

WORKSHOP DI VIROLOGIA VETERINARIA

Nell'ambito del 1° Workshop di Virologia Veterinaria tenutosi a Roma presso l'Istituto superiore di sanità sono stati conferiti alcuni premi da parte di diverse società scientifiche a quelli, tra i lavori presentati, che sono stati ritenuti più significativi e interessanti. La Società italiana di medicina veterinaria preventiva ha attribuito il suo riconoscimento al lavoro che di seguito pubblichiamo in considerazione, oltre che per la sua attualità, del fattivo coinvolgimento dei servizi veterinari territoriali nella sua attuazione ed elaborazione.

Ricerca diretta dell'HEV-RNA mediante PCR *real-time* con *Molecular beacon*

Germano Orrù¹, Manuele Liciardi², Ginevra Orrù¹, Vincenzo Piras¹,
Gesuina Pusceddu¹, Marco Regali³, Giuseppina Masia⁴ e Rosa Cristina Coppola⁴

Dipartimento Sanità pubblica, Policlinico universitario di Cagliari

¹Dipartimento di Chirurgia e Scienze odontostomatologiche, Università di Cagliari

²Istituto zooprofilattico sperimentale della Sardegna, Dpt. Cagliari

³Servizio Veterinario ASL n° 8 di Cagliari.

⁴Dipartimento di Igiene e Sanità pubblica, Università degli studi di Cagliari

Il virus dell'epatite E (HEV), recentemente classificato nel genere *Hepevirus*¹, è responsabile nell'uomo di una malattia itterica acuta e autolimitante a trasmissione oro-fecale, diffusa in parte dell'Asia, Nord Africa e America latina. Nei paesi industrializzati quali Nord America, Giappone ed Europa, la prevalenza dell'anticorpo diretto contro il virus E (anti-HEV) è molto bassa, ma è stato recentemente osservato un incremento della frequenza e la comparsa di casi autoctoni, non legati quindi ai viaggi in aree endemiche^{2, 6}.

Il ceppo suino di HEV, denominato Swine HEV, è stato isolato nel 1997 da Meng negli Stati Uniti⁷ ed è ormai nota la presenza di isolati di Swine

HEV in tutto il mondo, geneticamente e antigenicamente correlati all'HEV umano^{8, 10}.

Positività anticorpale è stata riscontrata anche in altre specie di animali domestici e selvatici (ratti, topi, pecore e recentemente, negli Stati Uniti è stato isolato un ceppo aviare di HEV (Avian HEV) in polli con epatite e splenomegalia, geneticamente e antigenicamente correlato al ceppo umano, presente anche in animali sani e capace di infezione *cross-specie*¹¹.

Diversi fattori contribuiscono ad affermare che l'infezione da HEV possa configurarsi come una zoonosi e sia capace di infezione *cross-specie*:

- *cross*-reazione tra gli anticorpi di origine animale e umana e possibilità

di infezione sperimentale di primati non umani con il ceppo suino¹²;

- elevata omologia nucleotidica tra i ceppi umani di recente isolamento (autoctoni) e i ceppi animali isolati nelle stesse località geografiche;

- maggiore prevalenza anticorpale in categorie professionali che lavorano a stretto contatto con i suini (5-20% negli USA)^{13, 14};

- riscontro di casi sporadici di epatite acuta in persone che consumano carni crude di animali selvatici (cinghiale, cervo)^{15, 17}.

Nell'uomo, la diagnosi di laboratorio di HEV è effettuata tramite la ricerca di anticorpi nel siero con tecniche di immunoenzimatica (EIA); tuttavia i kit presenti in commercio sono scarsamente specifici e sensibili per cui i risultati ottenuti devono essere inter-

pretati con cautela soprattutto in situazioni di bassa endemia¹⁸. Si preferisce quindi affiancare all'indagine indiretta, la ricerca diretta del virus con tecniche molecolari quali la RT-PCR che consentono di rilevare il genoma virale con maggior specificità e sensibilità. La PCR presenta però la limitazione di essere puramente qualitativa e richiede tempi di esecuzione relativamente lunghi e inoltre, laddove si esegua una reazione in più *step*, è suscettibile di contaminazione. Nel 2003 il nostro gruppo ha ideato una procedura in real-time PCR per la ricerca e la quantificazione dell'HEV-RNA in *single step* mediante *Light cycler* e *SYBR Green I*: tale metodica si è dimostrata molto sensibile, riuscendo a rilevare il virus sino a 10 cDNA/PCR in sole 4-5 ore in un range di quantificazione altamente lineare da 10 a 106 cDNA/PCR e con un buon coefficiente di correlazione. La specificità del sistema è stata validata dall'analisi di campioni di feci umane positive per HEV-RNA mediante RT-PCR. La tecnica è stata applicata all'analisi di campioni di siero umani e di campioni di siero suini di diversi allevamenti della Sardegna¹⁹.

Il passo successivo nell'evoluzione della metodica è rappresentato dalla sostituzione della molecola fluorescente aspecifica *SYBR Green I* con una sonda oligonucleotidica circolare altamente specifica, il *Molecular beacon* (MB); questa "modifica" permette la determinazione univoca del campione positivo senza dover ricorrere, nella fase post-amplificazione, all'analisi della curva di *melting* che a volte può risultare laboriosa.

Materiali e Metodi

Molecular beacon

Il *Molecular beacon* (MB) (figura.1) rappresentano i capostipiti di una classe di sonde molecolari fluorescenti a *folding* circolare. La sequenza complementare al bersaglio (10-20 nt) è posizionata nell'ansa (loop) della sonda; la molecola in assenza del target specifico è chiusa grazie a un corto doppio segmento nucleotidico detto *stem*. Alle estremità dello *stem* sono legati covalentemente due fluorocromi: (i) un *Reporter* (generalmente al 5') in grado di emettere luce fluorescente e un *Quencher* legato al

3' capace di assorbire la radiazione luminosa del *Reporter*. Per questa ragione, nella conformazione naturale chiusa, vista la vicinanza dei fluorocromi, il MB non emette fluorescenza (figura 1, a). La presenza di un target genico perfettamente complementare implica una variazione conformazionale della molecola in grado di far aprire lo *stem* e di allontanare di conseguenza i due fluorocromi; in queste condizioni si osserva una emissione luminosa da parte del MB (figura 1, b). In fase di progettazione è possibile ideare dei MB in grado di discriminare anche un solo *mismatch* lungo la sequenza bersaglio; per questa ragione i MB garantiscono elevati standard di specificità tra le sonde oligonucleotidiche.

Campioni clinici

- 192 emosieri suini: 152 prelevati nel 2003 da animali tra i 3 e 36 mesi (età media 13.4 mesi), 40 prelevati nel 2004 da animali di 30-40 giorni.
- 30 campioni di feci suine raccolti nel 2005 da animali di 8 mesi
- 10 sieri umani anti-HEV positivi.

Schema di Lavoro

La figura 2 evidenzia il percorso diagnostico e i risultati ottenuti con *Light Cycler* (Roche) e *Opticon II* (Foss) utilizzando il protocollo che prevede:

- (i) 20 pmoli (1_M vol. finale) di *Molecular beacon* disegnato su una regione dell'ORF2 costante in tutti gli HEV di origine umana-suina o aviaria depositati nella banca dati <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>;
- (ii) l'utilizzo di un kit di amplificazione RT-PCR one-step

(iii) 2 µl di RNA estratto da campioni di siero e feci (suine e umane).

Risultati

In esperimenti di ricostruzione la sensibilità del metodo è stata valutata su 102 molecole HEV cDNA/PCR.

La presenza di HEV-RNA è stata riscontrata in:

- 4 su 30 campioni di feci suine esaminati (13,3%)
- nessuno dei 192 emosieri suini
- nessuno dei 10 campioni di siero umani anti-HEV positivi.

Conclusioni

Negli animali suscettibili, uomo compreso, è stato osservato un periodo finestra di 7-14 giorni dal momento dell'infezione, in cui non si osserva alcun movimento anticorpale nei confronti del virus. In questo periodo però la carica virale nelle feci potrebbe essere elevata. Questo aspetto evidenzia i limiti dei sistemi indiretti per la diagnosi di laboratorio di infezione da epatite E, soprattutto quando è necessario disporre di sistemi in grado di rilevare l'RNA virale nei primi momenti dopo l'infezione, al fine di isolare precocemente i soggetti infetti/eliminatori del virus. Il metodo diretto, che utilizza il *Molecular beacon* consente di rilevare e quantizzare l'HEV RNA in tempi brevi e con elevati standard di specificità/sensibilità. La bassa positività all'HEV-RNA riscontrata negli allevamenti suini sardi esaminati depone per una scarsa circolazione del virus nella nostra regione, anche se studi sieroepidemiologici eseguiti

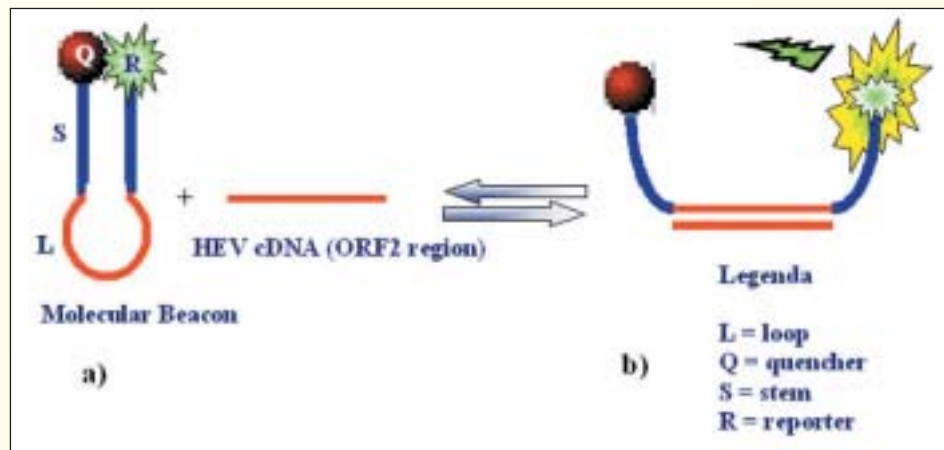


Figura 2: Percorso Diagnostico



in campioni di popolazione umana in tre differenti periodi di tempo (1988, 1995 e 2004), hanno evidenziato una diffusione dell'anticorpo anti-HEV rispettivamente del 1.6%, 0.8% e 2.1%, relativamente elevata per la nostra regione. Rimane difficile spiegare tale positività anticorpale, peraltro non giustificata dalla presenza di fattori di rischio noti per l'acquisizione dell'infezione. L'esito negativo per la ricerca di HEV-RNA nei sieri dei soggetti positivi per anti-HEV è in linea con la mancata osservazione di casi acuti, mentre appare interessante il riscontro del virus nelle feci dei maiali che indicherebbe la circolazione del virus pur senza determinare malattia apparente negli animali. Sarebbe quindi auspicabile estendere l'indagine a un maggior numero di aziende e animali, considerando le diverse tipologie di allevamenti presenti nell'isola compresi gli allevamenti familiari e allo stato brado, particolarmente diffusi in alcune zone della Sardegna.

Bibliografia

- Emerson, S.U., Anderson, D., Arankalle, A., Meng, X.J., Purdy, M., Schlauder, G.G., Tsarev, S.A., 2004. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Hepevirus*. Elsevier/Academic Press, London, pp. 851-855.
- Buti M, Clemente-Casares P, Jordi R, Formiga-Cruz M, Schaper M, Valdes A, Rodriguez-Frias F, Esteban R, Girones R. Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J Hepatol*. 2004 Jul;41(1):126-31.
- Ijaz S, Arnold E, Banks M, Bendall RP, Cramp ME, Cunningham R, Dalton HR, Harrison TJ, Hill SF, Macfarlane L, Meigh RE, Shafi S, Sheppard MJ, Smithson J, Wilson MP, Teo CG. Non-travel-associated hepatitis e in England and wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis*. 2005 Oct 1;192(7):1166-72.
- 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 Nov;74(3):419-24.
- Takahashi M, Nishizawa T, Yoshikawa A, Sato S, Isoda N, Ido K, Sugano K, Okamoto H. 2002. Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not travelled abroad. *J Gen Virol* 83:1931-1940.
- Zanetti AR, Schlauder GG, Romano L, Tanzi E, Fabris P, Dawson GJ, Mushahwar IK. 1999. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol* 57:356-360.
- Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., Haynes, J.S., Thacker, B.J., Emerson, S.U., 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (18), 9860-9865.
- Banks M, Bendall R, Grierson S, Heath G, Mitchell J, Dalton H. Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. 2004 May;10(5):953-5.
- Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. 2003. Identification of a genotype III Swine Hepatitis E Virus that was isolated from a Japanese pig born in 1990 and that is most closely related to Japanese isolates of Human Hepatitis E Virus. *J Clin Microbiol* 41:1342-1343.
- Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jordi R, MartIn M, Bofill-Mas S, Girones R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis*. 2003 Apr;9(4):448-54.
- Sun ZF, Larsen CT, Dunlop A, Huang FF, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ. Genetic identification of avian hepatitis E virus (HEV) from healthy chicken flocks and characterization of the capsid gene of 14 avian HEV isolates from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in different geographical regions of the United States. *J Gen Virol*. 2004 Mar;85(Pt 3):693-700.
- Meng, X.J., Halbur, P.G., Shapiro, M.S., Govindarajan, S., Bruna, J.D., Mushahwar, I.K., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 1998. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol*. 72 (12), 9714-9721.
- Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, Emerson SU, Purcell RH. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol*. 2002 Jan;40(1):117-22.
- Drobeniuc J, Favorov MO, Shapiro CN, Bell BP, Mast EE, Dadu A, Culver D, Iarovoi P, Robertson BH, Margolis HS. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis*. 2001 Dec 15;184(12):1594-7.
- Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology*. 2004 Dec 20;330(2):501-5.
- Tamada Y, Yano K, Yatsushashi H, Inoue O, Mawatari F, Ishibashi H. Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol*. 2004 Sep;74(1):67-70.
- Tei S, Kitajima N, Ohara S, Inoue Y, Miki M, Yamatani T, Yamabe H, Mishiro S, Kinoshita Y. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol*. 2004 May;40(5):869-70.
- Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH. 1998. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. *Hepatology* 27:857-861.
- Orru G, Masia G, Orru G, Romano L, Piras V, Coppola RC. Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *J Virol Methods*. 2004 Jun 15;118(2):77-82.