



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Convegno

**L'ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE
PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA:
*principali risultati e loro trasferibilità
operativa***



L'albero della vita

21 giugno 2018

*IZS Lazio e Toscana – Sede di Roma,
Via Appia Nuova 1411*

Epatite E

L'infezione da virus dell'Epatite E
nella regione Lazio e Toscana: una
zoonosi emergente

Ricerca corrente cod. LT08/11RC

Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti

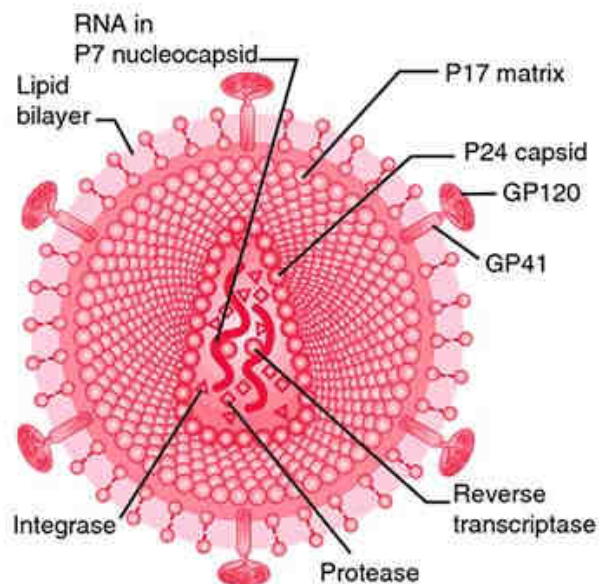
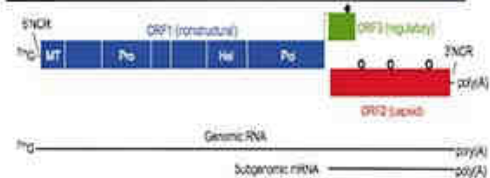


- ✓ La malattia è causata dal virus dell'epatite E (HEV)
- ✓ I suidi sono riconosciuti come il principale serbatoio d'infezione
- ✓ HEV si trasmette all'uomo attraverso alimenti e acque contaminati
- ✓ Sintomi lievi in persone immunocompetenti, ma gravi in persone immunocompromesse (tapianti)
- ✓ Tasso di letalità 0,5% fino al 25% in donne in gravidanza
- ✓ Sintomi: astenia, febbre, anoressia, vomito e ittero, forte aumento di alanina transaminasi (ALT).
- ✓ IgM anti-HEV fino a 3 mesi, IgG anti-HEV oltre 48 mesi o più.

Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti



VIRUS HEV



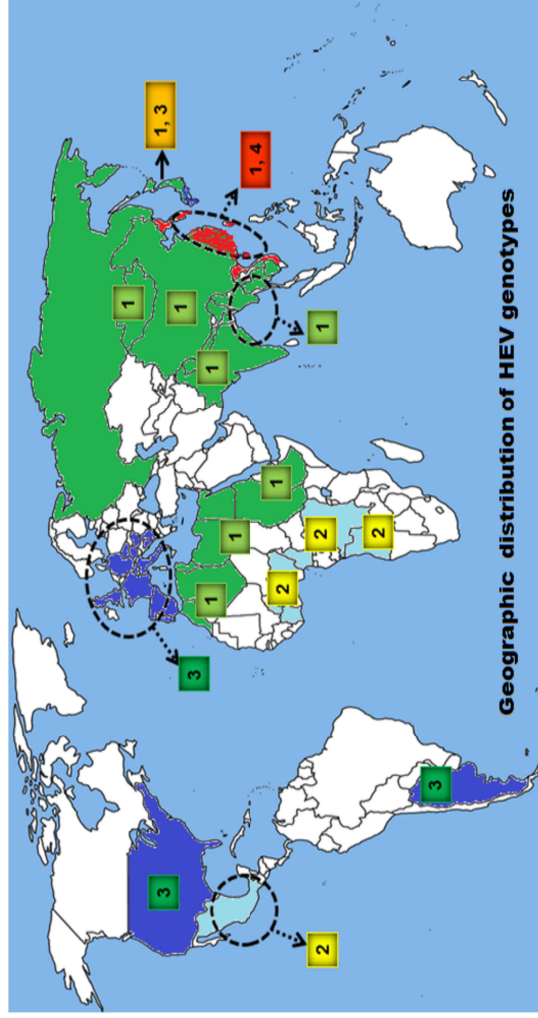
- Famiglia: *Hepeviridae*
- Genere: *Orthohepevirus*
- Specie: *Orthohepevirus A*
- Genoma: RNA+ monocatenario
- Sierotipi: 1
- Genotipi: 4 patogeni per l'uomo (da HEV-1 a HEV-4) e vari subgenotipi

Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti



GENOTIPI HEV NEL MONDO

- HEV-1: Asia-Africa (uomo)
 HEV-2: Messico-Nigeria-Chad
 (uomo-animali)
 HEV-3: Asia-Europa-Oceania-Nord
 e Sud America (uomo-animali)
 HEV-4: Asia-Europa raro (uomo-
 animali)
 HEV-5-6: Giappone (cinghiali)
 HEV-7: Medio Oriente (cammelli)
 HEV-8: Cina (cammello della
 Battriana)



Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti



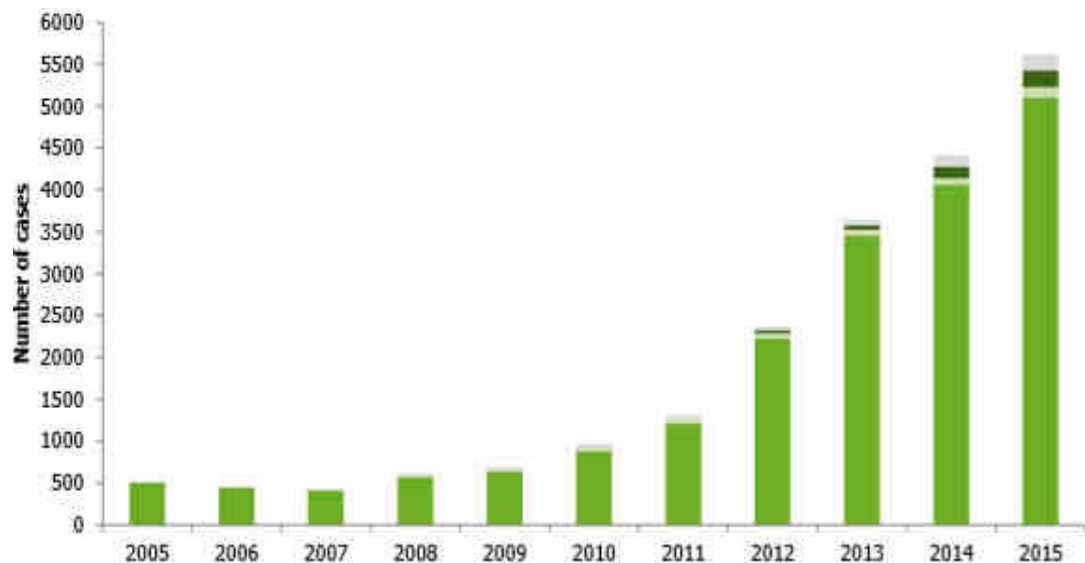
Epatite E: la malattia nell'uomo

- Considerata un problema emergente di sanità pubblica
- L'OMS stima annualmente 20 milioni di infezioni nel mondo con 3,3 milioni di epatiti acute
- Il 5-15% delle epatiti non A-C in EU/EEA sono causate da HEV

Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti



Rapporto ECDC 2005-2015



514 → 5617

- Nessuna sorveglianza ma dati forniti
- Sorveglianza iniziata tra il 2011 e il 2016
- Sorveglianza iniziata tra il 2006 e il 2010
- Sorveglianza iniziata dal 2005 o prima

Il numero di casi di HEV confermati dal 2005 al 2015 è aumentato ogni anno. Tra il 2011 e il 2015 i casi sono aumentati di tre volte. In totale, 28 decessi associati all'infezione da HEV sono stati segnalati da cinque paesi tra il 2005 e il 2015.

<https://ecdc.europa.eu/en/news-events/ecdc-report-10-fold-increase-hepatitis-e-cases-eueea-between-2005-and-2015>

Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti



L'infezione da virus dell'Epatite E nella regione Lazio e Toscana: una
zoonosi emergente

Ricerca corrente cod. LT08/11RC

UNITÀ OPERATIVA	SIGLA	SEDE	ATTIVITÀ
01 IMS: IZSLT Direzione Operativa Controllo degli Alimenti	IZSLT 01	Roma	Organizzazione prelievi, esecuzione prove, coordinamento
			Prelievo campioni
			Messa a punto ed esecuzione prove di PCR real time
			Sequenziamento genico
02 EMS Facoltà di Scienze MM.FF.NN dell'Università di Roma "Tor Vergata"	UniRoma2	Roma	Analisi sequenze
			Sviluppo ed esecuzione prove ELISA

Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti



- ✓ Studiare la prevalenza di HEV-RNA in matrici d'origine animale per valutare il rischio sanitario per l'uomo, con particolare attenzione alle matrici carnee di suidi.
- ✓ Determinare la prevalenza di anticorpi anti-HEV in donatori di sangue e/o in categorie a rischio di zoonosi.
- ✓ Ottenere una mappa molecolare dei genotipi HEV mediante sequenziamento di geni e analisi filogenetica.
- ✓ Ottimizzare le metodiche di diagnosi diretta (PCR) e indiretta (ELISA)



Campioni animali:

- 647 campioni di fegato di cinghiale
- 97 battute di caccia per il programma di abbattimenti selettivi
- 17 diversi comuni
- 3 stagioni venatorie consecutive
- Periodo 16/01/2012 al 16/01/2015

Donatori volontari:

51 sieri prelevati dai cacciatori coinvolti nelle battute di caccia e forniti dalla ASL Viterbo. I campioni, dopo il prelievo, sono stati resi anonimi.

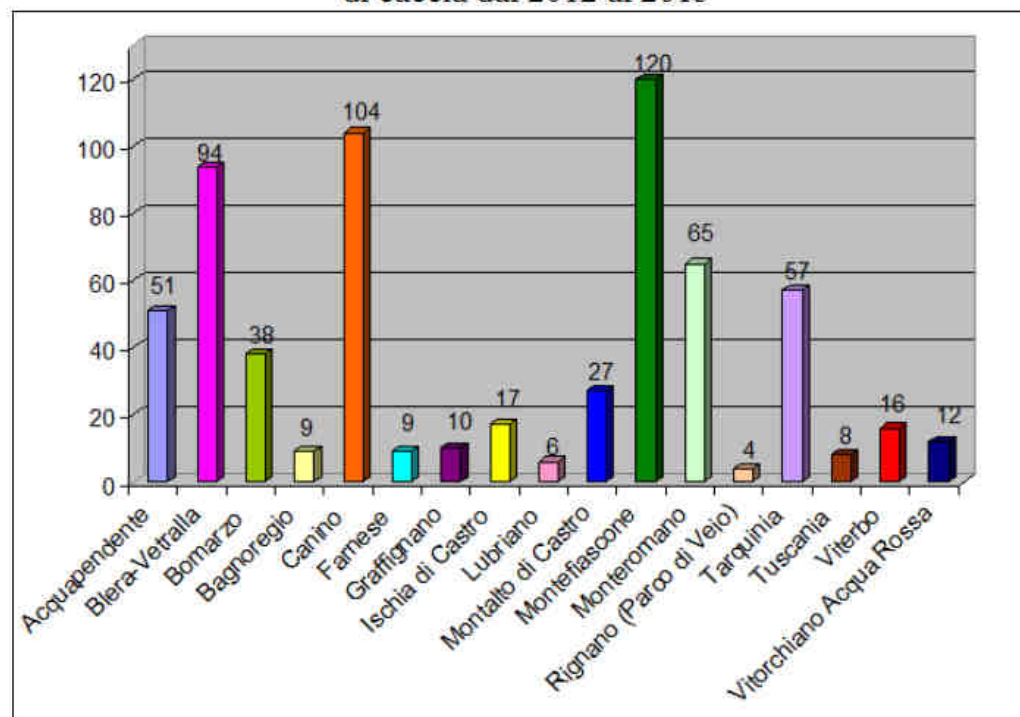


Epatite E: aree di campionamento

Tabella 1. Numero di animali campionati per Comune
di caccia dal 2012 al 2015

COMUNE	n° ANIMALI
Acquapendente	51
Blera-Vetralla	94
Bomarzo	38
Bagnoregio	9
Canino	104
Farnese	9
Graffignano	10
Ischia di Castro	17
Lubriano	6
Montalto di Castro	27
Montefiascone	120
Monteromano	65
Rignano (Parco di Veio)	4
Tarquinia	57
Tuscania	8
Viterbo	16
Vitorchiano Acqua Rossa	12
TOTALE	647

Grafico 1. Numero di animali campionati per Comune
di caccia dal 2012 al 2015



Metodi d'indagine di laboratorio: scelti sia dalla letteratura scientifica sia dal commercio.

Metodi diretti: RT-PCR real time, RT-PCR nested e sequenziamento genico per la genotipizzazione dei campioni positivi.

Metodi indiretti: ELISA per la determinazione di IgM e IgG anti-HEV nel siero di persone a rischio di zoonosi.



Estrazione del virus dalla matrice: adattamento della metodica per la ricerca del virus HAV nei molluschi bivalvi ISO/TS 15216-2:2013, scelta per similitudine HEV-HAV

Controllo di processo (CP): valutazione della qualità dell'RNA e l'efficienza di estrazione (kit CeeramTools® Mengo Extraction Control, Francia). I campioni idonei se ΔCt (RNA campione-RNA CP) $>1\%$

ΔCt	Calcolo del recupero (%)
$\Delta Ct > 3.3$	(numero di copie RNA estratto/Numero di copie 1° punto curva standard) x 100
$\Delta Ct < 3.3$	(numero di copie RNA estratto 1:10/Numero di copie 2° punto curva standard) x 100





Epatite E: metodi molecolari

Metodi di screening rt-PCR real time:

hepatititsE@ceeramTools™.health
(Francia)

Jotikumar et al. 2006. J Virol Meth. 131: 65-71



Negativi



Positivi

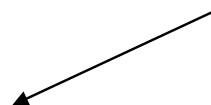


Nested rt-PCR

Inoue et al. 2006. J Virol Meth.137:325-33



Sequenziamento
Regione ORF2/ORF3



Analisi sequenze

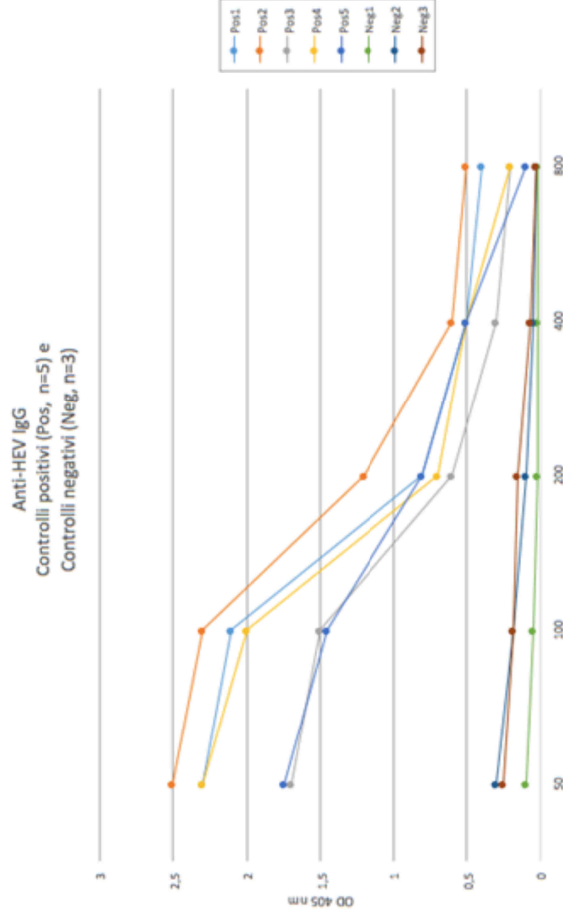
(Software Geneious BioMatters, Nuova Zelanda)

Assegnazione al genogruppo per confronto
banche dati



ELISA indiretta per IgM anti-HEV (IgM HEV ELISA kit, Adaltis, Italia)

ELISA indiretta per IgG anti-HEV (Metodo sviluppato "in house" UO2
EMS, UniRoma2 Tor Vergata)



Quantità fissa di antigene,
diluizione dei sieri 1:100,
anticorpi secondari anti-IgG,
coniugati con Perossidasi



Risultati: HEV in fegati di cinghiale

COMUNE	n° ANIMALI Campionati	ESAMINATI CeeramTools® Mengo	Analizzabili hepatitisE@ceeramTools ™	Positivi	Negativi
Acquapendente	51	46	42	3	39
Blera-Vetralla	94	91	85	10	75
Bomarzo	38	35	32	3	29
Bagnoregio	9	4	3	1	2
Canino	104	100	86	15	71
Farnese	9	10	8	3	5
Graffignano	10	10	8	1	7
Ischia di Castro	17	15	10	2	8
Lubriano	6	6	5	1	4
Montalto di Castro	27	25	19	5	14
Montefiascone	120	114	102	22	80
Monteromano	65	62	50	1	49
Rignano (Parco di Veio)	4	4	3	1	2
Tarquini	57	45	40	26	14
Tuscania	8	7	5	1	4
Viterbo	16	15	10	1	9
Vitorchiano Acqua Rossa	12	12	8	2	6
TOTALE	647	601	516	98	418

18.90% positivi
per HEV-RNA

La suddivisione in
classi d'età ha
evidenziato una
maggiore positività
nei soggetti giovani
≤ 1 anno

HEV genotipo 3,
con 4 diversi
subgenotipi:
3a, 3c, 3f e un
subgenotipo non
noto in "HEVnet "



Risultati: anticorpi anti-HEV

51 cacciatori volontari hanno donato sangue per i saggi ELISA:

ELISA IgM anti-HEV, tutti i campioni negativi

ELISA IgG anti-HEV, 20 positivi (39%)

La presenza di campioni positivi per IgG anti-HEV, ma negativi per IgM anti-HEV, indica l'avvenuta pregressa esposizione al virus.



Epatite E: IgG anti-HEV nell'uomo

Europa

VS

Italia

Grecia	0.26%	Int. J. Artif. Organs 2004;27:42-7
Italia	1.3%	2015 doi:10.3390/ijms161025711
Spagna	1-3.9%	
Portogallo	4%	
Scozia	4.7%	
Svizzera	4.9%	
Germania	6.8%	
Svezia	9.3%	
Serbia	15%	
Inghilterra	16-25%	
Danimarca	20.6%	
Olanda	26.7%	
Francia	52%	

2011-2014

IgG anti-HEV 5.38% (Lazio)

Lanini et al. doi:10.1136/bmjopen-2014-0071102002-2011

2015-2016

IgG anti-HEV 8.7% (Dati nazionali)

Spada et al. doi:10.2450/2018.033-18

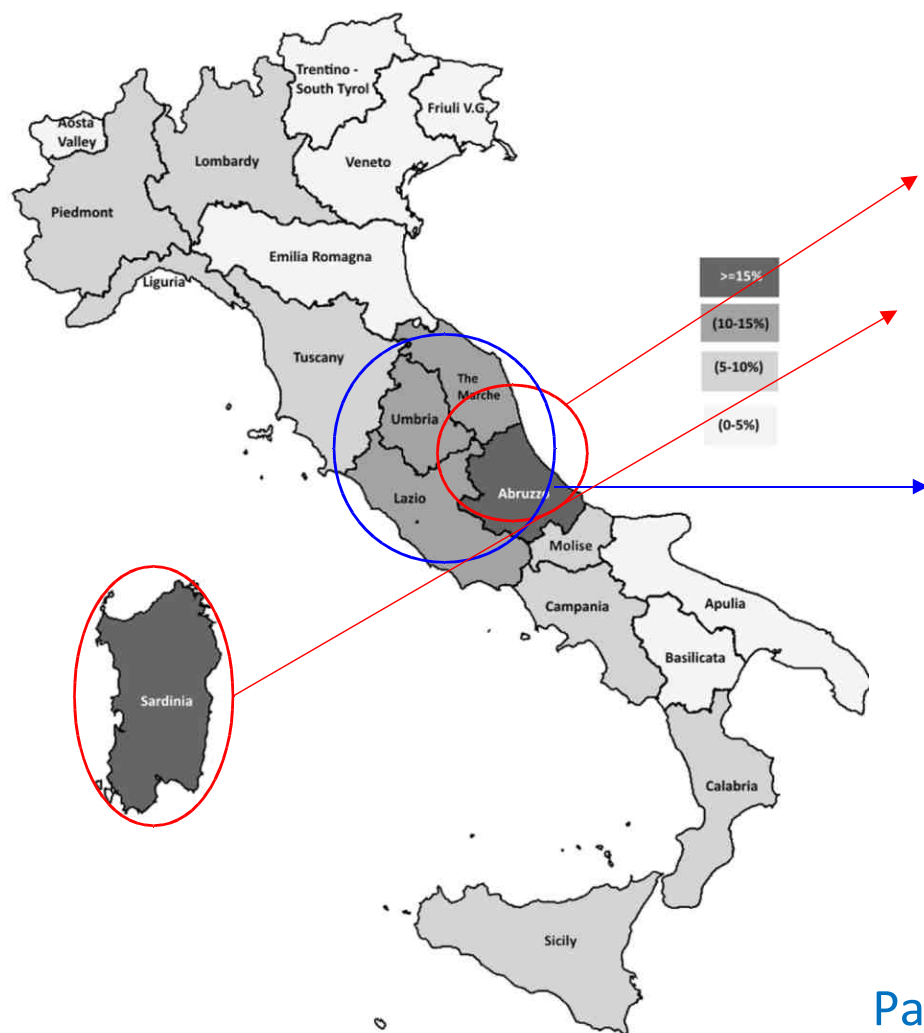
Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Prevalenza di IgG anti-HEV nelle regioni italiane



Spada et al. Blood
Transfus.

DOI 10.2450/2018.0033-18

Abruzzo >15%
(22,8%)

Sardegna >15%
(19,9%)

Lazio – Umbria – Marche 10-15%

10.011 donatori di sangue

Analisi ELISA per IgM e IgG

Saggi rtPCR per RNA virale

Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti



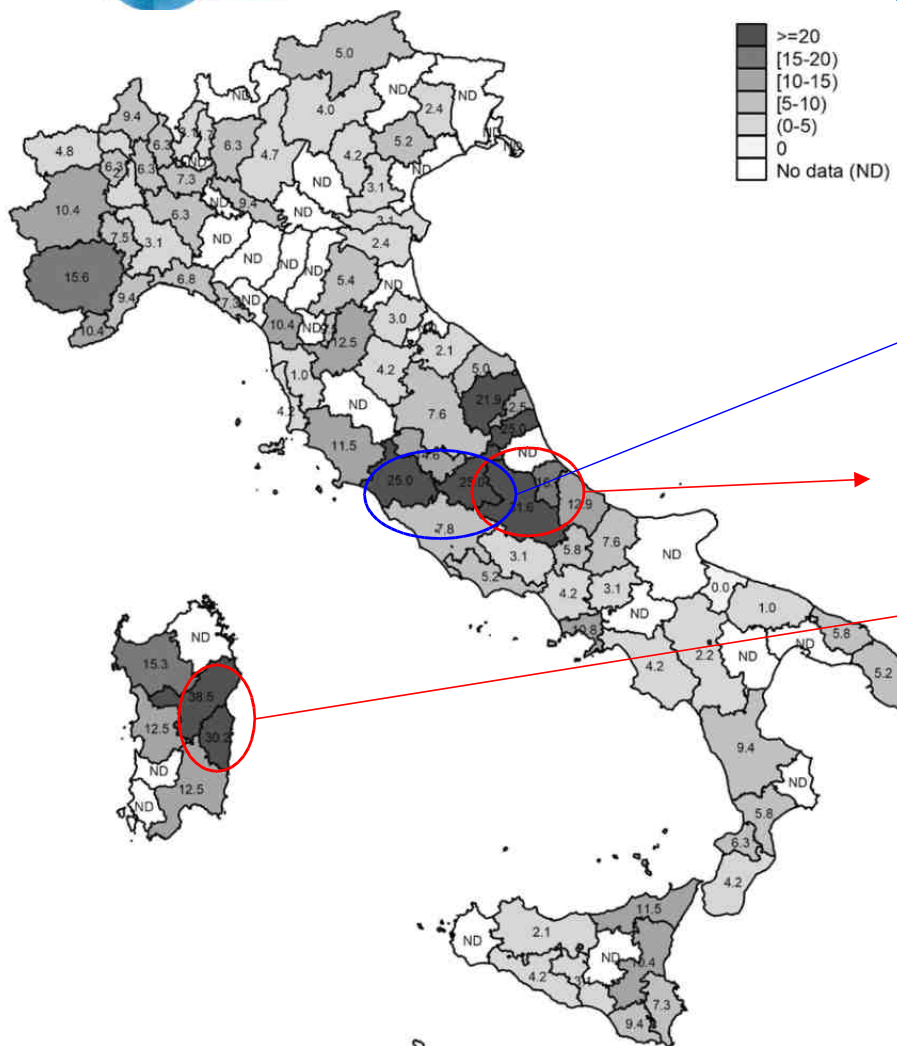


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Prevalenza di IgG anti-HEV in base ai centri trasfusionali

Spada et al. Blood
Transfus.

DOI 10.2450/2018.0033-18

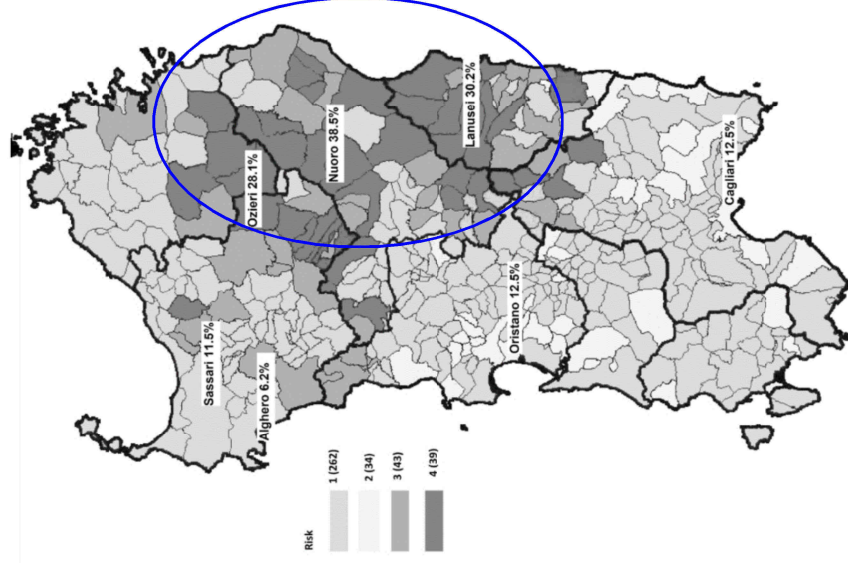


Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti



Aree di allevamento brado del suino

Spada et al. Blood Transfus.
DOI 10.2450/2018.00333-18



Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti



Standardizzazione/armonizzazione necessaria per:

Definizione unica di caso: varia a seconda dei paesi UE/EEA

Metodi diagnostici:

- Metodo sierologico armonizzato (sieroprevalenza)

- Metodo di estrazione HEV standardizzato da varie matrici (ISO15216?)

- Metodo di purificazione dell'RNA armonizzato

- Armonizzazione per tipizzazione, subtipizzazione, comparazione di ceppi e attribuzione delle sorgente d'infezione

Genotipizzazione:

- Definizione di soglie per l'attribuzione del tipo, subtipo e similitudine dei ceppi

Miglioramento delle colture cellulari

Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti





Piani di Sorveglianza in EU

Dei 31 Stati membri dell'UE/EEA, solo 20 paesi hanno sistemi di sorveglianza e protocolli di test specifici per HEV ben definiti.

Solo in 12 la sorveglianza è obbligatoria.

10 Stati membri non hanno piani di sorveglianza per HEV.

<https://ecdc.europa.eu/en/news-events/ecdc-report-10-fold-increase-hepatitis-e-cases-eueea-between-2005-and-2015>

Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti



- La popolazione di cinghiali esaminata rappresenta una fonte di contaminazione per l'uomo attraverso alimenti e ambiente
- Gli animali giovani, età ≤ 1 anno, trovati HEV-positivi, sono più numerosi degli adulti. La caccia selettiva di animali adulti e la cottura delle carni potrebbe ridurre il rischio associato al consume di carne di cinghiale
- La sieroprevalenza nel gruppo di cacciatori è più elevata di quella della popolazione generale della stessa zona (39% vs 25% nei donatori sani) a riprova della trasmissione zoonotica da animale a uomo.
- Il sequenziamento della regione di sovrapposizione ORF2/ORF3, ha consentito di individuare il genotipo 3 di HEV in tutti i campioni sequenziati e di definirne il subgenotipo (3a, 3c, 3f e un subgenotipo non noto)



- Per la divulgazione dei risultati è stato organizzato un corso ECM presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana "M. Aleandri" in data 8/11/2016.
- Per la comunicazione delle attività alla comunità scientifica è stato prodotto, in collaborazione con i veterinari della ASL di Viterbo, un poster dal titolo "Presenza del virus dell'epatite E nei cinghiali (*Sus scrofa scrofa*) nella regione Lazio" presentato al convegno AIVI di Sorrento il 28/9/2015.
- In corso di pubblicazione su rivista scientifica Euro Surveillance un elaborato dal titolo: Occurrence and levels of Hepatitis E virus in wild boar intended for domestic consumption.



2016: Virus dell'epatite E: studio nazionale per l'analisi del rischio di trasmissione alimentare (CCM2016)

Finalizzato alla sorveglianza del virus nei suini e negli alimenti per la definizione del rischio al consumatore

2017: Epatite virale da HEV trasmessa da alimenti. Realizzazione nelle regioni Lazio e Toscana di un piano interdisciplinare di sorveglianza per l'acquisizione di dati sulla circolazione del virus nel ciclo uomo-animale (LT03/17RC)

Implementare ulteriormente la connessione tra la sanità animale e quella umana, per rendere più fluente sistema di scambio delle informazioni in tempo reale, e dare supporto alle indagini epidemiologiche e al coordinamento delle stesse in caso di focolai di epatite E.

Paola De Santis – D.O. Controllo Alimenti



A vostra disposizione per domande e chiarimenti

