



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

**L'EVOLUZIONE DELL'INFEZIONE DEL VIRUS DELL'EPATITE E
NELLA REGIONE MARCHE**

THE EVOLUTION OF HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN THE MARCHE
REGION

Tesi di laurea Magistrale di:

Francesco Montesi

Relatore:

Patrizia Bagnarelli

Sessione: Sessione Autunnale (Ottobre 2021)

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	4
2. CENNI STORICI.....	6
2.1 Cenni storici	
3. EPIDEMIOLOGIA.....	8
3.1 Epidemiologia di HEV	
4. EZIOLOGIA.....	11
4.1 Tassonomia	
4.2 Caratteristiche morfologiche e strutturali	
4.3 Organizzazione del genoma	
5. Ciclo replicativo.....	13
5.1 Introduzione	
6. DIAGNOSI.....	18
6.1 Diagnosi	
6.2 Metodi di ricerca diretti	
6.3 Metodi di ricerca indiretti	
7. TERAPIA E PREVENZIONE.....	22
7.1 Terapia	
7.2 Prevenzione	
7.3 Immunoprofilassi	
8. MANIFESTAZIONI CLINICHE.....	24
8.1 Manifestazioni cliniche	
8.2 Manifestazioni extraepatiche	
9. PATOGENESI DELL'INFEZIONE.....	27
9.1 Modalità di patogenesi	
9.2 Meccanismi patogenetici	
9.3 Il contributo dell'immunità umorale	

9.4 Immunopatogenesi in donne gravide	
9.5 Patogenesi dell'infezione cronica	
10. RAZIONALE DELLO STUDIO.....	32
11. MATERIALI E METODI.....	33
11.1 Raccolta dei campioni	
11.2 Estrazione dell'acido nucleico	
11.3 Retrotrascrizione e amplificazione	
11.4 Amplificazione nested	
11.5 Elettroforesi capillare	
11.6 Reazione di sequenza	
11.7 Sequenziamento	
11.8 Lettura delle sequenze	
11.9 Composizione del dataset di sequenze	
11.10 Analisi filogenetica	
12. RISULTATI.....	42
12.1 Genotipizzazione	
12.2 Valutazioni clinico-epidemiologiche	
12.3 Sottotipizzazione	
13. DISCUSSIONE.....	51
13.1 Discussione	
13.2 L'approccio "one health"	
14. BIBLIOGRAFIA.....	54

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite E (HEV) è un virus di recente identificazione (inizi anni '80 del secolo scorso) e la sua importanza come patogeno umano è andata progressivamente aumentando nel corso degli ultimi anni con l'accumularsi delle evidenze relative alla sua patogenesi e diffusione epidemiologica.

HEV causa nell'uomo un'epatite acuta generalmente autolimitante e clinicamente indistinguibile da quella causata da altri agenti infettivi epatotropi quali per esempio il virus dell'epatite A (HAV) con il quale HEV condivide la principale modalità di trasmissione: la via oro-fecale.

Le caratteristiche epidemiologiche dell'infezione sono però peculiari: nei Paesi endemici, ovvero nelle regioni in via di sviluppo con condizioni igieniche-sanitarie scadenti, HEV determina accanto a forme sporadiche di epatiti anche importanti forme epidemiche prevalentemente legate al consumo di acque contaminate; nelle regioni industrializzate sono rilevabili prevalentemente infezioni sporadiche o di importazione (soggetti che rientrano da zone endemiche) o infezioni autoctone legate al consumo di alimenti infetti.

Per questo motivo, quale causa di malattia a trasmissione alimentare, HEV ha assunto negli ultimi anni una sempre maggior rilevanza in termini di rischio per la salute pubblica e, data la possibilità di infettare oltre all'uomo diverse altre specie animali, questa infezione oggi è considerata una zoonosi emergente.

Al fine di contenere l'emergenza delle infezioni da HEV si sono organizzate negli ultimi anni delle attività di sorveglianza e di controllo integrate tra medicina umana e medicina veterinaria, applicando cioè in questo ambito come per altre infezioni per le quali esiste un importante serbatoio animale, il concetto di One Health. L'espressione One Health fu proposta nel 2004 proprio per esaltare il concetto di multidisciplinarietà nella promozione della salute, inteso come completo benessere fisico e mentale nell'uomo.

In Italia l'attività di sorveglianza a carico di tutte le epatiti virali acute viene svolta dal Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA). Implementato nel 1985 il SEIEVA è coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità e collegato alle ASL e ai Laboratori di Riferimento Regionali a formare una rete nazionale di sorveglianza epidemiologica e virologica tramite cui è possibile monitorare l'incidenza della malattia e il contributo relativo dei diversi fattori di rischio. Questa Sistema Integrato ha poi l'obiettivo, valutati gli input Regionali, di definire le misure preventive prioritarie da adottare.

In questa tesi, dopo un aggiornamento sugli aspetti più rilevanti dell'infezione da HEV, verranno presentati i risultati di uno studio retrospettivo riguardante i casi di epatite acuta non A/non B in pazienti ricoverati in strutture ospedaliere della Regione Marche per la cui diagnosi differenziale è stata affidata al Laboratorio di Virologia dell'Azienda Ospedali Riuniti di Ancona.

CAPITOLO 2. CENNI STORICI

2.1 Cenni storici

Nella storia dell'uomo non sono rari i casi documentati di focolai epidemici di epatite acuta che si sono verificati in periodi dominati da guerre, carestie, catastrofi naturali, e dunque caratterizzati da scarse condizioni igienico-sanitarie, predisponenti la popolazione all'esposizione con alcuni tipi di virus a trasmissione oro-fecale che trovano nell'ambito di questo basso tenore di vita l'occasione adatta per propagarsi e dar potenzialmente luogo ad eventi epidemici.

Le epidemie causate da questo tipo di virus sono generalmente a sorgente comune ed è questo il caso di un'epidemia di epatite acuta scoppiata nel 1956 a New Delhi, la cui sorgente di contagio era rappresentata da un sistema di impianti idrici per la distribuzione dell'acqua potabile (presumibilmente contaminata) a gran parte della città⁽¹⁾.

Episodi epidemici in una capitale densamente affollata come New Delhi nella quale gran parte della popolazione vive in condizioni igienico-sanitarie assai precarie non sono una novità, tuttavia le peculiari caratteristiche cliniche ed epidemiologiche dell'infezione differivano da quelle tipiche dei focolai causati da altri virus epatotropi come HAV, la cui endemicità nel Paese è ormai da lungo tempo confermata.

Alcune di queste evidenze come ad esempio il lungo periodo di incubazione (40 giorni circa), l'età media straordinariamente alta dei contagiati (27 anni) ed il basso tasso di fatalità (0,009%, fatta eccezione per le donne gravide il cui tasso saliva al 10%) supportate dall'esito negativo al test per le IgM anti-HAV nei pazienti, fecero supporre l'esistenza di un agente eziologico non ancora identificato ⁽¹⁾.

Il nuovo virus fu identificato da un virologo russo, Mikhail Balayan solo nei primi anni '80 del secolo scorso quando, in seguito ad una epidemia di epatite non-A/non-B in una guarnigione di soldati al fronte afgano, ebbe l'intuizione di riprodurre la malattia su se stesso.

Immune per HAV e negativo per HBVsAg, ingerendo un estratto purificato del materiale fecale ottenuto dagli individui infetti. Fu possibile in questo modo identificare le particelle virali con tecniche di immuno-elettromicroscopia (IEM) nei suoi campioni fecali raccolti sequenzialmente durante un periodo di circa 60 giorni post-inoculo ⁽²⁾.

Il rialzo delle transaminasi accompagnò lo sviluppo di una sintomatologia caratterizzata inizialmente da astenia, dolori addominali, vomito e febbre, per poi evolvere verso un'epatite acuta intorno al 50^oesimo giorno post-inoculo: queste

evidenze furono sufficienti a mettere in luce l'esistenza di un'agente responsabile di una forma di epatite epidemica non A, non B (ENANB).

All'epoca mancava ancora una conoscenza adeguata sull'acido nucleico del virus ed una caratterizzazione biochimica del virione, tanto che Balayan ipotizzò che dovesse essere inserito nella famiglia dei *Picornaviridae* (alla quale appartiene HAV) in virtù delle molteplici caratteristiche in condivisione, quali la modalità di trasmissione oro-fecale ed i sintomi della malattia.

Il punto di svolta venne nel 1990 quando Reyes caratterizzò una specifica porzione del genoma virale che corrispondeva ad una RNA polimerasi RNA dipendente (enzima presente nei ribovirus a polarità positiva), inoltre fu trovata un'elevatissima similarità con delle sequenze virali presenti in campioni fecali infetti provenienti da diverse aree geografiche nelle quali si erano segnalate delle epidemie da ENANB ⁽³⁾; tuttavia il virus fu inizialmente classificato nella famiglia *Caliciviridae* in base alle dimensioni del virione, in seguito furono creati la famiglia *Hepeviridae* e il genere *Hepevirus* con HEV come unico membro, il cui nome è stato assegnato usando la quinta lettera dell'alfabeto, dopo i quattro virus dell'epatite già conosciuti.

Per più di dieci anni dopo la sua scoperta si è ritenuto che HEV fosse un virus esclusivamente a circolazione umana e che fosse unicamente presente in aree geografiche caratterizzate da uno scarso tenore di vita, le cui precarie condizioni igienico-sanitarie ne agevolassero la modalità di trasmissione fecale-orale; solamente nei primi anni '90 furono descritti in Europa i primi casi autoctoni di pazienti infetti non rientrati da Paesi in cui l'infezione era endemica.

Negli stessi anni dei virus HEV-like furono isolati e sequenziati in campioni biologici di origine animale, mettendo quindi in luce il carattere zoonotico dell'infezione ⁽⁴⁾.

CAPITOLO 3. EPIDEMIOLOGIA

3.1 Epidemiologia di HEV

Fino al decennio scorso si riteneva che l'infezione da HEV fosse diffusa principalmente nei Paesi in via di sviluppo e per questo nei Paesi occidentali gli approfondimenti diagnostici con ricerca di HEV, nei casi di epatite acuta non A/non B, venivano normalmente fatti solo negli individui provenienti da aree endemiche (casi di importazione e criterio epidemiologico).

Con l'introduzione di test specifici per HEV nella diagnosi differenziale di tutti i casi di epatite acuta, è apparso evidente che il virus è ubiquitario (vedi figura 3.1) ed anche nei Paesi industrializzati può determinare, non infrequentemente, casi di infezione cosiddetta autoctona perché non legata dal punto di vista epidemiologico a viaggi recenti in aree endemiche.

The two faces of hepatitis E

Genotype 3 primarily spreads through pork and causes "silent epidemics" in developed countries, as does genotype 4. Genotypes 1 and 2 spread through dirty water and cause outbreaks, often with many deaths, in the developing world.

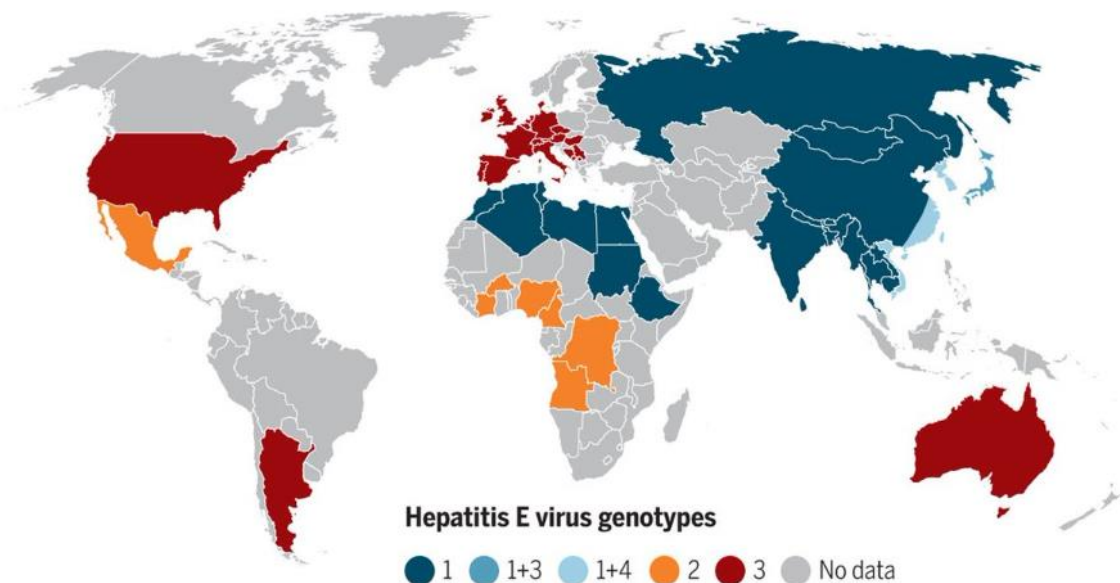


Figura 3.1. Distribuzione globale di HEV. "Science magazine", 2016.

E' quindi possibile delineare a livello mondiale due differenti scenari epidemiologici:

- 1) Nelle regioni in via di sviluppo, in particolare in quelle del sud-est asiatico e dell'Africa, regioni in cui le condizioni igienico sanitarie sono precarie, dove l'infezione da HEV è endemica. In queste zone HEV è causa di epatite acuta principalmente in giovani adulti e si presenta sia in forma di casi sporadici sia, occasionalmente, in forma di importanti focolai epidemici.

I principali genotipi circolanti sono HEV1 (ceppi asiatici) e HEV2 (ceppi africani e messicani), la cui trasmissione interumana avviene prevalentemente per via fecale-orale attraverso l'ingestione di acqua contaminata da materiale fecale di soggetti infetti.

- 2) Nei Paesi industrializzati dove l'infezione è di origine zoonotica ed il reservoir è costituito principalmente da animali della selvaggina, come cinghiali, cervi, conigli, ratti, volpi ed alcune specie di chiroteri, tuttavia i sistemi di tracciamento dell'infezione messi in atto dai sistemi di sorveglianza nazionali (per quanto l'operazione di tracciamento dei casi risulti estremamente complessa) suggeriscono che un importante ruolo sia assunto dagli allevamenti di maiali.

Da un punto di vista epidemiologico l'infezione autoctona da HEV in questi Paesi è molto diversa rispetto a quella nei Paesi in via di sviluppo, la malattia è sostenuta dai genotipi HEV3 e HEV4 e raramente si presenta in forma di focolai epidemici, il contagio avviene spesso all'interno del nucleo familiare e solitamente è associato al consumo di carne di suino poco cotta; l'infezione colpisce in maggior misura i soggetti di sesso maschile (con un rapporto maschi: femmine di 3:1, vedi la figura 3.2) e l'età media dei contagiati è di 60 anni ⁽⁵⁾.

Questi dati suggeriscono che altri fattori ambientali svolgano un ruolo di primo piano nella diffusione della malattia, appare infatti evidente come un più alto consumo di alcol sia associato ad una maggiore probabilità di sviluppare la sintomatologia epatica ⁽⁶⁾.

Negli ultimi dieci anni in Europa è stato segnalato un numero crescente di casi autoctoni legati alla trasmissione zoonotica del genotipo HEV 3, tanto che nel 2013 l'infezione ha interessato circa 28 milioni di persone nel mondo ⁽⁷⁾; è inoltre responsabile di 3,4 milioni di casi sintomatici all'anno, con un numero di morti che va dai 44000 ai 47000 (più del 3,3 % di tutte le epatiti virali).

La principale via di trasmissione in Europa è costituita dagli alimenti, legata al consumo di prodotti alimentari fatti di carne di suino cruda o poco cotta e di carne di cinghiale.

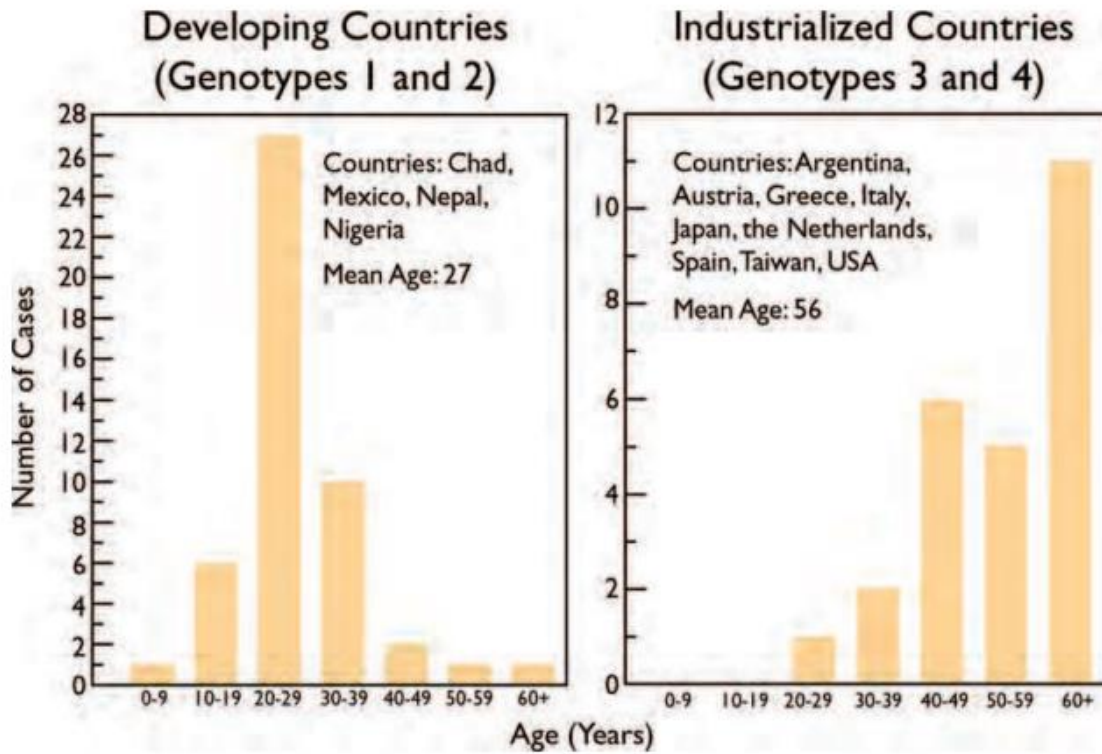


Figura 3.2. La media dei pazienti affetti da sintomatologie correlate ad un'infezione da HEV differisce tra i genotipi: la media è di 27 anni per i genotipi 1 e 2, mentre è di 56 anni per i genotipi 3 e 4.

CAPITOLO 4. EZIOLOGIA

4.1 TASSONOMIA

HEV è classificato nella famiglia *Hepeviridae*, genere *Orthohepevirus*.

I membri di questo genere infettano un ampio spettro di specie di mammiferi, incluso l'uomo, suini domestici e selvatici, cervi, pecore, conigli, cammelli (*Orthohepevirus A*); ratti, furetti, toporagni, visoni (*Orthohepevirus C*), pipistrelli (*Orthohepevirus D*), uccelli (*Orthohepevirus B*).

Virus ancora non classificati sono stati isolati in alci e volpi.

Dalla fine degli anni '80 sono stati isolati numerosi ceppi virali di HEV, l'analisi delle loro sequenze nucleotidiche ha permesso il riconoscimento di almeno 9 gruppi differenti, raccolti in 4 genotipi maggiori.

4.2 CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE E STRUTTURALI

Il virus dell'epatite E è un virus a forma sferica, di piccole dimensioni (27-34 nm di diametro), privo di envelope.

Il capsid, a simmetria icosaedrica, è formato da capsomeri costituiti da omodimeri di un'unica proteina capsidica.

Dentro al capsid è custodito il genoma del virus, rappresentato da un filamento lineare di RNA a polarità positiva di circa 7200 nucleotidi.

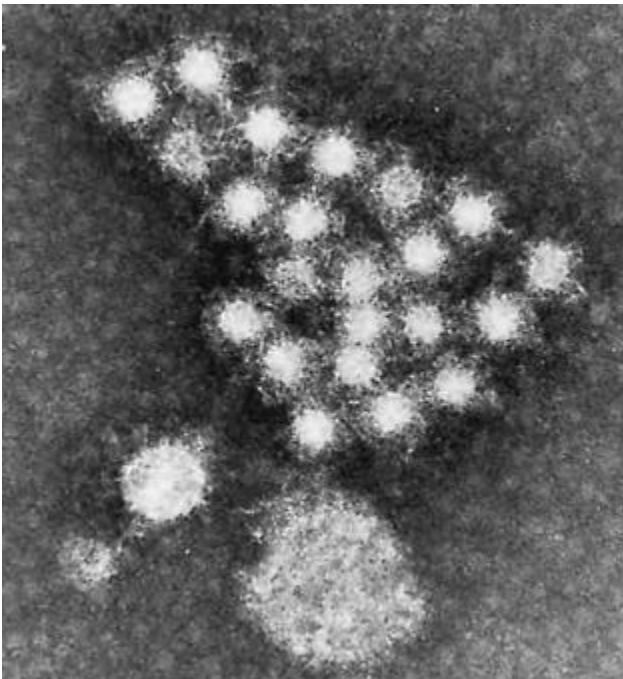


Figura 4.1. Anticorpi anti-HEV su campione fecale proveniente da pazienti HEV positivi in Messico. Immunolettromicroscopia (Courtsy of D. Bradley).

4.3 Organizzazione del genoma

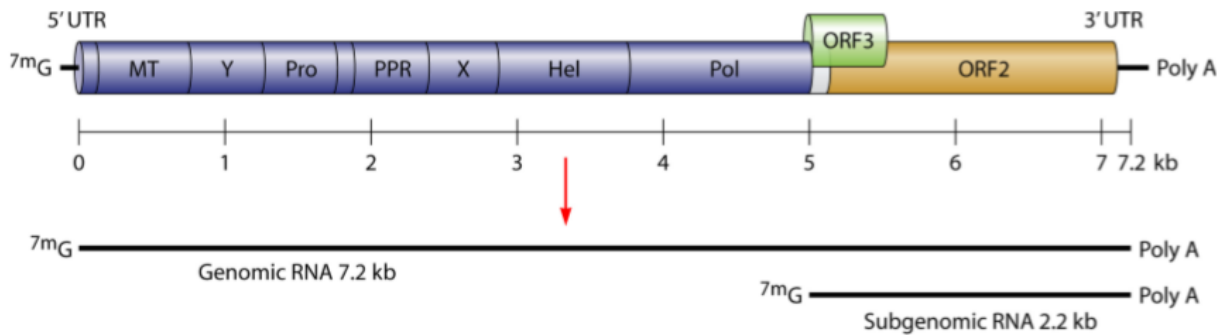


Figura 4.2. Organizzazione del genoma di HEV.

Il genoma di HEV è organizzato in 3 cornici di lettura (Open Reading Frame o ORF), ORF2 e ORF3 sono parzialmente sovrapposti:

- ORF1: lungo circa 5100 nucleotidi, codificante per un'unica poliproteina comprendente 4 domini principali ad attività enzimatica (metiltransferasi, cisteina proteasi, elicasi, RNA polimerasi RNA dipendente) e 2 domini (X e Y), che come anche per altri virus sono implicati nei meccanismi di regolazione della replicazione e della trascrizione virale.
- ORF2: lungo circa 1980 nucleotidi, si sovrappone parzialmente alla ORF3, codificante per la proteina capsidica di HEV.
- ORF3: lungo 325-328 nucleotidi codificante per una piccola proteina di 123 aminoacidi implicata nei meccanismi d'interazione con le funzioni cellulari e nei processi di morfogenesi e di rilascio della progenie virale.

Alle estremità 5' e 3' si trovano le *untranslated region (UTR)*, che consistono di brevi sequenze non tradotte localizzate rispettivamente a monte e a valle del genoma, la loro presenza è essenziale per massimizzare l'efficienza di traduzione e la stabilità del trascritto.

CAPITOLO 5. CICLO REPLICATIVO

5.1 Ciclo replicativo – introduzione

I virus sono parassiti endocellulari obbligati ed in quanto tali per poter compiere il proprio ciclo vitale necessitano di infettare una cellula ospite che sia sensibile e permissiva, solo in questo caso l'infezione virale si tradurrà in un'infezione produttiva che ha come esito finale la produzione di progenie virale infettante.

Una grande distinzione nel classificare i virus riguarda l'esistenza o meno dell'envelope per cui ci si riferisce rispettivamente a virus rivestiti o nudi, normalmente questa è una caratteristica univoca, tuttavia negli ultimi anni sempre più evidenze scientifiche hanno dimostrato la possibile coesistenza di entrambe le forme nella stessa entità virale; è questo il caso di HEV, il quale è stato isolato da siero di pazienti infetti e da colture cellulari in una forma definita "quasi-rivestita", nella quale il capsid è avvolto da una membrana lipidica di derivazione cellulare che conferisce al virus la capacità di eludere l'azione degli anticorpi neutralizzanti, mentre nelle feci si trova nella forma nuda che è responsabile della notevole resistenza di HEV nell'ambiente(Fig. 5.1, ¹⁴).

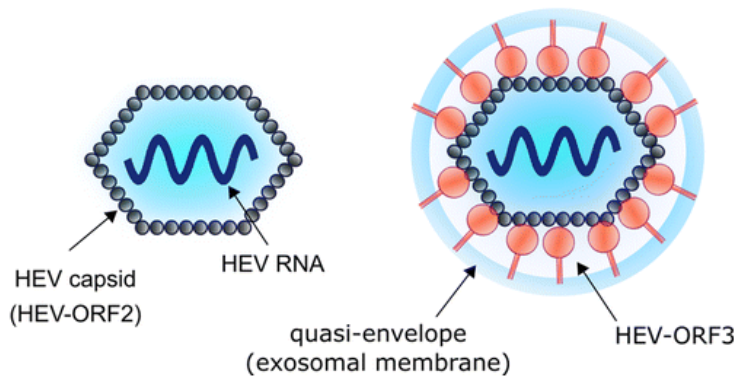


Figura 5.1. a sinistra è raffigurata la forma priva di envelope, a destra la forma provvista di envelope.

Il ciclo replicativo di HEV è suddivisibile in 5 fasi: adsorbimento, penetrazione, scapsidazione, espressione e replicazione del genoma, maturazione e liberazione.

- *Adsorbimento*: la prima fase di un'infezione virale consiste nell'interazione tra le proteine superficiali virali (antirecettori) ed i recettori cellulari, la presenza

dei quali stabilisce quali saranno i citotipi sensibili all'infezione, e quindi in ultima istanza ne determinano il tropismo (¹⁵).

Le interazioni che gli antirecettori virali instaurano con i recettori presenti sulla cellula ospite sono di natura sterica e/o elettrostatica, ed è proprio questo gran numero di legami deboli che nel loro insieme porteranno all'adsorbimento stabile del virione alla cellula (¹⁵).

Utilizzando dei label fluorescenti (GFP) taggati alla ORF2 si è ottenuta una proteina di fusione grazie alla quale si è potuti risalire all'identificazione dei recettori cellulari coinvolti nel meccanismo di uptake cellulare: i risultati mostrano che l'uptake avviene tramite endocitosi mediata da recettore-clatrina dipendente e che le molecole recettoriali principalmente coinvolte sono quelle di proteoglicano eparan-solfato, inoltre delle evidenze indicano anche un ruolo della Heat Shock protein 90.

- *Penetrazione*: subito dopo l'adsorbimento il virus penetra nella cellula attraverso dei meccanismi che richiedono un impiego di energia da parte della stessa.

L'entrata dei virus rivestiti all'interno della cellula avviene solitamente per fusione dell'envelope virale con la membrana cellulare attraverso un processo mediato da glicoproteine virali presenti sulla superficie del virione, mentre invece l'ingresso dei virus nudi all'interno della cellula ospite avviene principalmente mediante un meccanismo di endocitosi mediata da recettore, è infatti dimostrata l'importanza dell'acidificazione endosomiale per l'ingresso del virus nudo nella cellula escludendo quindi un possibile meccanismo di fusione del virus con la membrana cellulare.

L'ingresso di HEV (quasi-rivestito) e di HEV privo di envelope avviene comunque attraverso la formazione di un vacuolo rivestito di clatrina ma con differenti cinetiche: nel primo caso la cinetica di reazione avviene molto lentamente se comparata alla forma priva di envelope, con un tempo stimato di 6 e 3 ore, rispettivamente, a seguito dell'esposizione della cellula al virus (¹⁶).

- *Scapsidazione*: gli eventi che seguono l'entrata del virus nella cellula e precedono la replicazione del genoma virale costituiscono il processo di scapsidazione, attraverso il quale il genoma virale si separa dalle proteine che lo rivestono.

Questo processo può avvenire con modalità differenti, ad esempio alcuni virus sono presenti all'interno della cellula ospite come complesso nucleoproteico e di

conseguenza richiedono una fase di disassemblaggio per liberare il proprio genoma, per altri virus il processo di scapsidazione avviene spontaneamente o può richiedere l'intervento di proteasi cellulari, mentre per quelli che penetrano per endocitosi la scapsidazione può avvenire per azione di enzimi lisosomiali che si riversano all'interno dei vacuoli fagocitati.

Le modalità di scapsidazione per HEV non sono completamente chiarite, in ogni caso dopo la fase di scapsidazione il genoma virale rimane nel citoplasma ⁽¹⁵⁾.

- *Espressione e replicazione del genoma:* una volta che il genoma virale si è liberato dal capsido e ha raggiunto la propria sede nel citoplasma ha inizio la sintesi delle proteine virali, che come risultato finale porterà alla produzione di numerose copie di componenti strutturali e genomici necessari per la formazione della nuova progenie: per raggiungere questo obiettivo il virus deve sfruttare l'apparato biosintetico della cellula ospite.

I virus devono presentare ai ribosomi cellulari i propri mRNA in modo che questi vengano riconosciuti e immediatamente tradotti, inoltre bisogna considerare che l'apparato biosintetico cellulare è in grado di tradurre solo gli mRNA monocistronici, ovvero quelli che portano l'informazione per un solo gene; d'altro canto molti ribovirus producono un mRNA contenente l'informazione di diversi geni che viene tradotta sotto forma di precursore poliproteico successivamente scisso da proteasi virali e/o cellulari nelle singole proteine ⁽¹⁵⁾.

HEV, come tutti i virus appartenenti al IV gruppo della classificazione di Baltimore non necessita di trascrivere il suo genoma poiché l'acido ribonucleico essendo a polarità positiva può fungere da messaggero ed essere immediatamente tradotto.

Nel citoplasma la ORF1 viene tradotta in un'unica poliproteina contenente i 7 domini che verrà in seguito clivata da delle proteasi per poter generare degli mRNA monocistronici incluso quello della RNA polimerasi RNA dipendente.

La RdRp utilizzerà poi il ss RNA(+) come template per sintetizzare il trascritto a polarità negativa (vedi Fig. 5.2a), il quale a sua volta servirà come template per la sintesi di un trascritto sub genomico di circa 2.2 kb di lunghezza e dell'intero RNA genomico di HEV: in questo modo la replicazione garantirà sia l'RNA subgenomico che verrà in seguito tradotto nelle proteine della ORF2 e della ORF3, sia l'RNA genomico che verrà incapsidato per formare nuovi virioni ⁽¹⁷⁾ (vedi Fig. 4.2b).

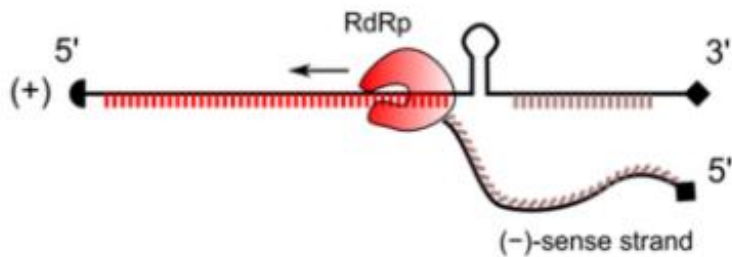


Figura 5.2. Sintesi del trascritto di RNA a polarità negativa.

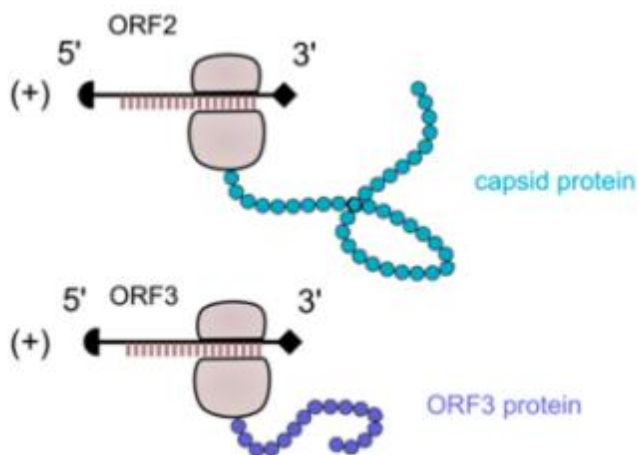


Figura 5.2. Traduzione della proteina capsidica e della ORF3.

➤ *Maturazione e liberazione*: il sito di assemblaggio e il meccanismo di liberazione dalla cellula ospite dipendono principalmente dalla struttura del virus.

La ORF3 assume un ruolo cruciale per il rilascio di HEV seppur non svolga un ruolo essenziale né per la replicazione né per la fase di assemblaggio del nuovo virione, queste conclusioni sono state confermate da evidenze che dimostrano come una mutazione nel terzo codone nella ORF3 non impedisca la replicazione del mutante, ma ne comprometta invece il rilascio dalla cellula ospite ⁽¹⁶⁾.

Questa proteina viene fosforilata e interagisce con la proteina capsidica e con varie altre componenti del citoscheletro cellulare (come la alfa 1 microglobulina) favorendo quindi il rilascio del virione dalla cellula ospite nel sangue tramite un processo di gemmazione.

Una rappresentazione schematica del ciclo di replicazione di HEV è descritto dalla seguente immagine.

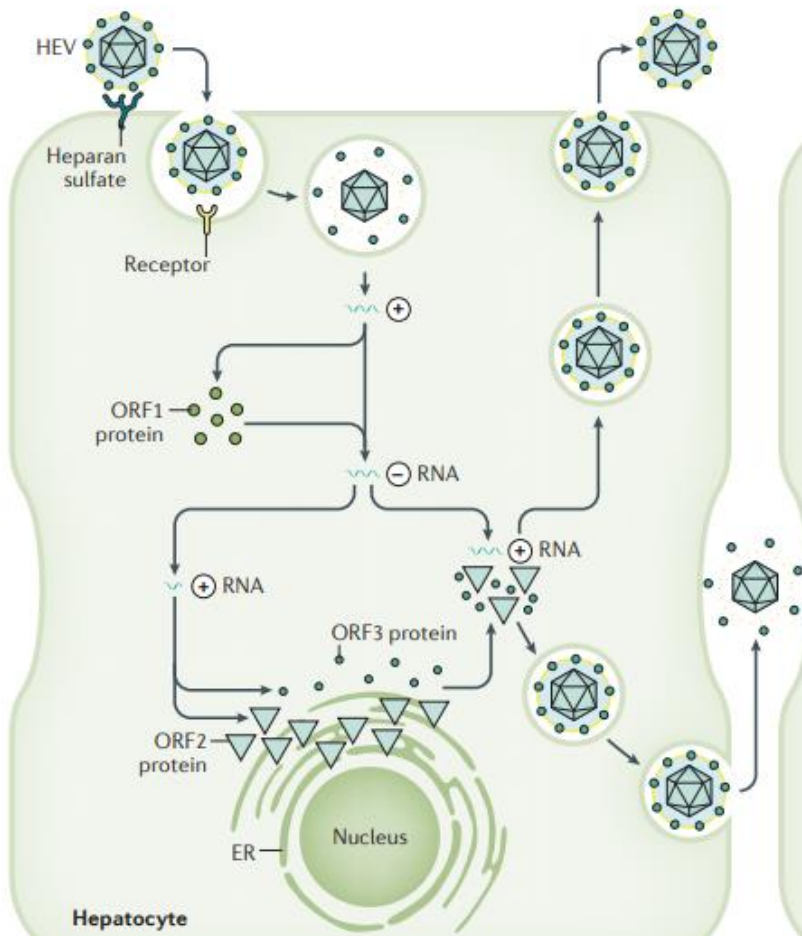


Figura 5.3. Ciclo replicativo di HEV (16).

CAPITOLO 6. DIAGNOSI

6.1 Diagnosi

Quello delle epatiti virali è un problema di sanità mondiale verso il quale però non è stato mai indetto un piano strategico comune di eradicazione e solo dal 2015 la WHO lo ha inserito tra gli obiettivi da raggiungere entro il 2030 (nell'ambito dell' agenda per lo sviluppo sostenibile) al fine di accrescere lo stato di benessere della popolazione mondiale, infatti attualmente ogni anno si contano circa 1.4 milioni di decessi a causa di infezioni acute e croniche sostenute dai 5 virus epatotropi, i quali seppur accomunati da simili manifestazioni cliniche hanno un diverso impatto sulla salute pubblica, nonché differenze nelle modalità di trasmissione e nelle caratteristiche antigeniche tanto da richiedere l'esigenza di una diagnosi di laboratorio differenziale, la quale in seguito si tradurrà nella formulazione di un tempestivo e mirato intervento terapeutico ⁽¹⁸⁾.

Tuttavia sono diversi i problemi che si interpongono al conseguimento di questo risultato, difatti l'assenza in molti Paesi di un adeguato sistema di sorveglianza e di kit standardizzati finora approvati e riconosciuti dalle autorità competenti, accompagnata dalla scarsa consapevolezza riguardo questo problema di salute pubblica (aggravato dagli inesatti e sottostimati dati epidemiologici) rendono difficile intraprendere un preciso percorso diagnostico ⁽¹⁹⁾.

Nel caso specifico di HEV la possibilità di aver contratto l'infezione dovrebbe essere considerata in qualunque persona con sintomi da epatite virale che risulti negativa per i primi tre virus dell'epatite (HAV, HBV, HCV), così come anche per persone sintomatiche rientranti da zone nelle quali HEV è endemico, inoltre il medico dovrà anche valutare i dati anamnestici forniti dal paziente di modo che possa evidenziare l'eventuale presenza di fattori di rischio a cui questi si è esposto.

Il processo infettivo è suddivisibile in 3 fasi ⁽²⁰⁾: fase di latenza, fase acuta e fase di convalescenza (vedi figura 6.1), ciascuna di queste tre è contrassegnata dalla presenza di alcuni marcatori di progressione i quali permettono di tracciare una fotografia istantanea dell'infezione e che vengono indagati tramite opportuni kit diagnostici; nell'ambito di HEV la diagnosi di infezione acuta in corso è indagata principalmente attraverso la ricerca dell'RNA virale e delle IgM_v quasi sempre accompagnate da un rialzo di marcatori epatici quali la alanina-amino transferasi (ALT.)

La diagnosi di laboratorio può essere eseguita utilizzando approcci differenti: l'approccio diretto si avvale di tecniche atte all'identificazione del virus direttamente nel campione (ricerca di antigeni virus-specifici e ricerca dell'acido nucleico virale) mentre l'approccio indiretto si avvale di metodi in grado di rilevare nel siero dei pazienti la presenza di anticorpi diretti contro specifici antigeni virali ⁽¹⁵⁾.

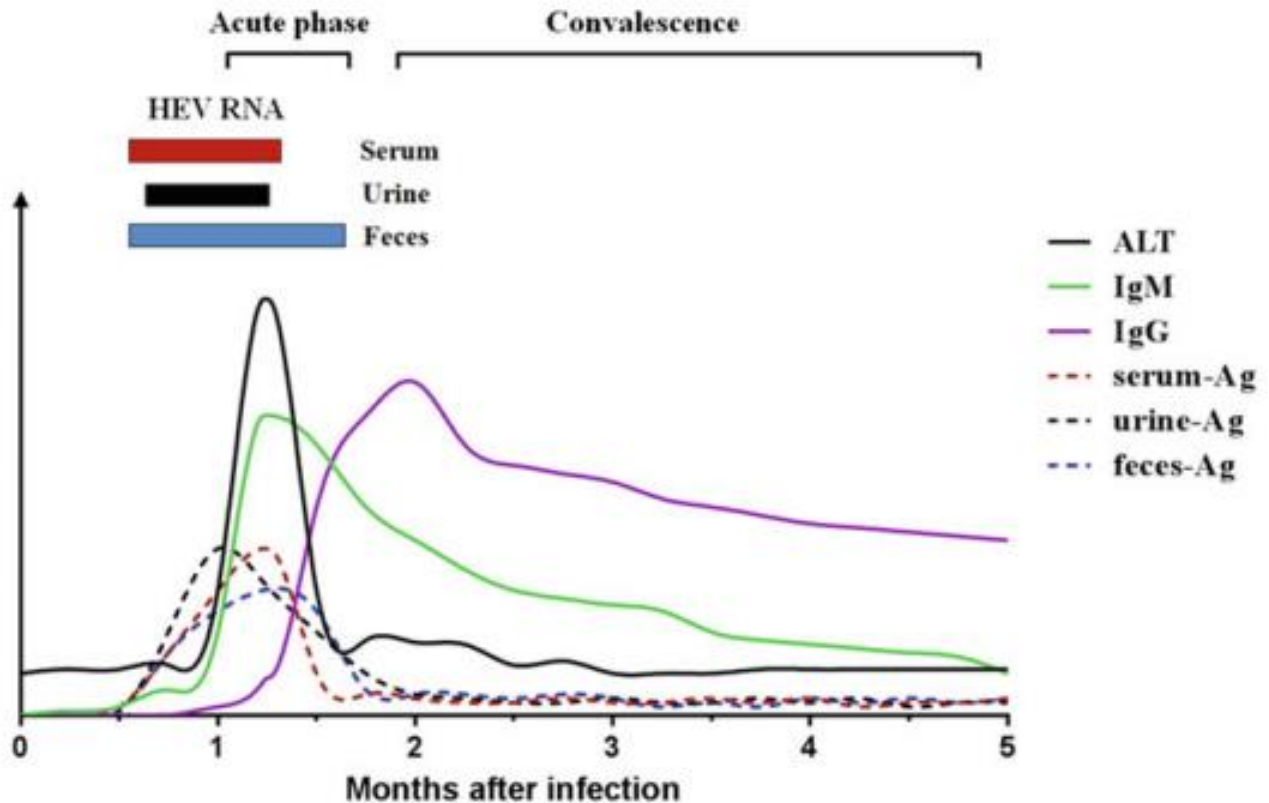


Figura 6.1. Variazione dei livelli dei principali marcatori sierologici in un'infezione da HEV. (Laboratory diagnosis of HEV infection. C. Zhao et al. "Hepatitis E virus. Advances in experimental Medicine and biology. 2016.)

6.2 Diagnosi – Metodi di ricerca diretti

Il periodo di incubazione è il tempo che intercorre tra il momento in cui il paziente contrae l'infezione e il manifestarsi della malattia, generalmente dura dai 15 ai 70 giorni ed i marcatori che si andranno a cercare sono quelli che segnalano un'attiva replicazione virale come l'RNA e gli antigeni virus-specifici, i primi a comparire nelle feci e nel siero.

Durante questa fase viremica (che persiste per tutto il periodo di incubazione fino alle prime settimane della fase acuta) l'acido nucleico può essere rintracciato nel siero e nelle feci dei pazienti tramite metodiche molecolari (RT PCR, seguita da una nested PCR) basate principalmente sull'amplificazione di una sequenza della ORF1 o della ORF2 a seguito della quale è possibile ricorrere al sequenziamento nucleotidico per determinare l'identità del genotipo infettante⁽²⁰⁾; tuttavia la presenza dell'RNA virale non solo può essere diagnostica di infezione acuta ma può anche essere utilizzata per la diagnosi di pazienti immunocompromessi che possono avere un basso titolo anticorpale non rilevabile dai saggi sierologici e nei quali l'infezione può

cronicizzare: a questo proposito la persistenza dell'RNA per un tempo maggiore a 6 mesi è indice di infezione cronica ⁽⁴⁵⁾.

In questi casi può anche essere raccomandata la rilevazione degli antigeni virali e in particolar modo la proteina capsidica codificata dalla ORF2, la cui presenza nel siero è sovrapponibile a quella delle transaminasi epatiche (ALT, AST) e dell'acido nucleico.

Al fine di effettuare una rapida diagnosi nelle fasi precoci dell'infezione sono stati messi a punto dei saggi immunoenzimatici in fase solida (EIA) per la rilevazione dell'antigene, disponibili nei laboratori per mezzo di kit standardizzati che consentono di realizzare una valutazione semi-quantitativa dell'antigene presente nel siero e in altri campioni biologici (urine e feci); tra i più utilizzati c'è il test a sandwich, in cui un anticorpo di cattura specifico per l'antigene in esame viene fatto adsorbire sul pozzetto di una micro-piastra ed a seguito dell'aggiunta del campione l'anticorpo legherà l'antigene eventualmente presente, il quale verrà rilevato utilizzando un anticorpo secondario marcato con un enzima: la reazione finale viene evidenziata aggiungendo un opportuno substrato dell'enzima in grado di sviluppare una reazione colorimetrica quantificabile facilmente da uno spettrofotometro ⁽²⁰⁾.

6.3 Diagnosi - Metodi di ricerca indiretti

A circa 2-3 settimane dall'esposizione al virus si assisterà alla siero-conversione delle immunoglobuline di classe M ed A (IgM e IgA) seguite dalle IgG: le prime raggiungono il picco intorno alla quarta-quinta settimana e svolgono un ruolo fondamentale nel contrastare il virus durante le fasi più precoci dell'infezione, ma tendono a decadere rapidamente durante la fase di convalescenza per poi negativizzarsi intorno alla 13^{esima} settimana, sia pur con una finestra temporale assai variabile che in alcuni pazienti si estende oltre la 30^{esima} settimana ⁽²¹⁾.

Le IgG compaiono poco dopo ed aumentano durante la fase acuta e di convalescenza persistendo nel siero per un periodo estremamente variabile che si estende da 1 a 14 anni, la positività alle IgG da sola indica lo stato immune del soggetto ed una pregressa infezione, mentre un incremento di 4 volte dei normali livelli di IgG sono indice di infezione in atto.

Il siero di pazienti positivi all'acido nucleico virale e con elevati livelli di ALT, accompagnati dalla positività alle IgM o ad alti livelli di IgG sono i criteri adottati per la diagnosi d'infezione acuta da HEV; le immunoglobuline di classe M vengono dosate nel siero utilizzando saggi di legame immunoenzimatico, i quali prevedono che degli antigeni virus specifici (tipicamente polipeptidi ricombinanti derivati dalla ORF2) vengano fatti adsorbire sul pozzetto di una micropiastra ed a seguito

dell'aggiunta del siero si avrà la formazione del legame degli anticorpi eventualmente presenti nel siero in esame, con l'antigene.

La rilevazione del complesso avverrà tramite l'aggiunta di un anticorpo secondario coniugato con un enzima diretto contro le immunoglobuline umane, che in presenza di un substrato idoneo darà luogo ad una reazione colorimetrica (similmente all'EIA per la rilevazione dell'antigene) ⁽²⁰⁾.

CAPITOLO 7. TERAPIA E PREVENZIONE

7.1 *Terapia*

L'infezione da HEV è spesso autolimitante e sebbene il tasso di mortalità nei soggetti sani sia molto basso sale al 30% nelle donne gravide al terzo trimestre di gravidanza, mentre il rischio di cronicizzazione dell'infezione rappresenta un serio problema per i soggetti immunocompromessi ed in particolar modo per le categorie di persone HIV positive e per i pazienti che hanno subito un trapianto di organo solido (SOT) o con preesistenti patologie epatiche ⁽⁸⁾.

Per i pazienti SOT si è visto che la sospensione della terapia immunosoppressiva porta alla clearance virale nell'1/3 dei casi, tuttavia laddove ciò non si verifichi si opta per una terapia antivirale basata sull'utilizzo dell'interferon alfa peghilato, il quale pur non possedendo un'attività antivirale diretta (né tanto meno specifica per HEV) è in grado di indurre nelle cellule con cui viene a contatto l'espressione di proteine effettrici che conferiscono lo stato di resistenza antivirale e la cui efficacia terapeutica si manifesta soprattutto nelle infezioni virali croniche ⁽¹⁷⁾.

Una classe di composti molto utilizzata nei confronti dei virus a RNA comprende gli inibitori della RNA polimerasi-RNA dipendente ed in particolar modo gli analoghi nucleosidici, i quali sono in grado di inibire l'attività polimerasica agendo da terminatore di catena: tra questi l'unico già utilizzato in clinica in associazione con l'interferon peghilato è la ribavirina, un nucleoside sintetico analogo della guanosina ⁽¹⁵⁾.

7.2 *Prevenzione*

Nei Paesi in via di sviluppo la principale fonte di contagio è rappresentata dall'ingestione di acqua non potabile contaminata e per questo motivo la possibilità di usufruire di acqua potabile è un requisito fondamentale per prevenire l'infezione, così come anche un miglioramento del tenore igienico delle strutture sanitarie porterebbe ad una diminuzione delle occasioni di contagio.

Nei Paesi industrializzati dove le infezioni sono sostenute principalmente dal genotipo 3 è sufficiente un'adeguata cottura del cibo (con particolare attenzione ai prodotti carnei di origine suina) in quanto il virus è inattivato a 70°C ⁽⁵⁾.

7.3 Immunoprofilassi

Per quanto riguarda la formulazione di un vaccino si sono avuti risultati soddisfacenti solo in tempi recenti e attualmente sono in studio due candidati.

Il primo è basato su una proteina di 56 kDa codificata dalla ORF2 di HEV1 e prevede la somministrazione di tre dosi (0, 1, 6 mesi): il vaccino è allo studio in Nepal e si trova alla fase 2 del trial clinico rivelandosi sicuro ed altamente immunogeno con una efficacia del 95%; i 4 genotipi umani consistono di un unico sierotipo per cui la risposta immunitaria suscitata dalla vaccinazione è in grado di fornire protezione tra i differenti genotipi ⁽²²⁾.

Il secondo vaccino allo studio in Cina è una proteina codificata dalla ORF2 del genotipo 1 con un peso molecolare di 26 kDa e in fase 3 del trial è stato testato in soggetti adulti con età compresa tra 16 e 65 anni rivelandosi sicuro e protettivo al 100%, nel 2012 ha ottenuto la licenza per essere somministrato in Cina anche se ad oggi non ha ancora avuto l'approvazione in altri Paesi ⁽²²⁾.

CAPITOLO 8. MANIFESTAZIONI CLINICHE

8.1 Manifestazioni cliniche

La malattia infettiva è il risultato della complessa interazione tra il sistema immunitario e il virus e rappresenta dunque la conseguenza infausta di un processo infettivo che generalmente, nella maggior parte dei casi non determina alcun evento nefasto o dannoso per l'ospite tanto che i virus (e altri agenti microbici) in grado di provocare uno stato morboso nell'uomo sono una minoranza rispetto al totale.

Nella maggior parte dei casi (>95%) l'infezione da HEV ha un decorso asintomatico e nella minoranza di pazienti che sviluppano un'epatite acuta la risoluzione della malattia segue un andamento autolimitante senza particolari complicanze, fatta eccezione per le donne gravide al terzo trimestre di gravidanza e per i pazienti con sottostanti patologie epatiche o che hanno subito un trapianto d'organo nei quali l'infezione può cronicizzare o progredire rapidamente verso un'epatite acuta fulminante con alto tasso di mortalità (>30%).

Clinicamente l'infezione da HEV è indistinguibile dalle altre forme di epatite virale e il corso dell'infezione acuta ha una durata di 4-6 settimane con un periodo di incubazione che varia da due a quattro settimane a cui segue una fase prodromica, la quale rappresenta il periodo di transizione tra lo stato di salute e quello di malattia caratterizzata da sintomi aspecifici come artralgia, mialgia e astenia a cui si accompagnano i sintomi clinici della fase acuta talvolta denominata "itterica" che comprendono nausea, vomito, epatomegalia, dolori addominali, talvolta anche diarrea e ittero (che appare nel 40-70% dei casi), d'emissione di urine scure indice degli alti livelli di bilirubina, questi sintomi si accompagnano all'alterazione degli indici della funzionalità epatica come le transaminasi (ALT-AST) e la fosfatasi alcalina che sono i marcatori più importanti; a partire dalla sesta settimana seguirà la fase di convalescenza caratterizzata dalla scomparsa dei segni e dei sintomi clinici della malattia, da un rialzo delle IgG di pari passo ad un drastico abbassamento dell'alanina-aminotrasferasi fino ai valori normali e dall'eliminazione dell'antigene virale ⁽²³⁾.

L'infezione cronica nel paziente immunodepresso è clinicamente caratterizzata da sintomi aspecifici come senso di stanchezza e malessere fisico generale raramente sostenuti dal significativo rialzo degli enzimi epatici anche se tuttavia in presenza di altre condizioni predisponenti come le sottostanti patologie epatiche o il consumo di alcol la malattia può progressivamente evolvere verso la drammatica sequela della cirrosi epatica, la quale è il risultato della necrosi del parenchima epatico causata dal danno protratto e dai conseguenti processi riparativi iperplastici (rigenerazione per proliferazione cellulare) e formazione di ponti fibrosi cicatriziali che sostituiscono il

parenchima necrotico compromettendo dunque la funzionalità del fegato sotto ogni aspetto.

Questo stadio della malattia è messo in evidenza da sintomi specifici che includono splenomegalia, accumulo di liquidi nella cavità addominali (ascite), ittero, alterazioni del processo coagulativo ed encefalopatia epatica, ovvero un deterioramento delle funzioni cerebrali dovuto all'afflusso di sostanze tossiche al cervello a causa della compromessa capacità detossificante del fegato ⁽²³⁾.

8.2 *Manifestazioni extraepatiche*

HEV così come anche gli altri virus epatotropi può essere causa di affezioni extraepatiche la cui fisiopatologia è riconducibile principalmente a reazioni immuno-mediate e all'effetto citopatico del virus a livello del pancreas, del sistema nervoso (centrale e periferico), cardiaco e urinario, ma che tuttavia appaiono con bassa frequenza ⁽²⁴⁾.

- *Malattie neurologiche.* La sindrome di Guillan Bairrè è un'affezione neurologica del sistema nervoso periferico che esordisce a seguito dell'esposizione del paziente con alcuni agenti patogeni come ad esempio batteri (*Campylobacter jejuni*, *Mycoplasma spp.*) ma anche virus, in particolar modo gli herpes virus umani (*HHV*) e *EBV*, tuttavia da analisi retrospettive emerge l'esistenza di una correlazione eziologica con il genotipo HEV-3 sia a seguito dell'infezione acuta che cronica ⁽²⁵⁾.

La forma della malattia che esordisce in circa il 5% dei pazienti affetti da HEV-3 è il risultato della produzione di anticorpi che attaccano i gangliosidi associati ai nervi periferici attraverso il mimetismo molecolare messo in atto dal virus; i primi sintomi che appaiono sono intorpidimento, parestesia, dolore e debolezza bilaterale degli arti inferiori e mentre il paziente già a partire dalla quarta settimana mostra segni di ripresa i tempi per un recupero completo vanno da pochi mesi a un anno; tuttavia 1 caso su 5 progredisce verso il coinvolgimento dei nervi cranici della testa e del viso portando a difficoltà di deglutizione e respiratorie.

- *Pancreatite acuta.* La pancreatite acuta è una complicanza associata anche ai virus dell'epatite A, B, C ed esordisce in pazienti di giovane età a seguito della fase itterica manifestandosi principalmente con dolori addominali nella zona alta del ventre mentre da un punto di vista sierologico si osserva un aumento di bilirubina e delle amilasi sieriche.

I casi clinici descritti sono provenienti dall'India e l'infezione è sostenuta dal genotipo HEV-1 (24).

- *Miocardite.* La miocardite è un'inflammatione della tonaca muscolare cardiaca che si sviluppa durante la fase di viremia (di batteriemia nel caso in cui sia associata ad un'infezione batterica) durante la quale l'agente infettante invade il miocardio e può replicarsi all'interno del miocita con la conseguente attivazione della risposta macrofagica e delle cellule dendritiche le quali reagiscono rilasciando grandi quantità di mediatori dell' infiammazione quali citochine, interleuchine, tumor necrosis factor e proteasi coinvolte sia nell'eliminazione del virus sia nel danno tissutale generato. La patologia ha inizio con l'infezione virale sintomatica o meno alla quale possono seguire da giorni a settimane prima della comparsa dei sintomi cardiaci che comprendono aritmia, eventi embolici, affaticamento, dispnea, dolore toracico e palpitazioni, mentre i segni clinici includono tachicardia e riduzione del tono cardiaco dovuto alla ridotta contrazione del miocardio.

Nel caso di HEV (così come anche per gli altri virus dell'epatite) un interessamento cardiaco clinicamente rilevabile è raro e generalmente la miocardite sintomatica si osserva tra la prima e la terza settimana di malattia mentre la prognosi è generalmente benigna e l'andamento della malattia è autolimitante.

- *Malattie renali.* L'infezione cronica da HEV (similmente al virus dell'epatite C) può causare in rari casi un'insufficienza renale acuta la quale consiste in un rapido declino della funzione renale che porta ad un accumulo di prodotti azotati nel sangue (creatinina, urea) a seguito di malattie del rene come la glomerulonefrite membranoproliferativa che prevede la formazione e l'accumulo nel tessuto glomerulare di immunodepositi costituiti principalmente da complessi antigene-anticorpo con il coinvolgimento del fattore reumatoide il quale agglutina con la porzione Fc delle IgG . L'associazione eziologica con HEV è sostenuta dal rilevamento dell'antigene e del genoma virale nelle urine e dall'evidenza che alla clearance dell'infezione si accompagna solitamente un miglioramento della corretta funzionalità renale (24).

CAPITOLO 9. PATOGENESI DELL'INFEZIONE

9.1 Modalità di patogenesi

La patogenesi virale descrive il processo di induzione della malattia causata dall'infezione virale la quale non sempre determina l'instaurarsi di uno stato morboso nell'ospite poiché questo dipende da una gran moltitudine di fattori sia dell'agente infettante, alcuni dei quali sono la modalità di trasmissione, il tropismo, potenziale di patogenicità e fattori di virulenza nonché la capacità del virus di eludere la risposta immunitaria, sia dell'ospite (età, patologie di base, pregressa esposizione al medesimo agente, stato immunitario dell'ospite.)

La patogenesi di HEV è simile a quella degli altri virus epatotropi e nonostante siano a disposizione degli adeguati metodi di studio come l'utilizzo di modelli animali e la propagazione del virus in colture cellulari restano ancora molti gli aspetti su cui non si è fatta luce, o almeno solo in parte (ad esempio l'elevata letalità nelle donne gravide o il differente corso clinico dell'infezione tra i genotipi 1-2 e 3-4.)

HEV non presenta un'azione direttamente citotossica e dunque i danni tissutali e d'organo sono una conseguenza di meccanismi immunopatogenetici messi in atto dal sistema immunitario dell'ospite per far fronte all'infezione, questo si verifica perché analogamente ad altri virus la reazione dell'ospite all'agente infettivo non è modulata né in durata né in intensità.

La trasmissione dell'infezione da HEV avviene generalmente per via fecale-orale attraverso l'ingestione di acqua o cibi contaminati anche se tuttavia è possibile riprodurla sperimentalmente in laboratorio su modelli animali tramite la via endovenosa, la quale richiede una dose infettante circa 10000 volte inferiore rispetto alla via orale.

Pur avendo HEV come sito preferenziale per la replicazione il fegato, la presenza dell' RNA virale in sede extraepatica indica la sua attiva replicazione in distretti quali i linfonodi, il piccolo intestino e nel colon, prima di raggiungere il fegato dove il virus si moltiplica nel citoplasma degli epatociti per poi accumularsi nella bile e da qui attraverso il coledoco torna nell'intestino, ed essere in parte anche rilasciato nel sangue; il virus è escreto tramite le feci⁽²⁶⁾.

9.2 Meccanismi patogenetici

La risposta dell'ospite evocata da HEV attiva entrambe le componenti del sistema immunitario (innata e adattativa) ma tuttavia al contrario di quanto accade per altre infezioni HEV ha una maggior suscettibilità alla componente innata, nella cui regolazione assume un ruolo di rilievo il sistema degli interferoni ed in particolare l'isoforma *alfa* (IFN- α), una proteina cellulare inducibile principalmente dalle infezioni virali che seppur non possiede attività antivirale diretta è in grado di indurre nelle cellule con cui viene a contatto uno stato di resistenza antivirale associato alla produzione di proteine effettrici; tra queste va menzionata la PKR, la cui attività chinasi si espleta attraverso la fosforilazione e l'inattivazione del fattore di inizio della sintesi proteica (eIF-2) impedendo la formazione del complesso d'inizio della traduzione con conseguente inibizione della traduzione dei ssRNA (+) virali⁽¹⁵⁾.

Tutto il sistema degli interferoni viene mobilitato, compreso l'interferon gamma (IFN- γ) che seppur avendo una minor attività antivirale stimola l'immunità cellulo-mediata, la componente dell'immunità adattativa che se da un lato contribuisce al controllo ed al confinamento dell'infezione, dall'altro si rende responsabile della patogenesi della malattia epatica, tuttavia studi condotti in vitro su linee cellulari derivate da epatocarcinoma umano hanno messo in luce come HEV (al pari di altri virus) abbia sviluppato meccanismi atti a sopprimere la risposta interferonica attraverso l'inibizione della via di segnalazione *Jak / STAT* (signal transducer and activator of transcription), la quale in condizione fisiologiche porta all'attivazione trascrizionale di 2 importanti citochine ad azione antivirale: la PKR e la 2', 5' oligoadenilato sintetasi, una proteina capace di degradare l'RNA virale tramite l'attivazione di una ribonucleasi cellulare e di promuovere l'apoptosi delle cellule infettate.

La compromissione di questa via di segnalazione avviene grazie all'intervento della ORF3 di HEV e risulta in un aumento della replicazione virale, dimostrandone dunque l'inequivocabile ruolo nel contenimento dell'infezione⁽²⁷⁾.

Un ruolo importante nella risposta immunitaria è assunto dalla classe di cellule presentanti l'antigene (APC) alla quale appartengono tutte le cellule in grado di esporre l'antigene virale sulla propria superficie di membrana attraverso l'MHC II (complesso maggiore d'istocompatibilità di classe II) le quali comprendono cellule dendritiche, linfociti B e macrofagi, i quali sono particolarmente abbondanti nel fegato, sede principale del processo infettivo; l'antigene presentato è poi riconosciuto dai linfociti T CD4+ (Th1 e Th2) che si attivano producendo IFN- γ e varie interleuchine (*IL-2, 6, 8*) le quali stimolano la proliferazione e l'attività dei linfociti B e T, in particolar modo quella dei linfociti T CD8+, i quali già sensibilizzati attraverso il precedente legame all'antigene combinato all'MHC I esposto sulla superficie di qualsiasi cellula infettata, vengono indotti a differenziarsi in linfociti T

citotossici, acquisendo la capacità di uccidere le cellule parassitate attraverso il rilascio di perforine.

Tuttavia dall'analisi dell'espressione genica di cellule del sangue periferico mononucleate (PBMC) infettate con HEV in pazienti in corso di epatite acuta emerge come la risposta infiammatoria sia prevalentemente guidata da elementi dell'immunità innata, infatti la concentrazione di *TNF-Alpha* (*TNF- α*), *IFN- γ* ⁽²⁸⁾ e di cellule NK (natural killer) è molto più alta rispetto al controllo, con un maggior afflusso di queste ultime dal sangue agli epatociti infetti⁽²⁹⁾, il che non solo ne acclara il ruolo di primo piano nella clearance dell'infezione ma anche nella patogenesi della malattia epatica qualora la risposta non sia adeguatamente modulata (Fig. 9.1)

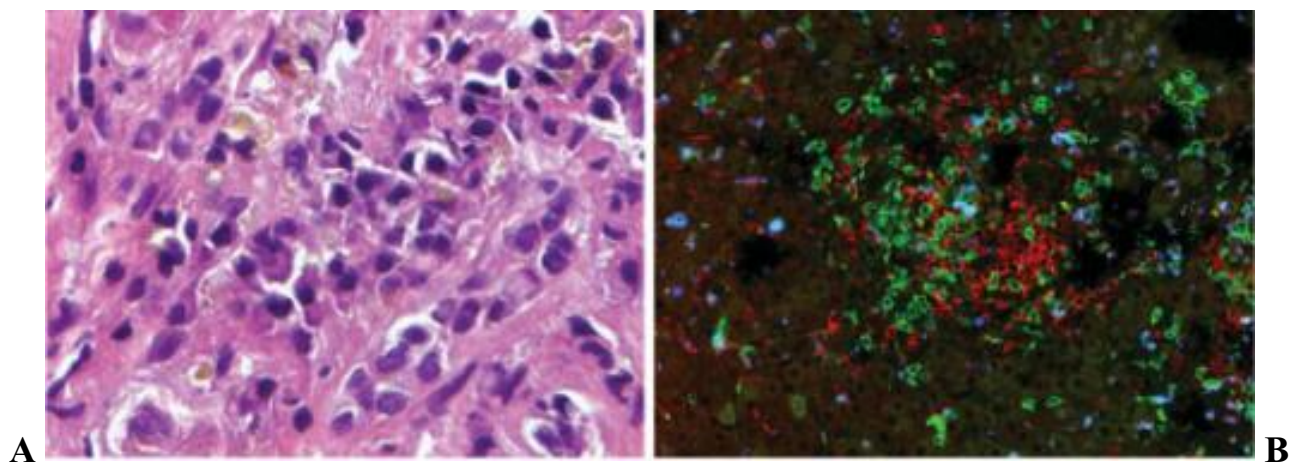


Fig. 9.1 Biopsia epatica di un paziente durante il corso di epatite acuta da HEV (Immunopathogenesis of HEV infection. Heiner W. Et al. 2013. “Seminars in liver disease”.)

(A) Infiltrazione cellulare e necrosi degli epatociti.

(B) Tecniche di immunistoichimica per i linfociti T CD4+ (in rosso) e CD8+ (in verde.)

Altra evidenza a sostegno di questa teoria è messa in luce dall'associazione di forme sintomatiche della malattia con dei polimorfismi a carico del promotore del *TNF- α* e dell'*IFN- γ* i quali determinano più alti livelli di espressione delle 2 citochine⁽³⁰⁾.

9.3 Il contributo dell'immunità umorale

Il ruolo della componente umorale nell'ambito dei meccanismi di difesa antivirali è generalmente subordinato a quello dell'immunità cellulo-mediata a causa della natura

intracellulare dei virus i quali sono riconosciuti e suscettibili all'azione degli anticorpi esclusivamente in ambiente extracellulare.

La presenza di anticorpi specifici anti HEV è evidenziabile a partire dalla terza-quarta settimana dall'esposizione al virus e diversi esperimenti ne confermano non solo la protezione conferita a distanza di mesi dalla risoluzione dell'infezione (³¹), ma anche l'esistenza di una cross reattività degli anticorpi nei confronti dei 4 genotipi di HEV, dimostrando quindi l'esistenza di un unico sierotipo (³²).

9.4 Immunopatogenesi in donne gravide

A fronte di una prognosi nella gran maggioranza dei casi benevola la gravidanza nelle pazienti affette da HEV è associata ad un alto tasso di letalità (30%), soprattutto quando l'infezione viene contratta al terzo trimestre.

Questo anomalo andamento della malattia è da ricondursi ai drastici cambiamenti nei livelli degli ormoni sessuali steroidei che si hanno durante la gravidanza e alla loro influenza sul sistema immunitario della donna, in particolar modo si è visto che gli alti livelli di progesterone inducono una maggiore attivazione dei linfociti T helper II, i quali producono una serie di citochine ad attività anti-infiammatoria (IL-4, 10) ed inibitoria nei confronti dell'altro sub set di linfociti (Th I) con conseguente repressione della capacità di "killing" dei macrofagi e delle cellule NK.

Questo diverso rapporto tra le 2 sotto popolazioni di linfociti da un lato consente il corretto sviluppo dell'embrione preservandolo da eventuali reazioni di rigetto principalmente mediate dai linfociti Th I, dall'altro rende maggiormente esposta la donna a gravi quadri patologici sostenuti da parassiti endocellulari, inclusi HEV.

9.5 Patogenesi dell'infezione cronica

Per molti anni si è ritenuto che l'infezione da HEV al contrario di quella sostenuta dagli altri virus epatotropi a trasmissione parenterale non potesse cronicizzare, tuttavia di recente è apparso evidente come in alcune categorie di pazienti in presenza di marcati stati di immunocompromissione (pazienti riceventi trapianto d'organo-SOT e HIV positivi) la presenza dell'RNA virale sia rilevabile costantemente per più di 6 mesi, periodo oltre il quale l'infezione viene definita cronica, tuttavia l'assenza di una chiara sintomatologia rende difficile intraprendere un adeguato percorso

diagnostico il quale è spesso motivato solamente dagli alti livelli sierici di ALT (100-300 IU/L.)

Uno studio condotto su 85 pazienti SOT⁽³³⁾ ha messo in luce come nel 66% dei casi l'infezione da HEV progredisca verso la cronicizzazione, una condizione necessaria affinché nel 9% dei casi l'infezione evolva verso la cirrosi epatica, una patologia cronica e progressiva caratterizzata dal sovvertimento diffuso e irreversibile della struttura del fegato come risultato della necrosi del parenchima epatico causata dal persistente processo infiammatorio in risposta alla continua presenza del virus, a cui si accompagna la massiccia produzione di citochine le quali indurranno la trasformazione di alcune cellule lipofile epatiche in miofibroblasti produttrici di collagene e altre sostanze della matrice connettivale che si depositeranno prima nello spazio compreso tra epatociti e sinusoidi (alterandone gli scambi metabolici) ed in seguito in tutte le porzioni dei lobuli formando dei setti di vario spessore, determinando quindi importanti alterazioni anatomo-funzionali del fegato.

Un ruolo nella cronicizzazione dell'infezione potrebbe essere assunto dalla scarsa attivazione delle cellule T in risposta all'infezione il che spiegherebbe come l'incidenza sia particolarmente alta nei pazienti in corso di terapia immunosoppressoria (pazienti SOT) e nei pazienti HIV positivi con bassa conta di linfociti T CD4⁺ (³⁴); altri studi sostengono invece la teoria di come la selezione di quasi-specie virali operata dall'attivazione delle cellule del sistema immunitario porterebbe a fenomeni di "*mutant escape*" o a selezione di varianti virali in continua evoluzione associate a un differente corso naturale dell'infezione (³⁵).

CAPITOLO 10. RAZIONALE DELLO STUDIO

10.1 Razionale dello studio

L'epatite E è un problema emergente di sanità pubblica non solo nei Paesi in via di sviluppo dove il virus è endemico ma anche in numerosi Paesi industrializzati considerati fino a poco tempo fa a basso rischio, in Italia l'attività di sorveglianza a carico di tutte le epatite virali acute è svolta dal Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA), dalla cui attività di monitoraggio emerge anno per anno un andamento crescente dei casi di epatite E dovuto soprattutto a un aumento dei casi autoctoni.

E' interessante notare come 3 regioni (Marche, Lazio, Lombardia) su tutto il territorio italiano notificano costantemente il numero più alto di casi, tuttavia resta ancora da chiarire se questa maggiore incidenza sia associabile ad una più alta circolazione del virus in queste aree oppure se sia legata alle più efficienti capacità diagnostiche dei laboratori regionali.

Lo scopo di questo studio è quello di indagare l'evoluzione dell'infezione da HEV in pazienti infetti per i quali ne è stata formulata la diagnosi presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona nel periodo compreso tra il 2017 e il 2019, al fine di esaminare le caratteristiche cliniche dei pazienti, la suddivisione degli stessi per genere, fasce d'età ed infine stabilire i fattori di rischio associati all'infezione.

Inoltre sebbene la genotipizzazione sia stata condotta con successo in molti dei campioni clinici esaminati la sottotipizzazione non è mai stata operata, per cui l'obiettivo di questo studio è anche quello di monitorare la diffusione dei diversi sottotipi di HEV nella regione Marche.

11. MATERIALI E METODI

11.1 *Raccolta dei campioni*

Nel periodo compreso tra il 2017 e il 2019 presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona è stato fatto il campionamento di pazienti affetti da epatite acuta, caratterizzati da ipertransaminasemia e per i quali è stata formulata la diagnosi di infezione da HEV.

Il virus è stato ricercato su campioni fecali e di sangue.

11.2 *Estrazione dell'acido nucleico virale*

Per le procedure di estrazione dell'acido nucleico virale è stato utilizzato il *kit virus / pathogen midi* della *QIAasympohony*, un sistema sviluppato per l'applicazione diagnostica in vitro il quale utilizza la tecnologia a particelle magnetiche per procedure automatizzate di estrazione e purificazione degli acidi nucleici da campioni biologici (Istruzioni per l'uso manuale del kit QIAasympohony DSP Virus/Pathogen.)

11.3 *Retrotrascrizione e amplificazione*

L'RNA di HEV è stato immediatamente retrotrascritto in cDNA e amplificato in un'unica reazione "one step" la quale consente di effettuare entrambe le reazioni nella medesima fialetta evitando in questo modo eventuali perdite di volume e/o danni meccanici all'acido nucleico; a tal fine è stato utilizzato il sistema kit commerciale basato sulla *SuperScript III One-Step RT-PCR* dell'Invitrogen.

Il protocollo di retrotrascrizione – amplificazione "one step" adottato consisteva di una reazione di retrotrascrizione condotta alla temperatura di 45 °C per 30 minuti, seguita da un ciclo di denaturazione a 94 °C per 2 minuti e da 35 cicli di PCR impostati come segue: 15 secondi a 95 °C (denaturazione), 30 secondi a 52 °C (annealing dei primers), 45 secondi a 72 °C (polimerizzazione), seguiti da un'estensione finale di 7 minuti a 72 °C.

Retrotrascrizione	45 °C per 30'
Denaturazione	95 °C per 2'
Amplificazione PCR (35 cicli)	95 °C per 15'' (Denaturazione) 52 °C per 30'' (Appaiamento dei primers) 72 °C per 45'' (Polimerizzazione)
Estensione finale	72 °C per 7'

Tabella 1. Profilo termico della reazione di retrotrascrizione e amplificazione “*one step*”.

La miscela di amplificazione (master mix) era costituita come di seguito riportato.

Reaction buffer 2 x	25 uL
Primer HEV044 (10uM)	2 uL
Primer HEV040 (10uM)	2 uL
H2O	15 uL
RNAasi inibitor (RRI)	0.5 uL
Enzima Super Script III	0.5 uL

Tabella 2. Composizione della master mix per la reazione di retrotrascrizione e amplificazione “*one step*”.

In ciascuna provetta di amplificazione sono stati aliquotati 45 ul di master mix + 5 uL di RNA estratto, mentre per verificare la corretta riuscita della seduta analitica sono stati utilizzati sia un controllo negativo (acqua) sia un controllo positivo per HEV.

Il frammento ottenuto con questa prima amplificazione è una porzione di 508 bp della ORF2 che codifica per la proteina del capsido.

11.4 Amplificazione nested

I frammenti ottenuti dalla prima amplificazione sono stati poi utilizzati come stampo per l'allestimento di una seconda reazione di amplificazione (*nested PCR*) in cui si usano primers che si appaiano più internamente rispetto alla coppia di primers inizialmente utilizzata al fine di incrementare la sensibilità e la specificità della reazione, ottenendo in questo modo una maggior quantità di DNA virale amplificato

e riducendo il rischio di prodotti aspecifici eventualmente formatisi durante la prima reazione.

Si ottiene in questo modo il prodotto di amplificazione di 459 bp che verrà poi sequenziato per la sottotipizzazione.

Il protocollo di *nested* PCR è avvenuto come segue.

Denaturazione	95 °C per 2'
Amplificazione PCR (35 cicli)	95 °C per 15'' 52 °C per 30'' 72 °C per 45''
Estensione finale	72 °C per 7'

Tabella 3. Profilo termico della reazione di *nested* PCR.

2 uL di amplificato della prima reazione sono stati aliquotati in 48 uL di una seconda mix costituita come di seguito riportato.

Reaction buffer Dream (con Mg)	5 uL
Primer HEV110 (10 uM)	2 uL
Primer HEV41 (10 uM)	2 uL
Dntp	1 uL
H2O	37.8 uL
Enzima Dream TAQ	0.25 uL

Tabella 4. Composizione della master mix della reazione di *nested* PCR.

11.5 Elettroforesi capillare

L'elettroforesi è una tecnica che consente la separazione di frammenti di DNA in base alla loro taglia e carica, infatti molecole di DNA cariche negativamente per la presenza di gruppi fosfato e ad alto peso molecolare migrano più lentamente verso un catodo (carica positiva) disposto al lato opposto della piastra rispetto a molecole a più basso peso molecolare.

Esistono 2 tipologie di tecniche elettroforetiche: elettroforesi su gel e capillare, per questo studio è stata impiegata la tecnica dell'elettroforesi capillare la quale consente di fornire risultati in tempi ridotti in aggiunta alla capacità di analizzare fino a 96 campioni per corsa.

In questa tecnica la presenza dei frammenti di DNA della taglia attesa (459 bp) viene rilevata attraverso la separazione dei campioni ottenuta grazie alla migrazione differenziale degli analiti in un campo elettrico applicato, i quali vengono preliminarmente coniugati a dei fluorocromi per essere in seguito separati all'interno di un capillare realizzato in silice nel quale viene iniettata una piccolissima quantità di campione e nel quale è contenuto un polimero.

Il sistema utilizzato per l'elettroforesi capillare è stato il *QIAxcel Advanced System*, *QIAGEN*.

Dal risultato della corsa elettroforetica è possibile analizzare alcuni aspetti di rilievo come l'eventuale presenza di dimeri dei primers, prodotti aspecifici evidenziabili all'elettroferogramma come picchi la cui altezza differisce dall'attesa, la dimensione del frammento di DNA e l'RFU (unità di fluorescenza relativa) la quale è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita in questione: in seguito a questo dosaggio indiretto del materiale amplificato, ogni campione è stato diluito con acqua in modo da corrispondere ad un valore di RFU pari a circa 500, valore valutato come ottimale per consentire il corretto svolgimento delle successive procedure di sequenziamento.

La proporzione eseguita per la preparazione dei diluiti è stata la seguente:

Valore di RFU rilevato : $X = 500 : 2$

dove X è il volume in uL di acqua che andranno aggiunti al materiale amplificato per la preparazione del campione diluito, 500 è il valore di RFU desiderato e 2 è il volume in uL di analita da prelevare per la preparazione del campione diluito.

11.6 Reazione di sequenza

Il protocollo di sequenziamento è basato sul metodo Sanger, per la reazione di sequenza sono stati utilizzati primers HEV41 (forward) e HEV110 (*reverse*) a concentrazione madre (100 uM), 2 uL di H₂O, 6 uL di master mix e 1 uL di campione amplificato diluito.

Per ogni campione sono state preparate 2 provettine per l'amplificazione, dove nella prima si aggiunge alla miscela di reazione 1 uL di primer *forward* e nella seconda 1 uL di primer *reverse*.

I ddNTPs sono marcati con 4 fluorocromi differenti per ogni base azotata i quali daranno una diversa emissione quando saranno in seguito letti dal sequenziatore.

La reazione è stata condotta impostando il profilo termico nel seguente modo:

25 cicli a 96° C per 10'', 50° C per 5'', 72° C per 60''.

A termine della reazione di sequenza è stata fatta una procedura di purificazione tramite l'utilizzo di una resina seguita da un'agitazione per 35'.

11.7 Sequenziamento

Il sequenziatore automatico impiegato per questo studio (*3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems*) possiede 16 capillari ed effettua un'elettroforesi usando come mezzo di separazione un polimero incluso nel capillare all'interno del quale viene applicato un potenziale elettrico che determina la migrazione delle molecole di DNA con velocità differenti lungo il capillare.

I frammenti di DNA marcati vengono colpiti da una sorgente luminosa ed emettono una fluorescenza diversa a seconda del tipo di nucleotide; al termine della corsa la rappresentazione dei risultati ottenuti viene effettuata tramite un elettroferogramma dove ciascun picco rappresenta un nucleotide letto durante il transito nel capillare.

11.8 Lettura delle sequenze

A termine del sequenziamento sono stati creati dei file di output in formato *.abi* i quali contengono l'informazione grezza relativa al sequenziamento del frammento di DNA per determinare la sequenza su entrambi i filamenti (Forward e Reverse) che dovrà poi essere accuratamente valutata ed ispezionata per poter ottenere un buon allineamento.

L'informazione contenuta nei file con estensione *.abi* può essere esplorata attraverso l'utilizzo di alcuni software disponibili su sistema operativo Windows, per questo studio è stato utilizzato *BioEdit*, un editor di allineamento di sequenze di DNA scritto in linguaggio C++ e scaricabile gratuitamente il quale dispone di un'intuitiva interfaccia grafica che rende relativamente semplice l'allineamento e la manipolazione delle sequenze (³⁶.)

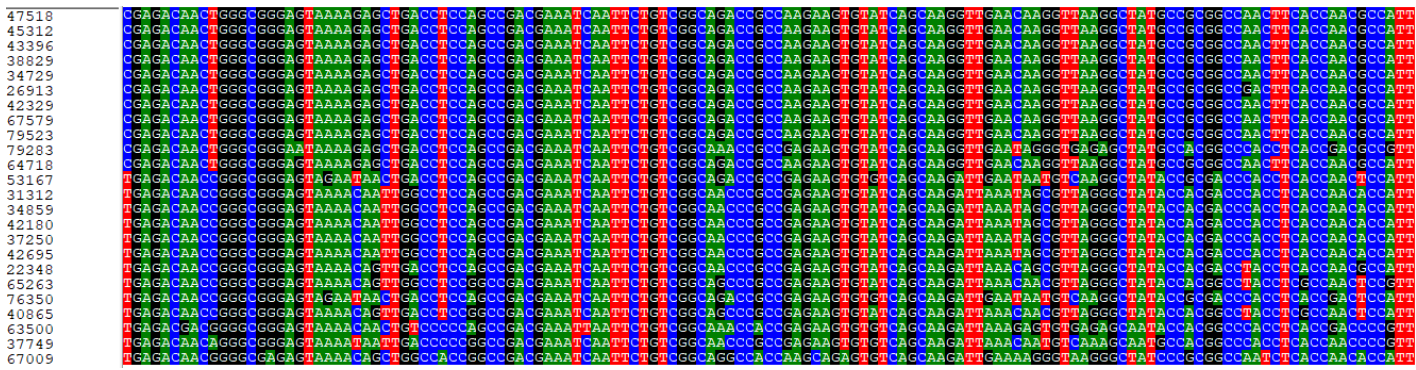


Figura 1. Allineamento delle sequenze per il quale è stata attivata la funzionalità che rende possibile mostrare i nt con una colorazione differenziale.

Accedendo ad un file *abi* viene reso visibile l'elettroferogramma, ovvero il grafico prodotto dal sequenziamento precedentemente effettuato nel quale l'altezza e la nitidezza dei picchi correlano con una buona accuratezza della "chiamata" del nucleotide, al contrario la presenza di picchi sovrapposti indica un'alta probabilità d'errore.

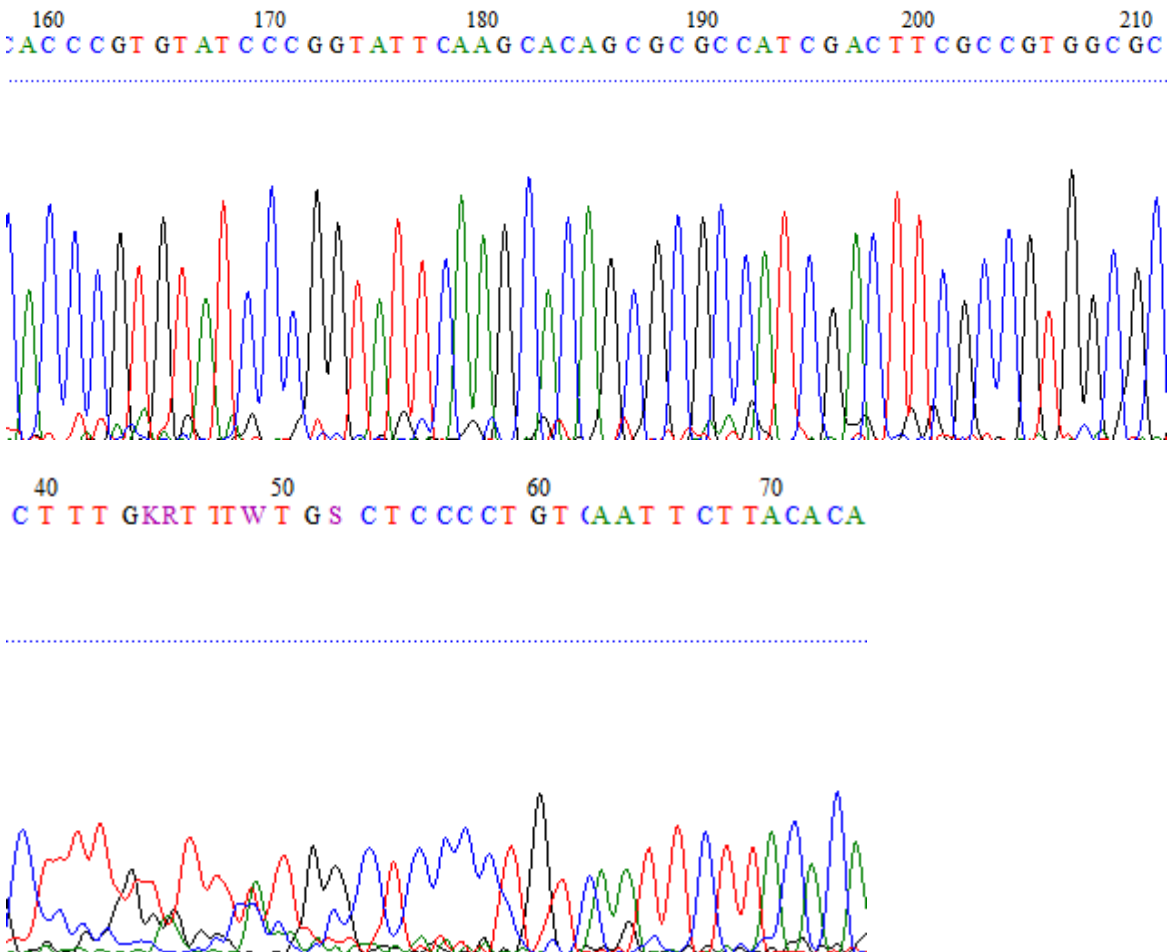


Figura 2. Porzione di elettroferogramma con buona accuratezza (in alto), scarsa accuratezza e alto rumore di fondo (in basso.)

E' inoltre rilevante notare come alcune volte in alternativa alle lettere d'inizio dei 4 nucleotidi compaiono dei caratteri diversi seguendo il codice IUPAC, i quali indicano la presenza di due o più nucleotidi nella posizione relativa, possibile in presenza di quasi-specie virali⁽³⁷⁾, si veda la tabella 6 per maggiori dettagli.

Nucleotide Code:	Base:
A.....	Adenine
C.....	Cytosine
G.....	Guanine
T (or U).....	Thymine (or Uracil)
R.....	A or G
Y.....	C or T
S.....	G or C
W.....	A or T
K.....	G or T
M.....	A or C
B.....	C or G or T
D.....	A or G or T
H.....	A or C or T
V.....	A or C or G
N.....	any base

Tabella 6. Codice nucleotidico IUPAC.

Dopo aver valutato la bontà delle sequenze in esame è stata fatta la procedura di allineamento, la quale permette di individuare regioni identiche o simili che possono avere relazioni filogenetiche.

L'eterogeneità dei sottotipi di HEV riflette una più o meno spiccata diversità nucleotidica tra gli stessi, inoltre nel contesto di un gruppo di sequenze appartenenti allo stesso sottotipo degli errori nell'allineamento possono essere interpretati come singole mutazioni.

Successivamente per ogni coppia di sequenze Forward e Reverse è stata costruita tramite il software *BioEdit* la sequenza consenso la quale viene dapprima convertita in formato fasta per poi essere lanciata su BLAST, uno dei programmi di allineamento più utilizzati nel web al fine di verificare la similarità della sequenza in esame con altre sequenze già depositate da altri autori e per le quali è già stato attribuito il sottotipo.

> 43396

```
CGAGACA AACTGGGCGGGAGTAAAAGAGCTGACCTCCAGCCGACGAAATC
AATTCTGTCGGCAGACCGCCAAGAAGTGTATCAGCAAGGTTGAACAAGG
TTAAGGCTATGCCGCGGCCAACTTCACCAACGCCATTCGTCCCAGTGAAG
TGCAGGTCCTTCATGAAGCGCGTGGCTGCAGTGGTCGTGAGCTCAGCAGT
TCCGTCGGCGCCACGGCGCAAACGGTGACGGGCGCGTGCTAGTGTACCGG
GATACACGGGTGTTAGTGTTCCTCCGGGGGTTAAATTCCTAAATTCAAGCTC
AAGTGCAA AATCAAGAAGGCCCAATGCCCCAGTATAGGGCGTATTGGTG
TAAGAATTAACAGGGGAGCCATGAATACAAAGCATAACCAGACCCGATG
TCGCCTCCTCCTCGGCC
```

Figura 3. Sequenza in formato fasta

Ripetendo tale procedura per ciascuna coppia di sequenze F e R è stato creato un file *.Bio* contenente le sequenze consenso allineate a gruppi per sottotipo, le quali sono state in seguito copiate su di un file *.txt* in formato fasta.

Il file *txt* precedentemente preparato è stato convertito in formato *.meg* per poter essere riconosciuto dal software *Mega* utilizzato per l'analisi filogenetica.

11.9 Composizione del dataset di sequenze

Il dataset per l'analisi filogenetica di genotipizzazione include un totale di 93 sequenze (n=93) relative al dominio metiltrasferasico della ORF1 (130 nt), delle quali 58 provenienti dal nostro laboratorio (n=58) e 35 (n=35) prese dal database *nucleotide* dell'NCBI.

Il dataset per l'analisi filogenetica di sottotipizzazione basata sul frammento di 412 nt (esclusa la sequenza dei primers) della ORF2 include un totale di 47 sequenze (n=47) delle quali 24 (n=24) provenienti dal nostro laboratorio e 23 (n=23) prese dal database *nucleotide* dell'NCBI.

11.10 ANALISI FILOGENETICA

Le relazioni evolutive tra gli organismi o più in generale tra geni omologhi possono essere rappresentate attraverso alberi filogenetici, ovvero grafi costituiti da nodi e rami in cui ogni ramo mette in relazioni due nodi, questi rappresentano le unità tassonomiche mentre i rami definiscono le relazioni tra queste, in termini di ascendenza e discendenza.

Per questo studio l'analisi filogenetica è stata condotta attraverso l'utilizzo di *Mega-X* (Molecular Evolutional Genetic Analysis), un package che comprende molteplici programmi di ricostruzione filogenetica ma che tuttavia non possiede algoritmi di multiallineamento e per questo motivo è fondamentale che le sequenze di input siano già state allineate (³⁸).

I metodi comunemente utilizzati per la costruzione di alberi filogenetici possono essere classificati in due diverse tipologie:

1. Metodi che applicano algoritmi di clustering, i quali si sviluppano a partire da una definizione di distanza tra sequenze;
2. Metodi di ottimizzazione i quali costruiscono l'albero direttamente dalle sequenze e non da una matrice di distanze, evitando la perdita di una parte dell'informazione conseguente al multiallineamento delle sequenze comportando però un grande aumento della complessità di calcolo computazionale.

➤ Il metodo *maximum likelihood*

Per questa tesi è stato applicato il metodo della massima verosimiglianza (*maximum likelihood*), un metodo di ottimizzazione il quale rappresenta l'approccio che più di tutti è in grado di determinare l'albero più consistente con i dati forniti in input, ovvero il multiallineamento delle sequenze nucleotidiche.

Per ciascun sito del multiallineamento si calcola la probabilità che esso sia generato da un preciso albero, estendendo la ricerca di probabilità a tutti i possibili alberi si ottiene l'albero a maggior probabilità di rappresentare il multiallineamento.

12. RISULTATI

12.1 GENOTIPIZZAZIONE

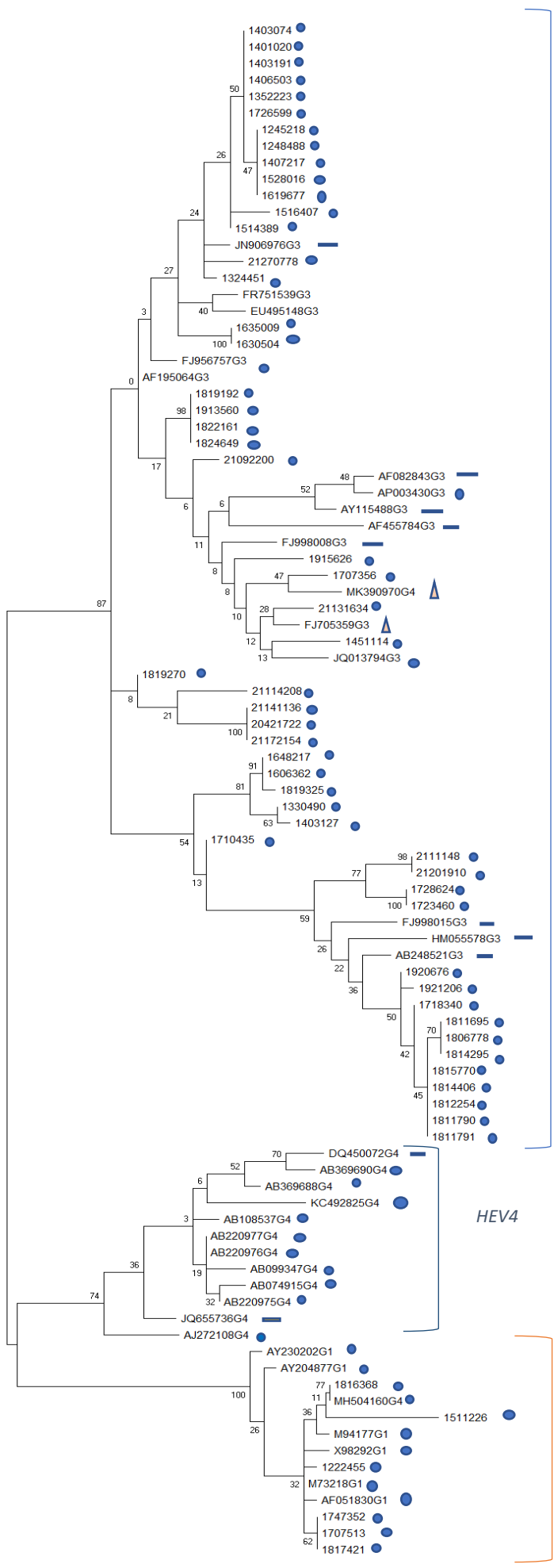
Nel corso di 8 anni (dal 2012 al 2019) sono state studiate e genotipizzate nel nostro laboratorio 58 sequenze (n=58) della lunghezza di 130 nt derivate dal dominio metiltrasferasico della ORF1.

La ricostruzione filogenetica di questa e di altre sequenze (n=35) depositate nel database *Nucleotide* dell'*NCBI* permette di ricostruire la storia evolutiva delle stesse.

Dalla topologia dell'albero si evidenziano 3 clusters dei quali il primo comprende esclusivamente sequenze (n=13) relative ad *HEV1* isolate in Paesi dove il genotipo è endemico (India, Nepal, Cina) e da fonti esclusivamente umane data la caratteristica modalità di trasmissione, all'interno di questo cluster sono presenti campioni positivi ottenuti da individui valutati nel nostro laboratorio, ritornati da zone endemiche per il genotipo; il secondo cluster comprende sequenze (n=12) del genotipo *HEV4*, presente tanto nei Paesi europei quanto nei Paesi asiatici (Cina, Giappone) ed il cui isolamento sia da fonte umana che animale correla con l'origine zoonotica dell'infezione, nella nostra casistica non c'è alcun campione con questo genotipo.

All'interno del terzo cluster comprendente sequenze (n=68) relative al genotipo *HEV3* si rendono evidenti 2 sub-cluster dei quali il primo comprendente alcune sequenze (FJ998015, HM055578, AB248521) sottotipizzate dagli autori come *HEV-3e* ad isolamento suino e molte delle sequenze provenienti dal laboratorio, il secondo cluster include invece anche alcune sequenze (FJ956757, JN906976) sottotipizzate dagli autori come *HEV-3f*, *3c* (JQ013794) e *3i* (FJ998008.)

E' evidente che la ricostruzione filogenetica ottenuta con queste sequenze risulta inadeguata per l'attribuzione del sottotipo virale. In effetti il breve frammento utilizzato per la diagnosi molecolare e per la tipizzazione non permette una sottotipizzazione affidabile, per questo motivo e data l'importanza di identificare con maggiore precisione le varianti virali che circolano, dal 2017 il laboratorio sottotipizza i campioni positivi al test molecolare come descritto in questa tesi.



HEV3

HEV4

HEV1

- = isolamento humano
- ▲ = isolamento da cinghiale
- = isolamento da suino

Figura 12.1 Analisi filogenetica basata sul frammento di 130 nt del dominio Met della ORF1 di sequenze sequenziate in laboratorio (n=58) e di sequenze sequenziate e depositate (n=35) nel database *Nucleotide* dell'*NCBI*, per *n* totale=93.

L'albero è stato costruito utilizzando il metodo *Maximum Likelihood*, No. Of Bootstrap replications: 100, Model\Method: Tamura-Nei Model. *Mega- X*.

12.2 Valutazioni clinico-epidemiologiche

Durante questo studio retrospettivo è stato fatto il monitoraggio di 24 pazienti sottotipizzati per HEV per i quali la diagnosi è stata perseguita tramite metodiche molecolari di amplificazione dell'acido nucleico virale, il cui rilevamento durante il periodo di malattia accompagnato da dati sierologici che attestano la positività alle IgM specifiche definiscono HEV come agente eziologico dell'epatite acuta in corso.

Il 100% dei pazienti in esame presentava ipertransaminasemia ed era affetto da epatite acuta (non sono stati segnalati casi di infezione cronica ed 1 caso presentava la sindrome di Guillain-Barrè) mentre il rapporto maschi-femmine era di 18 : 6 con un'età media di 58 anni, 3 pazienti inoltre riferiscono di aver consumato prodotti di origine suina nel periodo antecedente i sintomi della malattia.

Anno	n° di pazienti	maschi	femmine	Campioni sangue	Campioni feci *
2017	4	2	2	3	3
2018	4	3	1	3	4
2019	16	13	3	10	10
<i>Totale</i>	24	18	6	16	17

Tabella 12.1

* preferibile al sangue per la ricerca dell'acido nucleico virale a causa della sua maggior persistenza nel campione biologico.

I casi notificati erano tutti autoctoni e sostenuti dal genotipo 3 endemico in Italia e in altri Paesi europei con l'eccezione di 1 caso di importazione (paziente rientrante dal Bangladesh) con genotipo HEV1.

12.3 Sottotipizzazione

La sottotipizzazione del genotipo endemico in Italia (*HEV3*) ed in particolar modo nelle regioni del centro e in Lombardia, in accordo con la letteratura scientifica, mostra come i sottotipi *HEV- 3e* (n=11) e *3f* (n=10) siano i predominanti seguiti dal genotipo *3c* (n=2); si segnala inoltre un caso d'importazione in un paziente rientrante dal Bangladesh del genotipo *HEV- 1* (n=1), Paese in cui la circolazione di questo genotipo è endemica.

<i>Genotipo</i>	<i>Sottotipo</i>	<i>Numero di sequenze sottotipizzate</i>
3	<i>e</i>	11
	<i>f</i>	10
	<i>c</i>	2
1		1
<i>Totale</i>		24

Tabella 12.2 Sequenze di HEV sottotipizzate.

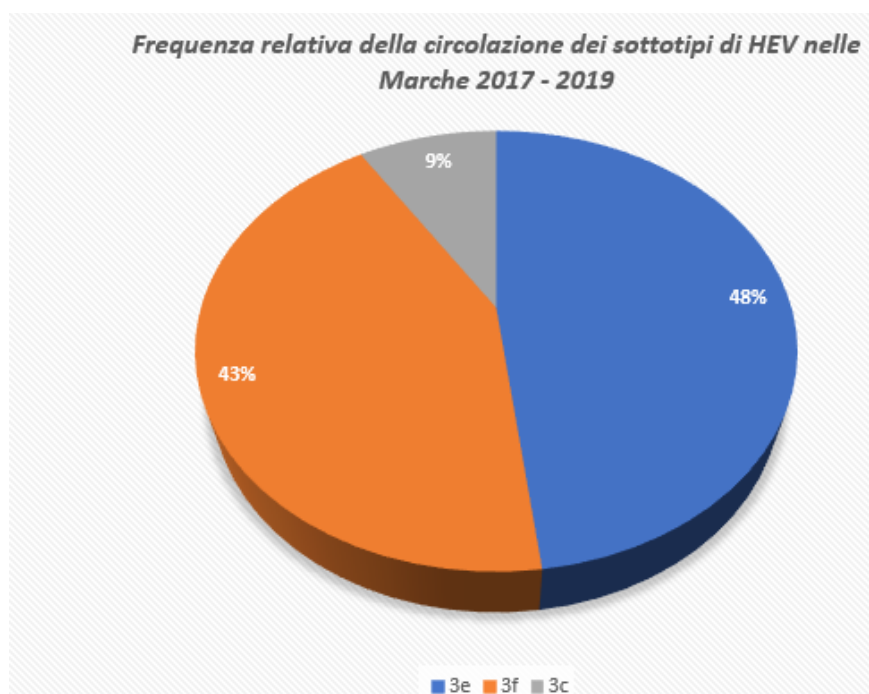


Figura 12.2 Il diagramma a torta mostra la frequenza relativa della circolazione dei sottotipi di HEV nei pazienti sottotipizzati, *Excel*.

Dall'analisi filogenetica emerge che alcune sequenze sono identiche (100% id. nt) o altamente simili (> 98% id. nt) le une alle altre essendo la divergenza tra sottotipi in genere minore del 2% e nell'albero sono identificabili 3 distinti clusters corrispondenti ai 3 sottotipi individuati (Figura 12.3), ben divergenti dal genotipo *HEV-1* la cui % d'identità con le altre sequenze è di circa il 79% (si veda per maggiori dettagli la figura 12.4.)

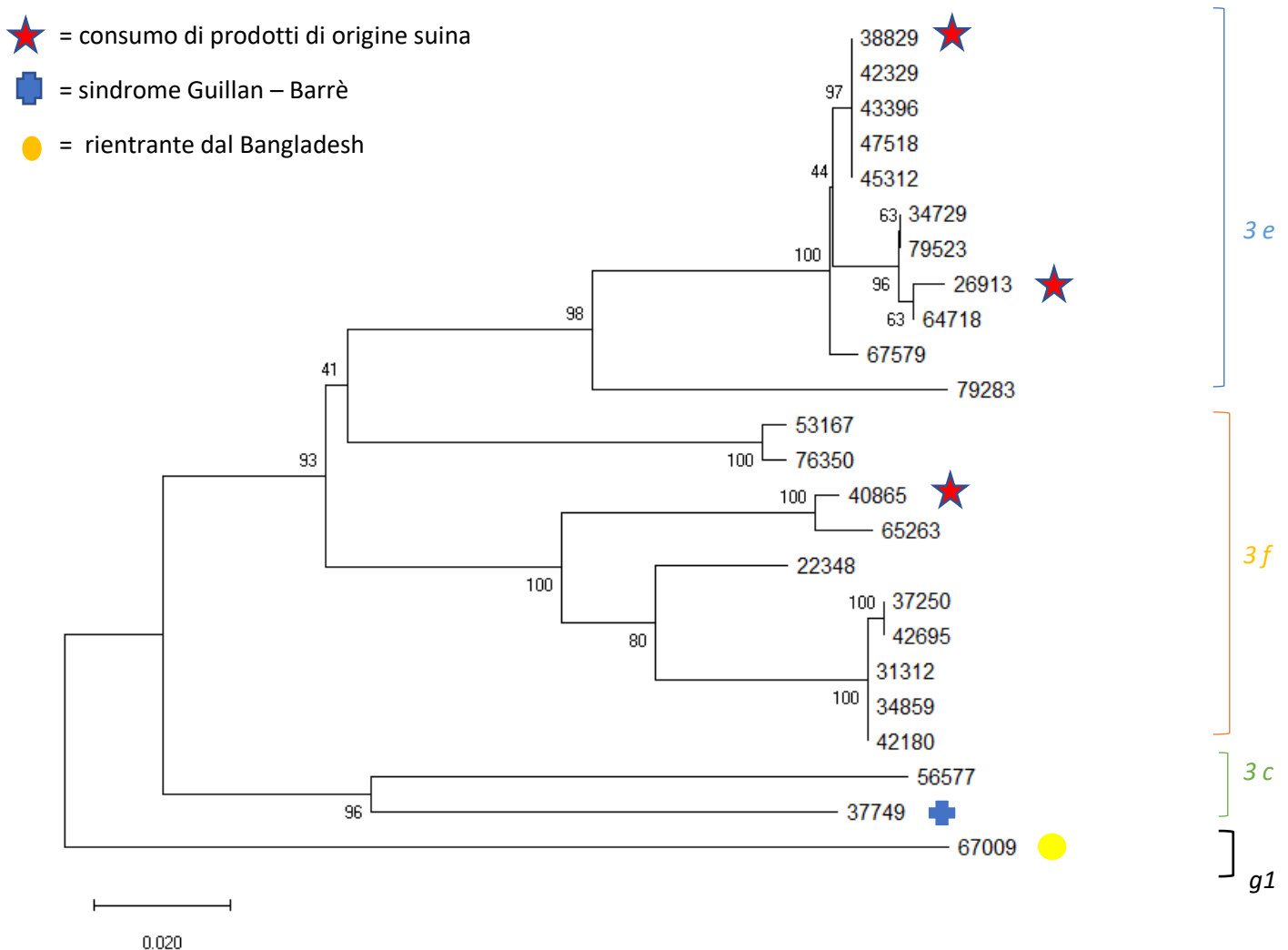


Figura 12.3 Analisi filogenetica basata sul frammento di 412 nt della ORF2 delle sequenze *HEV3* sottotipizzate (n=24), la sequenza *HEV1* è stata utilizzata come outgroup (67009); l'albero è stato costruito utilizzando il metodo *Maximum Likelihood*, No. Of Bootstrap replications: 100, Model/Method: Tamura-Nei Model. *Mega- X*.

47518	47518	45312	43396	38829	34729	26913	42329	67579	32146	79283	64718	53167	31312	34859	42180	37250	42695	22348	65263
47518	ID	1,000	1,000	1,000	0,987	0,980	1,000	0,992	0,987	0,917	0,985	0,876	0,856	0,856	0,856	0,854	0,854	0,871	0,856
45312	1,000	ID	1,000	1,000	0,987	0,980	1,000	0,992	0,987	0,917	0,985	0,876	0,856	0,856	0,856	0,854	0,854	0,871	0,856
43396	1,000	1,000	ID	1,000	0,987	0,980	1,000	0,992	0,987	0,917	0,985	0,876	0,856	0,856	0,856	0,854	0,854	0,871	0,856
38829	1,000	1,000	1,000	ID	0,987	0,980	1,000	0,992	0,987	0,917	0,985	0,876	0,856	0,856	0,856	0,854	0,854	0,871	0,856
34729	0,987	0,987	0,987	0,987	ID	0,992	0,987	0,985	1,000	0,910	0,997	0,873	0,849	0,849	0,849	0,847	0,847	0,864	0,854
26913	0,980	0,980	0,980	0,980	0,992	ID	0,980	0,978	0,992	0,905	0,995	0,878	0,854	0,854	0,854	0,851	0,851	0,868	0,854
42329	1,000	1,000	1,000	1,000	0,987	0,980	ID	0,992	0,987	0,917	0,985	0,876	0,856	0,856	0,856	0,854	0,854	0,871	0,856
67579	0,992	0,992	0,992	0,992	0,985	0,978	0,992	ID	0,985	0,915	0,983	0,876	0,859	0,859	0,859	0,856	0,856	0,873	0,864
32146	0,987	0,987	0,987	0,987	1,000	0,992	0,987	0,985	ID	0,910	0,997	0,873	0,849	0,849	0,849	0,847	0,847	0,864	0,854
79283	0,917	0,917	0,917	0,917	0,910	0,905	0,917	0,915	0,910	ID	0,907	0,849	0,871	0,871	0,871	0,868	0,868	0,873	0,859
64718	0,985	0,985	0,985	0,985	0,997	0,995	0,985	0,983	0,997	0,907	ID	0,876	0,851	0,851	0,851	0,849	0,849	0,866	0,851
53167	0,876	0,876	0,876	0,876	0,873	0,878	0,876	0,876	0,873	0,849	0,876	ID	0,890	0,890	0,890	0,888	0,888	0,873	0,861
31312	0,856	0,856	0,856	0,856	0,849	0,854	0,856	0,859	0,849	0,871	0,851	0,890	ID	1,000	1,000	0,997	0,997	0,949	0,927
34859	0,856	0,856	0,856	0,856	0,849	0,854	0,856	0,859	0,849	0,871	0,851	0,890	1,000	ID	1,000	0,997	0,997	0,949	0,927
42180	0,856	0,856	0,856	0,856	0,849	0,854	0,856	0,859	0,849	0,871	0,851	0,890	1,000	1,000	ID	0,997	0,997	0,949	0,927
37250	0,854	0,854	0,854	0,854	0,847	0,851	0,854	0,856	0,847	0,868	0,849	0,888	0,997	0,997	0,997	ID	1,000	0,951	0,924
42695	0,854	0,854	0,854	0,854	0,847	0,851	0,854	0,856	0,847	0,868	0,849	0,888	0,997	0,997	0,997	1,000	ID	0,951	0,924
22348	0,871	0,871	0,871	0,871	0,864	0,868	0,871	0,873	0,864	0,873	0,866	0,873	0,949	0,949	0,949	0,951	0,951	ID	0,917
65263	0,856	0,856	0,856	0,856	0,854	0,854	0,856	0,864	0,854	0,859	0,851	0,861	0,927	0,927	0,927	0,924	0,924	0,917	ID
76350	0,873	0,873	0,873	0,873	0,866	0,871	0,873	0,873	0,866	0,856	0,868	0,992	0,893	0,893	0,893	0,890	0,890	0,876	0,864
40865	0,864	0,864	0,864	0,864	0,861	0,861	0,864	0,871	0,861	0,861	0,859	0,873	0,924	0,924	0,924	0,922	0,922	0,924	0,987
56577	0,813	0,813	0,813	0,813	0,800	0,800	0,813	0,810	0,800	0,847	0,798	0,817	0,837	0,837	0,837	0,837	0,837	0,822	0,822
37749	0,830	0,830	0,830	0,830	0,827	0,822	0,830	0,827	0,827	0,820	0,825	0,820	0,827	0,827	0,827	0,827	0,827	0,830	0,832
HEV1	67009	0,793	0,793	0,793	0,793	0,786	0,783	0,793	0,791	0,786	0,783	0,783	0,798	0,783	0,783	0,783	0,786	0,786	0,791

Figura 12.4 Matrice d'identità delle sequenze nucleotidiche sottotipizzate, *BioEdit*.

Al fine di identificare una correlazione tra l'infezione nell'uomo e l'origine zoonotica della stessa nella seguente analisi filogenetica (figura 12.5) sono state aggiunte oltre alle 24 sequenze ad isolamento umano precedentemente analizzate, sia sequenze isolate nell'uomo sia sequenze isolate in animali da campioni fecali per le quali si è fatta la ricerca nel database *Nucleotide* dell'*NCBI* (National center for biotechnology information.)

Per individuare l'origine zoonotica dell'infezione da *HEV3* si deve considerare la presenza di clusters comprendenti sequenze isolate sia dall'uomo che dall'animale, per questo motivo nel cluster delle sequenze relative al sottotipo *HEV-3c* la presenza di sequenze isolate dall'uomo ★ (MH450021, 56577, 37749) e dal cinghiale ✕ (MH836532, MH836524, MK390970, MT840366) è indice di una correlazione zoonotica.

In particolar modo è significativa la vicinanza esistente tra 56577 e MH450021 isolate entrambe nel 2017 con MT840366 proveniente dal Lazio, territorio con alta prevalenza di suini trovati positivi per *HEV*.

Nel cluster *HEV-3f* le sequenze sono tutte ad isolamento umano e provenienti dall'Italia ▲, tuttavia si riscontrano 4 sequenze ▲ (MF444027, MW355380, JN906974, JN906975) la cui vicinanza filogenetica è riconducibile all'isolamento avvenuto nel territorio francese nello stesso anno.

Nel cluster *HEV- 3e* si individua un primo sub-cluster di 4 sequenze ■ isolate in Giappone delle quali 3 suine (AB094252, AB471011, AB471933) ed 1 umana (AB194284), 3 sequenze strettamente correlate inglesi ● ad isolamento umano e un sub-cluster di 14 sequenze⁾ isolate in Italia dall'uomo; è inoltre da segnalare una strettissima correlazione tra 2 sequenze italiane che si discostano dal sopracitato sub-cluster, delle quali una ad isolamento umano (79283) e una ad isolamento animale (KJ174069.)

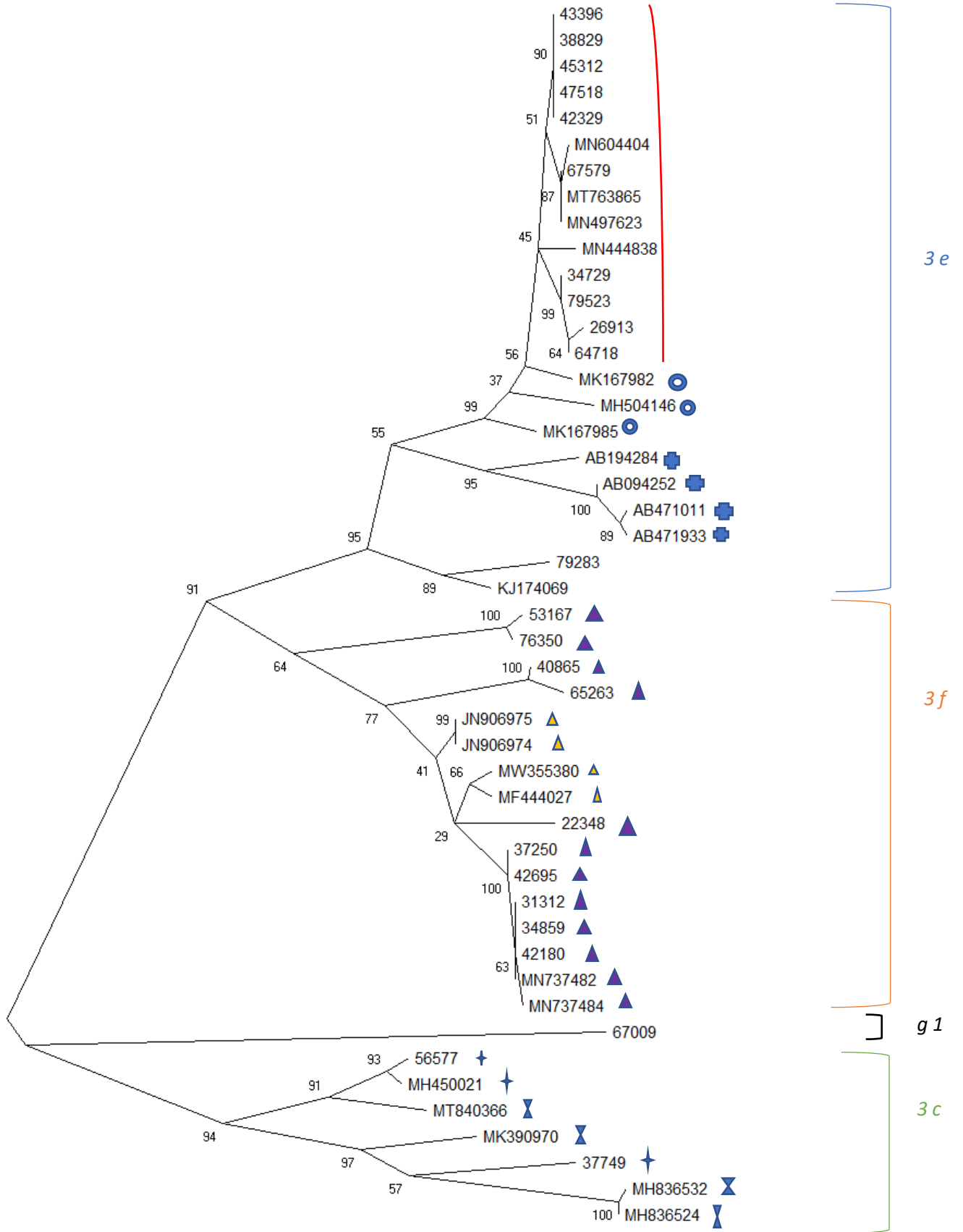


Figura 12.5 Analisi filogenetica basata sul frammento di 412 nt della ORF2 delle sequenze *HEV3* sottotipizzate (n=47), la sequenza *HEV1* è stata utilizzata come outgroup (67009); l'albero è stato costruito utilizzando il metodo *Maximum Likelihood*, No. Of Bootstrap replications: 100, Model\Method: Tamura- Nei Model. *Mega- X*.

13. DISCUSSIONE

13.1 *Discussione*

L'analisi filogenetica rivela un'ampia varietà tra i differenti sottotipi di *HEV3* circolanti in Italia dei quali i più diffusi sono i sottotipi *HEV-3e*, *3f* (n=16, n=12) la cui origine zoonotica è dimostrata dai crescenti rilevamenti su campioni fecali animali, soprattutto di cinghiali e suini; per quanto riguarda il sottotipo *HEV-3c* c'è una minor prevalenza di casi autoctoni tra i suini mentre invece rappresenta la variante predominante in Inghilterra, Germania e Paesi Bassi⁽⁴⁰⁾.

In ogni caso, l'origine zoonotica del virus è confermata da una stretta correlazione tra sequenze animali e sequenze isolate dall'uomo la cui evidenza è ampiamente riportata in questo studio così come nella letteratura scientifica⁽⁴¹⁾ e avvalorata la teoria che campionamenti eseguiti nello stesso anno e territorio siano riconducibili a piccoli clusters locali, definendo dunque una comune fonte di infezione.

Dalle valutazioni clinico epidemiologiche dei pazienti emerge come la circolazione del genotipo *HEV3* sia endemica nel nostro Paese, specialmente nella regione Marche dove il trend dei casi notificati dal SEIEVA la collocano al terzo posto evidenziandone quindi la presenza di condizioni ambientali e socio-culturali che rendono possibile la grande diffusione del virus a livello locale, tuttavia non vi è sempre piena consapevolezza sul ruolo delle infezioni autoctone nell'epidemiologia dell'infezione e, seppure con minore frequenza rispetto al passato, si tende ancora ad associarla a viaggi in Paesi esteri.

Conseguentemente la ricerca del virus viene difficilmente effettuata su soggetti che non sono viaggiatori, anche nei casi in cui sarebbe indicato, infatti è riportato come solo nel 38% dei soggetti con epatite acuta risultata negativa ai virus di tipo A, B e C, viene effettuata la ricerca specifica per le IgM anti *HEV* ⁽⁴⁶⁾.

In conclusione questo studio riporta che il genotipo *HEV3* circola prevalentemente tra maiali d'allevamento e selvatici che costituiscono quindi il reservoir naturale del virus mentre l'uomo rappresenta soltanto un ospite occasionale il quale si può infettare tramite la via fecale-orale per ingestione di alimenti contaminati, specialmente quelli di origine suina il cui consumo e manipolazione sono riconosciuti come fattori di rischio dell'infezione, infatti oltre alla via alimentare il contatto con animali infetti rappresenta una possibile via di trasmissione (esposizione professionale.)

Inoltre l'elevata età media dei contagiati (58 anni) e l'alto rapporto maschi-femmine (3:1) possono essere esplicativi di uno stile di vita che predispone l'individuo infettato allo sviluppo dell'epatite acuta, come ad esempio un maggior consumo di

alcool da parte di maschi adulti; nonostante ciò studi di natura epidemiologica mostrano che sebbene il numero di casi clinici notificati sia sottostimato, nelle zone in cui il virus è endemico è presente un'altissima sieroprevalenza di anticorpi anti *HEV* (15-20% della popolazione in USA, Europa e Giappone), tanto che il CDC (“Center for Disease Control and prevention”) lo ha definito “agente patogeno emergente”⁽⁴⁷⁾.

Per quanto riguarda l'Italia, è evidente una grande variabilità geografica nella sieroprevalenza tra i donatori (popolazione più adatta per valutazioni sieropidemiologiche) che va da 1.3% in Piemonte al 49% in Abruzzo, che lascia aperta l'ipotesi che diversi fattori predisponenti come abitudini alimentari, caratteristiche ambientali, differente presenza di reservoir animali, acque contaminate, livelli igienici e socio-economici possono giocare un ruolo ⁽⁴⁸⁾.

Per quanto riguarda le Marche la valutazione della sieroprevalenza condotta dal Servizio Trasfusionale Regionale nel corso del 2018 su 639 donatori di sangue afferenti ai diversi centri provinciali mostra una prevalenza media superiore al 15% e un evidente gradiente Nord-Sud, verosimilmente legato ad abitudini alimentari e alla presenza di un maggior numero di allevamenti di maiali nell'entroterra marchigiano (Macerata, Fermo, Ascoli. vedi tabella 13.1.)

<i>Provincia</i>	<i>N° di campioni positivi alle IgG</i>	<i>N° di campioni analizzati</i>	<i>Prevalenza %</i>
Senigallia	5	100	5,00
Pesaro	4	74	5,41
Macerata	24	191	12,57
Fermo	14	76	18,42
Ascoli	50	198	25,25
<i>Totale</i>	<i>97</i>	<i>639</i>	<i>15,18</i>

Tabella 13.1

13.2 L'approccio "One health"

Il concetto "One health" riconosce che la salute umana, animale e dell'ambiente sono indissolubilmente legate e tramite l'adozione di un approccio multidisciplinare che richiede la collaborazione di biologi, veterinari, fisici ed altri scienziati, permette la tutela ed il benessere di tutte le specie del pianeta, inoltre considerando che dei 30 patogeni umani identificati negli ultimi 30 anni il 75% ha origine zoonotica, allo stato attuale assume una primaria importanza nel comprendere e limitare la diffusione di malattie infettive, compresa l'infezione da HEV⁽⁴²⁾.

L'applicazione dell'approccio "one health" ad un'infezione zoonotica trasmessa principalmente tramite il consumo di alimenti contaminati prevede l'adozione di 3 steps, dei quali il primo consiste nell'identificazione del reservoir naturale del virus nell'ambiente e delle modalità con le quali viene a contatto con l'uomo, nonché i comportamenti umani a rischio nel contrarre l'infezione⁽⁴³⁾.

Il secondo step prevede la progettazione di adeguati sistemi di sorveglianza finalizzati a prevenire la diffusione del virus ed al rapido tracciamento dei casi per giungere alla fonte comune del contagio, a tale scopo vengono applicate delle misure di controllo della filiera alimentare che tuttavia non essendo specifiche per *HEV* risultano spesso inadeguate ed infatti è stato riscontrato che circa il 5% dei suini giunge viremica al macello rappresentando dunque una fonte di cross-contaminazione durante le fasi di macellazione e di eviscerazione della carne⁽⁴⁴⁾; la prevalenza di HEV è tuttavia estremamente variabile tra gli allevamenti anche se i sistemi non industriali sono stati identificati maggiormente a rischio.

L'ultimo step prevede l'adozione di misure di intervento diretto da parte della comunità medica e veterinaria atte al controllo dell'infezione, questo si ottiene attraverso la formazione continua dei professionisti coinvolti e attraverso l'educazione alimentare volta a sensibilizzare la popolazione nei confronti di un problema di sanità pubblica che può essere almeno in parte contenuto, quando sia veramente recepito il concetto dell'esistenza di una forte interdipendenza tra la salute animale, dell'uomo e dell'ambiente⁽⁴³⁾.

BIBLIOGRAFIA

1. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus. 1980. Wong et al. *The Lancet*.
2. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Braginsky DM, Savinov AP, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983;20:23-31.
3. G. Reyes et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. “*Science*” 1990.
4. A novel virus in swine is closely related to human hepatitis E virus. 1997. Meng et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
5. N.kamar. Hepatitis E virus infection. *Clinical Microbiology reviews* .2014.
6. Said B 2009. Hepatitis E outbreak on cruise ship. “*Emerg. Infect. Dis.*”
7. Benait et al. Outcome of acute hepatic failure due to acute hepatitis E in pregnant women., in *Indian J Gastroenterol*, n. 26, 2007, pp. 6–10.
8. *Fields Virology*, 6th Edition, chapter 70.
9. Molecular biology and infection of Hepatitis E virus. Yechen Nan et al. “*Frontiers in microbiology*”. 2016.
10. Mutational analysis of hepatitis E virus ORF1 “Y- domain”: effects on RNA replication and virion infectivity. Parvez. 2017 “*World Journal gastroenterology*”.
11. Mutational analysis of hepatitis E virus ORF1 “Y- domain”: effects on RNA replication and virion infectivity. Parvez. 2017 “*World Journal gastroenterology*”.
12. RNA dependent RNA polymerases: insights from structure, function and evolution, *Viruses*, 2018, Sangita V et al.
13. The Hepatitis E Virus Open Reading Frame 3 Protein Activates ERK through Binding and Inhibition of the MAPK Phosphatase.
14. Peek – aa -boo: membrane hijacking and the pathogenesis of viral hepatitis Zongdi Feng et al. “*Trends in Microbiology*”. 2014.
15. *Principi di virologia medica*. M Clementi et al.
16. Life cycle and morphogenesis of the Hepatitis E virus. K. Himmelsbach et al. “*Emerging Microbes & Infections.*”
17. Hepatitis E virus infection. N. Kamar et al. *Nature Review disease primers*.
18. Diagnosis of viral hepatitis. P.J.Easterbrook et al. “*Curr Opin HIV AIDS*”. 2017.
19. GLOBAL HEALTH SECTOR STRATEGY ON VIRAL HEPATITIS, 2016–2021.

20. Laboratory diagnosis of HEV infection. C. Zhao et al. "Hepatitis E virus. Advances in experimental Medicine and biology. 2016.
21. Laboratory diagnosis and monitoring of viral hepatitis. Kunatum P. et al. 2019. Gastroenterology Clinics of North America.
22. Yuchen Nan et al. Molecular biology and infection of Hepatitis E virus. 2016. "Frontiers in Microbiology".
23. Clinical manifestations of hepatitis E. S. Xin et al. 2016.
24. Hepatitis E virus: epidemiology, diagnosis, clinical manifestations and treatment. A. T. Aslan et al. "World J Gastroenterol." 2020.
25. Hepatitis E virus and neurological disorders. "Emerg. infect. dis." N. Kamar et al. 2011.
26. Hepatitis E Pathogenesis. "Viruses". S. Lhomme et al. 2016.
27. Disparity of basal and therapeutically activated interferon signaling in contrasting hepatitis E infection. "J. Viral hepatitis". Zhou X. Et al. 2016.
28. Cellular immune responses in acute Hepatitis E virus infection to the viral open reading frame 2 protein. V. Immunol. Ruchi S. et al. 2008.
29. Alterations in NK and NK T cells during acute viral hepatitis E. Journal of viral hepatitis. 2008.
30. Association of polymorphisms in the promoter regions of TNF- α with susceptibility to hepatitis E virus and TNF- α and IFN- γ genes with clinical outcome of hepatitis E infection in India. N. Mishra et al. 2011. "Journal of hepatology".
31. Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. "Virus Res". Krawczynski K et al. 2011.
32. Rhesus monkeys infected with hepatitis E virus from the former USSR are immune to subsequent challenge with an Indian strain of HEV. "Acta virol". Arankalle Va et al. 1993.
33. Factors associated with chronic Hepatitis in patients with HEV infection who have received SOT. "Gastroenterology". N. Kamar et al. 2011.
34. Hepatitis E in an HIV- infected patient. Philippe C. et al. "J. Of Clinical Virology" 2009.
35. Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute H. E in SOT patients. "J. Virol". S. Lhomme et al. 2012.
36. BioEdit manual.
37. Bioinformatics.org.
38. Mega manual.
39. Istruzioni per l' uso manuale del kit QIA Symphony DSP Virus/Pathogen.
40. Molecular characterization of HEV genotype 3 in Italy at human/animal interface. L. De Sabato et al. "Frontiers in Microbiology". 2020.

41. Risk factors for HEV infection and disease. B. L. Kmush et al. "Expert rev. Anti Infect. Ther." 2015.
42. The One Health approach – why is it so important? J.S.Mackenzia et al. "Tropical medicine and infectious disease". 2019.
43. A water focused one health approach for early detection and prevention of viral outbreaks. E.O'Brien et al. "one health7". 2019.
44. HEV Occurrence in pigs slaughtered in Italy. E.Chelli et al. "Animals". 2021.
45. Chronic hepatitis E: a brief review. A.R.Murali et al. "World j Hepatology". 2015.
46. Locally acquired hepatitis E virus in Marche Italy: clinical/laboratory features and outcome. G.Tarantino et al. "Digestive and Liver Disease". 2020.
47. Hepatitis E. Eyasu H.Teshale. "Chapter 4-Travel-Related Infectious Diseases."
48. Mauceri C, et al. Hepatitis E in Italy: A silent presence. "J Infect Public Health" 2017.