'anno non vivono in gruppo, riducendo quindi le probabilità di infettarsi da soggetti della stessa specie (Di Bartolo et al., 2017).

Il cinghiale



Figura 4: Cinghiale (*Sus scrofa*) (Fonte: Eric Isselee, Shutterstock, <https://www.shutterstock.com>)

Il cinghiale (Figura 4) appartiene all'ordine *Artiodactyla*, famiglia *Suidae*. È un mammifero di grossa taglia. La specie è adattabile e occupa ambienti anche molto diversi, dalle zone fortemente antropizzate alla macchia mediterranea fino a boschi di latifoglie e conifere. È presente dalla pianura agli ambienti montani. Il cinghiale mostra elevata mobilità. È presente in Europa, Nord Africa e parte dell'Asia e presenta circa 27 sottospecie. In Italia si riscontra in modo discontinuo su tutto l'arco alpino, in maniera più omogenea sull'Appennino e in Sardegna. In Sicilia è estremamente localizzato (Arci Caccia Umbria, 2015). La sottospecie *Sus scrofa scrofa* è quella più diffusa nel territorio europeo, mentre le sottospecie *Sus scrofa leucomysta* e *Sus scrofa riukiuanus* abitano attualmente il Giappone (la prima abita le isole principali Honshu, Shikoku e Kyushu, la seconda solo le isole Ryukyu). Queste due specie giapponesi sono distinguibili, ma più strettamente imparentate tra loro rispetto ai cinghiali dell'Asia centrale e dell'Europa (Watanobe et al., 1999).

Tra la fauna selvatica, il cinghiale è la riserva naturale di HEV e, pertanto, la sorveglianza sanitaria in questa specie è importante sia per ridurre i casi umani di epatite E dovuti al consumo di carne di cinghiale, sia per aumentare le informazioni epidemiologiche sul virus (Lorusso et al., 2022). I cinghiali ospitano molti agenti infettivi, incluso il virus HEV, che può essere trasmesso da questi ai

suini domestici e all'uomo (Meng, 2011). La trasmissione al suino è stata dimostrata anche sperimentalmente, con implicazioni notevoli soprattutto in quei paesi in cui l'allevamento di suini è estensivo, poiché viene facilitata la trasmissione virale inter-specie (Masotti et al., 2020). L'RNA e gli anticorpi anti-HEV sono stati individuati nella popolazione di cinghiali di svariati paesi incluso il Giappone, la Germania, l'Italia, la Spagna, i Paesi Bassi e l'Australia (Meng, 2011). La sieropositività nei cinghiali varia tra il 10% e il 57,4% a seconda dell'area geografica e l'isolamento di RNA virale è stato possibile dal 2,5% al 40% dei casi (Tabella 2, Figura 6). I range di prevalenza di HEV riscontrati nei cinghiali europei variano dal 2,5% nel sud-est della Francia al 68% in Germania (Arnaboldi et al., 2021). È stato stimato che, a livello mondiale, circa il 27% dei cinghiali abbia contratto l'infezione da HEV nel corso della vita e che il 9,5% sia attualmente infetto (sulla base del rilevamento dell'RNA virale dai campioni esaminati) (Li et al., 2022).

Le prime indicazioni di infezione da HEV nei cinghiali risalgono al 1999, quando il 17% dei suini conducenti vita libera indagati durante uno studio in Australia erano risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-HEV. Il primo rilevamento nel cinghiale è avvenuto poi nel 2004, in Giappone. In Europa, il genotipo 3 è stato successivamente isolato nei cinghiali in Francia, Germania, Ungheria, Italia, Paesi Bassi, Belgio, Svezia, Portogallo, Estonia e Spagna con una prevalenza variabile tra il 2,5% e il 25%. Come accennato, il più alto tasso di infezione nei cinghiali (68,2%) è stato osservato in Germania (Porea et al., 2017).

Studi svolti nel cinghiale in Italia

Il primo studio riguardante HEV nei cinghiali nel Nord Italia (Parco Regionale dei Gessi Bolognesi) fu condotto nel 2006, quando venne rivelata l'effettiva presenza del virus dell'epatite E nella popolazione. HEV non solo era presente, ma circolava in modo attivo tra i cinghiali del territorio (*Sus scrofa scrofa*, sottospecie presente anche negli altri paesi europei) e quindi non solo tra le sottospecie dei ceppi asiatici *Sus scrofa leucomysta* e *Sus scrofa riukiuanus* come era stato osservato dai primi studi. I risultati, inoltre, confermavano che i cinghiali, insieme ai suini domestici, rappresentano un importante reservoir d'infezione. Animali positivi sono

stati rilevati per ogni classe d'età, a partire dai 4 mesi di vita. La presenza di RNA è stata rilevata anche in animali di 24 mesi. Questi dati sono in contrasto con quelli provenienti dai suini domestici, nei quali l'infezione si verifica principalmente negli animali di 3-5 mesi, è di breve durata e, generalmente, autolimitante (Martelli et al., 2008). La differenza tra le specie potrebbe essere dovuta al fatto che negli allevamenti intensivi i suini vivono a stretto contatto l'uno con l'altro sin dalla nascita, permettendo quindi la trasmissione del virus in età molto giovane, mentre in natura i cinghiali, circolando liberi, potrebbero infettarsi in qualsiasi momento della loro vita. Il virus, a sua volta, incontrando una popolazione "naive", troverebbe tra i cinghiali le condizioni ottimali per la sua trasmissione (Martelli et al., 2008; Rutjes et al., 2010).

Nello studio di Martelli et al. (2008), il 25% degli animali era risultato positivo alla ricerca dell'RNA di HEV tramite PCR. La matrice esaminata era rappresentata da campioni di bile, recentemente segnalati come i più affidabili campioni per la rilevazione di HEV nei suini. Il fatto che gli animali positivi fossero clinicamente sani, supporta l'ipotesi che anche nei cinghiali, come nei suini domestici, l'infezione da HEV possa essere subclinica e questo non permette di distinguere, al momento della caccia, gli animali sani da quelli infetti. A tal proposito, quindi, il fegato dei cinghiali potrebbe risultare infetto. Lo studio citato non ha raccolto informazioni sulla contaminazione di altri organi o della carne dei cinghiali positivi. Confrontando le sequenze nucleotidiche ottenute da 10 campioni positivi, esse hanno dimostrato di essere identiche. L'analisi filogenetica ha anche dimostrato che il ceppo isolato dai cinghiali era geneticamente più vicino ai ceppi di HEV umani e suini circolanti in Europa rispetto ai ceppi circolanti nei cinghiali in Giappone (Martelli et al., 2008).

Durante le stagioni di caccia comprese tra il 2009 e il 2012, nel Nord Italia sono stati raccolti campioni di siero di cinghiale per la ricerca di HEV. Complessivamente, 226 animali su 2211 (10,2%) sono risultati positivi alla ricerca di anticorpi sierici. I valori più alti sono stati osservati nella provincia di Pisa (48,7%), mentre i più bassi nella provincia di Brescia (4,2%). Non è stato invece rilevato RNA virale da nessun campione di sangue e di fegato. Questo potrebbe essere dovuto a diversi fattori, come una viremia di breve durata o la difficoltà di

rilevamento dell'RNA nei campioni di fegato per la breve persistenza del virus all'interno di questo organo (Martinelli et al., 2015). Infatti, Adlhoch et al. (2016) hanno osservato che il virus viene isolato più efficacemente dai campioni di bile rispetto ai campioni di fegato: messi a confronto, HEV-RNA venne isolato dal 15,7% dei campioni di siero, dal 38,1% dei campioni di fegato e dal 56,3% dei campioni di bile.

Nel 2011-2012, in uno studio condotto in Toscana, sono stati analizzati 64 campioni di siero e feci da cinghiali cacciati in quell'area. Il 56,2% dei sieri sono risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-HEV e il 9,4% dei campioni di feci hanno mostrato positività alla RT-PCR per la ricerca del genoma virale. Quattro animali sono risultati positivi sia all'ELISA per la ricerca di anticorpi nel sangue, sia alla RT-PCR eseguita sulle feci (Mazzei et al., 2015).

In uno studio condotto nel 2012-2014 nella provincia di Viterbo, in Lazio, sono stati testati i cinghiali cacciati per la ricerca di HEV. Dallo studio è emerso che su 332 cinghiali, 54 sono risultati positivi a HEV (16,3%) a partire da campioni di fegato. Gli animali positivi erano distribuiti uniformemente all'interno di tre stagioni venatorie (2011-2012, 2012-2013 e 2013-2014). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata nella prevalenza di HEV sulla base del sesso. È stata invece rilevata una differenza statisticamente significativa per quando riguarda l'età media degli animali positivi con un tasso di positività maggiore per gli animali più giovani che tende a diminuire con l'avanzare dell'età. Questo si è confermato essere il fattore di rischio più rilevante per l'infezione da HEV. Nei cinghiali con età superiore ai 48 mesi, non è stata riscontrata alcuna positività per HEV. Per quando riguardava i campioni di tessuto intestinale analizzati, l'RNA di HEV è stato rilevato in 26 campioni (7,8%), tutti risultati positivi anche alla ricerca nel tessuto epatico. La carica virale intestinale era significativamente più bassa di quella epatica. Tutti gli isolati appartenevano al genotipo 3. Sono stati rilevati quattro diversi sottotipi (3a, 3c, 3f, 3i) confrontando la sequenza parziale dell'ORF2 con sequenze prototipo conservate nel database RIVM. Inoltre, 12 sequenze sono state identificate come G3 ma non potevano essere assegnate a nessun sottotipo noto a seguito del confronto con la GenBank e con il RIVM database. Le differenze regionali nella presenza di HEV nel

cinghiale rispecchiano i tassi di sieroprevalenza riscontrati nell'uomo (Di Pasquale et al., 2019).

Nella provincia di Viterbo, in Lazio, i fegati dei cinghiali sono stati campionati anche nella stagione venatoria del 2016-2017 e l'HEV-RNA è stato rilevato nel 52,2% dei campioni con un range che variava dallo 0% al 65,7% a seconda dell'area indagata. La prevalenza media osservata in questo studio è significativamente superiore rispetto ai precedenti studi condotti in Italia, dove l'RNA virale è stato rilevato nell'1,9-33,7% dei campioni di fegato o bile raccolti dai cinghiali. La differenza può essere spiegata da diversi fattori quali la strategia di campionamento, l'età degli animali testati, il tempo di conservazione dei campioni prima delle analisi, la densità delle popolazioni di cinghiali, la frequenza del contatto con altri animali domestici o selvatici ricettivi. L'analisi filogenetica ha mostrato che i ceppi si raggruppavano all'interno dei sottotipi c ed f del genotipo HEV3 (De Sabato et al., 2018).

Nel nostro paese, durante le stagioni venatorie del 2017-2018 e del 2018-2019 sono stati raccolti i dati relativi alla presenza e alla caratterizzazione di HEV nelle popolazioni di cinghiali presenti sul territorio ligure, grazie alla presenza di un piano regionale per il controllo sanitario della fauna selvatica. L'RNA virale è stato rilevato nel 4,4% (25/560) dei fegati testati. I campioni appartenevano al genotipo 3, sottotipi a, c, f ed altri non ancora identificati. I risultati ottenuti mostrano una prevalenza analoga a quella emersa da uno studio effettuato sui cinghiali in Piemonte durante la stagione venatoria del 2012-2013 (prevalenza del 4,9%) mentre in altre regioni italiane gli studi condotti durante l'attività venatoria del 2014-2015 hanno mostrato una prevalenza del 33,5% in Lazio, del 10,1% in Abruzzo e del 12,4% in Campania. In Calabria, nello stesso periodo, nessun animale testato è risultato positivo alla presenza di HEV-RNA. Le prevalenze riportate in altri paesi europei variano dal 10,1% in Spagna, al 18% in Romania. Tali differenze potrebbero essere dovute alle diverse condizioni epidemiologiche (densità, dimensioni e composizione delle popolazioni e contatti con i suini domestici). Dato che durante le precedenti stagioni venatorie in Liguria le prevalenze di HEV riscontrate nei cinghiali erano inferiori, si è osservata una

graduale espansione dell'infezione nella popolazione di cinghiali. (Masotti et al., 2020).

Nel 2019 è stato condotto uno studio in Italia, nella provincia di Chieti (Abruzzo), in cui si è rilevata la prevalenza di HEV nel cinghiale al fine di fornire maggiori dati per la valutazione di una prevalenza nazionale complessiva. È stata effettuata anche la ricerca di anticorpi anti-HEV in gruppi di cacciatori esposti. Dato che la popolazione di cinghiali della zona era stimata in circa 6.000 capi, è stato selezionato, secondo tecniche statistiche classiche, un campione rappresentativo di 102 soggetti (prendendo in considerazione una prevalenza prevista del 15% e un livello di confidenza del 95%). Da ogni carcassa venivano prelevati un campione di fegato e la cistifellea per eseguire su di essi la ricerca dell'RNA virale. La ricerca del genoma virale è stata effettuata tramite RT-PCR. I campioni con valori soglia $CT < 40$ sono stati considerati positivi. Da un gruppo di sette cacciatori esposti sono stati inoltre raccolti campioni di siero per la ricerca di anticorpi anti-HEV utilizzando dei kit ELISA. L'RNA del virus è stato rilevato in 8 animali sui 102 cinghiali testati (7,8%) con intervallo di confidenza al 95% del 4,1%-14,7%. In 6 cinghiali l'RNA virale è stato rilevato dal fegato, in 2 dalla cistifellea. Nessuno dei sieri dei cacciatori è risultato positivo alla ricerca sierologica di anticorpi anti-HEV. La prevalenza di HEV nella popolazione di cinghiali nella provincia di Chieti (7,8%) si è rivelata inferiore a quella rilevata da Aprea et al. (2018) nell'area del parco nazionale Gran Sasso, nell'Abruzzo settentrionale (20,1%) (De Massis et al., 2019).

Tra il 2019 e il 2020 è stato condotto uno studio in Calabria avente come scopo quello di stimare la prevalenza di HEV tra i cinghiali cacciati nella provincia di Catanzaro. La presenza di HEV3 è stata rilevata in 23/86 (26,7%) dei campioni di fegato. Tutti gli isolati sono stati riscontrati anche nell'uomo e ciò suggerisce una trasmissione per via alimentare o per contatto diretto con gli animali. I ceppi HEV3 sono noti per essere altamente divergenti e alcuni non si adattano ad alcun sottotipo di quelli presenti rimanendo non classificati. In questo studio gli isolati sembravano appartenere a varianti distinte o divergenti all'interno del sottotipo 3c e sembravano differire dalle varianti riscontrate nei cinghiali di altre regioni. Le persone infettate dal sottotipo 3c sono a minor rischio di ricovero ospedaliero

rispetto a quelle infettate dai sottotipi 3f o 3e e quindi nonostante HEV sia stato riscontrato in percentuale elevata nei fegati di cinghiale, non si è avuta una simile corrispondenza nei casi umani notificati nella regione Calabria poiché l'infezione decorre spesso in forma asintomatica e autolimitante. Questo suggerisce che si possa verificare una sottostima dell'infezione da HEV nell'uomo. (Lorusso et al., 2022).

Tra il 2015 e il 2020 è stato eseguito uno studio nel Nord Italia con lo scopo di indagare la presenza di HEV negli ungulati selvatici della zona delle Alpi Lombarde e del Po Emiliano (aree di Sondrio e Parma). Sono stati esaminati 602 campioni di fegato di cinghiale (322 da Sondrio, 280 da Parma) e 228 campioni di fegato di ruminanti selvatici (218 cervi, 6 caprioli e 4 camosci). Attualmente, gli ungulati selvatici sono ampiamente diffusi nel Nord Italia, a causa di una progressiva espansione iniziata a partire dal secolo scorso. Questo fatto, in combinazione con l'elevata densità di animali da reddito in Pianura Padana, aumenta le probabilità di contatto tra cinghiali e suini domestici. Lo studio ha evidenziato una prevalenza di HEV del 23,8% nella popolazione di cinghiali del parmense. La genotipizzazione ha identificato i campioni come HEV3a, un sottotipo diffuso in Europa ma raramente rinvenuto fino ad ora nei cinghiali presenti sul territorio italiano. Nella provincia di Sondrio la prevalenza era molto più bassa (1,2%) ed è stato rilevato un presunto nuovo ceppo di HEV correlato al sottotipo 3f. La bassa prevalenza probabilmente è dovuta ad una più bassa densità di popolazione, a sua volta legata al piano di eradicazione dei cinghiali che ostacola un'efficace trasmissione del virus. Nessun rilevamento di HEV è stato osservato nei cervidi (cervi, caprioli e camosci) (Arnaboldi et al., 2021).

Da novembre 2018 a marzo 2019, campioni di fegato raccolti da 97 cinghiali cacciati in Emilia-Romagna sono stati testati per HEV-RNA. Lo studio ha riscontrato una positività del 31,5% nell'area parmense, la maggior parte in animali sotto ai 12 mesi di età e con un calo dei soggetti positivi all'aumentare dell'età. Questo suggerisce che il sistema immunitario, a seguito di precedenti contatti col virus, contrasta le re-infezioni. Le sequenze isolate appartenevano al genotipo 3. Né il genere, né lo stato di gravidanza avevano influenzato lo stato di infezione nei cinghiali. In provincia di Parma, area in cui sono stati cacciati i cinghiali oggetto

dello studio, i suini sono allevati seguendo norme rigorose in materia di biosicurezza, come richiesto dal consorzio e dai disciplinari per la produzione del Prosciutto di Parma. Il contatto diretto tra i suini domestici e i cinghiali, quindi, è impedito dalle rigide pratiche di contenimento dei suini negli allevamenti intensivi. Il contatto indiretto dai suini ai cinghiali, al contrario, non va escluso ed è favorito dall'uso del letame suino in agricoltura con la conseguente dispersione nell'ambiente delle particelle virali (Bonardi et al., 2020).

In diverse regioni italiane, si sono tipizzati stipiti di HEV3 nei cinghiali appartenenti ai sottotipi 3a, 3c, 3e, 3f, 3i (Bonardi et al., 2020). Ad oggi, in Italia, come negli altri paesi europei, i sottotipi più rilevati tra i suini domestici e quelli selvatici sono 3c e 3f, a testimonianza di una circolazione virale tra le due specie (Arnaboldi et al., 2021).

Studio	Anno	Sieroprevalenza/HEV-RNA	Matrice	Positività	N campioni	Province	Positività	Sottotipo HEV3
Nord Italia (Parco Regionale Gessi Bolognesi)	2006	HEV-RNA	Bile	25%	88	-	-	
Nord Italia	2009-2012	Sieroprevalenza	Siero	10,2%	2211	Brescia	4,2%	
		HEV-RNA	Siero/Fegato	0%		Pisa	48,7%	
Toscana	2011-2012	Sieroprevalenza	Siero	56,2%	64			
		HEV-RNA	Feci	9,4%				
Lazio (Viterbo)	2012-2014	HEV-RNA	Fegato	16,3%	332			a, c, f, i
			Intestino	7,8%				
Lazio (Viterbo)	2016-2017	HEV-RNA	Fegato	52,2%	92			c, f
Liguria	2017-2019	HEV-RNA	Fegato	4,4%	560			a, c, f
Abruzzo (Chieti)	2019	HEV-RNA	Fegato e Cistifellea	7,8%	102			
Calabria (Catanzaro)	2019-2020	HEV-RNA	Fegato	26,7%	86			c
Nord Italia (Sondrio e Parma)	2015-2020	HEV-RNA	Fegato	11,6%	602	Parma	23,8%	a, f
						Sondrio	1,2%	
Emilia Romagna (Parma)	2018-2019	HEV-RNA	Fegato	31,5%	97			

Tabella 1: Studi condotti in Italia sul cinghiale per la ricerca di HEV mediante il rilevamento anticorpale di IgG anti-HEV o di RNA-HEV (Martelli et al., 2008; Martinelli et al., 2015; Mazzei et al., 2015; Di Pasquale et al., 2019; De Sabato et al., 2018; Masotti et al., 2020; De Massis et al., 2019; Lorusso et al., 2022; Arnaboldi et al., 2021; Bonardi et al., 2020)

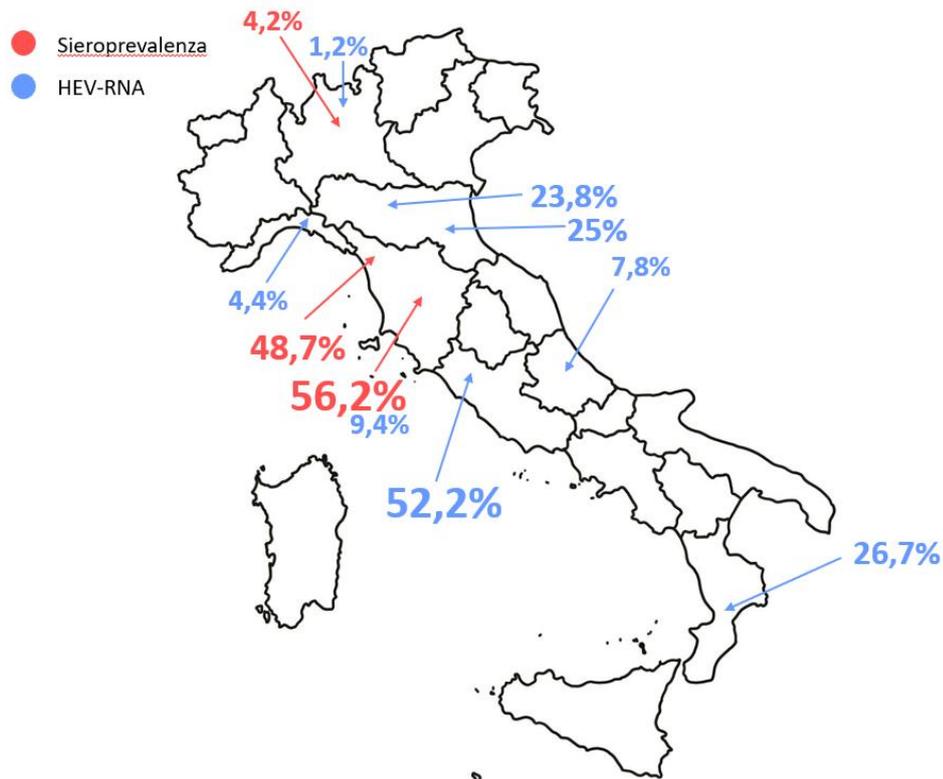


Figura 5: Positività rilevate dagli studi condotti in Italia sul cinghiale; in rosso le percentuali riferite alla sieroprevalenza, ovvero al rilevamento di anticorpi anti-HEV, in blu le percentuali riferite al rilevamento dell'RNA virale (Martelli et al., 2008; Martinelli et al., 2015; Mazzei et al., 2015; Di Pasquale et al., 2019; De Sabato et al., 2018; Masotti et al., 2020; De Massis et al., 2019; Lorusso et al., 2022; Arnaboldi et al., 2021; Bonardi et al., 2020)

Studi svolti nel cinghiale all'estero

Tra il 2003 e il 2010 è stato condotto uno studio in Spagna sulla situazione epidemiologica di HEV all'interno della popolazione di suini, cinghiali e cervi. E' stato analizzato il siero mediante la metodica ELISA. Le positività emerse erano del 43,75% per quanto riguarda i suini, del 57,4% per i cinghiali e del 12,85% per i cervi. In Spagna i suini vengono spesso allevati in zone confinanti con le aree di caccia e la loro alimentazione e stabulazione può avvenire all'esterno, per cui animali domestici e selvatici si ritrovano a condividere il loro habitat, comprese le fonti di cibo e acqua. Questo rappresenta un importante fattore di rischio per la trasmissione del virus tra le specie. Nella popolazione di suini, non era presente viremia in nessun animale, a differenza di quanto invece riscontrato per le specie

selvatiche. Questi fatti sostengono l'ipotesi che i suini domestici si infettino più precocemente rispetto a cinghiali e cervi, con conseguente sviluppo di una risposta immunitaria precoce. I risultati dell'analisi filogenetica hanno inoltre dimostrato che il virus era rimasto stabile nel tempo, senza cambiamenti importanti a livello genomico nel corso degli anni e nei passaggi inter-specie. Questo, suggerisce che la mancanza di una duratura protezione immunitaria nel cinghiale (dovuta alla coesistenza di viremia e riscontro di anticorpi) non è causata dalla mutazione del virus, ma probabilmente da una protezione anticorpale incompleta e/o da una continua reinfezione, fatto che evidenzia il loro ruolo come serbatoi (Kukielka et al., 2016).

Uno studio condotto nei Paesi Bassi tra il 2005 e il 2008 ha messo a confronto il rilevamento di HEV in suini domestici ed ungulati selvatici. Il test ELISA impiegato ha rilevato positività per la ricerca di anticorpi anti-HEV in 88 sieri su 130 (67,7%) per quanto riguarda i suini domestici. Per le specie selvatiche, sono stati testati campioni di feci, fegato, muscoli e siero per la ricerca di RNA virale. Tramite l'utilizzo della RT-PCR, nel cinghiale 8 campioni su 106 sono risultati positivi (8%). L'età in cui è stata riscontrata positività variava dai 4 ai 18 mesi. L'analisi filogenetica delle sequenze ottenute ha rivelato che il genotipo di appartenenza era il 3c, già isolato nel 2005 da allevamenti suini olandesi e nel 2004-2006 da casi di epatite E umana sempre nei Paesi Bassi. (Rutjes et al., 2010).

Tra il 2005 e il 2009, in Ungheria, sono stati raccolti 687 campioni da specie animali differenti al fine di indagare la presenza di HEV. Per quanto riguarda i suini, l'RNA virale venne rilevato nel 21% di campioni di feci e nel 31% dei campioni di fegato. Solo il 39% degli allevamenti testati, però, presentava almeno un suino positivo ad HEV. La percentuale di positività rilevata nei fegati cinghiali fu del 10,6% (8/75) (Forgach et al., 2010).

Campioni provenienti da suini, cinghiali, cervi, numerose altre specie selvatiche e molluschi, sono stati raccolti nel corso del 2009-2010 in Croazia. Sono stati analizzati 536 cinghiali, 848 suini domestici, 32 bovini, 40 caprioli, 280 cervi, 12 mufloni, 50 volpi, 10 martore, 8 furetti, 252 cozze e 286 ostriche. Per quanto

riguarda i molluschi, la matrice analizzata era composta dalla ghiandola digestiva; per i mammiferi furono campionati sangue, fegato e milza. È stato riscontrato HEV-RNA nel 24,5% dei suini domestici e nel 12,3% dei cinghiali, mentre i campioni delle altre specie sono risultati sempre negativi (Prpic et al., 2015).

Nel 2007-2008, in Francia è stato condotto uno studio volto a stabilire la prevalenza di HEV all'interno della popolazione di cinghiali. Sono stati prelevati 285 campioni di fegato dai cinghiali cacciati nel Sud-Est del paese. L'RNA virale è stato rilevato nel 2,5% dei cinghiali e le analisi filogenetiche hanno mostrato un elevato grado di omogeneità con gli isolati di HEV da casi umani di epatite E. Le sequenze di HEV di cinghiale appartenevano al genotipo 3f. La prevalenza di HEV nei cinghiali dello studio francese è simile a quella riscontrata in Giappone (2,3%), mentre è inferiore a quella riscontrata in Italia, Spagna, Ungheria e Germania (Kaba et al., 2010).

Durante la stagione di caccia del 2010-2011, in Belgio, sono stati raccolti ed esaminati 383 campioni di siero di cinghiale. È stato inoltre condotto il campionamento di siero e fegato dai cervidi (cervo e capriolo) cacciati nel medesimo territorio. Tramite la metodica ELISA è stata rilevata una sieroprevalenza (anticorpi anti-HEV) del 34% nei cinghiali. Tutti i ceppi rilevati in cinghiali, cervidi e suini della stessa regione appartenevano al genotipo 3 e la maggior parte al sottotipo f. La ricerca dell'RNA virale è, invece, risultata positiva in 4/69 sieri (5,8%) e 4/61 fegati (6,5%) di cinghiale (sottotipi 3f e 3c). L'area con un numero inferiore di cinghiali sieropositivi era situata al confine con la Francia, paese in cui le sieroprevalenze sono basse, specialmente al Nord (7,3%), mentre l'area con valori maggiori è stata quella al confine con la Germania, paese nel quale la sieroprevalenza nei cinghiali aveva all'epoca raggiunto il 29,9%. Questi dati supportano la necessità di svolgere studi sovranazionali al fine di comprendere meglio la diffusione del virus nelle popolazioni di cinghiali (Thiry et al., 2017).

Durante la stagione di caccia del 2011-2012, fu condotto il primo studio per la ricerca di HEV nei fegati e nelle feci di cinghiale destinati al consumo umano in

Portogallo. Il 25% dei fegati e il 10% delle feci campionate sono risultati positivi per HEV. L'analisi filogenetica ha mostrato che tutti i ceppi appartenevano al genotipo 3, sottotipo e (Mesquita et al., 2016).

Poiché anche in Polonia non vi era nessuna informazione sulla prevalenza di infezioni autoctone da HEV nell'uomo e negli animali, tra il 2012 e il 2013 vennero campionate e analizzate diverse specie animali per la ricerca di HEV. Vennero rilevati anticorpi nel 44,4% dei campioni di siero di cinghiale. La percentuale di sieropositivi differiva significativamente a seconda delle province ed era correlata alla densità di cinghiali e alla ruralità della zona (Larska et al., 2015).

Nel 2013 anche in Estonia sono stati condotti i primi studi volti ad indagare il ruolo epidemiologico di HEV all'interno del paese. Anticorpi anti-HEV sono stati rilevati nel 61,6% dei sieri provenienti dai suini domestici (con positività riscontrata in ogni allevamento campionato) e nel 17,2% dei cinghiali. L'RNA è stato rilevato nel 22,9% dei campioni fecali di suini giovani e nel 16% dei cinghiali che erano risultati positivi alla ricerca anticorpale. L'analisi dei sieri di 67 allevatori di suini e di 144 cacciatori hanno rilevato una prevalenza anticorpale (IgG specifiche per HEV) rispettivamente nel 13,4% e 4,2% dei campioni. Nessuno di questi campioni è risultato positivo alla ricerca dell'RNA virale (Ivanova et al., 2015).

Tra il 2013 e il 2015, sono stati campionati 45 fegati e 5 milze per la ricerca di HEV da 50 cinghiali cacciati nella Romania dell'Est. La prevalenza riscontrata era del 18%. Erano stati condotti anche studi sierologici per la ricerca virale che hanno rivelato una sieroprevalenza del 9,61% nel 2015 e del 10,29% nel 2016. Il dato interessante è che in questo studio, due dei nove campioni risultati positivi alla ricerca dell'RNA virale appartenevano alla milza. Anche un altro studio condotto in Germania nel 2017 ha dimostrato la presenza del virus sia nel tessuto splenico che in quello renale di cinghiali e cervi infetti da HEV. Questo suggerisce che il virus replica e si localizza in diversi tessuti oltre al fegato (Porea et al., 2017).

Tra i diversi studi condotti per documentare la circolazione del virus dell'HEV negli ungulati selvatici, si vuole citare anche uno studio svolto in Germania dal 2013 al

2015 sul siero di cinghiali, cervi, caprioli e daini per la ricerca di IgG anti-HEV (tramite metodica ELISA). Di 339 campioni, 81 sono risultati positivi (23,9%). La proporzione di cinghiali positivi è aumentata significativamente tra le due stagioni di caccia (2013-2014 e 2014-2015) passando dal 27% al 51,5% con una prevalenza media di anticorpi del 45%. Sono stati testati anche campioni di fegato e siero di 415 animali per il genoma di HEV (utilizzando la RT-PCR). È emersa positività in 72 cinghiali su 369 (19,5%). La maggior parte delle sequenze appartenevano ai sottotipi 3c e 3i. Quattro cinghiali cacciati nella stagione 2014-2015 erano infetti da HEV appartenente al sottotipo 3f. In questa indagine è stata dimostrata la somiglianza con i sottotipi umani del virus (Anheyer-Behmenburg et al., 2017).

Dal 2014 al 2016, campioni di sangue e di fegato sono stati prelevati da cinghiali, cervi, caprioli e alci cacciate in Lituania per la ricerca di HEV. È stata riscontrata positività, tramite rilevamento di RNA virale mediante RT-PCR, nel 25,9% dei cinghiali. Sono state osservate percentuali più basse (17% per quanto riguardava i cinghiali) nel momento in cui la ricerca di HEV tramite RT-PCR veniva fatta sulla regione ORF2 anziché su ORF1. Dalle analisi filogenetiche di frammenti di ORF2 è stato osservato che nel territorio lituano circolava principalmente HEV genotipo 3, sottotipo i, rilevato anche in altri paesi quali Austria, Germania, Francia, Argentina, Bolivia e Uruguay in diverse specie, compreso l'uomo, i cinghiali e i suini domestici (Spancerniene et al., 2018).

Studio	Anno	Sieroprevalenza/HEV-RNA	Matrice	Positività	N campioni	Sottotipo HEV3
Spagna	2003-2010	Sieroprevalenza	Siero	57,4%	108	
Paesi Bassi	2005-2008	HEV-RNA	Feci/Fegato/Muscolo/Siero	8,0%	106	c
Ungheria	2005-2009	HEV-RNA	Fegato	10,6%	75	
Croazia	2009-2010	HEV-RNA	Siero/Fegato/Milza	12,3%	536	
Francia (Sud-Est)	2007-2008	HEV-RNA	Fegato	2,5%	285	f
Belgio	2010-2011	Sieroprevalenza	Siero	34,0%	383	f
		HEV-RNA	Siero	5,8%	69	f, c
Portogallo	2011-2012	HEV-RNA	Fegato	6,5%	61	
			Fegato	25,0%	80	e
Polonia	2011-2012	HEV-RNA	Feci	10,0%	40	
			Siero	44,4%	261	
Estonia	2013	Sieroprevalenza	Siero	17,2%	471	
Romania (Est)	2013-2015	HEV-RNA	Fegato	15,5%	45	
			Milza	40,0%	5	
		Sieroprevalenza	Siero	10,0%	120	
Germania	2013-2015	Sieroprevalenza	Siero	45,0%	180	c, f, i
		HEV-RNA	Fegato/Siero	19,5%	369	
Lituania	2014-2016	HEV-RNA	Fegato/Siero	25,9%	505	i

Tabella 2: Studi condotti in Europa sul cinghiale per la ricerca di HEV mediante il rilevamento anticorpale di IgG anti-HEV o di RNA-HEV (Kukielka et al., 2016; Rutjes et al., 2010; Forgach et al., 2010; Prpic et al., 2015; Kaba et al., 2010; Thiry et al., 2017; Mesquita et al., 2016; Larska et al., 2015; Ivanova et al., 2015; Porea et al., 2017; Anheyer-Behmenburg et al., 2017; Spancerniene et al., 2018)

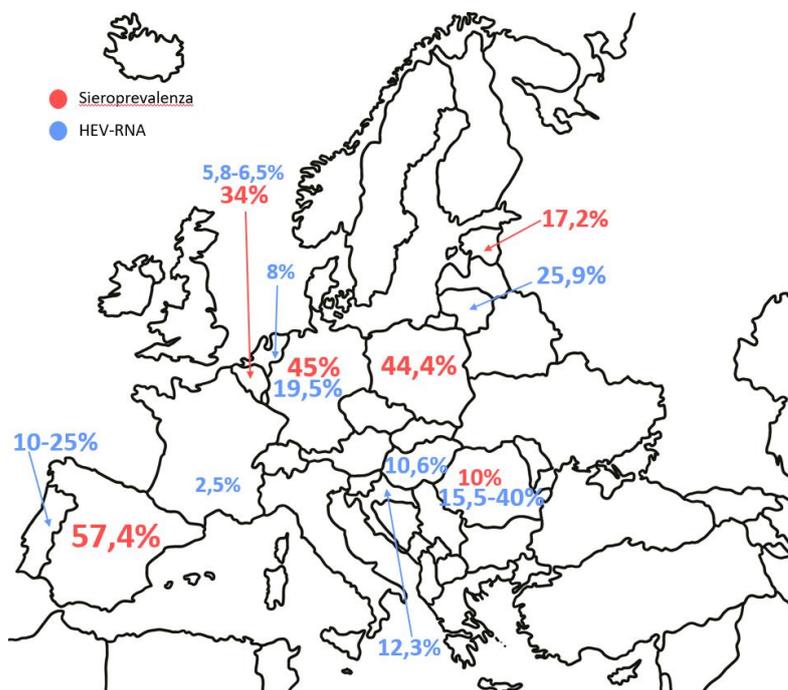


Figura 6: Positività rilevate dagli studi condotti in Europa sul cinghiale; in rosso le percentuali riferite alla sieroprevalenza, ovvero al rilevamento di anticorpi anti-HEV, in blu le percentuali riferite al rilevamento dell'RNA virale (Kukielka et al., 2016; Rutjes et al., 2010; Forgach et al., 2010; Prpic et al., 2015; Kaba et al., 2010; Thiry et al., 2017; Mesquita et al., 2016; Larska et al., 2015; Ivanova et al., 2015; Porea et al., 2017; Anheyer-Behmenburg et al., 2017; Spancerniene et al., 2018)

I ruminanti selvatici

In Italia la carne di cervo viene utilizzata per produrre prodotti a base di carne, come salsicce fresche o stagionate. Inoltre, in alcune zone ne è consentita la caccia controllata per contenere la numerosità della popolazione. Per i cacciatori che sono a contatto con i cervi, esiste pertanto un ulteriore rischio di contrarre l'infezione da HEV, oltre a quello della trasmissione per via alimentare, ed è dato dalla manipolazione di carcasse infette o di animali vivi (Di Bartolo et al., 2017).



Figura 7: Cervo (*Cervus elaphus Linnaeus*) (Fonte: Eric Isselee, Shutterstock, <https://www.shutterstock.com>)

Il cervo (*Cervus elaphus Linnaeus*) (Figura 7) appartiene all'ordine *Artiodactyla* e alla famiglia *Cervidae*. È una specie erbivora ed il peso, negli esemplari di sesso maschile, va da 100 kg a 180 kg, mentre in quelli di sesso femminile va da 60 kg a 90 kg. I maschi possiedono palchi ramificati provvisti di quattro o cinque cime per stanga una volta giunti a maturità. Il mantello estivo è di colore bruno rossiccio, mentre quello invernale si presenta grigio brunastro. I cerbiatti, fino ai tre mesi, possiedono picchiettature bianche lungo i fianchi. L'habitat del cervo è vario: esso vive in pianura, collina e montagna; in boschi intercalati da prati e pascoli, ma anche in zone paludose. Lo stile di vita è generalmente sedentario, si sposta per cercare cibo e per la riproduzione. Si tratta di una specie gregaria: le femmine

imparentate tra loro compongono gruppi piuttosto stabili e duraturi ai quali si uniscono soggetti giovani e cerbiatti; i maschi adulti formano piccoli gruppi instabili. I due sessi si associano solo in autunno per il periodo riproduttivo, talvolta anche in inverno. La durata massima della vita è di 17-20 anni. È presente in Europa, Africa Nord-Occidentale, Asia e America Settentrionale (Ambiente Regione Emilia-Romagna, 2011).



Figura 8: Capriolo (*Capreolus capreolus*) (Fonte: Eric Isselee, Shutterstock, <https://www.shutterstock.com>)

Il capriolo (*Capreolus capreolus*) (Figura 8) appartiene all'ordine *Artiodactyla*, famiglia *Cervidae*. Si tratta di grandi mammiferi erbivori muniti di corna caduche (come per il cervo). Il peso può variare tra 21 kg e 25 kg nei maschi, tra 20 kg e 23 kg nelle femmine. Il mantello è marrone-rossastro in primavera e bruno-grigiastro nel resto dell'anno; sul fondo della schiena è evidente una macchia di pelo bianca. I giovani caprioli presentano macchie bianche sul mantello. L'habitat è caratterizzato da aree cespugliate e boschi, ma si può ritrovare anche in zone situate al limite della vegetazione arborea. È una specie territoriale soprattutto nel periodo riproduttivo (estate), mentre nel corso dell'inverno tende a formare gruppi di individui. La sottospecie europea (*C.c. capreolus*) è ampiamente diffusa in tutta Europa, eccetto che alle latitudini più estreme (Arci Caccia Umbria, 2015).

Studi condotti nei ruminanti selvatici in Italia

Negli anni 2007-2010 è stato condotto uno studio nel Centro Italia volto a rilevare la presenza di anticorpi anti-HEV ed RNA nel siero della popolazione di cervi presente sul territorio. Si tratta del primo studio svolto sul territorio italiano per quanto riguarda la ricerca di HEV nei cervi. Trentacinque cervi su 251 (13,9%) sono risultati positivi alla ricerca di anticorpi IgG anti-HEV (metodo ELISA). L'RNA del virus è stato invece rilevato in 10 dei 91 campioni di siero (11%) esaminati tramite RT-PCR che, dal sequenziamento di due frammenti genomici nella regione del capsido, sono risultati appartenere al genotipo 3. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rivelata in base al sesso degli animali, mentre lo è stata per quanto riguarda la prevalenza tra i gruppi di età, che era maggiore negli animali giovani. Un'altra differenza è stata osservata per quanto riguarda i due gruppi sociali indagati, con prevalenza maggiore nei maschi solitari rispetto ai gruppi familiari. Infatti, i cervi di sesso maschile vengono normalmente abbattuti poche settimane dopo la fine del periodo riproduttivo, durante il quale potrebbero essere entrati a contatto con un gruppo familiare infetto o con l'ambiente contaminato ed aver a loro volta contratto l'infezione (Di Bartolo et al., 2017). Come da rilievi fatti in altre specie, la viremia inizia 2 settimane dopo l'infezione e può perdurare per 2-4 settimane, coincidendo con il periodo di abbattimento dei maschi (Ruggeri et al., 2013).

Tra il 2015 e il 2020, nello studio condotto da Arnaboldi et al. (2021), oltre ad essere stati campionati i fegati di cinghiale come già descritto, sono stati esaminati anche 228 fegati di ruminanti selvatici (218 cervi, 6 caprioli e 4 camosci). Tuttavia, non è stata rilevata alcuna positività nei campioni da ruminanti.

Dallo studio sui cervi, è emersa l'esistenza di una stretta correlazione dei ceppi presenti nel cervo italiano con quelli umani e suini. I risultati ottenuti sono simili a quelli di due studi condotti in Spagna, secondo i quali il 10,4-12,9% dei cervi era sieropositivo per HEV (contro il 13,9% riscontrato in Italia) e il 13,6-16,9% presentava viremia (11% quella riscontrata nello studio italiano) (Boadella et al., 2010; Kukielka et al., 2016; Di Bartolo et al., 2017). A confronto con questi studi,

risulta minore la prevalenza del 5% riscontrata nei Paesi Bassi negli anni 2006-2008 (Rutjes et al., 2010).

Negli studi effettuati sui ruminanti selvatici, la prevalenza di HEV è risultata inferiore a quella dei suini domestici o dei cinghiali. Dal momento che il ruolo dei ruminanti selvatici nella dinamica della trasmissione del virus non è del tutto chiaro, tutti gli autori concordano che saranno necessari ulteriori studi (Arnaboldi et al., 2021). Sarà importante indagare diverse aree geografiche sia in Italia, che in Europa, per tempi lunghi, in modo da raccogliere un numero di campioni adeguato e significativo per fornire informazioni riguardo alla circolazione dell'HEV in queste specie. Lo stesso andrebbe fatto parallelamente in altre specie animali appartenenti alla fauna selvatica per studiare l'epidemiologia e le dinamiche di trasmissione del virus (Anheyer-Behmenburg et al., 2017).

Studi svolti nei ruminanti selvatici all'estero

Uno studio svolto in Giappone nel 2003 ha indagato la possibilità di trasmissione dell'HEV all'uomo tramite il consumo di carne cruda o poco cotta di cervo. Questo fu uno dei primissimi studi riguardanti i ruminanti selvatici e venne svolto su due persone risultate positive all'HEV, che affermarono di aver mangiato carne cruda di cervo 6-7 settimane prima, e sui loro familiari. Dalla carne restante, congelata, è emersa positività per la ricerca di RNA virale tramite RT-PCR. Gli isolati appartenevano al genotipo 3 (Tei et al., 2003; Meng, 2011). In Giappone sono stati rilevati anticorpi IgG anti-HEV in circa il 3% dei cervi Sika e nel 35% dei cervi Yezo (Tomiyama et al., 2009; Matsuura et al., 2007). Gli anticorpi sono stati individuati anche nel 5% dei cervi nei Paesi Bassi. Negli Stati Uniti, invece, nessuno dei 174 campioni di cervo Sika analizzati in uno studio è risultato positivo alla ricerca di anticorpi specifici per HEV. La differenza tra USA, Cina e Giappone può essere spiegata dal fatto che in questi ultimi due paesi i cervi Sika vivono in prossimità delle popolazioni di suini e di cinghiali, entrambi noti quali ospiti di HEV (Rutjes et al., 2010). La trasmissione zoonotica di HEV dal cervo all'uomo tramite il consumo di carne contaminata cruda o poco cotta è stata accertata e quindi i ceppi di HEV isolati dal cervo sono considerati agenti di zoonosi (Meng, 2011).

In Giappone, sono stati testati 132 cervi Sika tra ottobre 2003 e marzo 2004. I campioni di siero e di tessuto epatico sono stati testati per la ricerca di RNA virale mediante RT-PCR, con primer mirati alla regione ORF2. La positività riscontrata si aggirava intorno al 2-3%. Lo stesso studio è stato rivolto anche alla popolazione di cinghiali e dall'analisi filogenetica è emersa una elevata omologia tra gli isolati di suini, uomo, cinghiali e cervo, tutti appartenenti al genotipo 3 (Sonoda et al., 2004).

Tra il 2003 e il 2010 è stato condotto uno studio in Spagna volto ad indagare la situazione epidemiologica di HEV. Sono stati esaminati i campioni di sangue provenienti da 70 cervi per la ricerca di anticorpi anti-HEV e la positività emersa era del 12,9% (Kukielka et al., 2016).

Uno studio condotto nei Paesi Bassi tra il 2005 e il 2008 ha indagato la presenza di HEV-RNA nel cervo e nel capriolo, oltre che nel cinghiale, come già riportato. Nel cervo 6 campioni su 39 sono risultati positivi (15%), mentre nel capriolo sono risultati tutti negativi. Per quest'ultima specie sono stati testati solamente 8 animali e quindi i risultati ottenuti potrebbero essere stati influenzati dal basso numero di campioni esaminati, dato che in altri paesi europei l'RNA di HEV è stato rilevato anche nel capriolo. Dall'analisi filogenetica è emerso che il genotipo di appartenenza era il 3c (Rutjes et al., 2010).

Anche nello studio condotto in Ungheria da Forgach et al. (2010), è stata indagata la presenza di HEV-RNA nel capriolo e nel cervo, oltre che nel cinghiale. Venne rilevata una percentuale di positività del 21,9% nei fegati di capriolo (9/41) e del 10% nei fegati di cervo (3/30).

Nel 2009-2010, in Croazia, sono stati analizzati sangue, fegato e milza di 32 bovini, 40 caprioli, 280 cervi e 12 mufloni per la ricerca di HEV-RNA, ma nessuno di questi campioni risultò positivo (Prpic et al., 2015).

Dal 2010 al 2018, in Norvegia, sono stati analizzati 715 campioni di siero provenienti da diverse specie di ungulati selvatici per la ricerca di anticorpi anti-

HEV, che sono stati rilevati nel 23,1% delle renne (43/186), nel 19,5% degli alci (32/164), nel 5,9% dei bovini (6/102) e nel 4% dei cervi (7/177). Nessun campione appartenente al capriolo è risultato positivo alla ricerca di anticorpi (0/86). Questi risultati, in un paese in cui è presente una popolazione ristretta di cinghiali e gli allevamenti di suini sono in numero limitato, suggeriscono che i cervidi potrebbero svolgere un ruolo importante nell'epidemiologia di HEV in Norvegia (Sacristan et al., 2021).

In Germania, durante le stagioni di caccia del 2011-2012 e del 2012-2013, è stato condotto uno studio volto a ricercare la presenza di HEV nella popolazione di cervi, caprioli e daini (al quale sono stati aggiunti i dati raccolti negli anni 2000-2001) e a capirne il ruolo in quanto potenziali serbatoi. La prevalenza anticorpale variava dal 2-3,3% nel cervo al 5,4-6,8% nel capriolo. L'RNA virale è stato identificato nel 2-6,6% dei cervi e nel 4,3% dei daini. Tutte e tre le specie andrebbero ulteriormente indagate per capirne il ruolo come ospiti e potenziali serbatoi di HEV. Nei Paesi Bassi sono stati rilevati anticorpi anti-HEV nel 5% dei cervi e in nessuno dei caprioli esaminati in uno studio condotto nel 2010. Sempre nei Paesi Bassi è stato rilevato l'RNA virale anche nei campioni di feci e nel 15% dei fegati di cervo esaminati e in nessun campione proveniente dai caprioli (Neumann et al., 2016).

Nel 2010-2011, in Belgio, sono stati esaminati, in contemporanea ad uno studio condotto sulla popolazione di cinghiali sopra riportato, campioni di siero e fegato dai cervidi (cervo e capriolo). Tramite la metodica ELISA è stata rilevata una sieroprevalenza (anticorpi anti-HEV) dell'1% nei cervi e del 3% nei caprioli. Tutti i ceppi identificati in cinghiali, cervidi e suini della stessa regione appartenevano al genotipo 3 e la maggior parte al sottotipo f. La ricerca dell'RNA virale è, invece, risultata positiva in 1/29 fegati (3,4%) di cervo (sottotipo f) e in 0/27 fegati per quanto riguarda il capriolo. Non è stato rilevato alcun campione di siero di cervo e di capriolo positivo alla ricerca per HEV-RNA. La prevalenza più bassa riscontrata nei cervidi potrebbe essere dovuta al fatto che questi hanno un comportamento più solitario rispetto ai cinghiali che invece tendono a vivere in gruppo. Il virus potrebbe essere trasmesso ai cervidi tramite le feci di cinghiale, in una zona dove le due popolazioni interagiscono, come i siti di alimentazione artificiale all'interno

dei parchi naturali. Queste ipotesi suggeriscono che i cervidi potrebbero essere considerati degli ospiti accidentali di HEV, ma saranno necessari ulteriori studi per capirne meglio il ruolo epidemiologico (Thiry et al., 2017).

Nel 2012-2013, durante uno studio condotto in Polonia, nessun anticorpo venne rilevato nei sieri di cervo, bisonte, capriolo, alce, daino, camoscio e orso (Larska et al., 2015).

Dal 2013 al 2015 uno studio condotto in Germania ha indagato la presenza di anticorpi IgG anti-HEV e dell'RNA virale in campioni di cervi, di caprioli e di daini, oltre che di cinghiali come già descritto. I campioni di siero appartenente ai cervi sono risultati negativi, mentre per quanto riguarda la ricerca del genoma di HEV in fegato e siero, è emersa una positività del 6,4% nei caprioli (5/78) e del 2,4% nei cervi (2/83). La maggior parte delle sequenze appartenevano ai sottotipi 3c e 3i (Anheyer-Behmenburg et al., 2017).

Dal 2014 al 2016, in Lituania, sono stati prelevati campioni di sangue e fegato da cervi, caprioli e alci per la ricerca di HEV. E' stata riscontrata positività (tramite il rilevamento di RNA virale), nel 22,6% dei caprioli, nel 6,7% dei cervi e nel 7,7% degli alci. Dalle analisi filogenetiche è stato osservato che circolava principalmente HEV3 di sottotipo i (Spancerniene et al., 2018).

Altri studi in cui è emersa la presenza di HEV nei caprioli sono stati condotti in Ungheria nel 2009 e 2010, in cui HEV RNA è stato individuato nel 34,4% e nel 22% dei fegati esaminati (Serracca et al., 2015).

Studio	Anno	Sieroprevalenza/HEV-RNA	Matrice	Cervo		Capriolo		Sottotipo HEV3
				Positività	N campioni	Positività	N campioni	
Nord Italia (Sondrio e Parma)	2015-2020	HEV-RNA	Fegato	0%	218	0%	6	
Centro Italia	2007-2010	Sieroprevalenza	Siero	13,5%	251			
		HEV-RNA	Siero	11%	91			
Spagna	2003-2010	Sieroprevalenza	Siero	12,9%	70			
Paesi Bassi	2005-2008	HEV-RNA	Feci/Fegato/Muscolo/Siero	15%	39	0%	8	c
Ungheria	2005-2009	HEV-RNA	Fegato	10%	30	21,9%	41	
Croazia	2009-2010	HEV-RNA	Siero/Fegato/Milza	0%	280	0%	40	
Belgio	2010-2011	Sieroprevalenza	Siero	1%	189	3%	235	f
		HEV-RNA	Siero	0%	84	0%	68	
			Fegato	3,4%	29	0%	27	
Polonia	2012-2013	Sieroprevalenza	Siero	0%	118	0%	68	
Germania	2013-2015	Sieroprevalenza	Siero	0%	78	0%	59	c, f, i
		HEV-RNA	Fegato/Siero	2,4%	83	6,4%	78	
Lituania	2014-2016	HEV-RNA	Fegato/Siero	6,7%	15	22,6%	93	i
		Sieroprevalenza	Siero	2-3,3%	161	5,4-6,8%	154	
Germania	2000-2013	HEV-RNA	Siero	2-6,6%	163	0%	156	
		HEV-RNA	Fegato/Siero	2-3%	132			
Giappone	2003-2004	HEV-RNA	Fegato/Siero					
Ungheria	2009-2010	HEV-RNA	Fegato			27,4%	73	
Norvegia	2010-2018	Sieroprevalenza	Siero	4%	177	0%	86	

Tabella 3: Studi condotti in Europa su cervo e capriolo per la ricerca di HEV mediante il rilevamento anticorpale di IgG anti-HEV o di RNA-HEV (Arnaboldi et al., 2021; Ruggeri et al., 2013; Kukielka et al., 2016; Rutjes et al., 2010; Forgach et al., 2010; Prpic et al., 2015; Thiry et al., 2017; Larska et al., 2015; Anheyer-Behmenburg et al., 2017; Spancerniene et al., 2018; Neumann et al., 2016; Sonoda et al., 2004; Serracca et al., 2015; Sacristan et al., 2021)

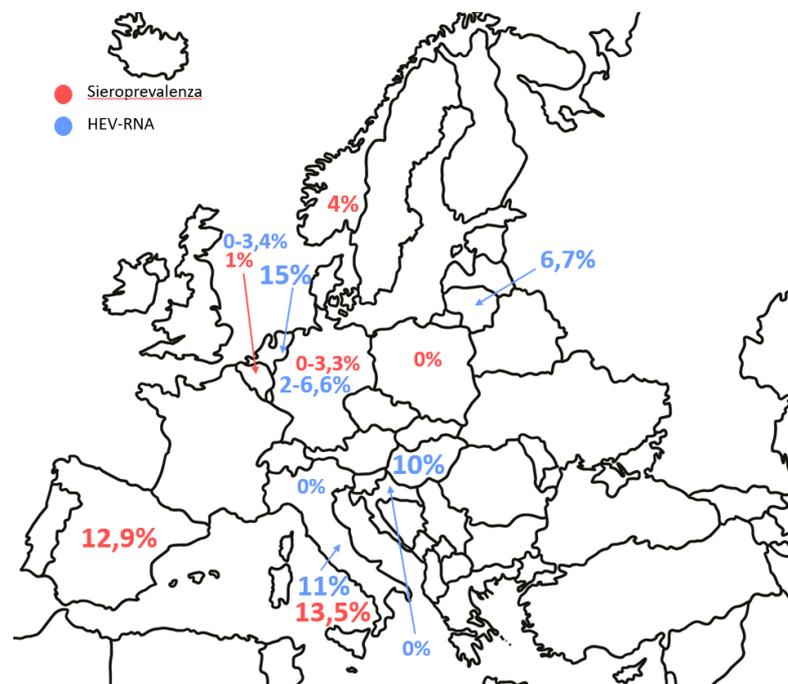


Figura 9: Positività rilevate dagli studi condotti in Europa su cervo e capriolo; in rosso le percentuali riferite alla sieroprevalenza, ovvero al rilevamento di anticorpi anti-HEV, in blu le percentuali riferite al rilevamento dell'RNA virale (Arnaboldi et al., 2021; Ruggeri et al., 2013; Kukielka et al., 2016; Rutjes et al., 2010; Forgach et al., 2010; Prpic et al., 2015; Thiry et al., 2017; Larska et al., 2015; Anheyer-Behmenburg et al., 2017; Spancerniene et al., 2018; Neumann et al., 2016; Sonoda et al., 2004; Serracca et al., 2015; Sacristan et al., 2021)

Epidemiologia

In generale, i dati relativi alle infezioni da HEV sono scarsi come conseguenza della mancata sorveglianza della malattia in molti paesi. A livello internazionale, la sieroprevalenza varia a seconda dell'area geografica, della popolazione studiata, ma anche della metodica di rilevamento delle IgG anti-HEV (EFSA, 2017). In Italia, la circolazione del virus dell'epatite E negli animali selvatici differisce da regione a regione, con sieroprevalenze variabili dal 4,2% al 56,2% (Figura 5). Il rilevamento di RNA virale da campioni di fegato, invece, varia dallo 0% al 33,5% (Tabella 1) (Di Pasquale et al., 2019).

Per quanto riguarda i cinghiali, il genotipo 3 è stato rilevato in Europa, mentre sia il genotipo 3 che il 4 sono stati riscontrati in Giappone. Studi hanno dimostrato che la prevalenza anticorpale per HEV e l'RNA virale nei cinghiali oscilla dal 3% al 71% in Europa e dal 3% al 25% in Giappone. L'RNA di HEV3 è stato rilevato anche nella popolazione di cervi di vari paesi, tra cui Messico, Spagna, Paesi Bassi, Ungheria e Giappone con una prevalenza anticorpale variabile dal 3% al 62,7% (Martinelli et al., 2015; Pavio et al., 2015).

Secondo i dati riportati fino all'anno 2015, la prevalenza di infezione da HEV nei cinghiali tra i paesi europei era del 3% nei Paesi Bassi, del 25% in Portogallo, dell'11-12% in Ungheria e del 14,9-68,2% in Germania. Alcuni autori ipotizzano che queste differenze potrebbero essere attribuite a diversi fattori, tra cui gli habitat differenti all'interno dei quali vivono le popolazioni di cinghiali, la densità delle popolazioni e le possibilità di entrare in contatto con allevamenti di suini domestici infetti. Per quanto riguarda il genere e l'età dei cinghiali infetti, non sono state riscontrate differenze significative. Una correlazione tra giovane età ed infezione da HEV è stata invece riportata negli studi condotti sui suini domestici. Inoltre, è stato osservato che nei cinghiali la carica virale rimane alta per un lungo periodo di tempo e questo li identifica come importanti serbatoi per la trasmissione di HEV (Serracca et al., 2015).

Anche nei ruminanti selvatici la sieroprevalenza e il rilevamento dell'RNA virale variano a seconda dell'area geografica indagata, dell'anno in cui è stato condotto lo studio, della matrice e del numero di campioni esaminati (Tabella 3, Figura 9).

Reservoir d'infezione nelle aree iper-endemiche

Il serbatoio di HEV responsabile del mantenimento della malattia nelle popolazioni iperendemiche non è stato individuato con certezza. Nell'uomo si sono verificati viremia ed escrezione fecale del virus che perdura per 38-50 giorni. In un modello sperimentale, primati inoculati con una dose bassa di HEV hanno eliminato per via fecale una quantità elevata di virioni (10^4 - 10^7 /g di feci) vitali ed infettanti, nonostante non avessero mostrato alcuna evidenza di danno epatico (Aggarwal et al., 2001).

La circolazione del virus tramite l'escrezione fecale da parte delle persone con infezione subclinica in aree iper-endemiche potrebbe giustificare il mantenimento di un pool di individui infetti che, a loro volta, potrebbero contaminare periodicamente le riserve di acqua potabile. A parte il ruolo dell'uomo, l'importanza di un serbatoio animale nelle regioni ad alto endemismo presenta ancora lati oscuri. La sua esistenza è suggerita da un'elevata presenza di anticorpi anti-HEV in diverse specie animali e dall'isolamento delle sequenze genomiche di HEV dai suini delle aree endemiche. Tuttavia, i dati sull'omologia delle sequenze genomiche tra esseri umani e specie animali provenienti da regioni ad alta endemia sono spesso contrastanti e hanno suggerito che non tutti i genotipi di HEV siano zoonosici. Infatti, mentre ceppi infettanti animali e uomo in Cina e Vietnam appartenevano allo stesso genotipo (HEV4), tale concordanza non è stata rilevata in altri paesi, quali ad esempio in India, dove circolava HEV1 all'interno della popolazione umana e HEV4 nei suini. Il genotipo 1, responsabile della maggior parte dei casi umani nei paesi iper-endemici, non è mai stato isolato dai suini e non è mai riuscito ad infettarli nemmeno sperimentalmente. Quindi, sulla base di questi fatti, la trasmissione zoonotica sembra improbabile nelle infezioni da HEV1. La stessa cosa si può dire anche per quanto riguarda le infezioni sostenute da HEV2 (Aggarwal, 2011).

Persistenza del virus nell'ambiente

Esistono ancora lacune per quanto riguarda la sopravvivenza di HEV negli alimenti, nell'ambiente e durante le procedure di decontaminazione messe in atto nel corso dei processi produttivi della filiera alimentare. Ciò che ha ostacolato lo svolgimento degli studi a questo riguardo è la mancanza di un test affidabile in grado di rilevare l'infettività del virus. Sarà, infatti, necessario portare avanti progetti di ricerca per sviluppare un metodo idoneo per comprendere la sopravvivenza e la persistenza del virus nell'ambiente e nelle varie tipologie di matrici e la sua risposta alle procedure di disinfezione e decontaminazione ambientale (EFSA, 2017).

La temperatura è considerata il principale fattore in grado di inattivare il virus nell'ambiente. Nel 2016, Johne et al. hanno dimostrato che HEV è rimasto infettante fino a 21 giorni a 37°C, fino a 28 giorni a temperatura ambiente e fino a 56 giorni a 4°C, ma ulteriori studi saranno necessari per stabilire un modello di riferimento che metta in correlazione la temperatura con il tasso di sopravvivenza del virus (EFSA, 2017).

3. Trasmissione del virus tramite il consumo di carni

Principali vie di trasmissione di HEV

La trasmissione di HEV avviene principalmente per via oro-fecale. HEV replica nel tratto gastrointestinale e nel fegato e viene diffuso nell'ambiente tramite l'emissione delle feci (Meng, 2011). La trasmissione di HEV può verificarsi tramite diverse vie (figura 10): interumana (ad esempio tramite trasfusioni di sangue o trapianto d'organo), trasmissione da animale a uomo, ingestione di alimenti vegetali o acqua contaminati da scarichi umani, esposizione e/o contatto con suini e prodotti di origine suina (sono quindi sottoposte ad un rischio maggiore figure professionali come allevatori, veterinari, macellai), contatto con animali selvatici portatori del virus e ingestione delle loro carni, ingestione di molluschi contaminati (Zoodiac, 2020). Questi ultimi, infatti, possono concentrare le particelle di HEV filtrando l'acqua contaminata nella quale sono immersi (Horvatits et al., 2019).

L'uomo e gli animali sono le fonti di HEV, mentre gli alimenti e l'ambiente sono i principali veicoli per la sua trasmissione (EFSA, 2017). I viaggi in zone endemiche aumentano le probabilità di esposizione al virus. Altre vie di trasmissione identificate includono la trasmissione attraverso trasfusione di emoderivati infetti e la trasmissione verticale da donne in gravidanza ai loro feti (Lapa et al., 2015).

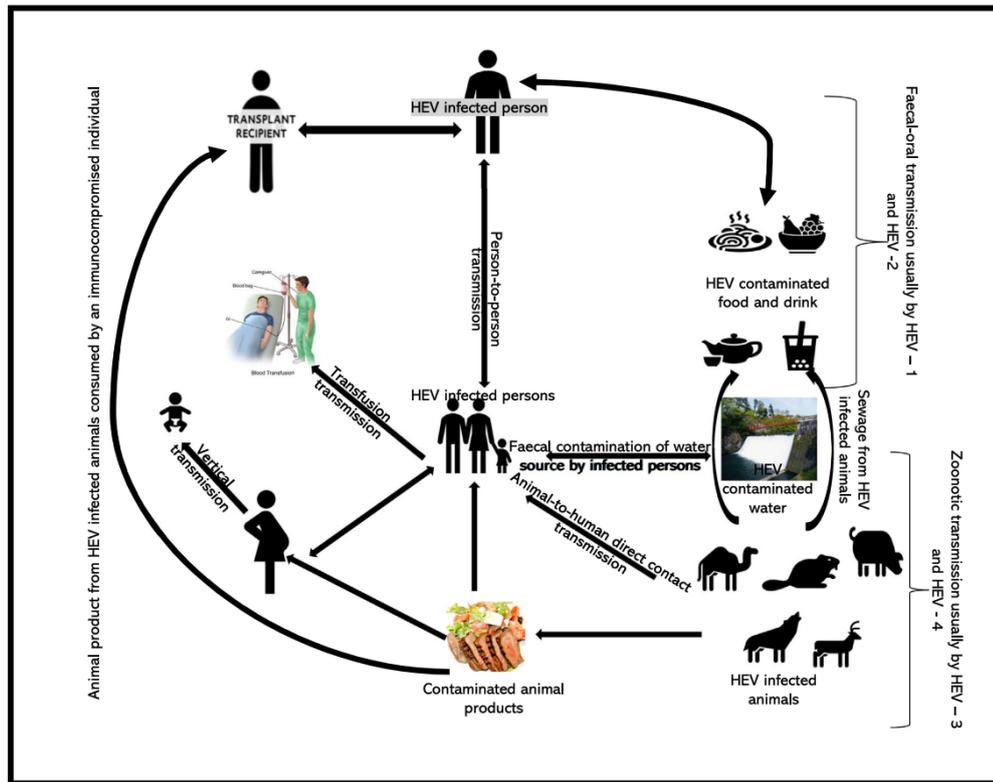


Figura 10: Vie di trasmissione dell'Hepatitis E Virus (Raji et al., 2022)

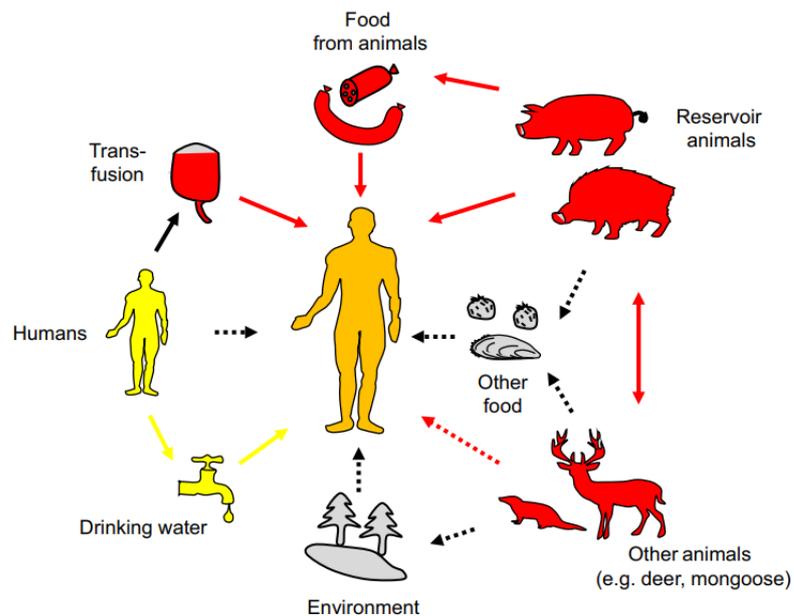


Figura 11: Vie di trasmissione dell'Hepatitis E Virus. In giallo sono raffigurate le principali vie di trasmissione per i genotipi 1 e 2; in rosso quelle riguardanti i genotipi 3 e 4 (zoonotici) (Spahr et al., 2018)

Per i genotipi 1 e 2, le principali vie di trasmissione sono rappresentate dal consumo di acqua contaminata e dal contatto uomo – uomo, mentre per i genotipi 3 e 4 (zoonotici) le principali vie di trasmissione sono rappresentate dal contatto con animali infetti, dal consumo delle loro carni crude/poco cotte o dalle trasfusioni di sangue. Altre vie di trasmissione riconosciute per tutti e quattro i genotipi riguardano il consumo di molluschi allevati in acque contaminate e l'acquisizione del virus dall'ambiente (Figura 11) (Spahr et al., 2018).

La trasmissione per via alimentare può avvenire principalmente tramite due tipologie di alimenti: la prima è rappresentata da materie prime provenienti da animali infetti da HEV (un esempio è il fegato di un suino infetto), la seconda da prodotti alimentari contaminati dal virus (come molluschi allevati in acque contaminate da liquami animali o umani veicolanti il virus) (EFSA, 2017).

In uno studio condotto negli Stati Uniti, 295 suoiatri provenienti da 8 stati e i donatori di sangue delle rispettive zone geografiche sono stati testati per la ricerca di IgG anti-HEV. È emerso che circa il 23% dei veterinari era positivo per IgG anti-HEV di genotipo 3, mentre all'interno dei donatori di sangue la sieroprevalenza era del 17%. Secondo lo studio, figure professionali che vengono a contatto quotidianamente coi suini risultano essere 1,51 volte più a rischio di contrarre l'infezione rispetto alla restante popolazione (Meng, 2011). In Europa, circa una donazione di sangue su 1000 risulta positiva per HEV. Questo problema ha indotto diversi paesi a testare regolarmente le donazioni per HEV onde evitarne la trasmissione per via ematica a pazienti in condizioni critiche che rischierebbero di manifestare la forma acuta di epatite (Horvatits et al., 2019).

Nei paesi in via di sviluppo, l'acqua contaminata provoca gravi focolai epidemici e per questo l'epatite E era considerata una malattia legata alle scarse condizioni igieniche tipiche di certe aree geografiche (Lapa et al., 2015). Infatti, ceppi di HEV di origine sia suina che umana ancora infettanti sono stati rilevati in acque di scarico. In India è stato dimostrato che la sieroprevalenza era significativamente più alta negli addetti alle fognature (57%) che nel resto della popolazione (19%)

(Meng, 2011). Nei paesi a basso livello igienico, l'acqua contaminata può essere un veicolo di trasmissione di HEV a frutta e verdura (EFSA, 2017).

In Europa è stato invece dimostrato che il virus si trasmette principalmente tramite l'ingestione di carne di maiale e di cinghiale, anche se non si possono escludere altre fonti di infezione come le trasfusioni di sangue (Lapa et al., 2015).

Trasmissione di HEV tramite alimenti di origine animale

Suini

Nel 2003, in Giappone, alcuni casi di epatite E sono stati associati all'ingestione di carne o organi crudi o poco cotti di suino, cinghiale e cervo (Caprioli et al., 2005). Questa fu la prima evidenza di trasmissione per via alimentare del virus HEV (Martelli et al., 2008).

In Europa, la trasmissione per via alimentare sembra essere la via principale per le infezioni umane da HEV e i suini domestici rappresentano il principale serbatoio animale del virus (Tabella 4) (EFSA, 2017).

Uno studio condotto nei Paesi Bassi e in Cina, attesta che, a livello mondiale, il 10% dei prodotti a base di carne suina risultano positivi alla ricerca di HEV-RNA (nonostante i dati disponibili siano limitati). La percentuale più alta di positività è stata osservata nei tagli di carne cruda (13,27%), seguita dalle salsicce (11,7%) e dai fegati (6,59%). Per quanto riguarda le salsicce è stata fatta distinzione tra le salsicce di fegato e quelle di carne di suino ed è emerso un tasso di positività tre volte superiore nelle prime rispetto alle seconde (15,23% contro 5,54%) (Li et al., 2022).

Il rilevamento di elevate quantità di RNA virale nel fegato degli animali infetti, nei loro organi e soprattutto nei muscoli, evidenzia l'altro rischio per l'uomo di contrarre il virus tramite l'ingestione di carni non correttamente cotte (Anheyer-Behmenburg et al., 2017). Circa il 10% dei suini con HEV rimangono viremici fino

alla macellazione e questa, probabilmente, rappresenta la causa del rilevamento del virus nei dei tagli di carne. L'RNA virale è stato identificato nell'intera filiera suina (allevamenti, macelli, trasformazione della carne e vendita al dettaglio) e in altri animali serbatoio destinati al consumo alimentare come cinghiali e cervi (EFSA, 2017). In dieci studi che hanno indagato la prevalenza di fegati con HEV nei suini macellati, le prevalenze riscontrate erano comprese tra lo 0,8% e il 10% dei campioni di fegato. La prevalenza in Italia, invece, era di oltre il 20%, per cui si è ipotizzato che nel nostro paese il virus debba diffondersi massivamente a livello di allevamento e l'infezione debba avvenire tardivamente, in modo che i suini siano ancora infettivi al momento della macellazione (Salines et al., 2017).

In alcune indagini si è osservato che il 2% dei fegati di suino venduti in Giappone e l'11% dei fegati di suino commercializzati negli Stati Uniti erano positivi per HEV3 o HEV4. Inoltre, negli Stati Uniti, il virus nei fegati era risultato ancora infettante e le sue sequenze si sono rivelate identiche o strettamente correlate a ceppi virali rinvenuti in pazienti umani con epatite E (Meng, 2011). In Inghilterra, il 10% delle salsicce di suino al dettaglio sono risultate positive alla ricerca di HEV-RNA; in Francia la percentuale arrivava fino al 30%. In molti paesi, quali USA, Germania, Corea, Francia, Giappone e Paesi Bassi, un'alta percentuale di fegati di suino contaminati (fino all'11%) entrano in commercio ed il virus può dimostrarsi infettante se inoculato nuovamente nei suini (Pavio et al., 2015). Questo suggerisce che alcuni casi autoctoni di epatite E siano legati al consumo di carne o visceri contaminati di produzione locale (Aggarwal, 2011). Da uno studio condotto in Francia da Kamar et al. (2013) è emerso che un numero significativo di casi di epatite E cronica è stato segnalato in individui immunocompromessi affetti dal genotipo HEV3 acquisito per via zoonotica (Pavio et al., 2015).

In Europa, HEV-RNA è stato rilevato dai fegati di suino con percentuale variabile a seconda del paese, dall'1,3% in Svizzera (secondo uno studio pubblicato nel 2017) fino al 13,5% nella Germania Nord-Ovest (indagine del 2013). Lo studio condotto da Di Bartolo et al. nel 2012 che coinvolse Spagna, Repubblica Ceca e Italia non riportò alcun caso di contaminazione crociata tra feci e fegato alla macellazione. Nei paesi al di fuori dell'UE, il rilevamento di RNA virale nel fegato di suino è stato segnalato in Canada nel 20,9% dei campioni esaminati (2010), nel

6,3% in Cina (2011) e nell'1,7% in Brasile (2012). La prevalenza più alta è stata segnalata in Colombia nel 2015 (41,3%) e ad Hong-Kong (Cina) nel 2010 (31%).

Oltre al fegato, un altro alimento a rischio è rappresentato dalle salsicce di suino crude o poco cotte e dagli insaccati; in paesi come Spagna, Regno Unito e Germania, il 6%, il 9,5% e il 26%, rispettivamente, degli insaccati di suino venduti sul mercato erano positivi per HEV-RNA (2012-2015). L'RNA è stato rilevato anche in altri prodotti quali fegatini, figatelli, fegato essiccato, quenelle (polpette), salsicce di fegato fresche ed essiccate. La replicazione del virus è stata dimostrata in una salsiccia HEV-positiva contenente fegato su quattro in Francia, dimostrando che il virus era ancora infettante all'interno dell'alimento trasformato (EFSA, 2017).

Nel 2013, sono stati segnalati tre casi clinici di infezione da HEV su un'isola francese. Gli individui avevano consumato un maialino allo spiedo farcito con carne cruda nella quale era compreso anche il fegato. Gli stessi isolati di HEV sono stati riscontrati nei liquami dell'allevamento in cui il suino era nato e nelle acque reflue umane non trattate provenienti dalle fognature comunali. Indagando più a fondo, sono emersi diciassette casi di infezione da HEV associate a quel pasto e, di questi, il 70,6% era asintomatico (EFSA, 2017).

Il rischio per la salute umana associato al consumo di carne cruda o poco cotta di suino, cinghiale e cervo è stato dimostrato da numerosi studi (Di Pasquale et al., 2019). Nove studi condotti a livello di mercato (sui prodotti a base di carne di suino come fegatini crudi, salsicce, figatelli e patè) volti alla ricerca di prodotti suini contaminati da HEV, hanno rivelato una prevalenza che variava da meno dell'1% a più del 50% a seconda del paese e del prodotto analizzato. Come prevedibile, le prevalenze più alte sono state osservate nei prodotti a base di fegato crudo (Salines et al., 2017).

Il consumo di prodotti a base di carne di maiale è stato identificato come fattore di rischio per l'infezione da HEV anche nel Regno Unito. Per avvalorare questa ipotesi, è stato eseguito uno studio caso-controllo nel 2014, dato che il consumo di pasticci di maiale, prosciutto e salsicce acquistati da una grande catena di

supermercati inglesi erano associati all'infezione. Da questi episodi è, quindi, emersa una preoccupazione ulteriore nei confronti di prodotti ready to eat crudi o poco cotti e di prodotti trasformati a base di carne di suino (EFSA, 2017).

Animali selvatici

Nelle regioni a bassa endemia, sono segnalati casi sporadici di infezione da HEV localmente acquisiti, causati principalmente dai genotipi 3 o 4 probabilmente per trasmissione zoonotica da suini, cinghiali o cervi. In Giappone si è osservato che un gruppo di persone infette da HEV aveva consumato carne di cervo non adeguatamente cotta alcune settimane prima della comparsa della malattia. Le sequenze genomiche erano identiche a quelle isolate dalla carne congelata avanzata, confermandone la trasmissione per via alimentare. Gli stipti virali avevano un alto tasso di omologia (99,7%) con la sequenza genomica isolata da cinghiali e da un altro cervo cacciato nella stessa area in cui si trovava il cervo responsabile della trasmissione di HEV per via alimentare. Il dato ha suggerito che la circolazione virale interspecie tra cinghiali e cervi fosse possibile (Aggarwal, 2011).

Il primo caso di infezione acuta da HEV a seguito dell'ingestione di carne di capriolo è stata descritta nella Corea del Sud nel 2013 (EFSA, 2017).

Country	Year	Gt	Number of human cases	Vehicle/source of infection	Source unpublished	Reference
Austria	2015		2	Not identified	ECDC MS survey	
Czech Republic	2011		36	Tripe sausages made in farm and selling in butcher shop	ECDC MS survey	
Czech Republic	2009		1	Undercooked pork meat		Holub et al. (2008)
Czech Republic	2009–2011		2 outbreaks 13 and 8 cases	Unknown, transmission through consumption of pork and pork products at pig-slaughtering feasts assumed		Trmal et al. (2012)
Czech Republic	2009–2012		27 case reports	Possible factors (cases): pork meat (3), butcher, home pig slaughter (3), excessive pork intake, minced meat/liver sausage, brawn, liver sausage (3), raw pork meat, grilled pork meat, contact with HEV (2), greaves, minced meat, precooked sausage, home-made sausage, wild boar goulash, sausage		Chalupa et al. (2014)
France	2007		3	Raw figatelli	ECDC MS survey	
France	2009		1	Raw figatelli	ECDC MS survey	
France	2010		2	Raw figatelli		Renou et al. (2011)
France	2011		7	Unknown	ECDC MS survey	
France	2011		1	Probably raw figatelli		Anty et al. (2012)
France	2012		4	Unknown	ECDC MS survey	
France	2013		2	Unknown	ECDC MS survey	
France	2013	3	17	Undercooked pig liver-based stuffing in spit-roasted piglet	ECDC MS survey	Guillois et al. (2016)
France	2015		7	Private well connected to public water supply	ECDC MS survey	
France	2007		2	Likely dried pig meat		Deest et al. (2007)
France	2014	3	1	Likely raw pig liver sausage (figatelli)		Doudier et al. (2015)
France	2011–2012	4	4	Raw pork liver sausage, not thoroughly cooked pig meat		Colson et al. (2012), Tesse et al. (2012)
France	2011	3	1	Raw pig liver sausage (figatelli)		Moal et al. (2012)
France	2013	3	2	Raw pig liver sausage (figatelli)*		Renou et al. (2014a)
France	2007–2009	3	7	Raw pig liver sausage (figatelli)		Colson et al. (2010)
Germany	2006		2	Unknown	ECDC MS survey	
Germany	2008		2	Unknown	ECDC MS survey	
Germany	2009		2	Unknown	ECDC MS survey	
Germany	2011		2 outbreaks 4 cases	Unknown	ECDC MS survey	
Germany	2012		3 outbreaks 6 cases	Unknown	ECDC MS survey	

Country	Year	Gt	Number of human cases	Vehicle/source of infection	Source unpublished	Reference
Germany	2013		2 outbreaks 4 cases	Unknown	ECDC MS survey	
Germany	2014		3 outbreaks 8 cases	Unknown	ECDC MS survey	
Germany	2015		6 outbreaks 14 cases	Unknown	ECDC MS survey	
Hungary	2012		2	Unknown	ECDC MS survey	
Hungary	2014		2 outbreaks 4 cases	Unknown	ECDC MS survey	
Hungary	2015		2	Unknown	ECDC MS survey	
Hungary	2004	3	1	Home-prepared pork sausage		Reuter et al. (2006)
Italy	2011	3	1	Likely figatelli from France*		Garbuglia et al. (2015)
Italy	2011	4	5	Unknown		Garbuglia et al. (2013)
Spain	2014	3	1	Pork meat*		Riveiro-Barciela et al. (2015)
Spain	2015	3f	8	Wild boar meat*		Rivero-Juarez et al., (2017)
UK	2008		33	Shellfish		Said et al. (2009)

HEV: hepatitis E virus; ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control; MS: Member State.

*: Molecular confirmation of the source/vehicle.

Unknown: epidemiological link between cases evident, no food item identified.

Tabella 4: Focolai d'infezione da HEV alimentare o di origine sconosciuta nei paesi dell'Unione Europea dal 2005 al 2015 (EFSA, 2017)

È stato dimostrato che il virus viene completamente inattivato quando i fegati di suino sono sottoposti a bollitura a 100°C o a cottura a 71°C per 20 minuti (Meng, 2011; Horvatits et al., 2019; Raji et al., 2022). Al contrario, l'incubazione dell'omogenato di fegato a 56°C per un'ora (temperatura equivalente a condizioni di cottura media-al sangue) non inattiva il virus, a dimostrazione che il consumo di carne di maiale cruda o poco cotta si associ al rischio d'infezione da HEV. Lo stesso problema riguarda il consumo di carne di selvaggina (Meng, 2011).

La resistenza al calore di HEV è variabile a seconda del genotipo, del sottotipo e della matrice esaminata (carne fresca, salsicce, molluschi). Inoltre, le particelle virali possono presentarsi "senza envelope" o "quasi-envelope" e questo influisce sulla loro stabilità. Le condizioni per il trattamento termico andrebbero convalidate per essere inserite nelle indicazioni commerciali, quali ad esempio quelle reperibili in etichetta (EFSA, 2017).

La persistenza di HEV nel fegato e nei prodotti a base di carne lavorata, non sottoposti a cottura ma a processi tecnologici diversi, quali stagionatura, affumicatura, essiccazione, fermentazione è ancora sconosciuta (EFSA, 2017).

Il sangue di animali viremici potrebbe rappresentare una potenziale fonte di infezione da HEV se utilizzato a fini alimentari (ad esempio, il sanguinaccio) in prodotti non adeguatamente cotti. Altri derivati del sangue, come il fibrinogeno, vengono sempre più utilizzati come ingredienti in prodotti alimentari, così come negli integratori, rappresentando un potenziale rischio per la trasmissione di HEV, se non adeguatamente trattati termicamente (EFSA, 2017).

Il latte, come possibile fonte di trasmissione dell'infezione da HEV, è stato recentemente preso in considerazione; si descrive, infatti, il caso di un paziente che consumava regolarmente il latte proveniente da un cammello infetto in Medio Oriente (Lee et al., 2016). Non sono disponibili, tuttavia, informazioni sulla presenza del virus nel latte di cammello. È stato rilevato, invece, HEV4 infettante in campioni di latte di 52 vacche infette in Cina (EFSA, 2017; Spahr et al., 2018). In un altro studio ancora, condotto in Germania nel 2008, non è stato rilevato nessun campione di latte bovino positivo ad HEV (su 400 campioni di latte prelevati da animali di cui non si conosceva lo stato sanitario nei confronti del virus). Questa differenza tra il rilevamento di positività nel latte in Cina e Germania è probabilmente dovuta anche alle modalità di gestione degli animali; in Cina, infatti, gli animali vengono allevati in zone rurali dove entrano a contatto con altre specie, mentre in Germania gli allevamenti sono industrializzati e i bovini non hanno generalmente contatto con altri animali (EFSA, 2017).

Per quanto riguarda il rilevamento di HEV negli alimenti, è necessario lo sviluppo di metodi di coltura cellulare in quanto, ad oggi, pochi dati disponibili non sono stati ottenuti seguendo un metodo standardizzato o validato (EFSA, 2017).

Il rilevamento di RNA virale all'interno di un fegato infetto non attesta la vitalità del virus stesso; per ottenere questa informazione sarebbe necessario effettuare la coltivazione in vitro. Tuttavia, anche se non si valuta la capacità infettante di HEV,

è importante stimarne la carica virale; ad esempio nel fegato, in quanto sito principale di replicazione del virus, poiché si tratta di un organo utilizzato per produrre specialità gastronomiche regionali che possono essere consumate crude (Pavio et al., 2015).

Matrici animali per il campionamento

Per il rilevamento di RNA virale, negli studi condotti sugli animali, sono state utilizzate come matrici soprattutto il tessuto muscolare, il fegato e l'intestino, nonostante sia stato dimostrato come nell'intestino la carica virale sia significativamente più bassa che nel fegato. Anche per quanto riguarda il tessuto muscolare del cinghiale è stato osservato che esso presenta una carica virale circa di 4 logaritmi inferiore a quella riscontrata nel fegato dello stesso animale (Anheyer-Behmenburg et al., 2017; Di Pasquale et al., 2019). EFSA (European Food Safety Authority) riporta che l'RNA del virus può essere rilevato anche all'interno dei linfonodi (EFSA, 2017). Per la ricerca di anticorpi anti-HEV, normalmente si utilizza il sangue e non altre matrici, come ad esempio il "meat juice". (Di Pasquale et al., 2019).

Pochi articoli riportano il rilevamento di HEV-RNA nella carne (e quindi nel muscolo dell'animale). Il ritrovamento del genoma virale si è verificato in 1/22 cinghiali nella Germania centrale, in 2/39 cervi cacciati nei Paesi Bassi, in 1/40 suini in Repubblica Ceca e in 2/33 suini italiani. In Thailandia, lo 0,36% dei campioni di carne fresca di maiale in vendita al dettaglio era positivo alla ricerca di HEV. Il carico di RNA virale è, tuttavia, inferiore nei campioni muscolari rispetto ai campioni di fegato (EFSA, 2017).

Molluschi bivalvi

Negli ultimi anni sta assumendo particolare rilievo anche la via d'infezione rappresentata dal consumo di molluschi bivalvi (cozze, telline e ostriche) coltivati in acque contaminate. La trasmissione all'uomo di HEV tramite il consumo di frutti di mare, tuttavia, non è ancora stata dimostrata, in quanto le sequenze del virus

isolato dai molluschi non sono state individuate nelle persone infette da HEV che hanno dichiarato di averli consumati. Ciò nonostante, il consumo di molluschi è stato epidemiologicamente collegato ad un caso di infezione da HEV4 in un paziente giapponese che dichiarò di averli consumati in Vietnam e ad un focolaio che ha coinvolto 33 persone a bordo di una nave da crociera (EFSA, 2017).

HEV, in quanto patogeno enterico sia per l'uomo che per gli animali, viene eliminato con le feci e quindi può essere ritrovato nelle acque reflue e nelle acque delle zone costiere. I molluschi bivalvi, filtrando l'acqua nella quale sono immersi, accumulano il virus a livello di epato-pancreas. Il materiale genomico di HEV3 e HEV4 è stato rinvenuto in ostriche e cozze in: Galizia (Spagna) (14,81% dei campioni) nel 2016, nei Paesi Bassi (4%) nel 2014, Corea (8,7%) nel 2010, Giappone (6,25%) nel 2007 e Cina (17,5%). Un'alta prevalenza è stata osservata in 48 cozze raccolte in Scozia (2012): una delle aree di raccolta era sita nelle vicinanze di uno scarico fognario in linea con un impianto di lavorazione di carni suine, che ha rappresentato un potenziale fattore di contaminazione. Uno studio condotto in Spagna, Grecia e Finlandia nel 2012, ha riportato il 6% di positività ad HEV in campioni di cozze spagnole e nessuna positività nel resto dei campioni. Studi sperimentali di bioaccumulo, insieme ad un'indagine condotta utilizzando le cozze come biomonitor, hanno dimostrato che ostriche, cozze e vongole possono concentrare HEV. Nonostante questi risultati, diversi studi non hanno rilevato alcuna positività per HEV nei molluschi bivalvi analizzati, e saranno quindi necessarie ulteriori indagini per capirne la valenza epidemiologica (EFSA, 2017).

4. Epatite E: patologia e aspetti clinici

Sintomatologia

L'epatite E è una malattia sistemica che colpisce prevalentemente il fegato ed è causata dall'infezione da HEV (Alfonsi et al., 2018). Nella maggior parte dei casi (>70%) la malattia decorre in forma asintomatica ed è autolimitante (Lapa et al., 2015; EFSA, 2017), ed è di lieve o modesta entità, eccetto che nelle donne in gravidanza, in cui la mortalità può raggiungere il 20% (Caprioli et al., 2005), e nei pazienti immunocompromessi nei quali può cronicizzare. Nei pazienti con epatite pregressa cronica, la malattia può manifestarsi clinicamente e non essere autolimitante. L'infezione da HEV, quindi, può causare manifestazioni cliniche di varia entità: epatite acuta e autolimitante, malattia epatica acuta su cronica, epatite cronica, cirrosi e insufficienza epatica (Aslan, 2020). La clearance virale si osserva solitamente entro 1-5 settimane (EFSA, 2017). L'infezione acuta da HEV è descritta come forma di epatite che si risolve entro i primi sei mesi post-infezione, mentre nell'infezione cronica la persistenza di HEV-RNA si protrae per più di sei mesi. Quest'ultima forma di epatite può portare a cirrosi. La mortalità varia tra lo 0,1% e il 3% (Lapa et al., 2015).

I sintomi iniziali dell'epatite acuta sono in genere aspecifici e includono mialgia simil-influenzale, artralgia, debolezza ed emesi. Alcuni pazienti possono presentare febbre, vomito, nausea, anoressia, dolore addominale e ittero accompagnato da bilirubinemia elevata e rialzo delle transaminasi sieriche (Lapa et al., 2015). Casi di epatite E acuta causata da HEV3 si verificano principalmente nei soggetti di sesso maschile adulti o anziani, mentre casi di epatite cronica si osservano soprattutto in individui immunocompromessi (Adlhocha et al., 2016). Il 20-50% delle persone sottoposte a trapianto d'organo che entrano in contatto con HEV, sviluppano epatite cronica. L'epatite E cronica, segnalata solo in soggetti infettati dai genotipi 3 e 4, porta a cambiamenti strutturali nel fegato, comprese alterazioni istopatologiche quali noduli, rimodellamento fibrotico e successiva cirrosi (Horvatits et al., 2019). Come nelle altre epatiti virali, possono verificarsi manifestazioni extraepatiche. Tra queste vi sono i disturbi ematologici, renali e

neurologici (EFSA, 2017; Aslan, 2020) e in Cina è stata frequentemente segnalata la sindrome di Guillan-Barrè (neuropatia infiammatoria) associata a infezione acuta da HEV (Lapa et al., 2015). Altri sintomi neurologici riportati in letteratura comprendono l'amiotrofia nevralgica (malattia del sistema nervoso periferico che colpisce il plesso brachiocefalico causando dolore, debolezza e ipoestesia ad una o entrambe le spalle), la miastenia e la meningoencefalite (Adlhocha et al., 2016; Horvatits et al., 2019). Tuttavia, uno studio cinese eseguito in un'area endemica per HEV4 ha riscontrato IgM nello 0,54% dei pazienti neurologici e nello 0,68% dei controlli sani. Tutti i pazienti positivi per IgM sono risultati negativi alla PCR. L'associazione tra HEV e disturbi neurologici sembra quindi essere una caratteristica delle infezioni da genotipo 3 ma non da genotipo 4 (Horvatits et al., 2019).

Il periodo d'incubazione va dalle 2 alle 10 settimane, con una media di 5- 6 settimane. L'infezione sintomatica è più comune nei soggetti tra i 15 e i 40 anni, mentre nei bambini è asintomatica e anitterica (Zoodiac, 2020).

A differenza delle varianti tropicali (genotipo 1 e 2), le infezioni da HEV nei paesi industrializzati (causate dai genotipi 3 e 4) sembrano causare un decorso meno grave della malattia, nonostante possano indurre insufficienza epatica acuta o acuta su cronica in uomini anziani o con malattie epatiche sottostanti. La diagnosi differenziale di insufficienza epatica acuta da HEV deve essere esclusa in pazienti con sospetto di danno epatico indotto da farmaci o con sospetta epatite autoimmune. Le caratteristiche tipiche di insufficienza epatica acuta su cronica includono un deterioramento acuto della funzionalità epatica con complicanze cliniche di scompenso epatico quali insorgenza o peggioramento dell'ascite, encefalopatia epatica e coagulopatia epatica. E', inoltre, associata a tassi di mortalità più elevati. Le infezioni da HEV1 e HEV2, invece, possono causare insufficienza epatica acuta anche in soggetti sani, senza alcuna patologia epatica sottostante (Horvatits et al., 2019).

Le infezioni da HEV in donne in gravidanza possono portare a gravi complicanze come eclampsia gravidica, emorragie, aborto, parto prematuro, insufficienza

epatica acuta o, addirittura, alla morte nel 20% dei casi. Complessivamente le infezioni da HEV causano fino a 70.000 decessi tra le donne gravide e 3.000 nati morti all'anno nelle regioni tropicali (genotipo 1 e 2). Le cause del decorso della patologia non sono ancora del tutto chiare. Sembrano essere coinvolti fattori ormonali, immunologici, ma anche genetici. È stato anche dimostrato che HEV è in grado di replicare nella placenta umana. Sfortunatamente non esiste alcuna terapia specifica per le donne in gravidanza affette da epatite E acuta, ma è attualmente sottoposto a studio un vaccino cinese. In contrasto con questi dati, non sono stati riscontrati frequentemente casi di epatite E acuta da HEV3 o HEV4 in donne in gravidanza (Horvatits et al., 2019).

Diagnosi

Ad oggi, la diagnosi dell'infezione da HEV è principalmente effettuata mediante PCR qualitativa o quantitativa. I metodi di estrazione del materiale genetico e i protocolli di rilevamento delle positività variano a seconda del laboratorio d'analisi. Per quanto riguarda la diagnosi di HEV, non è stato ancora definito nessun metodo "gold standard" e persino la scelta dei primer utilizzati nella Real Time PCR variano a seconda del laboratorio, comportando difficoltà nel confrontare i risultati dei vari studi (Spancerniene et al., 2018).

Nei casi acuti di infezione, l'approccio diagnostico di prima istanza avviene tramite la sierologia e la conferma di positività si ha in caso di rilevamento di anticorpi specifici, ovvero di IgM anti HEV. Per la diagnostica di seconda istanza si procede con la tipizzazione molecolare tramite Real Time PCR su un campione di feci (Zoodiac, 2020). Gli anticorpi specifici per HEV sono rilevabili per molto più tempo nelle matrici animali rispetto all'RNA virale. Nell'uomo le IgM sono rilevabili nel sangue per mesi e le IgG per anni, mentre il virus (viremia) per 1-2 settimane. Nelle feci, invece, il virus è rilevabile per 3-4 settimane (Rutjes et al., 2010; Salines et al., 2017).

Per stabilire l'infettività dei virioni di HEV (anche per quanto riguarda l'analisi di campioni alimentari) possono essere utilizzati modelli di inoculazione del virus nei

suini e nelle scimmie. Tuttavia vi sono dei limiti: la concentrazione del virus da inoculare rimane sconosciuta, il potenziale di replicazione del campione è limitato, incombe il problema etico legato alla sperimentazione animale e sono necessari grandi quantità di tempo e denaro per arrivare alla conclusione di tali studi (EFSA, 2017).

Terapia

Attualmente sta crescendo l'evidenza che la risposta cellulo-mediata (cellule T specifiche) contribuisca al controllo dell'infezione da HEV. Non ci sono farmaci specifici approvati per l'uso nei pazienti infetti da HEV ma nella stragrande maggioranza dei casi l'epatite E acuta è una malattia autolimitante che non richiede alcun trattamento. Tuttavia, nei casi in cui la sintomatologia si manifesti e si renda necessario un trattamento terapeutico, la ribavirina si è rivelata efficace nel trattamento di alcuni casi acuti. Le opzioni terapeutiche per l'epatite E cronica includono la riduzione dei farmaci immunosoppressori (nel caso vi fosse una terapia in atto, per esempio, nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato) in modo da migliorare lo stato immunitario del paziente, la somministrazione di interferone alfa o il trattamento con ribavirina. Quest'ultima è controindicata nelle donne in gravidanza in quanto teratogena. La riduzione della terapia immunosoppressiva nei pazienti sottoposti a trapianto di cuore, polmoni o reni, non è ipotizzabile senza tenere conto dei possibili rischi per il paziente (Horvatits et al., 2019).

Sebbene ribavirina e interferone-alfa siano gli agenti più utilizzati per il trattamento delle infezioni da HEV, presentano alcune controindicazioni: l'interferone-alfa non può essere impiegato nella maggior parte dei pazienti sottoposti a trapianto d'organo, mentre l'uso della ribavirina è controindicato, oltre che nelle donne in gravidanza, nei pazienti infetti da HEV resistente alla ribavirina (Aslan, 2020).

Sieroprevalenza

Come è noto, gli anticorpi anti-HEV testimoniano una precedente esposizione al virus dell'epatite E. I test per il rilevamento di IgG anti-HEV, basati sulla metodica

ELISA, hanno tassi di sensibilità e specificità variabili, rendendo necessaria la messa a disposizione di test migliori. Inoltre, la durata della persistenza anticorpale negli animali è ancora poco chiara (Aggarwal, 2011).

Uno studio condotto in allevamenti suini spagnoli riporta che le IgM sono state rilevate per la prima volta a 7 settimane post-infezione in cinque allevamenti, mentre in un altro allevamento sono state rilevate a 13 settimane. Le IgG sono state rilevate per la prima volta tra le 13 e le 18 settimane. All'età di macellazione (26 settimane circa) le IgG sono state riscontrate nel 50-100% dei suini di cinque allevamenti su sei analizzati. Si è anche osservato che la presenza di anticorpi materni sembra tardare la sieroconversione nei suinetti e le IgG acquisite passivamente sono state riscontrate nei suinetti fino a 9 settimane d'età (Salines et al., 2017).

I dati forniti dal SEIEVA mostrano che circa l'80% dei casi di epatite E segnalati in Italia nel 2017 erano autoctoni. Inoltre, un recente studio retrospettivo svolto a livello nazionale sui donatori di sangue ha rilevato che il tasso medio di sieroprevalenza (IgG anti HEV) è dello 8,7% e ha messo in evidenza, ancora una volta, la variazione di questo tasso a seconda della regione geografica. Le aree dell'Italia centrale presentano valori di sieroprevalenza superiori al 25% e ciò potrebbe essere dovuto alle abitudini alimentari locali e alla contaminazione ambientale da HEV (Di Pasquale et al., 2019). La sieroprevalenza più elevata nelle regioni del Centro Italia (Abruzzo, Lazio, Campania e Calabria) può essere anche dovuta al consumo di prodotti tipici a base di cinghiale, quali salsicce non sottoposte a lunga stagionatura (Lorusso et al., 2022).

Inoltre, a completamento della tematica affrontata, va sottolineato come la mancanza di test diagnostici standardizzati e le prestazioni variabili dei test rilevanti IgM e IgG anti-HEV potrebbero aver influenzato i referti analitici. Questi aspetti dovranno essere sicuramente presi in considerazione per l'istituzione di una sorveglianza regolare nazionale delle infezioni acute da HEV. Tuttavia, il test di ELISA per la ricerca di IgM anti-HEV si è dimostrato un buon metodo di screening ai fini della sorveglianza (Alfonsi et al., 2018).

5. Epatite E nel mondo

Nonostante i dati allarmanti, la grande diffusione della patologia a livello mondiale e il costante aumento di casi, la consapevolezza della potenziale gravità della malattia e della sua diffusione sono ancora piuttosto limitate. Il controllo routinario a livello ospedaliero è scarsamente condotto e per questo l'epatite E rimane una patologia sottodiagnosticata (Raji et al., 2022). Il vero peso della malattia è sconosciuto perché in gran parte dei casi si tratta di una forma asintomatica e autolimitante ma si ritiene, da studi sulla sieroprevalenza, che un terzo della popolazione mondiale sia stata infettata da HEV (Scotto et al., 2013). Da stime recenti, si ipotizza che ogni anno 20 milioni di persone possano acquisire l'infezione da HEV (Alfonsi et al., 2018) con 3,4 milioni di casi sintomatici, 70.000 casi fatali e 3.000 casi di natimortalità (Lapa et al., 2015). In base alla sieroprevalenza, il numero complessivo di individui che hanno contratto l'infezione a livello mondiale è stimato attorno ai 2,3 miliardi. Casi di HEV si riscontrano sia in paesi in via di sviluppo, come in aree endemiche dell'Asia e dell'Africa, che in paesi industrializzati che presentano alti tassi di sieroprevalenza. Si ritiene quindi che l'epatite E si sia evoluta da malattia confinata a determinate aree, enterica e autolimitante, a malattia globale, multifattoriale e cronica (Raji et al., 2022).

La distribuzione globale dell'HEV ha modelli epidemiologici distinti basati soprattutto su fattori socioeconomici. Nei paesi in via di sviluppo (Sud-Est asiatico, Medio Oriente, parte dell'Africa e dell'America centro-meridionale) l'epatite E si presenta come malattia endemica con focolai epidemici trasmessi dall'acqua (con pochi casi di trasmissione attraverso il contatto persona-persona). Al contrario, nei paesi industrializzati, la malattia era tradizionalmente considerata conseguente a viaggi nei paesi a rischio. Oggi, tuttavia, la percezione nei paesi industrializzati è cambiata ed il numero di casi autoctoni è aumentato. Attualmente HEV è endemico nei paesi della UE/EEA (Area Economica Europea) e le infezioni autoctone sono causate prevalentemente dal genotipo HEV3 (Alfonsi et al., 2018); di conseguenza, in Europa la principale via d'infezione sembra essere quella zoonotica, a differenza di quanto avviene nei paesi asiatici e africani.

Ogni genotipo di HEV sembra avere una distribuzione geografica specifica. Il genotipo 1 è stato isolato da casi di epatite E dell'uomo in alcune parti dell'Asia e dell'Africa, dove la malattia è altamente endemica e da viaggiatori di ritorno da queste aree. Sequenze del genotipo 2, riportate per la prima volta da un focolaio in Messico, sono stati successivamente segnalati in Africa occidentale. Il genotipo 3, identificato per la prima volta in rari casi di malattia acquisita negli Stati Uniti, è stato successivamente rilevato in diversi paesi europei (Regno Unito, Francia, Paesi Bassi, Spagna, Austria, Grecia, Italia), Giappone, Australia, Nuova Zelanda, Corea e Argentina. Questo genotipo mostra solo il 74-75% di omologia con gli isolati dei genotipi 1 e 2 ed è attualmente presente in tutto il mondo. Il genotipo 4 è stato riscontrato in casi di epatite acuta in Cina, Taiwan, Giappone e Vietnam (Aggarwal, 2011; Horvatits et al., 2019). Tutti i genotipi condividono almeno un importante epitopo cross-reattivo sierologicamente ed appartengono ad un singolo sierotipo (Aggarwal, 2011).

I genotipi HEV 3 e 4 sembrano essere meno patogeni per l'uomo rispetto ai genotipi 1 e 2. Da sottolineare, comunque, che il genotipo 4 sembra essere associato a danni epatici più gravi rispetto al virus appartenente al genotipo 3 (Aggarwal, 2011).

Oltre ai genotipi 1, 2, 3 e 4, un nuovo HEV potenzialmente patogeno per l'uomo è stato descritto di recente. Si tratta di HEV7, che sembra essere ampiamente distribuito tra i dromedari (*Camelus dromedarius*) in Medio Oriente. Il virus è stato isolato in un paziente immunocompromesso, poiché sottoposto a trapianto d'organo, che consumava regolarmente latte e carne di dromedario. Ulteriori studi saranno necessari per stabilirne il potenziale zoonosico (Spahr et al., 2018).

La situazione in Europa

Nell'ultimo decennio, si sono verificati più di 21.000 casi di infezione umana da HEV e si sono registrati 28 decessi. La principale via di trasmissione è quella zoonotica, in particolare la via alimentare dovuta al consumo di carne cruda o poco cotta o prodotti a base di carne non sottoposti a trattamento termico (come,

ad esempio, salsicce e salami poco stagionati). In Europa i casi umani sono principalmente associati a HEV3 che è il genotipo predominante negli animali le cui carni sono utilizzate a scopo alimentare (suini, cinghiali, cervi) (Lorusso et al., 2022; EFSA, 2017).

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) ha condotto uno studio della durata di dieci anni (2005-2015) nel quale ha raccolto dati sui casi di epatite E in ventidue paesi europei. A partire dal primo anno dello studio (2005) il numero di infezioni è stato in costante crescita (Figura 13) e tra il 2011 e il 2015 i casi sono più che triplicati. La maggior parte delle infezioni era acquisita localmente e riguardava soprattutto le persone di sesso maschile e con età superiore ai 50 anni. Il maggior numero di casi confermati (più del 75%) è stato segnalato da Germania, Francia e Regno Unito. È possibile che, in tali paesi, una maggiore consapevolezza della malattia abbia contribuito all'aumento dei test diagnostici e della notifica dei casi (ECDC, 2017).

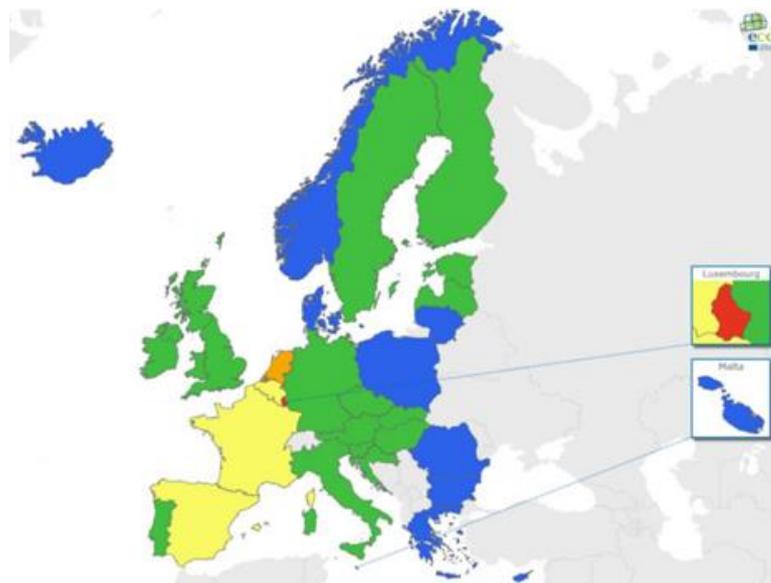
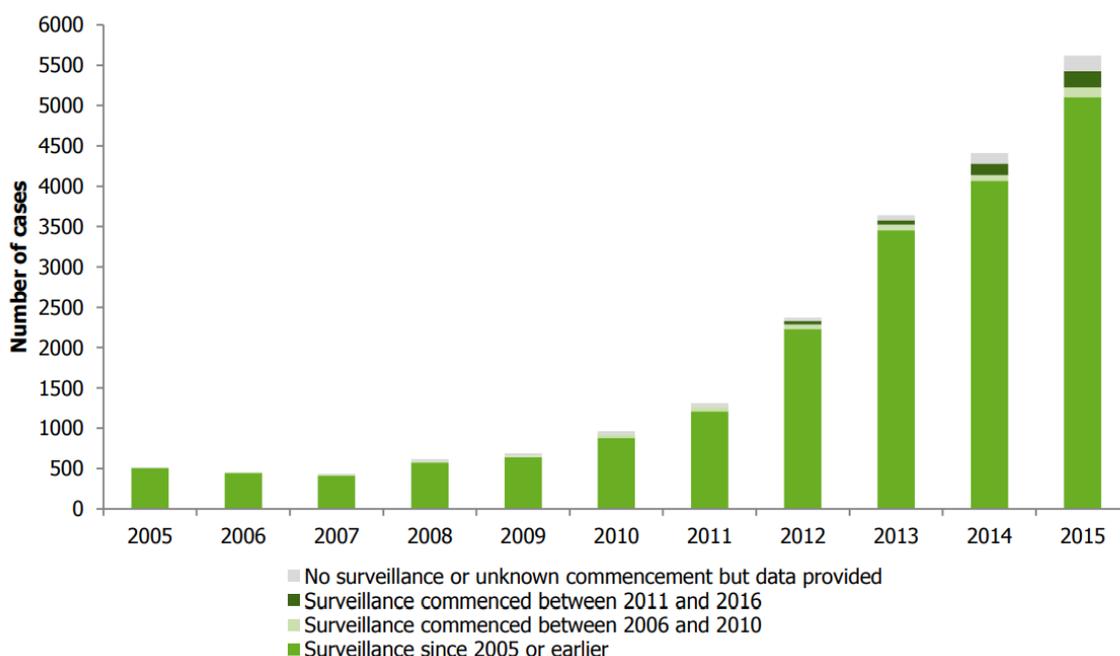


Figura 12: Modalità di sorveglianza condotta nei paesi membri dell'UE/EEA: in verde i paesi che dispongono di un sistema di sorveglianza nazionale, in arancione i paesi con sistema di sorveglianza sentinella, in giallo i paesi che dispongono di laboratori di riferimento che attuano sorveglianza, in rosso i paesi che dispongono di una sorveglianza tramite controllo sanguigno e in blu i paesi che non dispongono di alcun sistema di sorveglianza (ECDC, 2017)



* Data available for: Austria, Belgium, Bulgaria, Croatia, Cyprus, Czech Republic, Estonia, Finland, France, Germany, Hungary, Italy, Latvia, the Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, and the United Kingdom.

Figura 13: Numero dei casi confermati di epatite E per anno nei paesi membri dell'UE/EEA, 2005-2015 (ECDC, 2017)

I risultati dell'indagine hanno mostrato un quadro eterogeneo per quanto riguarda la sorveglianza di HEV in Europa (Figura 12), con oltre la metà degli stati membri che dispone di sistemi appositi, una piccola percentuale di paesi con sistemi più recenti o in evoluzione e circa un terzo senza alcuna sorveglianza specifica per HEV (ECDC, 2017).

In uno studio europeo, condotto nel 2014-2015, non è stata osservata l'elevata mortalità nelle donne in gravidanza, come invece riporta la letteratura, mentre un tasso di mortalità molto elevato (27%) è invece stato riscontrato in pazienti con sottostante malattia epatica cronica. Francia, Germania, Inghilterra, Galles e Paesi Bassi hanno riportato un maggior numero di casi di epatite E rispetto ai casi di epatite A. Un numero di casi di infezione da HEV considerevolmente più basso è stato invece riportato dai paesi del Nord e del Sud Europa, probabilmente dovuto all'impiego di differenti metodiche diagnostiche, ad una minor consapevolezza del problema e ad un diverso sistema di sorveglianza. Nell'Unione Europea, le infezioni da HEV sono prevalentemente autoctone e appartengono in maggior

misura al genotipo 3 (il più diffuso tra uomo ed animali nel nostro continente). In Inghilterra e Galles, tra il 2003 e il 2009 il virus maggiormente isolato nell'uomo era HEV3 sottotipo e, f, g, mentre tra il 2010 e il 2013 ha predominato HEV3 sottotipo c. In contrasto, nel 2013, dai suini in Inghilterra si isolava HEV3 sottotipo e, f, g. In Italia e Francia è stato anche riscontrato un numero molto ridotto di casi autoctoni umani causati da HEV4 (Adlhoch et al., 2016).

Anche i dati sulla sieroprevalenza nei paesi europei hanno mostrato una forte eterogeneità, probabilmente dovuta a differenze nelle metodiche di laboratorio e nella popolazione sottoposta ad analisi. Lo studio ha confermato una tendenza annuale all'aumento delle infezioni umane da HEV nell'Europa dell'Ovest, in accordo con un concomitante aumento di casi di infezione da HEV tra i donatori di sangue in Inghilterra e Paesi Bassi. L'aumento dei casi potrebbe anche essere dovuto ad un miglioramento del sistema di sorveglianza messo in atto negli ultimi anni in questi paesi, essendo aumentate le conoscenze nella categoria medica del "problema HEV" come causa di epatite acuta emergente (Adlhoch et al., 2016).

Nonostante la tendenza al miglioramento nei controlli messi in atto da alcuni paesi, l'infezione da HEV non è sottoposta a sorveglianza obbligatoria nell'Unione Europea. I sistemi di segnalazione, le definizioni di "caso" e le popolazioni poste sotto sorveglianza sono soggetti alle politiche nazionali, variabili quindi da paese a paese. Il numero di casi confermati rappresenta solo la cosiddetta "punta dell'iceberg", con inevitabile sottostima della incidenza reale dell'infezione (Adlhoch et al., 2016). Venti paesi (Austria, Belgio, Croazia, Repubblica Ceca, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Ungheria, Irlanda, Italia, Lettonia, Lussemburgo, Paesi Bassi, Portogallo, Slovacchia, Slovenia, Spagna, Svezia e Inghilterra) dispongono di sistemi di sorveglianza per registrare il numero di casi di epatite E acuta, cronica e la mortalità, mentre dieci paesi (Bulgaria, Cipro, Danimarca, Grecia, Islanda, Lituania, Malta, Norvegia, Polonia, Romania) mettono in atto una sorveglianza che riguarda in generale tutti i casi di epatite virale. Inoltre, ventidue paesi (i venti paesi con sistemi di sorveglianza specifica ad eccezione di Irlanda e Lussemburgo e con l'aggiunta di Bulgaria, Cipro, Norvegia e Polonia) hanno fornito dati clinici sui casi confermati di HEV, in modo da

comprendere meglio l'epidemiologia e l'andamento della malattia (EFSA, 2017; ECDC, 2017).

Nel 2017 l'EFSA ha pubblicato un parere scientifico riguardante il rischio per la salute pubblica associato ad HEV; in particolare il documento ha preso in esame i metodi attuali per il rilevamento, l'identificazione e la tracciabilità di HEV e la possibile esistenza di ulteriori serbatoi del virus (umani, animali e ambientali) in modo da migliorare le informazioni sull'epidemiologia di HEV e individuare possibili misure di controllo lungo la catena alimentare, valutando anche l'impiego di efficaci metodi di decontaminazione (EFSA, 2017).

Nel 2019, in Germania, la sieroprevalenza nell'uomo si aggirava intorno al 30%. Tassi ancora superiori sono stati rilevati in Francia e nei Paesi Bassi. Nel 2018, l'Associazione Europea per lo Studio del Fegato (European Association for the Study of the Liver, EASL) ha pubblicato linee guida riguardanti l'epatite E (Horvatits et al., 2019).

La situazione in Italia

In Italia, l'epatite virale è una malattia soggetta a notifica. Tuttavia, il sistema di sorveglianza non raccoglie dati specificatamente sull'epatite E, ma piuttosto sull'epatite virale in generale. Dal 2007, la notifica di infezione acuta da HEV è stata inclusa nel sistema di sorveglianza esistente per il virus dell'epatite denominato SEIEVA (Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta) e guidato dall'Istituto Superiore di Sanità. Parallelamente è stata messa in atto una sorveglianza ambientale di HEV su campioni di acque reflue urbane raccolte su tutto il territorio italiano (Alfonsi et al., 2018). I dati del SEIEVA hanno permesso di osservare che dal 2007 è rimasto stabile il numero di casi associati a viaggi in zone endemiche, mentre è aumentato progressivamente il numero di casi autoctoni (Istituto Superiore di Sanità, 2019).

L'effettivo numero di casi di epatite E acuta diagnosticati e notificati al SEIEVA è relativamente basso e la sottostima dei casi è dovuta a diversi fattori di cui i

principali sono: il carattere spesso sub-clinico dell'infezione, la mancanza di indagini sierologiche specifiche per HEV in molti centri clinici (nel 2007-2010 solamente il 22,8% dei casi notificati di epatite acuta "non A", "non C" o "non classificate" è stato saggiato per la ricerca di IgM anti HEV), la mancanza di metodiche diagnostiche sierologiche standardizzate, l'assenza di un saggio commerciale per il rilevamento del genoma virale, necessario nei casi in cui la comparsa delle IgM nel siero non sia rilevabile. A questi fattori si aggiunge il fatto che le fonti di infezione e le modalità di trasmissione del virus non sono ancora ben definite (Istituto Superiore di Sanità, 2014).

Secondo un'indagine recente, in Italia, dal 2012 al 2016, su 5.057 casi di epatite virale notificati al SEIEVA, 456 (ovvero il 9%) erano possibili casi di epatite E (Figura 14). Di questi, in 293 (64,3%) pazienti sono stati ricercati gli anticorpi IgM anti-HEV, in se provenienti da aree altamente endemiche o con un recente soggiorno in queste ultime. Di fatto, 169 casi (3,3%) sui 5.057 notificati al SEIEVA sono stati attribuiti all'infezione da HEV. Poiché di 456 possibili casi di epatite E, ne sono stati testati solo 293, è stato calcolato che il tasso di incidenza nazionale dei casi confermati di epatite E potesse essere riconducibile ad almeno 0,72 casi ogni 1.000.000 di abitanti l'anno. A livello regionale è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra l'incidenza nelle Marche, che presenta 4,08 casi ogni 1.000.000 di casi confermati all'anno, rispetto al resto del paese. Lo studio analitico dei fattori di rischio è stato effettuato su 177 casi confermati di epatite E (i 169 casi attribuiti all'infezione da HEV tra il 2012 e 2016 con l'aggiunta di otto casi nel 2017). Di questi, 139 erano maschi con un rapporto maschi/femmine di 3,7:1; l'età media era 50 anni; nessun caso è stato segnalato tra i bambini. La maggioranza di casi notificati sono stati diagnosticati nel Nord e nel Centro Italia. (Alfonsi et al., 2018).

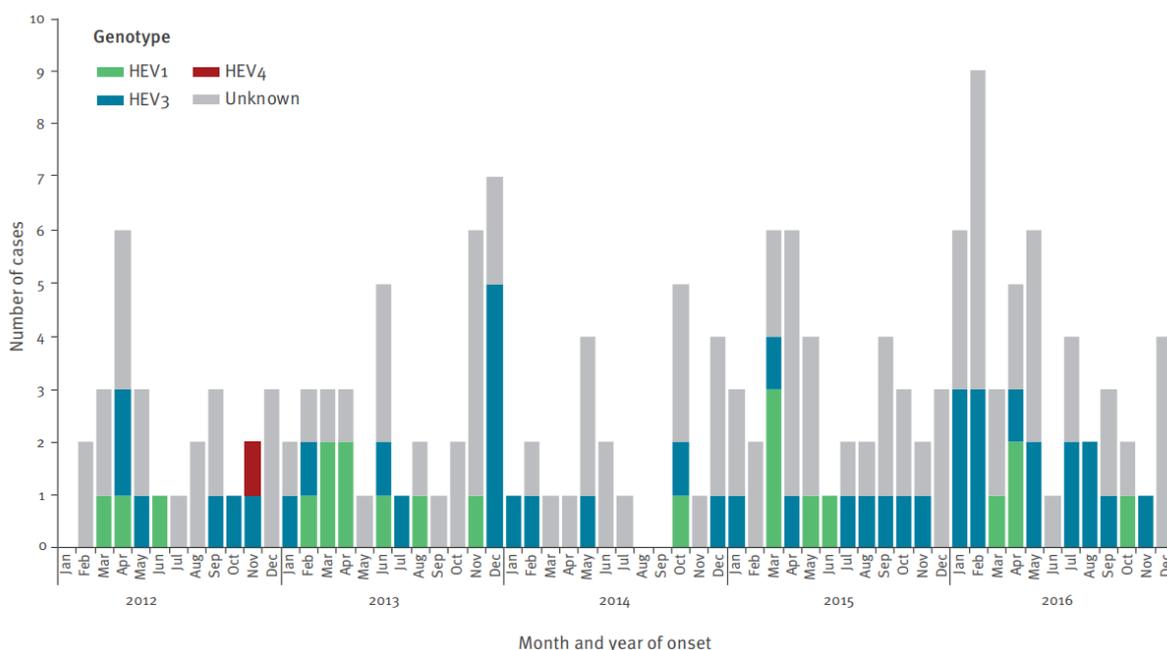


Figura 14: Distribuzione dei casi confermati di epatite E in Italia per mese ed anno, 2012-2016 (Alfonsi et al., 2018)

Risk factors	Hepatitis				p-value (univ.)	OR _{adj} ^a (95% CI)
	E (n = 177)		nonA-nonE (n = 124)			
	n	%	n	%		
Travel	61/163	37.4	32/116	27.6	0.086	NA
Shellfish consumption	64/135	47.4	35/82	42.7	0.498	NA
Raw (among shellfish consumers)	21/55	38.2	6/16	37.5	0.961	NA
Berries consumption	13/94	13.8	5/22	22.7	0.299	NA
Drinking well water	15/130	11.5	3/45	6.7	0.354	NA
Pork consumption	45/57	79.0	30/61	49.2	0.001	4.6 (1.3–16.1)
Undercooked sausages consumption	32/52	61.5	16/48	33.3	0.005	2.9 (1.1–7.6)

CI: confidence interval; NA: not applicable because not inserted in the model; OR_{adj}: adjusted odds ratio.
^aAdjusted for age, sex, nationality and the respective other listed factor.

Tabella 5: Confronto tra i fattori di rischio per i casi di epatite E e di epatite non A-non E (Alfonsi et al., 2018)

Il fattore di rischio più frequentemente riportato tra i casi confermati di epatite E è stato il consumo di carne di maiale poco cotta (79%) e di salsicce di maiale poco cotte (62%) (Tabella 5). In tutti i casi di HEV3 è stato segnalato uno, o entrambi, di questi fattori di rischio. Dei 135 casi confermati con informazioni disponibili, il 47% ha segnalato il consumo di molluschi e tutti tranne tre sono stati infettati da HEV3. Nonostante questi studi, l'importanza sanitaria della malattia in Italia rimane in

gran parte ancora sconosciuta. La inevitabile sottostima dell'incidenza delle infezioni da HEV nel territorio italiano, è sicuramente imputabile ai casi di infezioni asintomatiche o subcliniche non notificate. Questa ipotesi è supportata da studi che riportano una precedente sieroprevalenza del 1-10% (2002-2013) tramite il rilevamento di anticorpi IgG anti-HEV, mentre più recentemente (2014) è stata osservata una sieroprevalenza del 49% tra i donatori di sangue della regione Abruzzo. Nonostante la notevole eterogeneità riscontrata tra gli studi, attribuibile alla tipologia del test impiegato e alla posizione geografica, la sieroprevalenza suggerisce una circolazione più ampia del virus dell'epatite E rispetto a quanto visibile tramite la notifica dei casi clinici (Alfonsi et al., 2018; Istituto Superiore di Sanità, 2019).

L'eterogeneità geografica dei casi rilevati può essere dovuta a vari fattori, tra cui la diversa attenzione nei confronti della malattia tra il personale medico e la variabilità di risorse economiche destinate alla sanità dalle diverse regioni; inoltre, un sotto-accertamento potrebbe aver interessato le regioni con poca capacità diagnostica per HEV a livello ospedaliero, come supportato dai risultati della sorveglianza ambientale che, al contrario, non hanno mostrato differenze geografiche nella distribuzione di HEV nel territorio italiano (Alfonsi et al., 2018).

Per quanto riguarda la prevalenza di HEV negli animali, sia domestici che selvatici, la maggior parte dei dati italiani è circoscritta alle regioni centro-settentrionali, nelle quali il genotipo 3 è quello più rilevato con i corrispettivi sottotipi e ed f (De Massis et al., 2019).

In Italia la tipologia di carne più consumata è quella suina, con un consumo annuo pro capite stimato di 36,2 kg (dati riferibili al 2015). Oltre alla carne fresca da sottoporre a cottura, in diverse regioni italiane vengono proposti piatti tradizionali a base di carne suina cruda/poco cotta e a lavorazione casalinga. Le abitudini culinarie potrebbero, pertanto, spiegare in parte le differenze endemiche regionali della malattia. L'associazione tra carne suina (o di suidi, compreso il cinghiale) ed infezione umana è supportata dai dati di sieroprevalenza nei confronti di HEV nei suini domestici, indice di una circolazione attiva del virus (Alfonsi et al., 2018).

Per rafforzare la conoscenza dell'epatite E in Italia, nell'ambito del SEIEVA, nel 2018 è stata creata una scheda di sorveglianza specifica per i casi di infezione da HEV che, a seguito di un periodo pilota, dovrebbe essere adottata dal sistema di sorveglianza su tutto il territorio nazionale (Istituto Superiore di Sanità, 2019).

6. Prevenzione

Per prevenire l'epatite E nell'uomo è necessario eseguire un'attenta attività di monitoraggio sulla catena alimentare. Inoltre è necessario informare i consumatori sui rischi legati al consumo di carne cruda o poco cotta degli animali serbatoio d'infezione poiché la via di trasmissione alimentare rappresenta oggi la modalità d'infezione più frequente nei paesi industrializzati (Adlhocha et al., 2016). HEV, come molti altri virus, è sensibile ai trattamenti di disinfezione dell'acqua mediante clorazione (dai 3 ai 5 ppm di Cloro per 15 minuti sono necessari per ridurre la carica virale di 2 log₁₀) e all'irradiazione UV. Queste misure possono essere quindi utilizzate per ridurre la contaminazione crociata tramite il trattamento delle superfici a contatto con gli alimenti, la decontaminazione delle acque per l'irrigazione o per la depurazione di molluschi (EFSA, 2017).

Nel 2010, un vaccino ricombinante contro l'HEV è stato approvato per il suo utilizzo nell'uomo in Cina. Questo ha mostrato un'efficacia superiore al 90% nella prevenzione dell'epatite E acuta e sintomatica. Tuttavia, si è rivelato funzionante verso le infezioni da HEV1 e HEV4 ma il suo ruolo è ancora sconosciuto nei confronti degli altri genotipi, in particolare HEV3. Il vaccino si basa su una proteina codificata da ORF2 del genotipo HEV1 (Horvatits et al., 2019). Attualmente il suo utilizzo in altri paesi non è ancora stato approvato (EFSA, 2017). La proteina del capsido codificata da ORF2 è altamente immunogenica e gli anticorpi contro di essa hanno caratteristiche protettive e neutralizzanti, motivo per cui sembra essere un bersaglio adatto per lo sviluppo di vaccini contro HEV (Aslan, 2020).

La vaccinazione dei suini potrebbe rivelarsi un efficace metodo di contenimento della circolazione del virus dell'epatite E, anche se i suoi effetti come metodo di prevenzione dell'infezione nell'uomo necessitano ulteriori studi. Attualmente nessuna vaccinazione per gli animali è disponibile in commercio e studi sul possibile utilizzo del vaccino nei suini non sono stati finora pubblicati. Potrebbe rendersi utile lo sviluppo di un vaccino multivalente che combini diversi antigeni rilevanti per la salute dei suini, in modo da attuare la vaccinazione anche nei confronti di HEV. Tuttavia, sarebbe necessario un trend normativo e commerciale

che incoraggi la ricerca verso la protezione immunitaria dei suini nei confronti di questa zoonosi emergente (EFSA, 2017).

Un'altra importante misura preventiva sarebbe l'introduzione di HEV tra i virus ricercati nello screening sui donatori di sangue per evitare la trasmissione da uomo a uomo attraverso le trasfusioni (Raji et al., 2022).

Misure di controllo lungo la filiera alimentare

Gli alimenti possono essere contaminati da HEV in varie fasi della catena alimentare: in allevamento, durante la lavorazione o al punto vendita. Le metodiche di controllo differiscono a seconda dell'alimento in base al rischio di contaminazione. Le attuali misure di controllo per gli alimenti di origine animale fanno riferimento al Regolamento UE 2019/627. Il Regolamento CE 2073/2005, invece, stabilisce i criteri microbiologici per taluni microrganismi e le norme di attuazione che gli operatori del settore alimentare devono rispettare nell'applicazione delle misure di igiene generali e specifiche di cui all'articolo 4 del regolamento (CE) n. 852/2004. Non esistono ancora misure specifiche per i virus a trasmissione alimentare, compreso HEV (EFSA, 2017).

Per prevenire la diffusione di HEV all'interno degli allevamenti di suini (base della filiera alimentare), è necessario ridurre il livello di contaminazione fecale ambientale e quindi aumentare il livello di igiene, ridurre la densità e il tasso di sovraffollamento degli animali, adoperare corrette procedure di pulizia e disinfezione degli stabulari e delle attrezzature ed implementare le misure di biosicurezza (EFSA, 2017). I fattori di rischio correlati ad un'elevata sieroprevalenza di HEV in allevamento sono, quindi, principalmente correlati alle caratteristiche dell'azienda e alle pratiche di gestione della stessa. Alcuni fattori di rischio sono rappresentati da: dimensione delle aziende (rischio maggiore in quelle di piccole-medie dimensioni), tipologia di allevamento (rischio più alto per gli allevamenti biologici) e pratiche di allevamento (maggior rischio in caso di svezzamento tardivo, mescolanza di pratiche diverse durante l'allattamento e scarsa igiene). L'allevamento rurale o con accesso all'esterno è esposto ad un

rischio più elevato in quanto i suini potrebbero entrare a contatto con i cinghiali, reservoir per HEV. E' stata, inoltre, rilevata un'influenza stagionale in relazione alla prevalenza di HEV in allevamento, con un picco maggiore nei mesi di marzo-aprile e uno minore in settembre-ottobre. Le co-infezioni con altri virus immunosoppressivi, quali PRRS, potrebbero portare ad un'infezione cronica da HEV, il che aumenta il rischio di rilevamento del virus nei suini al momento della macellazione (Salines et al., 2017).

Altre misure efficaci da mettere in pratica a livello di allevamento sono: richiedere la doccia e fornire stivali o calzari ai visitatori, mettere in pratica efficaci norme di biosicurezza, non acquistare suini da ingrasso da più allevamenti. È stato dimostrato, da uno studio condotto in Francia e Spagna nel 2014, che la trasmissione dell'immunità materna passiva per HEV ai suinetti diminuisce di 13 volte l'efficienza della trasmissione del virus. Anche il colostro, quindi, contribuisce come fattore di prevenzione a livello di allevamento. Il tempo di copertura anticorpale variava da 2 a 3,5 mesi (EFSA, 2017).

Le attività di monitoraggio nella filiera suinicola servono per: acquisire dati riguardo la prevalenza di HEV e monitorarne i cambiamenti, indagare la dinamica dell'infezione e i fattori che la influenzano, impedire l'ingresso di carne contaminata nella catena alimentare. La qualifica di allevamento e/o di animali in relazione alla presenza di HEV è un fattore da prendere in considerazione (Salines et al., 2017), anche se il percorso normativo a livello europeo per imporre un monitoraggio in azienda è sicuramente lungo e complesso.

Le modalità di prevenzione dell'infezione da HEV nell'uomo, tramite il consumo di carne, seguono gli stessi principi adoperati per prevenire tutte le altre infezioni oro-fecali: prevenire l'introduzione di animali infetti, effettuare la produzione di carni suddivisa per lotti, effettuare una pulizia e una disinfezione efficace al passaggio da un lotto ad un altro, impedire il contatto con gli animali selvatici, gestire il flusso di suini per evitare l'infezione tardiva da HEV (ovvero nelle fasi finali della vita, in prossimità della macellazione) e scongiurare viremia, presenza del virus nel fegato e diffusione virale nell'ambiente al momento della macellazione (EFSA, 2017).

Al macello, per ridurre il rischio di infezione da HEV, è necessario evitare la contaminazione fecale delle carcasse. Vanno inoltre seguite le buone pratiche igieniche durante il trasporto e la stabulazione al macello, nonché durante la lavorazione delle carni e il loro stoccaggio. Poiché un'elevata carica virale può essere presente nelle feci, nella bile e nel fegato degli animali infetti, è bene che l'intestino, il fegato e la cistifellea vengano tenuti separati dal resto della carcassa per evitare il contatto diretto della carne (muscoli) e del grasso con le feci o la bile. Le attrezzature e gli utensili dedicati alla rimozione di questi organi, dovrebbero essere utilizzati solo per queste specifiche operazioni. È necessario, inoltre, formare gli operatori del macello riguardo l'infezione da HEV e fornire loro sistemi di protezione adeguati in quanto è dimostrato che essi sono esposti ad un rischio maggiore di contrarre l'infezione.

Per quanto riguarda gli animali selvatici, alcune raccomandazioni per ridurre il rischio di infezione da HEV nei cacciatori e in chi maneggia le loro carni sono l'utilizzo dei guanti, utilizzo di coltelli appositi per la lavorazione delle carni in modo da evitare una contaminazione crociata con l'intestino ed il fegato, il lavaggio delle mani dopo la manipolazione di organi e carni, la formazione sia riguardo la trasmissione di HEV associata agli animali selvatici, sia riguardo il trattamento termico delle carni prima del consumo (EFSA, 2017).

Oltre all'utilizzo della temperatura, anche i raggi UV-C si sono rilevati efficaci nel ridurre la carica virale negli alimenti. La luce ultravioletta è una radiazione non ionizzante di lunghezza d'onda compresa tra 200 e 280 nm con proprietà germicide. Può inattivare i microrganismi di origine alimentare a causa del danno all'acido nucleico garantendo alimenti più sicuri e preservando valori nutrizionali e livelli sensoriali elevati. Il trattamento di sospensioni virali di HEV3 umano con raggi ultravioletti ha determinato una riduzione dell'infettività del 99,99% (fino a 4 log₁₀). Uno studio condotto su un omogenato di fegato di suino infetto da HEV3, ha invece dimostrato che la luce UV ha solo effetti limitati contro il virus ed è stata osservata un'infettività residua. Questa metodica, tuttavia, non è stata ancora indagata a fondo nei confronti di HEV. L'utilizzo è limitato dalla legislazione europea, inoltre il consumatore finale non è propenso all'acquisto di prodotti sottoposti a queste radiazioni (EFSA, 2017).

Per la gestione del rischio di contaminazione dei molluschi bivalvi, le norme legislative sono mirate a controllare i livelli di inquinamento fecale delle acque (Regolamento UE 2019/627, artt. 52, 53, 54 e 55). A questo scopo, il batterio indicatore che viene ricercato è *Escherichia coli*. All'interno dell'UE, tutte le aree di produzione commerciale devono essere monitorate periodicamente per la ricerca di *E. coli* nei molluschi e questo determina la classificazione dell'area in A, B o C, in base alla quantità crescente di contaminazione. I molluschi di classe A possono essere immessi direttamente sul mercato per il consumo umano, mentre i molluschi di classe B o C necessitano di un periodo di stabulazione in acque naturali o di depurazione all'interno di vasche artificiali o ancora di un trattamento termico definito per poterli immettere sul mercato. Queste sono le raccomandazioni messe in pratica per prevenire l'infezione da NoV (Norovirus) e HAV (Hepatitis A Virus), ma possono essere applicate anche per prevenire la trasmissione di HEV. Al momento, non sono tuttavia disponibili dati sull'impatto della depurazione per quanto riguarda HEV nei molluschi e alcuni studi sostengono che *E. coli*, come indicatore di contaminazione fecale, non sia utilizzabile come indicatore di contaminazione virale (EFSA, 2017).

Per quanto riguarda frutta e verdura, la produzione primaria e gli impianti di trasformazione devono rispettare le norme previste dal Regolamento CE 852/2004 al fine di impedire la trasmissione del virus dell'epatite E. Come già ricordato, finora HEV non è incluso tra i pericoli biologici considerati dalla legislazione comunitaria. Tuttavia, nei pareri scientifici pubblicati dall'EFSA, sono incluse anche le raccomandazioni riguardo l'utilizzo dei prodotti freschi quali frutta e ortaggi. Secondo EFSA, occorre prestare attenzione per quanto riguarda le fonti d'acqua per l'irrigazione e l'utilizzo di prodotti chimici per l'agricoltura. I fertilizzanti organici possono includere il letame e, se non trattato adeguatamente, può trasferire il virus sui prodotti agricoli. Anche alcuni vettori, come gli insetti, o le particelle di aerosol possono fungere da veicoli di trasporto del virus. Un ulteriore fattore di rischio è rappresentato dagli animali selvatici che possono albergare il virus a livello intestinale e diffonderlo nell'ambiente e, quindi, nelle coltivazioni. È importante utilizzare acqua potabile o pulita durante le successive fasi di lavorazione e informare i consumatori sulle corrette prassi igieniche per evitare la contaminazione crociata degli alimenti (EFSA, 2017).

Discussione

La trasmissione zoonotica del virus dell'epatite E, in particolare HEV3 e HEV4, rappresenta attualmente un problema sanitario emergente. Il suino funge da serbatoio principale del virus e i prodotti a base di carne da esso derivati contribuiscono alla trasmissione per via alimentare. E' stato rilevato che, a livello mondiale, circa il 60% dei suini domestici e il 27% dei cinghiali contrae l'infezione da HEV almeno una volta nel corso della vita. Circa il 13% dei suini e il 9,5% dei cinghiali sono invece attualmente infetti (sulla base del rilevamento di RNA virale) (Li et al., 2022). Secondo uno studio condotto nei Paesi Bassi e in Cina da Li et al. (2022) basato su dati raccolti su scala globale, circa il 10% dei prodotti commerciali a base di carne di suino sono positivi a HEV-RNA; tuttavia, i dati disponibili sono ancora scarsi e sono presenti grandi variazioni in termini di numero a seconda dell'area geografica sottoposta ad indagine.

Suini domestici, cinghiali e cervi sono le uniche specie animali ad essere state direttamente collegate a casi umani di epatite E a trasmissione zoonotica, nonostante ceppi di HEV siano stati identificati anche in altre specie (Pavio et al., 2015). Si ricorda, comunque, che le grandi differenze nei metodi utilizzati per l'identificazione dell'infezione da HEV rendono difficile il confronto tra studi diversi, in alcuni dei quali sono stati rilevati solo gli anticorpi anti-HEV, senza ricercare il genoma virale (Spahr et al., 2018), mentre in altri è emersa positività alla ricerca di anticorpi ma non è stato rilevato alcun campione positivo all'RNA. Questo potrebbe essere dovuto a diversi fattori, come una viremia di breve durata o la difficoltà di rilevamento dell'RNA nei campioni di fegato per la breve persistenza del virus all'interno di questo organo (Martinelli et al., 2015). La differenza tra le prevalenze emerse dai vari studi può essere spiegata da diversi fattori, quali la strategia di campionamento, l'età degli animali testati, il tempo di conservazione dei campioni prima delle analisi, la densità delle popolazioni di cinghiali, la frequenza del contatto con altri animali domestici o selvatici ricettivi (De Sabato et al., 2018).

La vita degli animali selvatici potrebbe rallentare la circolazione del virus all'interno di queste popolazioni rispetto ai suini domestici degli allevamenti intensivi. La sieroprevalenza, infatti, varia in modo significativo all'interno delle due specie, con livelli molto più elevati per quanto riguarda i suini, che si infettano molto precocemente nel corso della vita e raramente riescono a sfuggire al virus vista l'elevata densità di animali in allevamento (Thiry et al., 2017).

Nel territorio italiano si sono tipizzati stipiti di HEV3 nei cinghiali appartenenti ai sottotipi 3a, 3c, 3e, 3f, 3i (Bonardi et al., 2020). Ad oggi, in Italia, come negli altri paesi europei, i sottotipi più comuni tra i suini domestici e selvatici sono 3c e 3f, a testimonianza di una circolazione virale tra le due specie (Arnaboldi et al., 2021).

Secondo gli studi citati in questo elaborato di tesi, la prevalenza di HEV è risultata inferiore nei ruminanti selvatici rispetto alla prevalenza osservata nei suini domestici o nei cinghiali. La prevalenza più bassa riscontrata nei cervidi potrebbe essere imputabile al comportamento più solitario rispetto ai cinghiali, che tendono invece a vivere in gruppo. Il ruolo dei ruminanti selvatici nella dinamica della trasmissione del virus, anche se accertato, non è ancora del tutto chiaro (Arnaboldi et al., 2021; Thiry et al., 2017). Sarà importante indagare diverse aree geografiche sia in Italia, che in Europa, per tempi lunghi, in modo da raccogliere un numero di campioni adeguato e significativo per fornire informazioni riguardo alla circolazione di HEV in queste specie, ma anche in altre specie animali appartenenti alla fauna selvatica che potrebbero ricoprire un ruolo nella trasmissione del virus (Anheyer-Behmenburg et al., 2017).

In generale, i dati relativi alle infezioni da HEV sono scarsi come conseguenza della mancata sorveglianza della malattia in molti paesi (EFSA, 2017). Nonostante la tendenza al miglioramento nei controlli messi in atto da alcuni paesi, l'infezione da HEV non è sottoposta a sorveglianza obbligatoria nell'Unione Europea. I sistemi di segnalazione sono soggetti alle politiche nazionali, variabili quindi da paese a paese. Il numero di casi confermati rappresenta solo la cosiddetta "punta dell'iceberg", con una sottostima della incidenza reale dell'infezione (Adlhocha et al., 2016).

In linea generale, è necessario sviluppare metodi di coltura cellulare efficienti per HEV, in modo da facilitare l'acquisizione di dati quantitativi sull'infettività, l'inattivazione e la sopravvivenza del virus negli alimenti e nell'ambiente (EFSA, 2017). Inoltre, l'uso della metagenomica e del sequenziamento del genoma potrebbero aiutarci in futuro ad identificare tutte le varianti di HEV, a correlarle tra di loro e determinare quali specie animali ospitano il virus. Saranno inoltre necessari studi sperimentali sulla trasmissione interspecie per poterne determinare il potenziale zoonotico, soprattutto per quanto riguarda i genotipi di HEV di recente scoperta, e per poter migliorare i sistemi di prevenzione (Pavio et al., 2015).

Conclusioni

L'epatite E è una malattia causata da HEV ampiamente diffusa a livello mondiale e i casi d'infezione sono in costante aumento. Per quanto riguarda l'ambito di competenza veterinaria, particolare attenzione va rivolta ai genotipi HEV3 e HEV4, in quanto è stato dimostrato il loro potenziale zoonosico. Dagli studi condotti sugli ungulati selvatici e contenuti in questo elaborato di tesi, si evince che il cinghiale rappresenta il maggior serbatoio di HEV, mentre per il cervo, pur ricoprendo un ruolo nella diffusione del virus ad altre specie animali e all'uomo, non è ancora stato chiarito se funga da ospite accidentale oppure da vero e proprio reservoir. In entrambe le specie animali, i casi di infezione da HEV sono comunque in aumento rispetto agli anni passati e la diffusione del virus riguarda aree geografiche sempre più ampie.

Il legame epidemiologico tra casi umani di epatite E ed il consumo di carne cruda o poco cotta appartenente agli animali serbatoio è stato ampiamente dimostrato, grazie all'elevato grado di omologia tra i sottotipi di HEV rinvenuti nell'uomo e quelli rinvenuti nelle popolazioni di suini, cinghiali e cervi appartenenti a comuni aree geografiche.

A livello globale, diversi studi hanno dimostrato che i ceppi isolati dagli animali, dall'uomo, dagli alimenti e dall'ambiente, sono correlati, sottolineando che HEV è un problema di salute pubblica che deve essere analizzato sulla base del concetto di "One Health". Da alcuni anni, infatti, questo tipo di approccio si ritiene fondamentale nella tutela delle infezioni zoonosiche e pertanto si dovrebbe sottoporre ad attiva sorveglianza anche il settore animale (allevamenti e fauna selvatica) oltre a quello umano e ambientale. La collaborazione con la medicina umana risulterebbe fondamentale nel contesto "One Health", soprattutto nella sorveglianza dei focolai di infezione da HEV di origine alimentare. Per ottimizzare i piani di sorveglianza occorrerebbero procedure standardizzate, in grado di tracciare gli isolati umani, animali e ambientali per raggiungere i migliori risultati in ambito clinico ed epidemiologico. Anche se, nonostante gli appelli dell'EFSA, la presa di coscienza a livello comunitario non è ancora soddisfacente, si auspica

che si arrivi alla stesura di linee comuni per uniformare la raccolta dei campioni, la ricerca del virus secondo metodiche di riferimento e l'elaborazione dei dati.

Il ruolo epidemiologico del cinghiale e dei ruminanti selvatici necessita di essere approfondito per una migliore comprensione del rischio legato al consumo delle loro carni. In molti casi, il consumo di selvaggina cacciata è ancora condotto in modo artigianale e casalingo, soprattutto nei casi di "autoconsumo" da parte del cacciatore e di "vendita di piccoli quantitativi" a ristoranti e punti vendita a livello locale. Come è noto dal Regolamento CE 853/2004, la filiera è sottoposta ad un completo ed adeguato controllo sanitario solo nel caso in cui le carcasse dei selvatici vengano consegnate ai centri di lavorazione della selvaggina per una commercializzazione regolare su tutto il territorio nazionale e comunitario.

Specialmente nelle regioni italiane in cui il rilevamento di anticorpi anti-HEV all'interno della popolazione umana è superiore alla media nazionale, andrebbero eseguiti ulteriori studi per valutare la presenza di HEV negli animali selvatici, la carica virale e la variabilità genetica. Da questi studi si comprenderebbe meglio il ruolo degli animali, selvatici o da allevamento (suini), ed in particolare si aggiornerebbe la tassonomia di HEV in merito ai genotipi e alle loro varianti presenti sul territorio nazionale. Sarebbero utili anche studi addizionali sulla carica virale nei diversi tessuti/organi della carcassa animale.

Da ultimo, ma della più grande importanza, sarebbe essenziale informare il cacciatore, il ristoratore ed il consumatore circa il "pericolo HEV" che può nascondersi soprattutto dietro la carne suina e le carni dei selvatici a rischio. Le linee guida da divulgare dovrebbero comprendere sia le buone pratiche igieniche da seguire da parte del cacciatore nel caso di macellazione artigianale, sia le temperature e le corrette pratiche di inattivazione del virus presente nelle carni e nei visceri degli animali infetti.

Bibliografia

- Adlhocha C., Avellon A., Baylis SA., Ciccaglione AR., Couturier E., De Sousa R., Epstein J., Ethelberg S., Faber M., Feher A., Ijaz S., Lange H., Mandakova Z., Mellou K., Mozalevskis A., Rimhanen-Finne R., Rizzi V., Said B., Sundqvist L., Thornton L., Tosti ME., Van Pelt W., Aspinall E., Domanovic D., Severi E., Takkinen J., Dalton HR. (2016). Hepatitis E virus: Assessment of the epidemiological situation in humans in Europe, 2014/15. *Journal of Clinical Virology* 82, Vol.82, pp.9-16.
- Aggarwal R., Kamili S., Spelbring J., Krawczynski K. (2001). Experimental Studies on Subclinical Hepatitis E Virus Infection in Cynomolgus Macaques. *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 184, pp. 1380-1385.
- Aggarwal R. (2011). Hepatitis E: Historical, contemporary and future perspectives. *Journal of gastroenterology and hepatology*, Vol.26, pp.72-82.
- Alfonsi V., Romanò L., Ciccaglione AR., La Rosa G., Bruni R., Zanetti A., Della Libera S., Iaconelli M., Bagnarelli P., Capobianchi MR., Garbuglia AR., Riccardo F., Tosti ME., Collaboration Group. (2018). Hepatitis E in Italy: 5 years of national epidemiological, virological and environmental surveillance, 2012 to 2016. *Eurosurveillance and outbreak report*, Vol. 23.
- Ambiente Regione Emilia-Romagna. (2011). "consultabile online all'indirizzo <https://ambiente.regione.emilia-romagna.it/it/parchi-natura2000/sistema-regionale/fauna/mammiferi/schede/cervo>".
- Anheyer-Behmenburg HE., Szabo K., Schotte U., Binder A., Klein G., Johne R. (2017). Hepatitis E Virus in Wild Boars and Spillover Infection in Red and Roe Deer, Germany, 2013–2015. *Emerging Infectious Diseases*, Vol.23, pp. 130-133.

- Aprèa G., Amoroso M.G., Di Bartolo I., D'Alessio N., Di Sabatino D., Boni A., Cioffi B., D'Angelantonio D., Scattolini S., De Sabato L., Cotturone G., Pomilio F., Migliorati G., Galiero G., Fusco G. (2018). Molecular detection and phylogenetic analysis of hepatitis E virus strains circulating in wild boars in south-central Italy. *Transboundary and emerging diseases*, Vol. 65, pp. 25-31.
- Arci Caccia Umbria. (2015). "consultabile online all'indirizzo <https://www.arcicacciaumbria.it/waving-portfolio/capriolo-capreolus-capreolus/>".
- Arci Caccia Umbria. (2015). "consultabile online all'indirizzo <http://www.arcicacciaumbria.it/waving-portfolio/cinghiale-sus-scrofa>".
- Arnaboldi S., Righi F., Carta V., Bonardi S., Pavoni E., Bianchi A., Losio MN., Filipello V. (2021). Hepatitis E Virus (HEV) Spread and Genetic Diversity in Game Animals in Northern Italy. *Food and Environmental Virology*, Vol.13, pp. 146-153.
- Aslan AT., Balaban HY. (2020). Hepatitis E virus: Epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, Vol.26, pp.5543-5560.
- Boadella M., Casas M., Martin M., Vicente J., Segales J., de la Fuente J, Gortazar C. (2010). Increasing Contact with Hepatitis E Virus in Red Deer, Spain. *Emerging infectious disease*, Vol.16, pp. 1994-1996.
- Bonardi S., Filipello V., Pavoni E., Carta V., Bolzoni L., Corradi M., Gilioli S., Losio MN. (2020). Geographical restriction of Hepatitis E virus circulation in Wild Boars (*Sus scrofa*) in Emilia-Romagna region, Northern Italy. *Italian Journal of Food Safety*, Vol. 9, pp. 9-13.

- Caprioli A., Ostanello F., Martelli F. (2005). Il virus dell'epatite E: un agente di zoonosi emergente. *veterinaria italiana*, Vol.42, pp.97-112.
- De Massis F., Aprea G., Scattolini S., D'Angelantonio D., Boni A., Pomilio F., Migliorati G., Di Paolo G., Morgani C., Giammarino A. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, 64100 Teramo, Italy; Asl Lanciano Vasto Chieti, Via Martiri Lancianesi 17/19, 66100 Chieti, Italy. (2019). Detection of Hepatitis E virus (HEV) in the wild boar population of Chieti province, Abruzzo region, Italy.
- De Sabato L., Ostanello F., De Grossi L., Macario A., Franzetti B., Monini M., Di Bartolo I. (2018). Molecular survey of HEV infection in wild boar population in Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, Vol. 65, pp. 1749-1756.
- Di Bartolo I., Ponterio E., Angeloni G., Morandi F., Ostanello F., Nicoloso S., Ruggeri M. (2017). Presence of Hepatitis E Virus in a RED Deer (*Cervus elaphus*) Population in Central Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, Vol 64, pp. 137-143.
- 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. (2019). Quantification and genetic diversity of Hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) hunted for domestic consumption in Central Italy. *Food microbiology*, Vol.82, pp.194-201.
- ECDC surveillance report (2017). *Hepatitis E in the EU/EEA, 2005-2015*. "consultabile online all'indirizzo https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/HEV_Surveillance-report-2005-2015.pdf".
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci A., Allende A., Bolton D., Chemaly M., Davies R., Salvador P., Escamez F., Herman L., Koutsoumanis K., Lindqvist R., Norrung B., Robertson L., Ru G., Sanaa M.,

Simmons M., Skandamin P., Snary E., Speybroeck N., Ter Kuile B., Threlfall J., Wahlstrom H., Di Bartolo I., Johne R., Pavo N., Rutjes S., Van der Poel W., Vasickova P., Hempen M., Messens W., Rizzi V., Latronico F., Girones R. (2017). Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *EFSA Journal*, Vol.15.

Eric Isselee, Shutterstock. Male of roe deer (*Capreolus capreolus*). "consultabile online all'indirizzo: <https://www.shutterstock.com/it/image-photo/male-roe-deer-capreolus-isolated-on-1576613908>".

Eric Isselee, Shutterstock. Red deer (*Cervus elaphus Linnaeus*). "consultabile online all'indirizzo: <https://www.shutterstock.com/it/image-photo/red-deer-stag-front-white-background-321708992>".

Eric Isselee, Shutterstock. Wild boar (*Sus scrofa*). "consultabile online all'indirizzo: <https://www.shutterstock.com/it/image-photo/wild-boar-pig-sus-scrofa-15-107477213>".

Forgach P., Nowotny N., Erdelyi K., Boncz A., Zentai J., Szucs G., Reuter G., Bakonyi T. (2010). Detection of Hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. *Veterinary Microbiology*, Vol.143, pp. 106-116.

Horvatits T., Schulze zur Wiesch J., Lutgehetmann M., Lohse AW., Pischke S. (2019). The Clinical Perspective on Hepatitis E. *Viruses*, Vol. 11.

Istituto Superiore di Sanità. Protocollo Progetto Sorveglianza dell'epatite E in Italia 2014. Dr.ssa Maria Elena Tosti. Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute Istituto Superiore di Sanità. "consultabile online all'indirizzo <https://www.epicentro.iss.it/epatite/pdf/Protocollo%20Progetto%20Sorveglianza%20dell%E2%80%99epatite%20E%20in%20Italia%202014.pdf>"

- Istituto Superiore di Sanità. (2019). SEIEVA Sorveglianza dell'epatite E. "consultabile online all'indirizzo https://w3.iss.it/site/Seieva/files/Protocollo_sorv%20epatite%20E.pdf"
- Ivanova A., Tefanova V., Reshetnjak I., Kuznetsova T., Geller J., Lundkvist A., Janson M., Neare K., Velstrom K., Jokelainen P., Lassen B., Hutt P., Saar T., Viltrop A., Golovljova I. (2015). Hepatitis E Virus in Domestic Pigs, Wild Boars, Pig Farm Workers, and Hunters in Estonia. *Food and Environmental Virology*, Vol.7, pp.403-412.
- Kaba M., Davoust B., Marie JL., Colson P. (2010). Detection of hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) livers. *The Veterinary Journal*, Vol 186, pp. 259-261.
- Kamar N., Rostaing L., Izopet J. (2013). Hepatitis E virus infection in immunosuppressed patients: Natural history and therapy. *Seminars in Liver Disease*, Vol.33, pp.62-70.
- Kobayashi T., Murakami S., Terumasa Y., Mineshita K., Sakuyama M., Sasaki R., Maeda K., Horimoto T. (2018). Detection of bat hepatitis E virus RNA in microbats in Japan. *Virus Genes*, Vol 54, pp. 599-602.
- Kukielka D., Rodriguez-Prieto V., Vicente J., Sanchez-Vizcaino JM. (2016). Constant Hepatitis E Virus (HEV) Circulation in Wild Boar and Red Deer in Spain: An Increasing Concern Source of HEV Zoonotic Transmission. *Transboundary and Emerging Diseases*, Vol. 63, pp. 360-368.
- Lapa D., Capobianchi MR., Garbuglia AR. (2015). Epidemiology of Hepatitis E Virus in European Countries. *International Journal of molecular sciences*, Vol.16, pp.25711-25743.

- Larska M., Krzysiak MK., Jablonski A., Kesik J., Bednarski M., Rola J. (2015). Hepatitis E Virus Antibody Prevalence in Wildlife in Poland. *Zoonoses and Public Health*, Vol. 62, pp. 105-110.
- Lee GH., Tan BH., Teo EC., Lim SG., Dan YY., Wee A., Aw PP., Zhu Y., Hibberd ML., Tan CK., Purdy MA. and Teo CG., (2016). Chronic infection with camelid hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. *Gastroenterology*, Vol.150, pp.355-357.
- Lhomme S., Marion O., Abravanel F., Chapuy-Regaud S., Kamar N., Izopet J. (2016). Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses*, Vol. 8.
- Li P., Ji Y., Li Y., Ma Z., Pan Q. (2022). Estimating the global prevalence of hepatitis E virus in swine and pork products. *One Health*, Vol. 14.
- Lorusso P., Bonerba E., Pandiscia A., Mottola A., Di Pinto A., Piredda R., Terio V. (2022). Occurrence of hepatitis E virus (HEV) in Calabrian wild boars. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 371.
- Martelli F., Caprioli A., Zengarini M., Marata A., Fiegna C., Di Bartolo I., Ruggeri FM., Delogu M., Ostanello F. (2008). Detection of Hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Veterinary Microbiology*, Vol.126, pp.74-81.
- Martinelli N., Pavoni E., Filogari D., Ferrari N., Chiari M., Canelli E., Lombardi G. (2015). Hepatitis E Virus in Wild Boar in the Central Northern Part of Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, Vol. 62, pp. 217-222.
- Masotti C., Battistini R., Mignone W., Berio E., Dellepiane M., Andreoli T., Razzuoli E., Peletto S., Acutis P., Beltramo C., Modesto P., Listorti V., Ercolini C., Serracca L. (2020). Ricerca del virus dell'epatite E (HEV) in cinghiali

durante la stagione venatoria 2017/2018 e 2018/2019. *Large Animal Review*, Vol.26, pp.149-151.

Matsuura Y., Suzuki M., Yoshimatsu K., Arikawa J., Takashima I., Yokoyama M., Igota H., Yamauchi K., Ishida S., Fukui D., Bando G., Kosuge M., Tsunemitsu H., Koshimoto C., Sakae K., Chikahira M., Ogawa S., Miyamura T., Takeda N., Li TC. (2007). Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Archives of Virology*, Vol. 152, pp. 1375-1381.

Mazzei M., Nardini R., Verin R., Forzan M., Poli A., Tolari F. (2015). Serologic and molecular survey for hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) in Central Italy. *New Microbes and New Infections*, Vol. 7, pp. 41-47.

Meng, XJ. (2011). From barnyard to food table: The omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Research*, Vol. 161, pp. 23-30.

Mesquita JR., Oliveira RMS., Coelho C., Vieira-Pinto M., Nascimento MSJ. (2016). Hepatitis E Virus in Sylvatic and Captive Wild Boar from Portugal. *Transboundary and Emerging Diseases*, Vol. 63, pp. 574-578.

Neumann S., Hackl SS., Piepenschneider M., Vina-Rodriguez A., Dremsek P., Ulrich RG., Groschup MH., Eiden M. (2016). Serologic and Molecular Survey of Hepatitis E Virus in German Deer Populations. *Journal of Wildlife Disease*, Vol.52, pp.106-113.

Pavio N., Doceul V., Bagdassarian E., Johne R. (2017). Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human. *Veterinary Research*, Vol.48, articolo 78.

- Pavio N., Meng XJ., Doceul V. (2015). Zoonotic origin of hepatitis E. *Current Opinion in Virology*, Vol. 10, pp. 34-41.
- Porea D., Anita A., Demange A., Raileanu C., Oslobanu (Ludu) L., Anita D., Savuta G., Pavio N. (2017). Molecular detection of hepatitis E virus in wild boar population in eastern Romania. *Transboundary and Emerging Diseases*, Vol. 65, pp.527-533.
- Prpic J., Cerni S., Skoric D., Keros T., Brnic D., Cvetnic Z., Jemersic L. (2015). Distribution and Molecular Characterization of Hepatitis E virus in Domestic Animals and Wildlife in Croatia. *Food and Environmental Virology*, Vol. 7, pp. 195-205.
- Raji YE., Toung OP., Taib NM., Sekawi ZB. (2022). Hepatitis E Virus: An emerging enigmatic and underestimated pathogen. *Saudi Journal of Biological Sciences*, Vol. 29, pp. 499-512.
- Ramanzin M., Amici A., Casoli C., Esposito L., Lupi P., Marsico G., Mattiello S., Olivieri O., Ponzetta MP., Russo C., Trabalza Marinucci M. (2010). Meat from wild ungulates: ensuring quality and hygiene of an increasing source. *Italian Journal of Animal Science*, Vol.9, pp.318-331.
- Regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari, Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 30.04.2004 L139/1.
- Regolamento (CE) N.853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 30.04.2004 L 139/55.

Regolamento (CE) n.2073/2005 della commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 22.12.2005 L338/1.

Regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento europeo e del Consiglio del 15 marzo 2017 relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari, recante modifica dei Regolamenti (CE) n. 999/2001, (CE) n. 396/2005, (CE) n. 1069/2009, (CE) n. 1107/2009, (UE) n. 1151/2012, (UE) n. 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio, dei Regolamenti (CE) n. 1/2005 e (CE) n. 1099/2009 del Consiglio e delle Direttive 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE del Consiglio, e che abroga i Regolamenti (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, le Direttive 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE del Consiglio e la Decisione 92/438/CEE del Consiglio (regolamento sui controlli ufficiali), Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 7.04.2017 L 95/1.

Regolamento di esecuzione (UE) 2019/627 della Commissione del 15 marzo 2019 che stabilisce modalità pratiche uniformi per l'esecuzione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano in conformità al Regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento europeo e del Consiglio e che modifica il Regolamento (CE) n. 2074/2005 della Commissione per quanto riguarda i controlli ufficiali, Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 17.05.2019 L 131/1.

Ruggeri FM., Di Bartolo I., Ponterio E., Angeloni G., Trevisani M., Ostanello F. (2013). Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. *New microbiologica*, Vol.36, pp.331-344.

- Rutjes SA., Lodder-Verschoor F., Lodder WJ., van der Giessen J., Reesink H., Bouwknegt M., de Roda Husman AM. (2010). Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands. *Journal of Virological Methods*, Vol. 168, pp.197-206.
- Sacristan C., Madslie K., Sacristan I., Klevar S., das Neves CG. (2021). Seroprevalence of Hepatitis E Virus in Moose (*Alces alces*), Reindeer (*Rangifer tarandus*), Red Deer (*Cervus elaphus*), Roe Deer (*Capreolus capreolus*), and Muskoxen (*Ovibos moschatus*) from Norway. *Viruses*, Vol.13.
- Salines M., Andraud M., Rose N. (2017). From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Veterinary Research*, Vol. 48:31.
- Scotto G., Bulla F., Campanale F., Tartaglia A., Fazio V. (2013). Epatite E. *Le infezioni in medicina*, Vol.3, pp.175-188.
- Serracca L, Battistini R., Rossini I., Mignone W., Peletto S., Boin C., Pistone G., Ercolini R., Ercolini C. (2015). Molecular Investigation on the Presence of Hepatitis E Virus (HEV) in Wild Game in North-Western Italy. *Food and Environmental Virology*, Vol.7, pp.206-212.
- Smith DB., Simmonds P., members of the International Committee on the Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group, Jameel S., Emerson U., Harrison TJ., Meng XJ., Okamoto H., Van der Poel WHM., Purdy MA. (2014). Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *Journal of General Virology*, Vol.95, pp.2223-2232.
- Sonoda H., Abe M., Sugimoto T., Sato Y., Bando M., Fukui E., Mizuo H., Takahashi M., Mishizawa T., Okamoto H. (2004). Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV) Infection in Wild Boars and Deer and Genetic Identification of a

Genotype 3 HEV from a Boar in Japan. *Journal of clinical microbiology*, Vol.42, pp. 5371-5374.

Spahr C., Knauf-Witzens T., Vahlenkamp T., Ulrich RG., Johne R. (2018). Hepatitis E virus and related viruses in wild, domestic and zoo animals: A review. *Zoonoses Public Health*, Vol.65, pp-11-29.

Spancerniene U., Grigas J., Buitkuvieniė J., Zymantiene J., Juozaitiene V., Stankeviciute M., Razukevicius D., Zienius D., Stankevicius A. (2018). Prevalence and phylogenetic analysis of hepatitis E virus in pigs, wild boars, roe deer, red deer and moose in Lithuania. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vol. 60.

Tei S., Kitajima N., Takahashi K., Mishiro S. (2003). Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, Vol.362, pp.371-373.

Thiry D., Mauroy A., Saegerman C., Licoppe A., Fett T., Thomas I., Brochier B., Thiry E, Liden A. (2017). Belgian Wildlife as Potential Zoonotic Reservoir of Hepatitis E Virus. *Transboundary and Emerging Disease*, Vol.64, pp. 764-773.

Tomiyaama D., Inoue E., Osawa Y., Okazaki K. (2009). Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer, *Cervus nippon yesoensis*, in Hokkaido, Japan. *Journal of Viral Hepatitis*, Vol.16, pp.524-528.

Watanobe T., Okumura N., Ishiguro N., Nakano M., Matsui A., Sahara M., Komatsu M. (1999). Genetic relationship and distribution of the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) and Ryukyu wild boar (*Sus scrofa riukiuanus*) analysed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, Vol. 8, pp. 1509-1512.

Zodiac (2020). Zoonosi e malattie da vettori: documento di indirizzo per la diagnosi di laboratorio nell'uomo. "consultabile online all'indirizzo https://spvet.it/archivio/zodiac/documenti/documento_di_inidirizzo_11-02-2020-2.pdf".