

Ricerca del virus dell'epatite E (HEV) in cinghiali durante la stagione venatoria 2017/2018 e 2018/2019



CHIARA MASOTTI¹, ROBERTA BATTISTINI¹, WALTER MIGNONE², ENRICA BERIO², MONICA DELLEPIANE³, TIZIANA ANDREOLI³, ELISABETTA RAZZUOLI⁴, SIMONE PELETTI⁵, PIERLUIGI ACUTIS⁵, CHIARA BELTRAMO⁵, PAOLA MODESTO⁴, VALERIA LISTORTI¹, CARLO ERCOLINI¹, LAURA SERRACCA¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione La Spezia - La Spezia - Italy,

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione Imperia - Imperia - Italy,

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione Savona - Savona - Italy,

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione Genova - Genova - Italy,

⁵Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino - Italy

SUMMARY

An increasing number of Hepatitis E virus (HEV) cases are currently recognized in many European countries. HEV is an emerging disease in industrialized countries. HEV is an important cause of human acute viral hepatitis worldwide, where the infection is acquired probably through ingestion of contaminated food, in addition to travel-related cases. In Europe, outbreaks have been reported linked to the consumption of pork liver sausages and wild boar meat. It has been shown that wildlife can serve as natural reservoirs of HEV. In Europe, especially in region where game meat is widely consumed, wild boars (*Sus scrofa*) are considered as the main wildlife reservoir of zoonotic Hepatitis E virus genotypes. HEV is classified into eight genotypes. Genotypes 3 and 4 are considered zoonotic and are responsible for sporadic cases of food-borne disease due to the consumption of contaminated raw or undercooked meat. Genotype 3 mainly circulates in domestic pigs and wild boars, which are the main sources of infection for humans. To assess the potential risk of zoonotic transmission of HEV from wild boars, an epidemiological survey has been conducted during the 2017-2018 e 2018-2019 hunting seasons in the Liguria region. Liver samples of 560 wild boars were analyzed for HEV RNA by realtime RT-PCR; positive samples were then sequenced and submitted to phylogenetic analysis. The results of the survey revealed the presence of HEV in 4.4% (25/560) of the examined wild boar's livers. Phylogenetic analysis classified the isolates as HEV genotype 3, highlighting the risk related to the consumption of wild boar-derived products for humans. HEV sequences belonged to HEV subtypes 3a, 3chi, 3c, and 3f, and 3* (unclassified). Our results indicate that HEV is circulating in wild boars among the considered game species in north-western Italy and suggest a potential zoonotic risk related to handling and/or consumption of raw or undercooked meat and products made of the liver from this species.

KEY WORDS

Hepatitis E Virus, wild boar, foodborne transmission, prevalence.

INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite E (HEV) è un *Orthohepevirus A* appartenente alla famiglia *Hepeviridae*, di piccole dimensioni (27-34 nm) a simmetria icosaedrica, privo di envelope. Ha un genoma a singolo filamento di RNA di circa 7,2 Kb. Il genoma è costituito da una regione non tradotta 5' (UTR) seguita da tre regioni codificanti (ORF 1, 2, 3) e una seconda regione non tradotta poliadenilata all'estremità 3'. I ceppi che infettano l'uomo appartengono alla specie *Orthohepevirus A* e sono stati identificati otto genotipi, di cui HEV-1, HEV-2, HEV-3 e HEV-4 sono principalmente causa di patologia nell'uomo². HEV è, infatti, responsabile di una forma autolimitante di epatite acuta infettiva che di solito si risolve in 2-6 settimane. I genotipi 1 e 2 hanno come ospite unicamente l'uomo e sono associati ad infezioni ed epidemie in Asia, Africa e Messico. I genotipi 3 e 4 sono zoonotici, in quanto colpiscono sia gli animali (suini, cinghiali, cervi) che l'uomo. Il genotipo 3 circola principalmente in Europa, Stati Uniti e Giappone, mentre il genotipo 4 è stato identificato in Asia (Cina, Giap-

pone e India) e più raramente in Europa³. Il genoma di HEV è stato, inoltre, riscontrato in diversi tessuti e organi di suini, cervi e cinghiali.

Nell'ultimo decennio, l'epatite E è diventata una delle principali priorità nel campo della ricerca dei virus di origine alimentare, per il fatto che le sono stati attribuiti più di 3 milioni di casi clinici rilevati ogni anno e l'infezione di circa 20 milioni di persone⁴. La malattia è considerata endemica nei Paesi in via di sviluppo, dove si manifesta con episodi epidemici generalmente associati al consumo di acqua contaminata, mentre nei paesi industrializzati i casi di epatite E nell'uomo erano considerati sporadici e legati a viaggi in Paesi dove la malattia è endemica¹.

HEV rappresenta una minaccia emergente nei Paesi industrializzati, poiché indagini epidemiologiche hanno dimostrato un incremento della prevalenza e dell'incidenza di HEV sia nell'uomo che negli animali e hanno identificato suini e cinghiali come possibile fonte di infezione umana attraverso il consumo di carne cruda o poco cotta, specialmente nelle regioni in cui la carne di selvaggina è ampiamente consumata. L'esclusione della carne e degli organi degli animali infetti per la produzione di cibo durante l'esame ispettivo delle carni è ostacolata dal fatto che suini domestici e cinghiali, nonostante siano altamente suscettibili all'infezione da HEV, non

Corresponding Author:

Chiara Masotti (chiara.masotti@izsto.it).

sviluppano segni di epatite infettiva^{5,6}.

Tra le specie selvatiche, il cinghiale è considerato il principale *reservoir* dell'HEV e svolge un importante ruolo nella trasmissione del virus in Europa. È stato dimostrato sperimentalmente, infatti, che i cinghiali infetti da HEV possono trasmettere l'infezione ad altri animali, come ai suini^{7,8}. Questo gioca un ruolo importante, specialmente nei Paesi in cui l'allevamento estensivo di suini è diffuso, perché è facilitato il contatto tra suini domestici e specie simpatiche, aumentando così il rischio di trasmissioni inter-specie⁹.

La conoscenza dello stato sanitario della fauna selvatica è quindi indispensabile, oltre che per minimizzare l'effetto diretto sulla salute umana derivante dal consumo di selvaggina cacciata, anche per studiare la diffusione sul territorio di patologie a carattere zoonosico. Nel presente lavoro sono stati riportati i dati relativi alla presenza e alla caratterizzazione di HEV nelle popolazioni di cinghiali presenti sul territorio ligure durante la stagione venatoria 2017/2018 e 2018/2019, grazie ai piani regionali presenti per il controllo sanitario della fauna selvatica.

MATERIALI E METODI

Durante l'attività venatoria 2017/2018 e 2018/2019 sono stati raccolti 280 campioni di fegato da cinghiali provenienti in pari numero dalle quattro province della Regione Liguria (Imperia, Savona, Genova e La Spezia) per stagione venatoria, per un totale di 560 campioni complessivi durante le due stagioni di caccia citate. I fegati sono stati analizzati individualmente: 25 mg di tessuto sono stati posti in 300 microlitri di tampone fosfato salino e successivamente omogenati mediante tissuelyser¹⁰ ed analizzati con tecniche di biologia molecolare. L'estrazione dell'RNA è stata effettuata mediante il kit QIAamp Cadaver Pathogen Mini Kit (QIAGEN) seguendo il protocollo della ditta di produzione. L'RNA ottenuto è stato analizzato con una metodica di one-step real-time RT-PCR¹¹. I campioni risultati positivi alla real-time RT-PCR sono stati poi sottoposti a sequenziamento ed analisi filogenetica dopo riamplicazione con una RT-nested-PCR, utilizzando due set di primer degenerati per la regione 5' della ORF2¹².

L'albero filogenetico è stato costruito da un dataset di sequenze parziali (135 bp) della regione 5' ORF2 dei campioni risultati positivi all'HEV e di sequenze disponibili in GenBank, utilizzando il software MEGA7, mediante il metodo Neighbor-Joining (NJ) basato sul modello Kimura-2 parametri. La robustezza dell'inferenza filogenetica è stata testata utilizzando l'analisi di bootstrap con 1.000 pseudorepliche².

RISULTATI

L'RNA di HEV è stato rilevato nel 4,4% (25/560) dei fegati di cinghiale testati e rispettivamente nel 4,6% (13/280) durante il 2017-2018 e 4,2% (12/280) nel 2018-2019.

I dati da noi ottenuti dall'analisi effettuata sulle due stagioni di caccia evidenziano positività per HEV in tutte le province liguri con le seguenti prevalenze: 7,8% (11/140) Imperia; 2,9% (4/140) Savona; 2,1% (3/140) Genova; 5% (7/140) La Spezia. Le tabelle 1 e 2 riportano questi dati suddivisi anno per anno.

Il sequenziamento genico e l'analisi filogenetica (Fig. 1) hanno permesso di identificare i campioni positivi come appartenenti al genotipo 3, sottotipi 3a (n=1), 3c (n=2), 3f (n=2), 3* (non classificati; n=8) durante la stagione venatoria 2017-2018, e sottotipi 3a (n=6), 3f (n=3), 3* (non classificati; n=3) durante la stagione del 2018-2019.

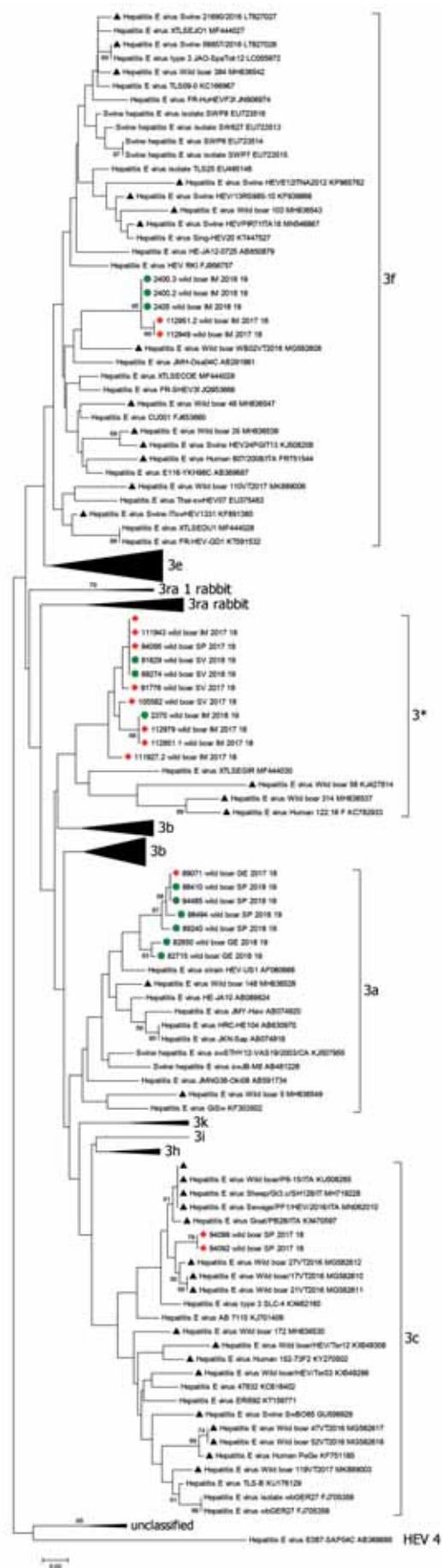


Figure 1 - Albero filogenetico della sequenza parziale della regione 5' ORF2 di HEV. I campioni dello studio sono indicati (◆ stagione venatoria 2017/2018; ● stagione venatoria 2018/2019). Sequenze di altri isolati italiani da uomo, suino e cinghiale sono indicati dal simbolo ▲.

Tabella 1 - Prevalenza dell'epatite E suddivisa per province della regione Liguria e stagione venatoria 2017-2018.

Provincia	N° animali testati	N° animali positivi	Prevalenza (%)
Savona (SV)	70	2	2,9
Imperia (IM)	70	7	10,0
La Spezia (SP)	70	3	4,3
Genova (GE)	70	1	1,4
Totale	280	13	4,6

Tabella 2 - Prevalenza dell'epatite E suddivisa per province della regione Liguria e stagione venatoria 2018-2019.

Provincia	N° animali testati	N° animali positivi	Prevalenza (%)
Savona (SV)	70	2	2,9
Imperia (IM)	70	4	5,7
La Spezia (SP)	70	4	5,7
Genova (GE)	70	2	2,9
Totale	280	12	4,3

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti mostrano dati di prevalenza analoghi a quelli di uno studio effettuato su cinghiali in Piemonte durante la stagione venatoria 2012-2013 dove la prevalenza si attesta intorno al 4,9%¹³; in altre regioni italiane studi condotti durante la stagione venatoria 2014-2015 hanno mostrato una prevalenza del 33,5% nel Lazio¹⁴, 10,1% in Abruzzo e 12,4% in Campania, mentre in Calabria nessuno degli animali testati è risultato positivo per la presenza di RNA di HEV⁹. Le prevalenze riportate in altri paesi europei variano dal 10,1% in Spagna¹⁵ al 18% in Romania¹⁶. Tali differenze sono probabilmente da imputare alle diverse condizioni epidemiologiche nelle diverse zone (densità, dimensioni e composizione delle popolazioni considerate e contatti con suini domestici)¹².

Durante le stagioni venatorie precedenti sono stati riportati diversi studi sulla prevalenza di HEV effettuati nella popolazione di cinghiali nel territorio ligure. Nel periodo 2012-2014 la prevalenza dell'RNA di HEV trovata nella provincia di Imperia è del 2,3%¹⁷. Nella stagione 2013-2015 l'RNA di HEV è stato rilevato nel 3,9% (17/430) dei pool di fegati di cinghiali testati¹⁸. Il nostro studio, in linea con i dati riscontrati in precedenti analisi condotte, nel territorio ligure, evidenzia un'attiva circolazione di HEV nelle popolazioni di cinghiali liguri esaminate. L'analisi filogenetica ha dimostrato che i ceppi virali rilevati sono classificabili come HEV genotipo 3, evidenziando inoltre che le sequenze liguri appartenenti ai sottotipi HEV 3c e 3f formano dei cluster con sequenze identificate da cinghiali in Lazio¹⁹. È importante infine sottolineare che il genotipo 3, riscontrato nei campioni, è considerato zoonotico e quindi può rappresentare un rischio di infezione per le categorie professionali esposte e per il consumo di carni crude (insaccati) o poco cotte e di prodotti a base di fegato, dal momento che tale genotipo è quello maggiormente identificato nei paesi industrializzati e comprende ceppi virali che colpiscono sia l'uomo che gli animali.

Bibliografia

- Sridhar S., Teng J.L.L., Chiu T., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. (2017). *Hepatitis E Virus Genotypes and evolution: emergence of camel hepatitis E variants*. Int J Mol Sci, 18: 869. doi: 10.3390/ijms18040869
- Nicot F., Jeanne N., Roulet A., Lefebvre C., Carcenac R., Manno M., Dubois M., Kamar N., Lhomme S., Abravanel F., Izopet J. (2018). *Diversity of Hepatitis E Virus genotype 3*. Rev Med Virol, 28(5): e1987
- Colson P., Borentain P., Queyriaux B., Kaba M., Moal V., Gallian P., Heyries L., Raoult D., Gerolami R. (2010). *Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans*. J Infect Dis, 202: 825-834.
- World Health Organization. (2017) Hepatitis E. Retrieved August 22, 2018 from <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis>
- Mazzei M., Nardini R., Verin R., Forzan M., Poli A. and Tolari F. (2015). *Serologic and molecular survey for hepatitis E virus in wild boar (Sus scrofa) in Central Italy*. New Microbes New Infect, 7: 41-47.
- Rivero-Juarez A., Frias M., Martinez-Peinado A., Riscalde MA., Rodriguez-Cano D., Camacho A., Garcia-Bocanegra I., Cuenca-Lopez F., Gomez-Villamandos JC., Rivero A. (2017). *Familial Hepatitis E Outbreak Linked to Wild Boar Meat Consumption*. Zoonoses Public Health, 64: 561-565.
- Schlosser J., Eiden M., Vina-Rodriguez A., Fast C., Dremsek P., Lange E., Ulrich R.G., Groschup M.H. (2014). *Natural and experimental hepatitis E virus genotype 3-infection in European wild boar is transmissible to domestic pigs*. Vet Res, 45, p. 121.
- Schlosser J., Vina-Rodriguez A., Fast C., Groschup M.H., Eiden M. (2015). *Chronically infected wild boar can transmit genotype 3 hepatitis E virus to domestic pigs*. Vet Microbiol, 180: 15-21.
- Apra G., Amoroso M., Di Bartolo I., Boni A., D'Alessio N., Cio B., D'Angelantonio D., Scattolini S., De Sabato L., Di Sabatino D., Fusco G., Pomilio F., Migliorati G., Galiero G., Guarino A. (2016). *Rilevazione molecolare e indagine filogenetica di ceppi di virus dell'epatite E circolanti in cinghiali del Sud Italia*. Pages 255-256 in SIDILV 2016, Pacengo di Lazise (Ve), Settembre 2016.
- 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) unthred for domestic consumption in Central Italy*. Food Microbiol, 82: 194-201
- Jothikumar N., Cromeans T.L., Robertson B. H., Meng X.J., Hill V. R. (2006). *A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus*. J Virol Methods 131: 65-71.
- Lu L., Li C., Hagedorn C. H. (2006). *Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity subtypes and zoonosis*. Rev Med Virol, 16(1): 5-36.
- Caruso C., Modesto P., Bertolini S., Peletto S., Acutis P.L., Dondo A., Robetto S., Mignone W., Orusa R., Ru G., Masoero L. (2016). *Serological and virological survey of hepatitis E virus in wild boar populations in northwestern Italy: detection of HEV subtypes 3e and 3f*. Arch Virol, 160: 153-160.
- Montagnaro S., De Martinis C., Sasso S., Ciarcia R., Damiano S., Auletta L., Iovane V., Zottola T., Pagnini U. (2015) *Viral and Antibody Prevalence of Hepatitis E in European Wild Boars (Sus scrofa) and Hunters at Zoonotic Risk in the Latium Region*. J Comp Pathol, 153: 1-8.
- Kukiella D., Rodriguez-Prieto V., Vicente J., Sánchez-Vizcaíno JM. (2016). *Constant Hepatitis E Virus (HEV) Circulation in Wild Boar and Red Deer in Spain: An Increasing Concern Source of HEV Zoonotic Transmission*. Transbound Emerg Dis, 63: 360-368.
- Porea D., Anita A., Demange A., Raileanu C., Oslobanu Ludu L., Anita D., Savuta G., Pavio N. (2018). *Molecular detection of hepatitis E virus in wild boar population in eastern Romania*. Transbound Emerg Dis, 65: 527-533.
- Serracca L., Battistini R., Rossini I., Mignone W., Peletto S., Boin C., Pistone G., Ercolini R., et al. (2015). *Molecular Investigation on the Presence of Hepatitis E Virus (HEV) in Wild Game in North-Western Italy*. Food Environ Virol, 7: 206-2012.
- Serracca L., Battistini R., Rossini I., Tomei L., De Montis G., Mignone W., Arossa C., Dallepiane M., Ferrari A., Razzuoli E., Peletto S., Ercolini C. (2016). *Sorveglianza del virus dell'epatite E (HEV) nei cinghiali presenti sul territorio ligure*. Pages 345-346 in SIDILV 2016, Pacengo di Lazise (Ve), Settembre 2016.
- De Sabato L., Ostanello F., De Grossi L., Marcario A., Franzetti B., Monini M., Di Bartolo I. (2018). *Molecular survey of HEV infection in wild boar population in Italy*. Transbound Emerg Dis, 65(6): 1749-1756.