

PREVALENZA DI ANTICORPI ANTI-HEV IN ALLEVAMENTI SUINI DEL NORD ITALIA

PREVALENCE OF HEPATITIS E VIRUS ANTIBODIES AMONG PIGS IN NORTHERN ITALY

N.MARTINELLI, A.LUPPI, D.LELLI, E.SOZZI, E.CANELLI,
A.M.MORENO MARTIN, R.FONTANA, A.LAVAZZA, G.F.LOMBARDI

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia
e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Brescia*

Parole chiave: Epatite E, Suino, Sieroprevalenza.

Key words: Hepatitis E virus, Swine, Seroprevalence.

Riassunto. Il virus dell'epatite E (HEV), virus ad RNA appartenente al genere *Hepevirus*, unico membro della famiglia *Hepeviridae*, è attualmente suddiviso in quattro principali genotipi ed in un unico sierotipo.

Un'indagine sierologica per la ricerca di anticorpi anti-HEV è stata condotta in 1422 sieri suini, provenienti da 39 allevamenti (17 a ciclo aperto, 10 a ciclo chiuso e 12 ingrassati), mediante un test ELISA del commercio utilizzato per la diagnosi sierologica di HEV nell'uomo ed opportunamente modificato per il suo impiego nel suino. La presenza di anticorpi anti-HEV è stata dimostrata in 714 sieri (50,21%) ed in 38 allevamenti (97,43%). L'elevata sieroprevalenza riscontrata conferma che il virus dell'epatite E è probabilmente endemico e sta circolando attivamente in numerosi allevamenti suini italiani.

Abstract. *The Hepatitis E virus (HEV), the causative agent of hepatitis E, is a non enveloped RNA virus, belonging to genus Hepevirus, the only member of the Hepeviridae family. HEV is classified into four major genotype but only one serotype is identified. A survey to detect antibodies against hepatitis E virus was undertaken on 39 Italian pig farms (17 farrow to feeder, 10 farrow to finish and 12 fattening enterprises). For the study 1422 pig sera samples were tested using a commercial indirect ELISA, originally developed for testing human sera and properly adapted for the analysis of pig sera. 38 of the farms (97,43%) were positive for anti-HEV IgG antibodies and 714 of 1422 sera samples resulted positive (50,21%). The study confirm that HEV is spread in pigs in Italy and is probably endemic in many farms.*

PREMESSE

Il virus dell'epatite E (HEV), appartiene alla famiglia delle *Hepeviridae*, genere *Hepevirus*, è privo di envelope, presenta un genoma ad RNA positivo a singolo filamento di circa 7,5 Kb ed è causa di epatiti nell'uomo, nei primati e nel suino (10). Nonostante se ne conosca un solo sierotipo, il virus dell'epatite E viene suddiviso in almeno 4 principali genotipi: il genotipo 1 (che comprende i ceppi asiatici), il genotipo 2 (un solo ceppo messicano), il genotipo 3 (ceppi provenienti dai paesi industrializzati) ed il genotipo 4 (casi sporadici in Cina, Giappone e Taiwan) (8). Nell'uomo HEV è trasmesso principalmente per via oro-fecale soprattutto in seguito al consumo di acqua contaminata, raramente dopo il contatto

persona-persona, ed è causa di una sindrome caratterizzata da malessere generale, nausea e vomito. Il tasso di mortalità è generalmente basso (< 1%), ma nelle donne in gravidanza sono stati osservati casi gravi di epatite con un tasso di mortalità che può raggiungere il 20-25%. Epidemie scatenate da HEV sono state descritte in molte parti del mondo tra cui Messico, Asia ed Africa, mentre nel Nord America ed in Europa sono stati osservati casi sporadici, soprattutto in turisti che avevano viaggiato in aree dove la malattia è endemica (1). I ceppi di HEV di tipo suino ed umano isolati nei paesi industrializzati sono filogeneticamente correlati fra loro e sono raggruppati nei genotipi 3 e 4, avvalorando l'ipotesi che HEV sia un virus zoonosico (9). Le modalità di contagio riconoscono principalmente la via oro-fecale e la trasmissione è più efficace in animali posti a stretto contatto (6). L'eliminazione del virus avverrebbe inoltre attraverso la saliva, l'urina e le secrezioni nasali. Si ipotizza che una volta penetrato per via orale e prima d'indurre viremia, il virus replichi nell'intestino. Successivamente raggiungerebbe il fegato tramite la vena porta, replicherebbe negli epatociti per essere in seguito rilasciato nella bile e nel sangue (12). La presenza di anticorpi anti HEV è stata dimostrata in numerosi animali domestici (suino, bovino, cane, cavallo) e selvatici (cinghiale, cervo e numerosi roditori). Studi di sieroprevalenza nei suini condotti in diversi Paesi dimostrano che la circolazione di HEV costituisce un evento tutt'altro che sporadico.

La ricerca di HEV con tecnica nested RT-PCR, eseguita negli allevamenti italiani in precedenti studi, ha riportato prevalenze del 40% e del 100% (3;5) ma non sono disponibili dati riguardanti la sieroprevalenza.

Nel presente lavoro è stato eseguito un monitoraggio sierologico su campioni di sangue suino, prelevati in allevamenti ubicati nel Nord Italia e scelti in modo da ottenere un campionamento rappresentativo per quanto riguarda le diverse tipologie produttive e l'età degli animali.

MATERIALI E METODI

I campioni di sangue suino da sottoporre ad indagine sierologica per la ricerca di anticorpi anti-HEV sono stati raccolti nel primo semestre 2008, in concomitanza con il campionamento eseguito nell'ambito del monitoraggio sierologico del piano nazionale di eradicazione e sorveglianza della Malattia Vescicolare e sorveglianza della Peste Suina Classica. Il monitoraggio sierologico ha coinvolto 39 aziende (17 a ciclo aperto, 10 a ciclo chiuso e 12 ingrassi (tabella 1) distribuite sul territorio di competenza dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

Tabella 1: Dati riassuntivi relativi alle aziende sottoposte all'indagine sierologica per HEV.
Table 1: Data of swine herds submitted to HEV serological survey.

Tipologia d'allevamento	Numero di allevamenti testati	Consistenza media	N° medio di scrofe	Sieroprevalenza min-max	Sieroprevalenza media
Ciclo chiuso	10	2600	207	0-94,1	62%
Ciclo aperto	17	1767	268	21,6-100	66%
Ingrasso	12	2247	-	3,6-81,3	31%

Negli allevamenti a ciclo chiuso il numero medio di capi presenti era di 2600 (minimo 18, massimo 9740), in quelli a ciclo aperto di 1767 (minimo 69, massimo 4800) e per gli ingrassi di 2247 (minimo 1035, massimo 7700). Negli allevamenti a ciclo chiuso ed in quelli a ciclo aperto era presente un numero medio di riproduttori pari a 207 e 268 rispettivamente. Nella tabella 2 sono riportati i campioni testati per tipologia produttiva.

Tabella 2: Campioni sottoposti a test sierologico.

Table 2: Number of samples tested for HEV.

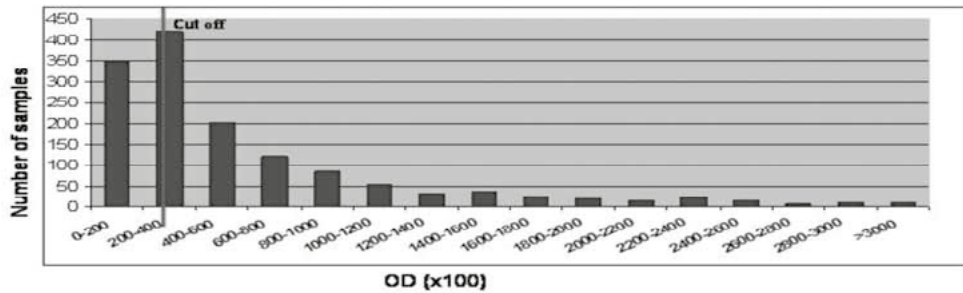
Tipologia produttiva	N° campioni
Scrofe	633
Lattonzoli	58
Magroncelli	133
Magroni	325
Grassi	273
Totale	1422

La media degli animali testati per allevamento è stata del 10% con valore massimo del 100% e minimo dello 0,36%. In totale sono stati testati 1422 campioni, impiegando un test ELISA indiretto del commercio (DIA.PRO®), utilizzato per la diagnosi sierologica di HEV nell'uomo ed opportunamente modificato per il suo impiego nel suino. Il test si è basato sull'impiego di micropiastre attivate con antigeni HEV specifici derivati da ceppi virali Messicani e Birmani (4). I campioni sono stati testati in un'unica diluizione 1/100 e gli anticorpi eventualmente presenti nei sieri, legati agli antigeni presenti sui pozzetti, sono stati messi in evidenza da un siero policlonale di capra del commercio (Serotec®) anti-IgG di suino coniugato con perossidasi (HRP). La successiva lettura delle piastre tramite spettrofotometro ha consentito la valutazione delle densità ottiche e la loro collocazione fra i risultati negativi o positivi per la presenza di anticorpi anti-HEV. Il valore di cut-off di 0,274 è stato calcolato sommando 3 deviazioni standard alla media aritmetica dei valori di OD di 80 controlli negativi provenienti dai suinetti SPF allevati presso lo Stabulario dell'IZSLER. Come controllo positivo è stato impiegato un siero suino ottenuto in seguito ad infezione sperimentale (7), mentre come controllo negativo il siero di un suino SPF dello Stabulario dell'IZSLER. Il test del χ^2 è stato impiegato per confrontare i risultati ottenuti. Un valore di $P < 0.01$ è stato considerato come soglia di significatività statistica.

RISULTATI

I valori di OD rilevati sono riportati nel grafico 1. I valori sono compresi tra 0,045 e 3,369, con una media di 0,52 (DS: 0,62). Usando il valore di cut-off di 0,274, 38 aziende su 39 (97,43%, 95% CI: 92,5-100%) hanno almeno un campione positivo e 714/1422 campioni di siero (50,21%, 95% CI: 47,7-52,8%) sono positivi alla ricerca di anticorpi anti-HEV.

Grafico 1: Valori di OD dei campioni testati per anticorpi anti-HEV
Figure 1: OD values of samples tested for HEV antibodies.



La media di OD dei valori positivi è di 0,914 (standard deviation: 0,67). La categoria produttiva caratterizzata dalla sieroprevalenza più elevata è risultata essere quella delle scrofe, con una percentuale di animali positivi pari al 70,6% (95% CI: 67-74,1%). Il numero più basso di animali sieropositivi è stato osservato tra i lattonzoli, con una percentuale del 12,1% mentre magroncelli, magroni e grassi hanno presentato percentuali di sieropositività rispettivamente del 30,8%, del 41,5% e del 30,8% (tabella 3). I campioni sono stati inoltre suddivisi arbitrariamente in due gruppi, in funzione dell'età degli animali (gruppo 1, costituito dalle scrofe e gruppo 2, costituito dalle altre categorie produttive e tendenzialmente con età inferiore a 7 mesi). In tal modo, l'analisi statistica dei risultati forniti dai due gruppi sopraccitati ha evidenziato nelle scrofe una frequenza di positivi significativamente maggiore rispetto agli animali del gruppo 2 ($\chi^2 = 166.91$ $P < 0.00001$).

Tabella 3: Campioni positivi suddivisi per tipologia produttiva
Table 3: Positive samples and production phases

Tipologia produttiva	N° campioni positivi	% (95% CI)
Scrofe	447 su 633	70,6 (67-74,1%)
Lattonzoli	7 su 58	12,1 (3,7-20,4%)
Magroncelli	41 su 133	30,8 (23-38,7%)
Magroni	135 su 325	41,5 (36,2-46,9%)
Grassi	84 su 273	30,8 (25,3-36,2%)
Totale	714 su 1422	50,2 (47,6-52,8%)

Gli allevamenti a ciclo aperto ed a ciclo chiuso sono stati arbitrariamente suddivisi in 2 gruppi sulla base del numero di riproduttori presenti (gruppo A aziende con >200 riproduttori e gruppo B aziende con <200 riproduttori). Le aziende del gruppo A hanno una frequenza di positivi significativamente maggiore rispetto alle aziende con meno di 200 riproduttori ($\chi^2 = 29.78$ $P < 0.00001$). Considerando la sieroprevalenza in relazione

alle tre tipologie produttive analizzate, questa si assesta in media intorno al 66% per le aziende a ciclo aperto, al 62% per le aziende a ciclo chiuso e al 31% per le aziende da ingrasso. All'interno dei tre gruppi sopraccitati esistono delle radicali differenze: tra i 17 allevamenti a ciclo aperto quattro allevamenti hanno presentato una sieroprevalenza superiore al 90%, sette tra il 60-90% e sei tra il 20-50%. Tra i 10 allevamenti a ciclo chiuso, due hanno presentato una sieroprevalenza maggiore al 90%, quattro tra il 60% e l'85%, due tra il 30-60% e due tra l'1% ed il 3%. Infine tra i 12 allevamenti di ingrasso, uno solo ha presentato una sieroprevalenza superiore all'80%, in tre aziende i valori erano compresi tra il 46 e il 66%, in cinque tra il 20 ed il 30%, ed in una la percentuale degli animali sieropositivi era inferiore al 5%.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

I risultati ottenuti dall'indagine sierologica per la ricerca di anticorpi anti-HEV hanno dimostrato una elevata percentuale di suini sieropositivi, sebbene con prevalenze differenti a seconda dell'età degli animali. Tali differenze sono dovute alla dinamica dell'infezione nella specie suina, ampiamente influenzata dall'andamento dell'immunità materna. In particolare la quantità di IgG assunte tramite il colostro dai suinetti e la durata dell'immunità passiva, sarebbero direttamente proporzionale al titolo anticorpale della madre. L'immunità passiva preserverebbe dall'infezione i suinetti mediamente fino alla nona settimana di vita, successivamente alla quale si osserverebbero la maggior parte delle sieroconversioni, con comparsa delle IgG intorno alla quindicesima settimana d'età. Non stupisce pertanto che la prevalenza più elevata sia presente nelle scrofe, come descritto anche negli allevamenti Spagnoli (11) e che nei magroncelli, animali fino 50 kg di peso (14-16 settimane di età) la percentuale di campioni positivi sia più bassa rispetto a quella riscontrata nei magroni (animali fino a circa 28 settimane d'età). Nei grassi la percentuale degli animali sieropositivi appare nuovamente in flessione rispetto ai magroni. Il rimescolamento di animali di diversa provenienza nelle aziende da ingrasso, potrebbe aver influenzato in tal senso il dato riportato. La percentuale di animali sieropositivi varia ampiamente da un allevamento all'altro, ed è pertanto possibile osservare aziende in cui la percentuale relativa di animali sieropositivi è prossima allo 0% ed altre dove questa raggiunge il 100%. Esiste tuttavia una maggiore prevalenza, indipendente dalla tipologia aziendale, negli allevamenti con più di 200 riproduttori ed in generale nelle aziende con una maggiore consistenza. In confronto ai dati di sieroprevalenza di altri Paesi europei, la nostra percentuale del 50% di sieropositivi si assesta sotto ai valori rilevati nel Regno Unito, 85,5% (2), in Spagna, 77,6% (11), e in Svezia, 58% (2), ma superiore a quella descritta in Germania (23,5%) (2). Il test ELISA impiegato, pur basandosi sull'impiego di antigeni provenienti da ceppi Birmani e Messicani di origine umana ed appartenenti rispettivamente ai genotipi I e II, ha dimostrato una buona efficienza nello svelare la presenza di IgG anti-HEV nei campioni di siero suino testati. Questo dimostra che i ceppi sopraccitati possiedono epitopi che vengono riconosciuti dalle IgG suine anti-HEV e che pertanto sono comuni a quelli presenti nei ceppi appartenenti al genotipo 3, tipico del suino e per il quale è stata dimostrata la presenza in Italia. In conclusione i dati ottenuti dal presente lavoro, evidenziano valori di sieroprevalenza piuttosto elevati ed indicativi di una attiva circolazione di HEV negli allevamenti suini del nord Italia.

Bibliografia

1. Aggarwal R., Krawczynski K. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2000 Jan;15(1):9-20.
2. Banks M., Heath G.S., Grierson S.S., King D.P., Gresham A., Girones R., Widen F., Harrison T.J. Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 2004 Feb 21;154(8):223-7.
3. Caprioli A., Martelli F., Ostanello F., Di Bartolo I., Ruggeri F.M., Del Chiaro L., Tolari F. Detection of hepatitis E virus in Italian pig herds. *Vet. Record* 2007; 161, 422-423.
4. Dawson G.J., Chau K.H., Cabal C.M., Yarbough P.O., Reyes G.R., Mushahwar I.K. Solid-phase enzyme linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. *Journal of virological methods*. Giugno 1992. Vol. 38, Issue 1, 175-186.
5. Di Bartolo I., Martelli F., Inglese N., Pourshaban M., Caprioli A., Ostanello F., Ruggeri F.M. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet. Microbiol.* 2008
6. Kasorndorkbua C., Guenette D.K., Huang F.F., Thomas P.J., Meng X.J., Halbur P.G.. (2004). Route of Transmission of Swine Hepatitis e in Pigs. *Journal of Clinical Virology*. 5047-5052.
7. Lombardi G., Pavoni E., Faita R., Losio M.N., D'Abrosca F., Luppi A., Gelmetti D., Cordioli P., Boni P. Infezione sperimentale in suini SPF con feci di campo contenente il virus dell'epatite E (HEV). *Atti della Società Italiana di patologia ed allevamento dei suini*. 2008, p.451-458.
8. Lu L., Li C., Hagedorn C.H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Reviews in medical virology*. 2006 Jan-Feb;16(1):5-36.
9. Meng X.J., Purcell R.H., Halbur P.G., Lehman J.R., Webb D.M., Tsareva T.S., Haynes J.S., Thacker B.J., Emerson S.U. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94: 9860-9865.
10. Reyes G.R., Yarbough P.O., Tam A.W., Purdy M.A., Huang C.C., Kim J.S., Bradley D.W., Fry K. Hepatitis E virus (HEV): the novel agent responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Gastroenterologia Japonica*. 1991 Lugl;26 Suppl 3:142-7.
11. Seminati C., Mateu E., Peralta B., de Deus N., Martin M. Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J*. 2008 Jan;175(1):130-2.
12. Williams T.P.E., Kasorndorkbua C., Halbur P.G., Haqshenas G., Guenette D.K., Toth T.E., Meng X.J. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001 Sept, p. 3040-3046, Vol. 39, No. 9.