



Rapporti ISTISAN

12/16



**Sviluppo di un protocollo
di diagnosi dell'epatite E per le strutture
del Servizio Sanitario Nazionale**



ISSN 1123-3117

**A. Candido, S. Taffon, P. Chionne,
E. Madonna, S. Dettori, R. Giuseppetti,
R. Bruni, A.R. Ciccaglione**

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Sviluppo di un protocollo
di diagnosi dell'epatite E per le strutture
del Servizio Sanitario Nazionale**

Angela Candido, Stefania Taffon, Paola Chionne, Elisabetta Madonna,
Stefano Dettori, Roberto Giuseppetti, Roberto Bruni, Anna Rita Ciccaglione

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

12/16

Istituto Superiore di Sanità

Sviluppo di un protocollo di diagnosi dell'epatite E per le strutture del Servizio Sanitario Nazionale.

Angela Candido, Stefania Taffon, Paola Chionne, Elisabetta Madonna, Stefano Dettori, Roberto Giuseppetti, Roberto Bruni, Anna Rita Ciccaglione
2012, 35 p. Rapporti ISTISAN 12/16

Presso l'Istituto Superiore di Sanità è stato formulato e sviluppato un protocollo standard per la diagnosi di epatite E acuta. Il protocollo prevede l'uso di saggi immunoenzimatici multipli e di un saggio complementare di tipo molecolare. La procedura metodologica è stata sviluppata con la finalità di fornire alle strutture del Servizio Sanitario Nazionale una collaborazione attiva che metta a disposizione le tecnologie più avanzate nel settore. Il protocollo è stato valutato su 52 pazienti con epatite virale acuta non-A-C per i quali era stato richiesto, dalle strutture dell'SSN, un approfondimento diagnostico in un periodo compreso tra febbraio 2004 e novembre 2010. I risultati ottenuti indicano che la metodologia sviluppata è adeguata per una diagnosi certa dei casi di epatite E. Inoltre, la valutazione dei dati suggerisce la necessità di pianificare uno studio nazionale che valuti esattamente l'impatto delle infezioni acute da HEV nel nostro Paese.

Parole chiave: HEV; Diagnostica; IgM; IgG; Real time-PCR; PCR

Istituto Superiore di Sanità

Development of a protocol for the diagnosis of acute hepatitis E for the National Health Service.

Angela Candido, Stefania Taffon, Paola Chionne, Elisabetta Madonna, Stefano Dettori, Roberto Giuseppetti, Roberto Bruni, Anna Rita Ciccaglione
2012, 35 p. Rapporti ISTISAN 12/16 (in Italian)

A standard protocol for the diagnosis of acute hepatitis E was developed at the Istituto Superiore di Sanità (the National Health Institute in Italy). The protocol involves the use of multiple enzyme immunoassays and a complementary molecular test. The methodological procedure has been developed with the aim of providing the facilities to the units of the National Health Service. This protocol for the diagnosis of hepatitis E was validated on 52 sera from patients with non-A-C acute hepatitis, coming from different Italian regions and collected in a period between 2004 and 2010. Present data indicate that the proposed diagnostic strategy is recommended to ensure a correct diagnosis of acute hepatitis E. The results suggest that a national study to assess the exact impact of acute HEV infection in our country should be planned.

Key words: HEV; Diagnosis; IgM; IgG; Real time-PCR; PCR

Il lavoro è stato finanziato dal progetto ISS "Kit e reagenti di diagnostica molecolare per malattie infettive virali" (Prog. 1M14).

Per informazioni su questo documento scrivere a: annarita.ciccaglione@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Candido A, Taffon S, Chionne P, Madonna E, Dettori S, Giuseppetti R, Bruni R, Ciccaglione AR. *Sviluppo di un protocollo di diagnosi dell'epatite E per le strutture del Servizio Sanitario Nazionale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2012. (Rapporti ISTISAN 12/16).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



INDICE

Introduzione al virus dell'epatite E e stato dell'arte della diagnostica	1
Il virus dell'epatite E.....	1
Tassonomia, morfologia e organizzazione genomica.....	1
Eterogeneità genotipica.....	2
Spettro d'ospite	2
Epidemiologia	2
Stato dell'arte della diagnostica dell'epatite E.....	4
Diagnostica dell'epatite E per le strutture del Servizio Sanitario Nazionale	5
Sviluppo di un protocollo di diagnostica	6
Saggi analitici sui campioni.....	6
Test sierologici per il rilevamento degli anticorpi anti-HEV IgM e IgG.....	6
Estrazione da siero dell'RNA virale e <i>real time</i> -PCR per il rilevamento del virus HEV	6
Amplificazione del genoma virale mediante <i>nested</i> -PCR della regione ORF2.....	6
Analisi delle sequenze e genotipizzazione dei campioni.....	7
Procedura standardizzata della raccolta dati	7
Analisi dei dati raccolti nel periodo 2004-2010	9
Pannello di campioni utilizzato.....	9
Risultati.....	9
Analisi dei casi incerti	13
Dati epidemiologici dei pazienti	13
Analisi filogenetica	13
Discussione	15
Bibliografia	17
Appendice A	
Modulistica allegata all'invio dei campioni.....	23
Appendice B	
Schede del database HEV	27
Appendice C	
Lettera di risposta dell'ISS alle strutture sanitarie	33

INTRODUZIONE AL VIRUS DELL'EPATITE E E STATO DELL'ARTE DELLA DIAGNOSTICA

Il virus dell'epatite E

Il virus dell'epatite E (*Hepatitis E Virus*, HEV), appartenente alla famiglia *Hepeviridae*, è un virus ad RNA privo di *envelope* che si trasmette principalmente per via oro-fecale e causa una patologia epatica acuta con decorso generalmente benigno.

Gli aspetti clinici e anatomo-patologici della malattia sono sovrapponibili a quelli delle altre epatiti virali, ma la sua epidemiologia si differenzia nettamente.

Il virus HEV è la causa più frequente di epatiti virali sporadiche nelle zone a clima tropicale o subtropicale con scarse condizioni igieniche, ed è responsabile di epidemie dovute alla contaminazione di acque potabili (1-4). Gli ultimi dati riportano che un terzo della popolazione dei Paesi in via di sviluppo è entrata in contatto con il virus (5).

Nei Paesi industrializzati si osserva una prevalenza di anticorpi anti-HEV superiore a quella attesa con un range che varia tra lo 0,7% e il 5%. La presenza di anticorpi anti-HEV in assenza, almeno apparentemente, di casi clinici, ha fatto sorgere il sospetto che possano esistere serbatoi animali del virus. Infatti, l'HEV è stato recentemente isolato in diversi animali e l'analisi nucleotidica degli isolati virali di origine animale ha mostrato omologia con i ceppi di HEV umani confermando l'esistenza di serbatoi naturali d'infezione (6, 7).

Il genoma di HEV è stato clonato e sequenziato completamente, rendendo possibile l'allestimento di saggi specifici da utilizzare nella diagnostica e quindi lo studio delle caratteristiche epidemiologiche e clinico-evolutive di tale forma di epatite virale (8,9).

Oggi si stima che nei paesi industrializzati il 6-7% delle epatiti acute non-A-C (pazienti negativi ai marcatori dei virus dell'epatite A, B, C) sia attribuibile ad HEV, mentre nei paesi in via di sviluppo tale percentuale sale al 50% (2).

Tassonomia, morfologia e organizzazione genomica

Il virus HEV appartiene al genere *Hepevirus* ed è l'unico membro della famiglia *Hepeviridae*. Le particelle virali di HEV sono sferiche, presentano simmetria icosaedrica, hanno un diametro di circa 27-34 nm e sono sprovviste di *envelope* (10).

Il genoma virale è costituito da una molecola di RNA positivo a singolo filamento poliadenilata, di circa 7,2 kilobasi (Kb) che contiene tre cornici di lettura (*Open Reading Frame*, ORF):

- ORF1, di 5Kb, è localizzata nella regione 5' e codifica per le proteine non strutturali (nsP) che includono una metiltransferasi, una proteasi, una RNA elicasi ed una RNA polimerasi RNA-dipendente, insieme con ulteriori domini a funzione sconosciuta.
- ORF2, di 2kb, è localizzata nella regione 3' e codifica per la maggiore proteina capsidica (72 kilodalton).
- ORF3, la cornice più piccola, codifica per una fosfoproteina associata al citoscheletro che sembra avere un ruolo importante nella replicazione virale e nella regolazione della risposta dell'ospite all'infezione da HEV (11). Il genoma virale contiene inoltre piccole regioni non tradotte (UTR) agli estremi 5' e 3', rispettivamente di 26 e 68 nucleotidi. La

replicazione del virus HEV in colture cellulari è poco efficiente e questa limitazione ha fortemente influenzato lo studio del ciclo replicativo (12).

Eterogeneità genotipica

L'analisi delle sequenze genomiche di HEV ha permesso di suddividere gli isolati virali provenienti dall'uomo e da altre specie di mammiferi in quattro genotipi principali denominati da 1 a 4, e di distinguere almeno 24 sottotipi (1a-1e, 2a-2b, 3a-3j e 4a-4g) (13, 14).

Mentre i ceppi del genotipo 1 e 2 sono stati isolati solo dall'uomo, quelli del genotipo 3 e 4 sono stati identificati sia nell'uomo sia in diverse specie animali, tra cui il suino, il cinghiale, il cervo e la mangusta (13).

Ciascun genotipo di HEV ha una specifica distribuzione geografica. Il genotipo 1 è stato isolato in zone dell'Asia e dell'Africa dove la malattia è altamente endemica, da casi umani epidemici e sporadici (13); tale genotipo è stato anche isolato nei paesi industrializzati da viaggiatori provenienti da regioni endemiche.

Il genotipo 2 è presente in Messico e in Africa occidentale, e mostra una similitudine nella sequenza pari al 75% con gli isolati del genotipo 1 (13,15). Il genotipo 3, dapprima identificato negli Stati Uniti in alcuni casi di epatite E autoctoni (16,17), è stato successivamente riscontrato in numerosi Paesi industrializzati dell'Europa, Giappone, Australia, Nuova Zelanda, Corea ed Argentina (18,19). Gli isolati del genotipo 3 presentano similitudine di sequenza del 75% con quelli del genotipo 1 e 2. Il genotipo 4 è stato ritrovato in casi sporadici in Cina, Giappone e Vietnam (20). Tutti i genotipi appartengono ad un unico sierotipo (21).

Spettro d'ospite

Sperimentalmente è stato dimostrato che alcuni genotipi di HEV possono infettare numerose specie animali. Questa osservazione è stata confermata dal rilevamento di anticorpi anti-HEV in molte specie di animali domestici e selvatici (suini, cinghiali, bovini, pecore, capre, polli, bufali, cervi, ratti, topi, gatti e scimmie), suggerendo l'ipotesi, confermata dalla caratterizzazione del virus, che alcuni di questi costituiscano serbatoi d'infezione nelle aree non endemiche (22, 23).

Epidemiologia

Modalità di trasmissione

Negli ultimi anni, grazie anche ad una maggiore disponibilità di test diagnostici, sono andate chiarendosi le caratteristiche epidemiologiche dell'epatite E. Nei Paesi endemici, ovvero nelle regioni a clima tropicale o subtropicale o laddove esistano situazioni igienico-sanitarie carenti, l'epatite E si presenta prevalentemente in forma epidemica (24-26). In tali Paesi, possono anche ricorrere casi sporadici, indipendentemente dalle condizioni climatiche. Durante le epidemie il virus si trasmette prevalentemente attraverso la via oro-fecale. La maggior parte delle epidemie sono state messe in relazione con il consumo di acque contaminate da materiale fecale; pertanto l'epatite E rappresenta un problema di sanità pubblica soprattutto nei Paesi a basso livello socioeconomico (27-29). Durante le epidemie di epatite E, sono piuttosto rari i casi secondari a trasmissione interumana, anche fra i soggetti conviventi (28, 29). La percentuale dei casi di infezione da persona a persona è stimata intorno al 1-2%. Questo dato si contrappone a quello relativo alla frequenza di casi secondari di epatite A, che può raggiungere anche il 75% (30). Una possibile spiegazione di questo fenomeno, può essere la bassa concentrazione fecale del

virus HEV e la sua minore resistenza nell'ambiente. I giovani-adulti sembrano essere gli individui maggiormente colpiti in corso di epidemie di HEV (3-30%), piuttosto che i bambini (0,25-10%) (31).

Nei Paesi industrializzati vengono segnalati esclusivamente casi sporadici, per lo più in soggetti che hanno soggiornato in zone dove l'infezione da HEV è endemica.

Studi condotti nel passato hanno descritto alcuni casi di epatite E correlati all'ingestione di frutti di mare crudi o poco cotti contaminati (32). Recentemente, è stato dimostrato che l'infezione può essere acquisita per via alimentare attraverso il consumo di prodotti carni contaminati crudi o poco cotti. In questi ultimi anni le maggiori conoscenze delle caratteristiche epidemiologiche e virologiche di HEV hanno dimostrato come l'epatite E possa essere considerata una zoonosi emergente. Il principale serbatoio animale è rappresentato proprio dal suino e le persone che lavorano a stretto contatto con tali animali sono considerate a rischio di infezione.

Per quanto riguarda le altre modalità di trasmissione, essendo breve la durata della viremia (nonostante siano stati riportati casi di viremia protratta fino a 4-6 mesi), la trasmissione per via ematica è estremamente rara, ma possibile. I pochi casi di infezione avvenuti con questa modalità sono stati segnalati in personale sanitario ospedaliero e nei feti di madri infettatesi durante il terzo trimestre di gravidanza. Tuttavia i rari casi di viremia prolungata potrebbero costituire un pericolo per quanto riguarda la trasmissione dell'infezione attraverso il sangue infetto: la determinazione degli anticorpi anti-HEV non viene eseguita di routine in corso di donazione di sangue, pertanto alcuni casi potrebbero sfuggire ai normali controlli clinico-serologici aumentando il rischio di trasmissione dell'infezione per via parenterale (33, 34).

La presenza del virus nelle feci, e quindi l'infettività, appare limitata alla settimana precedente l'esordio della malattia e alle due immediatamente successive. Questo periodo è considerato quello di maggior contagiosità.

Prevalenza nelle aree endemiche

L'infezione da HEV è endemica nel Centro e nel Sud-Est dell'Asia, ma diverse epidemie sono avvenute in Medio Oriente, Africa settentrionale, orientale e occidentale, in molti Paesi dell'ex URSS e in America del Sud e Messico, con il coinvolgimento di decine di migliaia di soggetti. Al di sopra dei 40 anni di età, la prevalenza di anticorpi anti-HEV nelle aree endemiche varia dal 10 al 40%, apparentemente senza differenza tra i sessi. La Cina rappresenta il Paese con il maggior numero di epidemie di epatite E. Nelle aree endemiche è possibile anche il verificarsi di piccoli focolai epidemici, in genere autolimitanti, o di casi sporadici: è stato calcolato che oltre il 25% delle epatiti in forma sporadica non-A-C sia attribuibile al virus dell'epatite E (35). Le epidemie di epatite E sono associate con un alto tasso di incidenza di manifestazioni patologiche nelle donne in gravidanza con esito spesso letale soprattutto nel primo trimestre di gestazione. Sebbene l'esatta causa dell'aumentata patogenicità per questa categoria rimanga tuttora sconosciuta, è stato ipotizzato un ruolo per fattori immunologici o ormonali (36-38).

Prevalenza nelle aree non endemiche

Numerosi studi sieroepidemiologici hanno rilevato una notevole prevalenza anticorpale anti-HEV (5-20%) nella popolazione sana di molti Paesi industrializzati, facendo ipotizzare un'elevata diffusione dell'infezione, seppur in genere a livello subclinico.

In Europa, USA e Giappone sono stati segnalati sempre più spesso casi sporadici di malattia in soggetti che non hanno viaggiato all'estero in zone a rischio (39-43). I ceppi isolati in tali pazienti sono geneticamente differenti rispetto a quelli isolati nei Paesi in via di sviluppo,

facendo supporre che questi casi di malattia siano ascrivibili a virus endemici nel territorio. Un numero crescente di casi autoctoni, dovuti a genotipo 3, è stato recentemente riportato in Europa occidentale, in particolare nel Regno Unito (39,40), in Olanda (41) e in Francia (44,45). In generale, queste osservazioni suggeriscono che l'epatite E sia una malattia emergente nei paesi sviluppati.

In Italia, la presenza di anticorpi anti-HEV è stata rilevata in diverse regioni con prevalenze che oscillano tra l'1% e il 6% (46-48). Il virus dell'epatite E sembra responsabile di circa il 10-20% delle epatiti virali non-A-C (48,49). La maggior parte dei casi di malattia sono stati registrati in viaggiatori provenienti da aree considerate tradizionalmente endemiche. Tuttavia, nel 1999, una nuova variante di HEV è stata identificata nelle feci di un paziente che non aveva viaggiato né era venuto a contatto con individui di ritorno da tali zone. Questo isolato virale si è rivelato geneticamente diverso dai virus provenienti da altri Paesi, mostrando una relativa omologia nucleotidica solo con i ceppi americani del genotipo 3 (42).

Stato dell'arte della diagnostica dell'epatite E

La diagnosi di epatite E acuta si basa sul rilevamento di anticorpi anti-HEV IgM ed IgG e del genoma virale nel siero.

Le metodiche usate di routine sono di tipo immunoenzimatico, test ELISA commerciali specifici per IgM e IgG che utilizzano come antigeni proteine ricombinanti o peptidi sintetici di HEV che corrispondono a epitopi immunodominanti delle proteine virali (ORF2 e ORF3) generalmente degli isolati di genotipo 1 e 2 (50-52).

Durante l'infezione acuta, gli anticorpi di classe IgM precedono di pochi giorni quelli di classe IgG, raggiungendo il picco intorno alla quarta settimana e scomparendo gradualmente nel giro di 4-5 mesi (53-55). La positività delle IgM anti-HEV può raggiungere valori del 100% quando il campione di siero viene prelevato da 1 a 40 giorni dopo la comparsa dei sintomi (50). Tale positività si riduce, nello stesso campione di soggetti, se il prelievo viene eseguito 3-4 mesi e 6-12 mesi dopo l'inizio dei sintomi, raggiungendo valori di positività delle IgM rispettivamente del 50% e del 40%. Il titolo delle IgG aumenta già nella fase acuta fino a quella di convalescenza, raggiungendo un picco in media 2-4 settimane dopo e può persistere elevato anche per i 4-5 anni successivi. Gli anticorpi di classe IgG indicano la sierconversione, tuttavia, non è completamente noto se gli anticorpi anti-HEV che compaiono in seguito all'infezione acuta siano neutralizzanti e per quanto tempo realmente persistano. La durata degli anticorpi anti-HEV di classe IgG è estremamente variabile ed il titolo anticorpale sembra decrescere nel tempo, fino alla completa negativizzazione. Inoltre, è stato dimostrato che la sensibilità dei test diagnostici diminuisce quando vengono utilizzati in pazienti convalescenti, creando problemi di sottostima in corso di studi di sieroprevalenza (56). Sono presenti sul mercato anche kit per il rilevamento dell'antigene di HEV nel siero la cui validità è ancora da confermare (57, 58).

Per quanto riguarda il rilevamento del genoma virale, esso viene effettuato con la tecnica di amplificazione genica (*nested-PCR* o *RT-PCR*, *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*); nelle feci questo si può rilevare durante la fase acuta dell'infezione, in particolare durante il periodo che va dalla settimana precedente l'inizio dei sintomi fino alle 2-4 settimane successive. Nel sangue, il virus può essere rilevato con la medesima tecnica ancor prima della comparsa dell'ittero e dell'aumento delle transaminasi, circa 2 settimane prima e 2-4 settimane dopo l'inizio dei sintomi (54). Negli ultimi anni sono state messe a punto metodiche sempre più sensibili e specifiche mediante l'utilizzo di oligonucleotidi progettati in modo da rendere possibile l'amplificazione di isolati virali dei differenti genotipi di HEV. La metodica *real time-*

PCR è stata impiegata di recente per il rilevamento dell'HEV RNA. Il metodo fornisce dati quantitativi relativi ai livelli di genoma circolante e permette una più precisa identificazione dello stato dell'infezione. Si tratta di una metodica attendibile, sensibile e specifica che rileva tutti i quattro genotipi virali del virus HEV (59-62).

Uno dei principali problemi che riguarda i saggi per la diagnosi di epatite E acuta è la variabilità che essi presentano in alcune situazioni. Infatti, sebbene la sensibilità dei saggi IgM attualmente disponibili sia elevata (91-97%) (63-65), il loro impiego può produrre risultati falsamente negativi in alcuni pazienti con infezione da genotipo 1 (63) o falsamente positivi in pazienti con fattore IgM-reumatoide nel siero (66) o con infezione acuta primaria da citomegalovirus umano (*Cytomegalovirus*, CMV) e da virus Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus*, EBV) (67). Anche sul fronte dei test genomici, il rilevamento dell'HEV RNA viene effettuato con saggi non commerciali quindi solo in un numero ristretto di laboratori. Inoltre, viene utilizzata una metodica di amplificazione genica (*nested-PCR*) la cui sensibilità è ridotta rispetto a tecniche sviluppate più di recente (*real time-PCR*) (62).

A causa di tutto ciò, le metodiche per la diagnosi di epatite E sono in costante evoluzione come dimostra lo sviluppo continuo sia di nuovi saggi immunoenzimatici che di test genomici ad elevata sensibilità. Resta quindi cruciale il problema della standardizzazione dei metodi.

Diagnostica dell'epatite E per le strutture del Servizio Sanitario Nazionale

Nel Reparto Epatiti Virali del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate (MIPI) è stato formulato un protocollo standard per la diagnosi di epatite E acuta. Il protocollo prevede l'uso di saggi immunoenzimatici multipli e di un saggio complementare di tipo molecolare. La procedura metodologica è stata sviluppata con la finalità di fornire alle strutture del Servizio Sanitario Nazionale (SSN) una collaborazione attiva che metta a disposizione le tecnologie più avanzate nel settore.

Il protocollo standard per la diagnosi di epatite E acuta prevede la valutazione contemporanea dei campioni di siero con saggi commerciali specifici per IgM ed IgG anti-HEV e con un test (*in-house*) di *real time-PCR* per il rilevamento dell'HEV RNA. In base ai risultati, i campioni positivi vengono classificati in 4 diverse categorie corrispondenti a fasi diverse dell'infezione acuta:

- 1) periodo "finestra" (IgM -, IgG -, HEV RNA +);
- 2) fase di sierconversione precoce (IgM+, IgG -,HEV RNA +)
- 3) fase di post-sierconversione precoce (IgM+, IgG +,HEV RNA +)
- 4) fase di post-sierconversione tardiva (IgM+, IgG +,HEV RNA -).

I "casi incerti" (campioni con pattern inusuale) vengono esaminati con ulteriori saggi di conferma (ELISA e *immunoblotting*) e con saggi specifici per IgM anti-CMV e anti-EBV al fine di escludere possibili risultati aspecifici.

La metodologia è stata valutata su un totale di 52 pazienti con epatite virale acuta non-A-C per i quali è stato richiesto un approfondimento diagnostico da parte di strutture ospedaliere dell'SSN.

Le richieste di analisi sono pervenute in ISS in un periodo compreso tra febbraio 2004 e novembre 2010 e provengono da 15 unità di malattie infettive, distribuite in 11 differenti regioni.

In questo documento vengono riportati i dati ottenuti e la descrizione dell'organizzazione del servizio di diagnostica specifico per l'epatite E presente in ISS.

SVILUPPO DI UN PROTOCOLLO DI DIAGNOSTICA

Saggi analitici sui campioni

Test sierologici per il rilevamento degli anticorpi anti-HEV IgM e IgG

I saggi sono stati eseguiti secondo le istruzioni presenti sul foglietto illustrativo della Ditta produttrice. Sono stati utilizzati i seguenti kit commerciali: Bioelisa HEV IgM (cut-off = 0,421) e Bioelisa HEV IgG (cut-off = 0,574) (Biokit, Spagna). Alcuni campioni sono stati analizzati anche con i seguenti saggi: HEV IgM Elisa 3.0 (cut-off = 0.403) (MP diagnostics, MP Biomedicals, Singapore); HEV IgM Elisa (cut-off = 0,263) (Wantai Biopharm, Cina); Anti-EBV VCA IgM ELISA (Bio-Rad Medical Diagnostics, Germania); Bioelisa CMV IgM (Biokit, Spagna).

Estrazione da siero dell'RNA virale e *real time*-PCR per il rilevamento del virus HEV

L'RNA virale viene estratto a partire da 200 µL di siero utilizzando QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN, Germania) secondo le indicazioni del produttore. Ad ogni campione, durante la fase di estrazione, sono stati aggiunti nel buffer AVL 4 µL di RNA di controllo interno dell'estrazione (PrimerDesign Ltd, UK). Un volume equivalente a 60 µL di siero è stato amplificato tramite Light-Cycler V. 2.0 utilizzando il kit Quantitect RT PCR (QIAGEN, Germania) con *primer* e *probe* TaqMan, specifici per la regione ORF3 di HEV (60). La sensibilità del saggio *real time*-PCR (100-250 copie/mL) è stata valutata nel contesto di uno studio collaborativo organizzato dal Paul-Erlich-Institut (62). A questo studio hanno partecipato 20 laboratori di 10 differenti paesi, che hanno saggiato "alla cieca" un pannello di 22 campioni di siero positivi derivanti da diluizioni seriali provenienti da pazienti infetti con genotipo: 3a, 3b, 3f e 4c.

A partire da un campione di referenza di genotipo 3b sono stati preparati tre calibratori per la *real time*-PCR, ad una concentrazione finale di circa 25.000, 2.500 e 250 copie/mL. In relazione al valore di *crossing point* osservato per i tre standard di calibrazione, è possibile avere una stima della carica virale che viene quindi espressa come segue: non reattiva o sotto il limite di rilevamento (-): < 250 copie/mL; reattiva (+): da 250 a 2.500 copie/mL; reattiva (++) : da 2.500 a 25.000 copie/mL; reattiva (+++) : oltre le 25.000 copie/mL.

Amplificazione del genoma virale mediante *nested*-PCR della regione ORF2

Al fine di analizzare le sequenze dei campioni in studio un frammento di 457 paia di basi (nt 5982-6438) della regione ORF2 del genoma virale dell'HEV è stato amplificato mediante una reazione di *nested*-PCR come descritto (68). L'RNA virale è stato estratto da 200 µL di siero come descritto nel paragrafo precedente. 10 µL di RNA estratto è stato retrotrascritto utilizzando 1 µL di *random primer* 0,03 OD260/µL e 200 U di trascrittasi inversa di Moloney murine leukemia virus (Invitrogen, Life Technologies, CA) in un volume finale di 20 µL incubati a 50°C per 1 ora, e infine a 70°C per 15 minuti per interrompere la reazione. Metà volume del cDNA ottenuto viene utilizzato per la reazione di PCR. Dopo uno step di

denaturazione di 2 minuti a 94°C, il DNA è stato amplificato per 35 cicli con le seguenti condizioni: 94°C per 30 secondi, 55°C per 30 secondi e 72°C per un minuto; alla fine dei 35 cicli altri 7 minuti a 72°C; la reazione viene eseguita in un volume finale di 50 µL contenente buffer di PCR 1X, 1,5 mM di MgCl₂, miscela di nucleotidi (0,2 mM ciascuno), 100 pmol di ciascun primer e 1 U di Platinum Taq DNA polimerasi (Invitrogen, Life Technologies, CA). La *nested*-PCR è stata eseguita utilizzando 2 µL di prodotto di prima PCR alle stesse condizioni di reazione e di cicli scritti per la prima PCR. Il prodotto di *nested*-PCR è stato analizzato su un gel di agarosio al 2% con bromuro di etidio.

Analisi delle sequenze e genotipizzazione dei campioni

I prodotti di PCR della regione ORF2 sono stati purificati mediante il kit Amicon Microcon-PCR (Millipore Corporation, MA) secondo le indicazioni del produttore. Il sequenziamento è stato eseguito utilizzando gli stessi primers usati nella fase di amplificazione con il kit Big-Dye terminator versione 1.1 (Applied Biosystems) e sequenziatore automatico ABI310 (Applied Biosystems).

Le sequenze ottenute dai 7 pazienti sono state allineate insieme a sequenze di riferimento prese dalla banca dati (*accession number*: Genotipo 1a: AF051830, AF185822, X99441, AF076239, AF459438, HM446626, HM446588, HM446599, HM446615, M73218. Genotipo 1b: M80581. Genotipo 1c: X98292. Genotipo 1d: AY230202. Genotipo 1e: AY204877. Genotipo 2: M74506. Genotipo 3c: AY032756, GU369940, HM769974. Genotipo 3d: EU495230. Genotipo 3e: HM446631, AB248522, AB248520, AF503511 HM446628. Genotipo 3f: HM446627, HM769975, GU117636, HM769972, FJ464744. Genotipo 3h: HM446630. Genotipo 4: AB108537) utilizzando il programma CLUSTAL X (69).

Le sequenze sono state analizzate manualmente mediante il programma BIOEDIT; i gap sono stati rimossi dall'allineamento finale.

L'analisi filogenetica è stata eseguita utilizzando il programma MEGA 4.1 (70) applicando il metodo Neighbour-Joining, Kimura 2-parametri e una analisi di ri-campionatura (1000 replicati) per valutare la robustezza dell'albero.

Procedura standardizzata della raccolta dati

Alla struttura sanitaria che richiede la diagnosi dell'infezione da HEV, viene inviata una Scheda (Appendice A), impostata in modo tale da ottenere il maggior numero di informazioni da parte dei laboratori su:

- dati anagrafici del paziente;
- recenti viaggi all'estero;
- contatti recenti con animali di allevamento, o domestici, o selvatici;
- eventuale gravidanza in corso;
- esami di laboratorio effettuati;
- altre infezioni o patologie.

Le informazioni vengono inserite attraverso un programma informatico (costruito utilizzando un apposito software in ambiente Access) che permette l'archiviazione e l'elaborazione di tutti i dati inviati dalle strutture sanitarie. Il programma consente l'immissione e la gestione in un database relazionale dei dati relativi a:

- informazioni contenute nella Scheda;
- analisi eseguite sul campione;
- tempo di uscita della lettera di risposta.

L'inserimento dei dati nel database informalmente chiamato HEV avviene tramite un'interfaccia costituita da apposite maschere. Nell'Appendice B sono riportate le 4 schede principali del programma:

- Scheda per l'inserimento dei dati del paziente;
- Scheda visualizzazione lista pazienti con codice alfanumerico;
- Scheda esami di laboratorio virologici e sierologici;
- Scheda per l'inserimento dei fattori di rischio del paziente.

Una volta eseguiti i saggi analitici sul campione inviato, viene preparata una lettera di risposta (Appendice C) che contiene:

- identificativo del campione;
- struttura sanitaria che ha inviato il campione;
- saggi eseguiti sul campione;
- risultati dei saggi.

ANALISI DEI DATI RACCOLTI NEL PERIODO 2004-2010

Pannello di campioni utilizzato

Dal febbraio 2004 al novembre 2010 è stato richiesto un approfondimento diagnostico da parte di strutture ospedaliere dell'SSN per 52 pazienti con epatite virale acuta non-A-C (pazienti negativi ai marcatori dei virus dell'epatite A, B, C).

Le richieste di analisi dei marcatori d'infezione da HEV e i campioni di siero corrispondenti provenivano da 15 unità di malattie infettive, distribuite in 11 differenti regioni italiane. I campioni arrivati all'ISS sono stati conservati in frigorifero a -80°C, per garantire l'integrità del genoma virale.

Nei 52 pazienti, la diagnosi di epatite acuta è stata definita presso le strutture di provenienza sulla base dei seguenti criteri: livelli alterati di ALT, anoressia, nausea, malessere, dolore addominale, ittero, urine scure. Tutti i pazienti sono stati ricoverati con una diagnosi di epatite virale non-A-C stabilita sulla base dei risultati di laboratorio (campioni di siero negativi per gli anticorpi anti-HAV IgM, HBsAg, anti-HBc IgM, anti-HCV e HCV-RNA) e dopo l'esclusione di fattori quali autoimmunità, consumo di alcol o uso di farmaci epatotossici.

Risultati

La distribuzione sul territorio nazionale dei casi e dei centri ospedalieri da cui provengono i campioni è riportata in Figura 1.

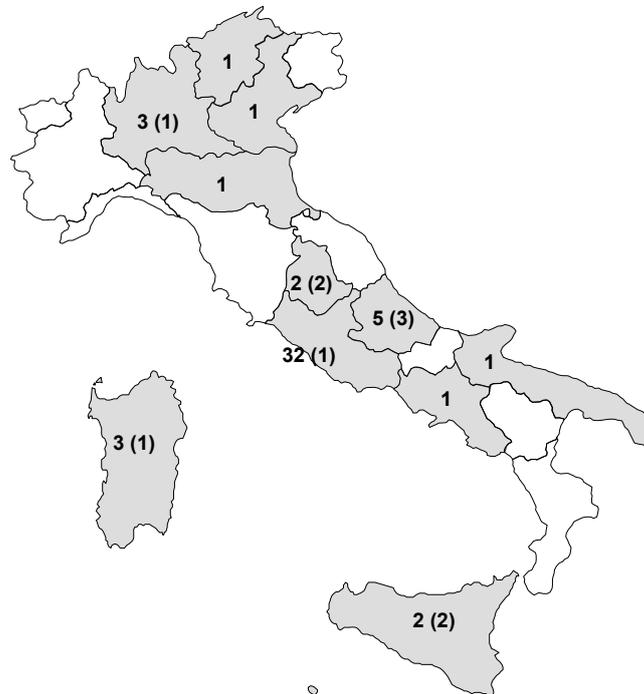


Figura 1. Distribuzione geografica dei casi e dei centri ospedalieri (tra parentesi il numero dei centri)

In Tabella 1 sono riportati i risultati dei test sierologici e del test molecolare eseguiti sul pannello dei sieri dei pazienti.

Tabella 1. Risultati dello screening sierologico e genomico di 30 dei 52 pazienti (sono riportati solo i campioni positivi per almeno un marcatore di infezione da HEV)

N. paziente	Risultati dei saggi sierologici ^a		Risultati della <i>real time</i> -PCR (HEV-RNA) ^b	HEV genotipo	Paese di origine *	ALT (UI/L)
	Bioelisa HEV-IgM	Bioelisa HEV-IgG				
8	>3,000	>3,000	+++	1a	Italia (India)	2640
3	1,304	>3,000	+++	1a	Bangladesh	1726
12	>3,000	>3,000	+++		India	1072
39	0,882	>3,000	+++		India	2463
16	1,801	>3,000	++	1a	Bangladesh	1263
19	1,695	>3,000	++		Bangladesh	835
22	>3,000	>3,000	++	1a	Italia (India)	nd
43	0,508	>3,000	++		Bangladesh	4515
47	0,867	>3,000	++		Bangladesh	1683
48	2,709	>3,000	++		Bangladesh	2050
52	0,869	>3,000	++	1a	Bangladesh	2496
55	1,316	>3,000	++		India	1263
56	1,508	>3,000	++		Bangladesh	nd
58	0,793	2,070	++		Italia (Tailandia)	4044
60	2,665	0,775	++	3e	Italia	2010
7	0,498	>3,000	++		India	486
51	>3,000	>3,000	++		Italia	nd
61	0,630	1,972	++	1a	Italia (India)	2472
10	2,388	>3,000	+		Etiopia	5328
29	2,212	>3,000	+		Bangladesh	nd
34	>3,000	2,969	+		Italia	855
63	0,102	0,088	+++		Albania	597
33°	0,057	1,354	+		Italia	384
20°	0,653	0,151	-		Italia (Africa)	over
30°	2,986	0,336	-		Pakistan	nd
50°	0,480	0,081	-		Italia	3860
67°	0,546	0,000	-		Italia (Africa)	842
26°	0,271	0,814	-		n.a.	2050
28°	0,062	0,709	-		Bangladesh	806
32°	0,126	1,226	-		Italia	2391

I risultati positivi sono evidenziati in grassetto.

^a Bioelisa HEV IgM, (cut-off = 0,421); Bioelisa HEV IgG, (cut-off = 0,574); Biokit.

^b +: 250 <copie/mL <2.500; ++: 2.500 <copie/mL <25.000; +++: > 25.000 copie/mL; -: <250 copie/mL.

* Tutti i pazienti stranieri sono arrivati in Italia meno di un mese prima della comparsa dei sintomi clinici. Per i pazienti italiani che hanno viaggiato in zone endemiche è indicato il paese in cui si sono recati.

nd: non disponibile

^o Il siero è stato analizzato con HEV IgM Elisa MP Diagnostics (cut-off = 0,403); HEV IgM Elisa Wantai Biopharm (cut-off = 0,263). Tutti i campioni sono risultati negativi ad eccezione del campione 33 che ha mostrato rispettivamente valori di OD di 0,421 e 0,334 in MP Diagnostics e Wantai Biopharm.

L'analisi dimostra che 30 (58%) dei 52 campioni sono risultati positivi per almeno un marcatore di infezione da HEV (Tabella 1 e Figura 2).

Tra i 30 campioni, 25 (48%) di 52 sono risultati positivi per gli anticorpi anti-IgM, 25 (48%) per gli anticorpi anti-IgG e 21 (40%) presentano la positività per entrambi i marcatori sierologici

(IgM e IgG); il test di *real time*-PCR ha evidenziato 23 campioni positivi per HEV-RNA (44%) (Figura 2).

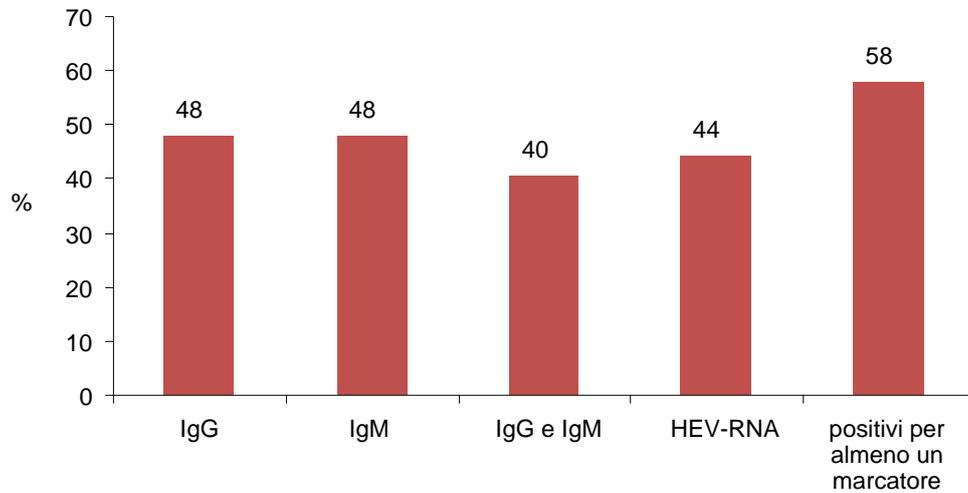


Figura 2. Percentuale dei campioni positivi per gli anticorpi anti-HEV IgM/IgG, e per l'HEV-RNA

La Figura 3 riporta la distribuzione dei marcatori sierologici nei 30 campioni risultati positivi per almeno un marcatore. Ventinove campioni su 52 sono positivi per IgM e/o IgG (56%), 4 (8%) presentano soltanto gli anticorpi anti-IgM, 3 (6%) soltanto gli anticorpi anti-IgG.

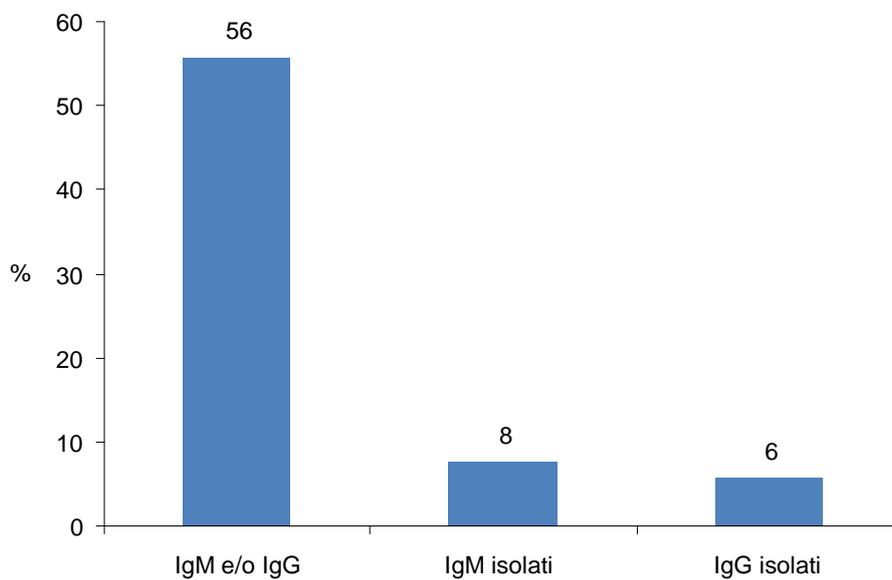


Figura 3. Distribuzione dei marcatori sierologici dei 30 campioni positivi

La Figura 4 riporta la distribuzione delle positività per HEV-RNA. Tra i 23 (44%) campioni positivi per HEV RNA, un campione su 52 è positivo solo per HEV-RNA (2%) senza la presenza di alcun anticorpo specifico, mentre un altro campione (2%) presenta l'HEV RNA e anticorpi anti-HEV IgG.

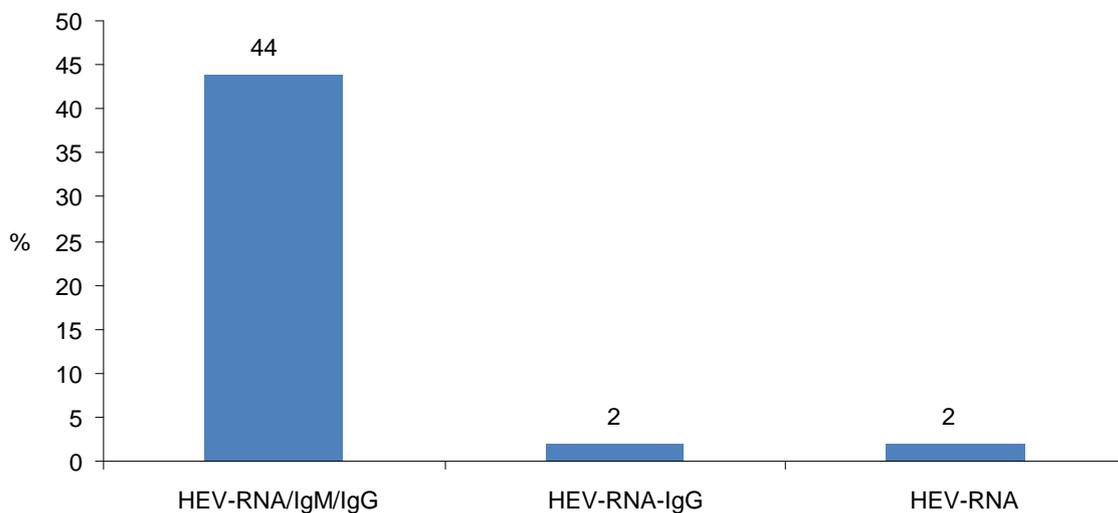


Figura 4. Distribuzione dei marcatori sierologici nei 23 campioni positivi per HEV-RNA

La Figura 5 riporta i dati della viremia ottenuti per i 23 campioni positivi, il 61% dei campioni presenta una viremia compresa tra le 2.500 copie/mL e le 25.000 copie/mL.

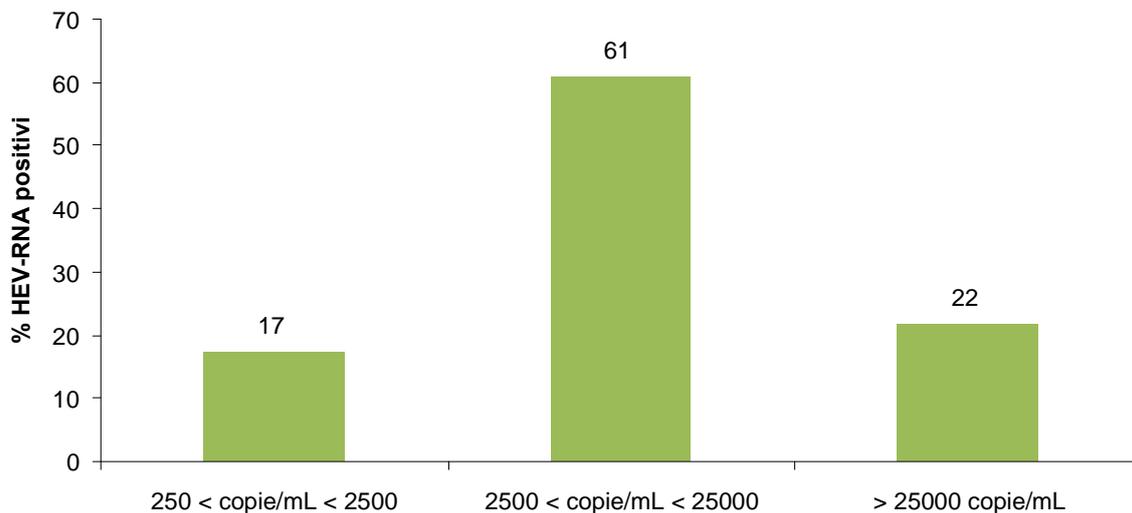


Figura 5. Livelli di viremia nei 23 campioni positivi per HEV-RNA

Analisi dei casi incerti

Come mostrato nella Tabella 1, gli ultimi 8 campioni elencati presentano un *pattern* diagnostico incerto. Per definire la diagnosi in questi casi atipici, i campioni sono stati analizzati con i seguenti saggi commerciali: HEV IgM Elisa MP Diagnostics e HEV IgM Elisa Wantai Biopharm. Inoltre, negli stessi campioni è stata valutata la presenza di marcatori d'infezione specifici per CMV ed EBV con i saggi Bioelisa CMV IgM, Biokit e anti-EBV VCA IgM Elisa, Bio-Rad.

In una prima fase di analisi, il paziente 33 aveva mostrato positività per l'HEV RNA e le IgG ma risultava negativo per gli anticorpi IgM valutati con il saggio Bioelisa (Tabella 1). L'analisi con i saggi supplementari ha confutato il primo risultato confermando l'infezione acuta per HEV: infatti, il campione ha mostrato valori di OD superiore al cut-off in entrambi i saggi (rispettivamente 0,421 e 0,334 nelle prove eseguite con MP Diagnostics e Wantai Biopharm).

Ad una prima analisi, i successivi 4 campioni mostravano solo anticorpi IgM (Tabella 1, pazienti 20, 30, 50 e 67). Questi risultati non sono stati confermati dai saggi supplementari (dati non mostrati) suggerendo che si trattava di risultati falsamente positivi.

Gli ultimi 3 pazienti mostravano inizialmente solo anticorpi IgG (tabella 1, pazienti 26, 28 e 32). Questo profilo sierologico, che indica una infezione pregressa da HEV, è stato confermato dalle analisi supplementari (dati non mostrati). Infine, gli 8 campioni sono risultati tutti negativi al test per le IgM anti-EBV; solo il paziente 30 ha mostrato positività per le IgM anti-CMV (dati non mostrati).

Nel complesso, l'infezione acuta da HEV è stata rilevata, in modo affidabile, in 23 dei 52 pazienti (44%) (Tabella 1, i primi 23 pazienti). Nel resto dei pazienti l'epatite acuta è dovuta ad infezione primaria da CMV solo in un caso (Tabella 1, paziente 30).

Dati epidemiologici dei pazienti

Tra i 23 pazienti con infezione acuta da epatite E, 19 soggetti (15 stranieri e 4 italiani) hanno sviluppato epatite acuta dopo il ritorno da un viaggio nelle aree endemiche. In particolare, 9 dei pazienti stranieri sono rientrati dopo aver visitato il loro paese d'origine, mentre 6 pazienti sono arrivati per la prima volta in Italia 15-30 giorni prima della comparsa dei sintomi; i restanti 4 pazienti sono italiani che hanno viaggiato in India e in Thailandia.

Quattro pazienti, tutti di origine italiana, non hanno viaggiato e non presentano altri fattori di rischio conosciuti.

Analisi filogenetica

L'amplificazione della regione ORF2 è stata eseguita su 7 campioni (indicati con il simbolo). In figura 6 sono mostrati i risultati della analisi filogenetica: la comparazione con le sequenze presenti in banca dati dei diversi genotipi dell'HEV permette di assegnare 6 casi al genotipo 1a e uno al genotipo 3.

Incrociando i dati di genotipizzazione con i dati epidemiologici si può osservare che tutti i pazienti che presentano il genotipo 1a hanno viaggiato in aree endemiche; in particolare, 3 pazienti sono immigrati che rientrano dal Bangladesh mentre 3 pazienti sono italiani che sviluppano la malattia al ritorno da un viaggio in India. Come atteso, le sequenze ottenute dai pazienti rientrati dal Bangladesh e dall'India si raggruppano in due branche distinte dell'albero filogenetico insieme alle rispettive sequenze di riferimento. Il paziente che presenta il genotipo

3 è un italiano che non ha recentemente viaggiato, la sequenza di questo campione si raggruppa insieme a delle sequenze provenienti da casi italiani.

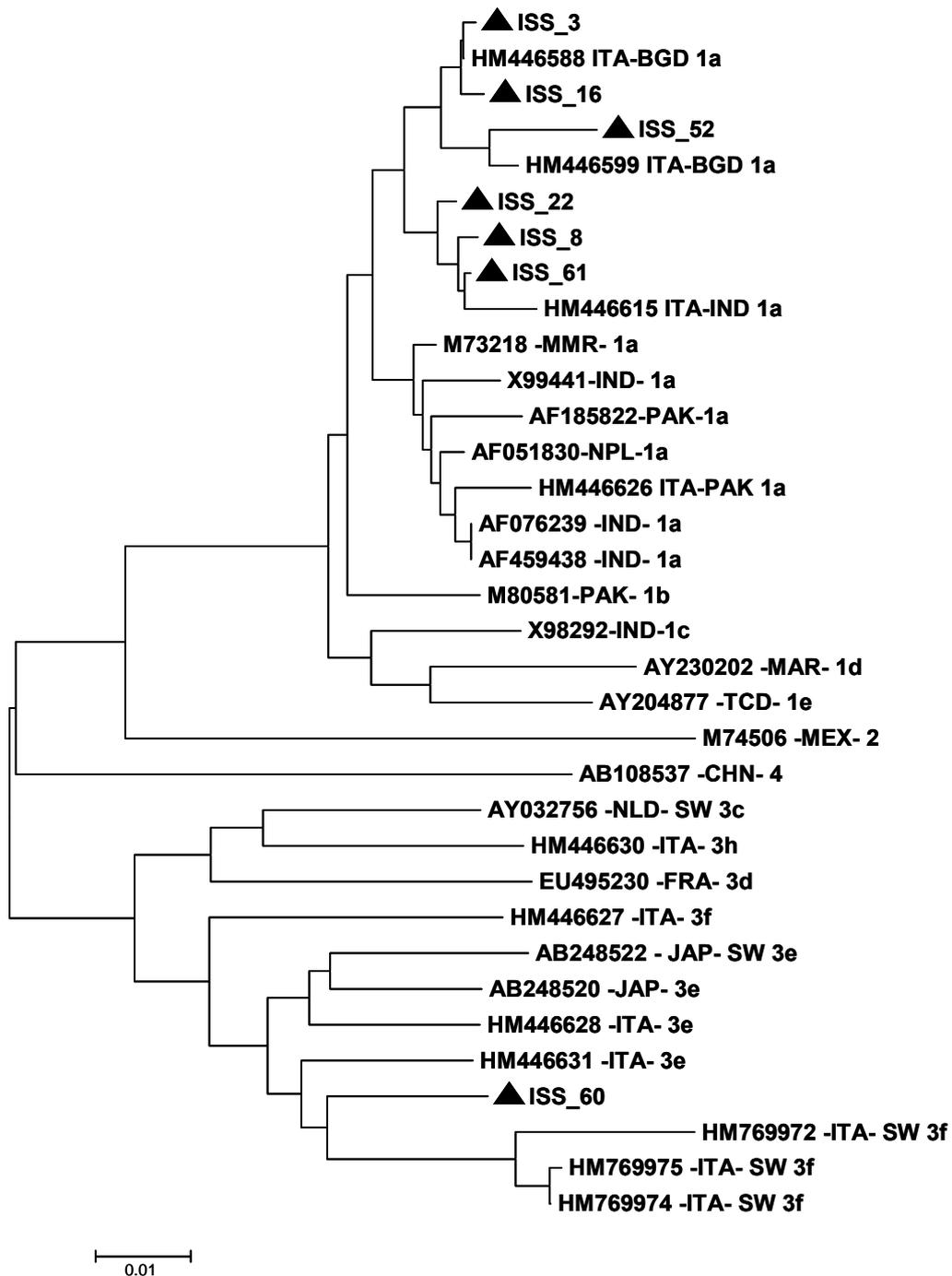


Figura 6. Albero filogenetico: Confronto delle sequenze dello studio (▲) rispetto ad isolati di riferimento appartenenti ai differenti genotipi presenti in banca dati

Discussione

Nel presente rapporto sono stati riportati i dati ottenuti utilizzando un pannello di 52 campioni di siero provenienti da pazienti ospedalizzati con una diagnosi di epatite acuta virale non-A-C. L'utilizzo di tali campioni ha consentito di testare e validare la nostra strategia diagnostica, e di poterla quindi mettere al servizio delle strutture sanitarie che negli anni si sono rivolte al Dipartimento MIPI dell'ISS con la necessità di avere una risposta diagnostica accurata per l'epatite E.

L'infezione acuta da HEV è stata identificata in modo affidabile in 23 dei 52 pazienti (44%). Per 22 di essi, l'infezione è stata confermata dal rilevamento di tutti e tre i marcatori (IgM, IgG e HEV RNA). Quindi, la maggior parte dei pazienti (22 su 23) si trovano nella fase precoce, post-sieroconversione (tutti e tre i marcatori positivi) mentre solo 1 paziente si trova nel periodo finestra della fase acuta in cui gli anticorpi non sono ancora rilevabili e la viremia è l'unico marcatore di infezione.

L'analisi dei livelli di HEV RNA circolante ha mostrato che 83% dei pazienti (19 su 23) presenta un livello di viremia medio-alto ($2.500 < \text{copie/mL} < \text{oltre } 25.000$), mentre solo il 17% (4 su 23) ha livelli più bassi (da 250 a 2.500 copie/mL). Questi dati suggeriscono che la maggior parte dei pazienti accede alla struttura ospedaliera nel momento in cui l'infezione può essere facilmente diagnosticata con un test genomico. Di conseguenza, l'eventualità di ottenere risultati falsamente negativi con un saggio molecolare sensibile è piuttosto rara.

Un aspetto critico nella diagnosi di epatite E riguarda il possibile rischio di ottenere risultati falsamente positivi o negativi nel saggio di rilevamento degli anticorpi IgM (63-67). Un caso esemplare è quello del paziente 33 che, ad una prima analisi, presentava un *pattern* sierologico atipico (IgM-, IgG +, HEV RNA+) dovuto ad un probabile risultato falsamente negativo al test IgM. Infatti, la presenza degli anticorpi IgM è stata poi rilevata utilizzando altri saggi commerciali ed il paziente è stato classificato tra i casi di infezione acuta con positività per tutti e tre i marcatori. Analogamente, i quattro pazienti 20, 30, 50 e 67 mostravano in prima analisi anticorpi IgM come singolo marcatore sierologico. Tuttavia, l'analisi successiva con altri saggi commerciali non ha confermato il risultato, dimostrando che si trattava di false positività. Almeno in un caso (paziente 30) la falsa positività era dovuta alla possibile stimolazione policlonale dei linfociti B causata da un'infezione acuta primaria da CMV come ha dimostrato l'analisi eseguita con saggi specifici per le IgM anti-CMV (67). L'approfondimento diagnostico di questi casi atipici indica chiaramente che la diagnosi di epatite E basata sull'uso esclusivo del marcatore IgM può non essere corretta e sottolineano la necessità di combinare più metodi complementari e/o eventualmente confermare i risultati dei saggi IgM con test aggiuntivi.

In uno studio recente condotto in Italia è stato dimostrato che il 20,6% delle epatiti acute non-A-C è dovuto all'infezione da HEV (48). La maggior parte dei casi (83,6%) si verifica in soggetti provenienti da aree endemiche ed è causata dal genotipo 1, mentre solo alcuni dei casi sono autoctoni e dovuti al genotipo 3. In accordo con questo studio, la maggior parte dei casi acuti, osservati nel nostro campione di pazienti, sono importati (19 su 23, 82,6%). Tuttavia, i nostri dati dimostrano che una percentuale più alta di epatiti acute non-A-C è dovuta all'infezione da HEV (44% vs 20,6%). Sebbene lo studio precedente sia stato condotto su un numero maggiore di pazienti, i campioni sono stati analizzati in tempi diversi lungo un periodo di 15 anni (1994-2009), utilizzando saggi immunologici e molecolari, con sensibilità e specificità variabili nel tempo (48). Al contrario, nel nostro studio, tutti i campioni sono stati esaminati con lo stesso pannello di diagnostici, che include esclusivamente saggi di ultima generazione: questo approccio spiega probabilmente la percentuale più alta di casi di HEV osservata nel campione di pazienti esaminato.

I dati riportati nell'elaborato di servizio suggeriscono che il numero effettivo delle infezioni acute da HEV in Italia potrebbe essere superiore a quello stimato in precedenza (48,49,71-75). Questa osservazione è particolarmente importante per un paese che mostra una percentuale elevata e crescente di popolazione non-nazionale (7,5%, secondo la stima più recente nel 2010) (76) e indica la necessità di pianificare uno studio sul territorio che valuti esattamente l'impatto delle infezioni acute da HEV nel nostro Paese.

BIBLIOGRAFIA

1. Reyes GR, Yarbough PO, Tam AW et al. Hepatitis E virus (HEV): the novel agent responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Gastroenterol Jpn* 1991;26(Suppl 3):142-7.
2. Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol* 2008;48:494-503.
3. Teshale EH, Hu DJ, Holmberg SD. The two faces of hepatitis E virus. *Clin Infect Dis* 2010;51:328-34.
4. Aggarwal R. Hepatitis E: historical, contemporary and future perspectives. *Gastroenterol Hepatol* 2011;26; (Suppl 1):72-82.
5. Hepatitis E vaccine: why wait? [editorial]. *Lancet* 2010;376(9744):845.
6. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997;94(18): 9860-5
7. Bihl F, Negro F. Hepatitis E virus: a zoonosis adapting to humans. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:817-21.
8. Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990;247:1335-9.
9. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991;185:120-31.
10. Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis virus. *Virus Res* 2011;161(1):47-58.
11. Chandra V, Kar-Roy A, Kumari S, Mayor S, Jameel S. The hepatitis E virus ORF3 protein modulates epidermal growth factor receptor trafficking, STAT3 translocation, and the acute-phase response. *J Virol* 2008;82:7100-10.
12. Tam AW, White R, Yarbough PO. In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* 1997;10;238:94-102.
13. Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Research* 2007;127:216-28.
14. Purdy MA, Khudyakov YE. The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. *Virus Res* 2011;161(1):31-9.
15. Huang CC, Nguyen D, Fernandez J. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 1992;191:550-8.
16. Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC, et al. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 1998;79:447-56.
17. Erker JC, Desai SM, Schlauder GG, Dawson GJ, Mushahwar IK. A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J Gen Virol* 1999;80:681-90.
18. Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 2006;16:5-36.
19. Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis* 2008;8:698-709.
20. Wang Y, Ling R, Erker JC et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 1999;80:169-77.

21. Guo H, Zhou EM, Sun ZF, Meng XJ, Halbur PG. Identification of B-cell epitopes in the capsid protein of avian hepatitis E virus (avian HEV) that are common to human and swine HEVs or unique to avian HEV. *J Gen Virol* 2006;87:217-23.
22. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003;362:371-3.
23. Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, *et al.* Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol* 2004;42:5371-4.
24. Khuroo MS. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis: possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* 1980;68:818-23.
25. Vishwanathan R. Infectious hepatitis in Delhi (1955-1956): a critical study: epidemiology. *Indian J Med Res* 1957;45(Suppl. 1):1-29.
26. Naik SR, Aggarwal R, Salunke PN, Mehrotra NN. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. *Bull World Health Organ* 1992;70:597-604.
27. Krawczynski K, Aggarwal R, Kamili S. Hepatitis E. *Infect Dis Clin North Am* 2000;14:669-87.
28. Zhuang H, Cao XY, Liu CB, *et al.* Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroenterol Jpn* 1991;26(Suppl 3):135-8.
29. Aggarwal R, Naik SR. Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread. *J Hepatol* 1994;21(5):718-23.
30. Somani SK, Aggarwal R, Naik SR, *et al.* A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat* 2003;10:446-9.
31. Arankalle VA, Tsarev SA, Chadha MS, *et al.* Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992. *J Infect Dis* 1995;171:447-50.
32. Caredda F, Antinori S, Re T. Clinical features of sporadic non-A non-B hepatitis possibly associated with faecal-oral spread. *Lancet* 1985;2(8452):444-5.
33. Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, *et al.* Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J Med Virol* 2004;74:563-72.
34. Colson P, Coze C, Gallian P, *et al.* Transfusion-associated hepatitis E in France. *Emerg Infect Dis* 2007;13:648-9.
35. Purcell RH, Meng XJ, Dea S, Engle RE. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J Med Virol* 1999;59(3):297-302.
36. Pal R, Aggarwal R, Naik SR, Das V, Das S, Naik S. Immunological alterations in pregnant women with acute hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:1094-101.
37. Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int* 2008;28:1190-9.
38. Kar P, Jilani N, Husain SA, *et al.* Does hepatitis E viral load and genotypes influence the final outcome of acute liver failure during pregnancy? *Am J Gastroenterol* 2008;103:2495-501.
39. Dalton HR, Thuraiajah PH, Fellows HJ, Hussaini HS, Mitchell J, Bendall R, Banks M, Ijaz S, Teo CG, Levine DF. Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J Viral Hepat* 2007;14:304-9.
40. De Silva AN, Muddu AK, Iredale JP, Sheron N, Khakoo SI, Pelosi E. Unexpectedly high incidence of indigenous acute hepatitis E within South Hampshire: time for routine testing? *J Med Virol* 2008;80:283-8.

41. Herremans M, Vennema H, Bakker J, van der Veer B, Duizer E, Benne CA, Waar K, Hendrixks B, Schneeberger P, Blaauw G, Kooiman M, Koopmans MP. Swine-like hepatitis E viruses are a cause of unexplained hepatitis in the Netherlands. *J Viral Hepat* 2007;14:140-6.
42. Zanetti AR, Schlauder GG, Romano L, *et al.* Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J. Med. Virol.* 1999;57:350-60.
43. Panda S K., Thakral D, Rehman S. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol.* 2007; 17:151-80
44. Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, Poirson H, Dubois M, Miedouge M, Vischi F, Alric L, Vinel JP, Izopet J. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J. Med. Virol.* 2004; 74:419-24.
45. Renou C, Moreau X, Pariente A, Cadranel JF, Maringe E, Morin T, Causse X, Payen JL, Izopet J, Nicand E, Bourlière M, Penaranda G, Hardwigsen J, Gerolami R, Péron JM, Pavio N; ANGH, France. A national survey of acute hepatitis E in France. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2008; 27:1086-93.
46. Cacopardo B, Russo R, Preiser W *et al.* Acute hepatitis E in Catania (eastern Sicily) 1980-1994. The role of hepatitis E virus. *Infection* 1997;25:313-6
47. Stroffolini T, Menchinelli M, Dambrosio V *et al.* Prevalence of hepatitis E in a central Italian town at high endemicity for hepatitis C virus. *Ital. J. Gastroenterol.* 1996;28:523-5
48. Romanò L, Paladini S, Tagliacarne C, Canuti M, Bianchi S, Zanetti AR. Hepatitis E in Italy: a long-term prospective study. *J Hepatol* 2011, 54: 34-40
49. Mele A, Tosti ME, Spada E, Mariano A, Bianco E, and SEIEVA Collaborative Group. *Epidemiology of acute viral hepatitis: twenty years of surveillance through SEIEVA in Italy and a review of the literature.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2006. (Rapporti ISTISAN 06/12).
50. Favorov MO, Khudyakov YE, Mast EE, *et al.* IgM and IgG antibodies to hepatitis E virus (HEV) detected by an enzyme immunoassay based on an HEV-specific artificial recombinant mosaic protein. *J Med Virol* 1996; 50(1):50-8
51. Paul DA, Knigge MF, Ritter A, Gutierrez R, Pilot-Matias T, Chau KH, Dawson GJ. Determination of hepatitis E virus seroprevalence by using recombinant fusion proteins and synthetic peptides. *J Infect Dis* 1994;169(4):801-6.
52. Qi Z, Cui D, Pan W, Yu C, Song Y, Cui H, Arima T. Synthesis and application of hepatitis E virus peptides to diagnosis. *J Virol Methods* 1995;55(1):55-66.
53. Bryan JP, *et al.* Epidemic hepatitis E in Pakistan: patterns of serologic response and evidence that antibody to hepatitis E virus protects against disease. *J Infect Dis* 1994;170(3):517-21.
54. Krawczynski K, Meng XJ, Rybczynska J. Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. *Virus Res* 2011;161(1):78-83.
55. Khuroo MS, Kamili S, Dar MY, *et al.* Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet* 1993;341:135.
56. Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology* 1998; 27(3):857-61
57. Zhang F, Li X, Li Z, Harrison TJ, Chong H, Qiao S, Huang W, Zhang H, Zhuang H, Wang Y. Detection of HEV antigen as a novel marker for the diagnosis of hepatitis E. *J Med Virol* 2006;78(11):1441-8.
58. Zhao C, Li L, Harrison TJ, Wang Q, Song A, Fan J, Ma H, Zhang C, Wang Y. Relationships among viral diagnostic markers and markers of liver function in acute hepatitis E. *J Gastroenterol* 2009;44(2):139-45.

59. Enouf V, Dos Reis G, Guthmann JP, Guerin PJ, Caron M, Marechal V, Nicand E. Validation of single real-time TaqMan PCR assay for the detection and quantitation of four major genotypes of hepatitis E virus in clinical specimens. *J Med Virol* 2006;78:1076-82.
60. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 2006;131:65-71.
61. Gyarmati P, Mohammed N, Norder H, Blomberg J, Belak S, Widen F. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. *J Virol Methods* 2007;146:226-35.
62. Baylis SA, Hanschmann KM, Blümel J, Nübling CM. On behalf of the HEV Collaborative Study Group: Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol* 2011;49:1234-9.
63. Herremans M, Bakker J, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:562-8.
64. Myint KS, Endy TP, Gibbons RV, Laras K, Mammen Jr MP, Sedyaningsih ER, Seriwatana J, Glass JS, Narupiti S, Corwin AL. Evaluation of diagnostic assays for hepatitis E virus in outbreak settings. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:1581-3
65. Seriwatana J, Shrestha MP, Scott RM, Tsarev SA, Vaughn DW, Myint KS, Innis BL. Clinical and epidemiological relevance of quantitating hepatitis E virus-specific immunoglobulin M. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002;9:1072-8.
66. Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y, Aikawa T, Nishizawa T, Okamoto H. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:49-56
67. Fogeda M, De Ory F, Avellón A, Echevarría J. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J Clin Virol* 2009;45:259-61.
68. Shrestha SM, Shrestha S, Tsuda F, Nishizawa T, Gotanda Y, Takeda N, Okamoto H. Molecular investigation of hepatitis E virus infection in patients with acute hepatitis in Kathmandu, Nepal. *J Med Virol* 2003; 69:207-214.
69. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:4876-82
70. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Bio Evol* 2007;24:1596-9.
71. Clayson ET, Myint KS, Snitbhan R, Vaughn DW, Innis BL, Chan L, Cheung P, Shrestha MP. Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J Infect Dis* 1995; 172:927-33.
72. Echevarría JM, Fogeda M, Avellón A. Diagnosis of acute hepatitis E by antibody and molecular testing: a study on 277 suspected cases. *J Clin Virol* 2011;50:69-71.
73. Huang S, Zhang X, Jiang H, Yan Q, Ai X, Wang Y, Cai J, Jiang L, Wu T, Wang Z, Guan L, Shih JW, Ng MH, Zhu F, Zhang J, Xia N. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS One* 2010; 21:5:e13560.
74. Wu KT, Chung KM, Feng IC, Sheu MJ, Kuo HT, Koay LB, Lin CY, Tang LY, Tsai SL. Acute hepatitis E virus infection in Taiwan 2002-2006 revisited: PCR shows frequent co-infection with multiple hepatitis viruses. *J Med Virol* 2009;81:1734-42.

75. Goumba AI, Konamna X, Kommas NP. Clinical and epidemiological aspects of a hepatitis E outbreak in Bangui, Central African Republic. *BMC Infect Dis* 2011;11:93.
76. Caritas/Migrantes. *Migrazioni in aumento e scenari in mutamento. Dossier statistico immigrazione: 21° Rapporto 2011*. Roma: IDOS, Centro Studi e Ricerche; 2011. Disponibile all'indirizzo: http://www.caritasitaliana.it/materiali/Pubblicazioni/libri_2011/dossier_immigrazione2011/scheda.pdf; ultima consultazione 13/6/12.

APPENDICE A
Modulistica allegata all'invio dei campioni

APPENDICE B
Schede del database HEV

Scheda per inserimento dati paziente

The screenshot shows the Microsoft Access interface for a database named 'HEPATITIS: Database (formato file di Access 2002 - 2003)'. The ribbon includes 'Home', 'Crea', 'Dati esterni', 'Strumenti database', and 'Acrobat'. The 'Pazienti' table is selected in the 'Tabelle' pane on the left. The main window displays a 'Nuovo Paziente' form with the following fields:

- N. Paziente:
- Codice Paziente:
- Sesso:
- Data di Nascita:
- Medico:
- Struttura:
- Nazionalità:
- Comune di nascita:
- Comune di residenza:
- Anni di permanenza in Italia:

At the bottom of the form are four buttons: 'Salva', 'Abbandona', 'Annulla', and 'Elimina'. The Windows taskbar at the bottom shows the system tray with the date '13/02/2012' and time '09:52'.

Scheda di visualizzazione dei pazienti con codice alfanumerico

HEPATITIS : Database (formato file di Access 2002 - 2003) - Microsoft Access

Visualizza Incolla Copia Copia formato Taglia Appunti Carattere Formato RTF Nuovo Salva Elimina Record Totali Controllo ortografia Altro Ordina e filtra Trova Sostituisci Vai a Selezione Avanzate Attiva/disattiva filtro

Visualizzazioni Tabelle STUDIO EPATITI STUDIO EPATITI Pazienti SKHINIord

Lista Pazienti

	N. Paziente	Cod. Paziente	Sesso	Data Nascita	Struttura	Comune nascita
Dettagli	1	1045G	M		M.I.Policl.Uroma	
Dettagli	2	204AG	M		M.I.Policl.Uroma	
Dettagli	3	3042M	M		Osp Palermo	
Dettagli	4	5048M			M.I. Univ. Sassari	
Dettagli	5	604DM	F		M.I. Univ. Sassari	
Dettagli	6	704PS			Osp.C.Poma Mantova	
Dettagli	7	805FE	M		Polc.Modena	
Dettagli	8	1005CK			Osp. Trento	
Dettagli	9	1205SHS			M.I.Policl.Uroma	
Dettagli	10	1305BL	F		M.I.Policl.Uroma	
Dettagli	11	1506DLC	F		M.I.Policl.Uroma	
Dettagli	12	1606HR	M		M.I.Policl.Uroma	
Dettagli	13	1706IS	M		M.I.Policl.Uroma	

Records: 1 di 13 Nessun filtro Cerca

Visualizzazione Maschera BLOC NUM 09:58 13/02/2012

Scheda di visualizzazione degli esami di laboratorio virologici e sierologici

HEPATITIS : Database (formato file di Access 2002-2003) - Microsoft Access

Home Crea Dati esterni Strumenti database Acrobat

Visualizza Incolla Copia Copia formato Taglia

Visualizzazioni Appunti Carattere Formato RTF

Aggiorna tutto Nuovo Salva Elimina

Record

Totale Controllo ortografia Altro

Filtro Selezione Avanzate Attiva/disattiva filtro

Ordina e filtra

Trova Sostituisci Vai a Selezione

Tabelle

STUDIO EPATITI STUDIO EPATITI Pazienti SKTEST

Esami di laboratorio

N. Paziente: 1 N. Campione: 1 Struttura diagnosi: M.I. Policl. Uroma Operatore: Candido Angela

Data Prelievo: 15/07/2004 Data Test: Posizione Figorifero:

DIAGNOSI CENTRO RICHIEDENTE

HAV RNA HBV_DNA HCV RNA HDV RNA HEV RNA NABCE

HAV

IgM AntiHAV: NEG IgM AntiHA_V

AntiHAV: NEG AntiHAV_V

HAV RNA: 0

HBV

HBsAg: HBsAg_V

AntiHBsAg: AntiHBsAg_V

IgM AntiHBc: IgM AntiHBc_V

AntiHBc: AntiHBc_V

Anti_HBe: AntiHBe_V

HBV DNA: 0

HDV

ANTI HDV: ANTIHDV_V

HDVAg: HDVAg_V

HDV RNA:

HEV

IgM Anti HEV: IgM AntiHEV_V

Anti HEV: AntiHEV_V

HEVAg: HEVAg_V

HEV-PCR: NEG HEV RNA:

Genotipizzazione HEV:

BIOCHIMICA

ALT/GPT: 1000 Gamma GT: AST/GOT:

Fosfatasi Alcalina: Bilirubina Totale: Bilirubina Diretta:

LDH:

HCV

AntiHCV: AntiHCV_V

HCV RNA: 0 Genotipizzazione HCV:

NS3 baseline:

NS5 baseline:

NS3:

NS5:

Altri Virus

IgM CMV: Anti CMV: IgM EBV: Anti EBV:

Salva Abbandona Annulla Elimina

Visualizzazione Maschera

BLOC NUM Filtro

10:00 13/02/2012

Scheda per l'inserimento dei fattori di rischio del paziente

The screenshot shows a Microsoft Access database window titled "HEPATITIS: Database (formato file di Access 2002 - 2003) - Microsoft Access". The interface includes a ribbon with tabs for "Home", "Crea", "Dati esterni", "Strumenti database", and "Acrobat". The main area displays a form for "Fattori di rischio" (Risk Factors) for a patient. The form is organized into several sections:

- Fattori di rischio**: Includes fields for "N. Paziente" (set to 1), "Progressivo Comp. a rischio", "Data Compilazione", "Data contagio", and "Nazione Contagio".
- Viaggi all'estero negli ultimi 12 mesi**: Includes a checkbox and a dropdown for "Nazione viaggio Es.".
- Lavora all'estero**: Includes a checkbox and a dropdown for "Nazione Lavoro".
- Droghe**: A group box containing checkboxes for "Droghe Orali", "Droghe Endovenose", "Uso siringhe altrui", "Droghe Inhalatorie", "Uso Carta/Soldi altrui", "Tatuaggi", and "Piercing".
- Uso rasi altrui**: A group box containing checkboxes for "Uso rasi altrui", "Uso Spazzolino altrui", and "Cure Odontoiatriche".
- Trasfusioni**: Includes checkboxes for "Trasfusioni" and "Int. Chirurgico", each with a corresponding text field for "Anno ultima trasfusione" and "Anno int. Chirurgico".
- Contatto con animali**: A group box containing checkboxes for "Ovini", "Equini", "Bovini", "Uccelli", "Suini", and "Molluschi/Mitri".
- Alimenti a Rischio**: Includes a checkbox and a text field for "Alimenti".
- Contatto umano**: A group box containing checkboxes for "Coniugato/a", "Pluri Partner Pre matrimonio", "Pluri Partner Post matrimonio", "Prostituta/o", "Rapporti omosessuali", "Familiari HCV positivi", and "Gravidanza", along with a dropdown for "Tempo di gestazione".

At the bottom of the form, there are buttons for "Salva", "Abbandona", "Annulla", and "Elimina". The Windows taskbar at the bottom shows the system tray with the date "13/02/2012" and time "10:04".

APPENDICE C
Lettera di risposta
dell'ISS alle strutture sanitarie

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, aprile-giugno 2012 (n. 2) 14° Suppl.