Corso di Laurea Magistrale in Scienze delle Produzioni Animali Sostenibili LM-86

Insegnamento in: ***SANITA' E SICUREZZA DEI PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE OTTENUTI DA TECNOLOGIE INNOVATIVE E SOSTENIBILI***

SSD: VET/04; 6 CFU (60 ore)

Virus a Trasmissione Alimentare

A.A. 2026-2027

Docente del Corso:
Dr. Gianluigi Ferri
DVM; PhD in Food Inspection
gferri@unite.it

Premessa

I casi di tossinfezioni alimentari di natura virale sono sottostimati

La possibilità di utilizzare metodiche biomolecolari innovative quali la Next Generation Sequencing (NGS) ha migliorato sia il **rilevamento** di virus trasmessi per via alimentare che una **maggiore efficienza dei programmi di sorveglianza**

Virus a trasmissione alimentare e loro ruolo nella sicurezza alimentare

- Parassiti intracellulari non in grado di replicare al di fuori della cellula ospite specifica
- La cellula ospite tratta le informazioni genetiche del virus come se fossero proprie
- La replicazione del virus avviene attraverso la trascrizione e la traduzione del genoma virale usando i meccanismi della cellula ospite
- I virus non sono coltivabili in substrati privi di cellule viventi ……..

Virus a trasmissione alimentare e loro ruolo nella sicurezza alimentare

- … il numero di particelle virali non aumenta pertanto nell’acqua e negli alimenti durante le fasi di produzione, lavorazione, trasporto e stoccaggio
- Le caratteristiche sensoriali di alimenti contenenti virus e di alimenti non contaminati sono identiche

Virus a trasmissione alimentare e loro ruolo nella sicurezza alimentare

- La trasmissione del virus non dipende solo dalla sua interazione con l'ospite, ma risente anche della influenza con l'ambiente esterno
- Fuori dall'organismo dell'ospite, i virus sono particelle inerti prive di un proprio metabolismo
- Più a lungo sono in grado di resistere nell'ambiente allo stato infettante, più alta è la probabilità di trasmissione e diffusione della infezione

Virus a trasmissione alimentare e loro ruolo nella sicurezza alimentare

- La trasmissione per via alimentare è stata dimostrata in virus tassonomicamente ascrivibili ad almeno 10 famiglie
- Le malattie alimentari associate a queste infezioni presentano una sintomatologia che varia da blande forme diarroiche a gravi encefaliti

Virus

Sul *nostro cibo*

Nel *nostro cibo*

Cioè..... possiamo pensare ai virus, di nostro interesse, in due modi:

- Virus <u>che sono solo contaminanti degli alimenti</u>
  (ben conosciuti, importanti agenti di tossinfezioni alimentari: es.
  Epatite A - HAV, Norovirus - NoV, Rotavirus)

Cioè…….. possiamo pensare ai virus, di nostro interesse, in due modi:

- Virus animali e vegetali che troviamo *all'interno degli alimenti*
  (*virus nativi*, non ancora ben conosciuti e piuttosto rari. A questa categoria appartiene il virus dell'epatite E - HEV endemico nei suini, trasmesso attraverso la carne di suino e riconosciuto come una emergente zoonosi nei paesi industrializzati)

- Virus che sono solo contaminanti degli alimenti

Priority Hazards (World Health Organization e Food and Agricoltural Organization)

Norovirus (NoV)
Rotavirus gruppo A
Virus dell'Epatite A (HAV)

- Virus che sono solo contaminanti degli alimenti

Si trasmettono attraverso la via oro-fecale

- Contaminazioni da maestranze infette (frequenti)
- Contaminazioni durante il processo produttivo (frequenti es. Molluschi bivalve molluscan shellfish)

L'infezione dell'ospite avviene per ingestione dell'alimento contaminato, a cui seguono l'invasione delle cellule dell'epitelio intestinale e la replicazione del virus nel medesimo distretto oppure altrove nell'organismo

- Virus che sono solo contaminanti degli alimenti

Si trasmettono attraverso la via oro-fecale

- Contaminazioni da maestranze infette (frequenti)

I focolai di malattia alimentare da NoV sono ad es. spesso legati a maestranze che contaminano alimenti destinati ad essere consumati **direttamente crudi** o **non sottoposti ad ulteriori trattamenti** prima del consumo (Ready To Eat)

Molti di questi focolai vedono implicate maestranze con patologie gastroenteriche in atto o da poco superate; in molti casi si è verificato il contatto con familiari infetti (bambini) prima della manipolazione dell'alimento

Gli errori più comuni da parte delle maestranze nei focolai di NoV e HAV sono riferibili a:

- soggetti **infetti** o **portatori** del virus
- che manipolano alimenti **RTE** in modo **improprio** (a mani nude)
- mani non adeguatamente lavate e disinfettate

La **scarsa igiene personale** è stata anche identificata come un co-fattore nel determinismo di focolai di malattia alimentare da NoV

Le maestranze possono contaminare gli alimenti in seguito ad episodi di vomito (NoV) o con feci (NoV/HAV), quando non rispettano le più basilari norme di igiene personale dopo l'uso dei servizi igienici

Sono maggiormente coinvolte **maestranze asintomatiche** rispetto a quelle che presentano una sintomatologia, il che spiega quanto possa essere difficile identificare e arginare un focolaio di malattia

- Virus che sono solo contaminanti degli alimenti

Si trasmettono attraverso la via oro-fecale

- Contaminazioni durante il processo produttivo (frequenti es. Molluschi bivalve molluscan shellfish)

Durante la **produzione primaria** materie prime a rischio vengono contaminate (frutti di bosco e altri alimenti di origine vegetale, molluschi bivalvi)

Gli **scarichi** e le **acque reflue** rappresentano le principali fonti di contaminazione e NoV e HAV i gruppi che destano le maggiori preoccupazioni (WHO, FAO)

Scarichi e acque reflue frequentemente contengono **più virus** a **RNA**, privi di envelope, diversamente a quanto si verifica nel caso di contaminazioni da parte delle maestranze

In questi casi la coabitazione di più virus a RNA e la seguente co-infezione di cellule umane da parte di ceppi virali geneticamente distinti può portare alla nascita di **ricombinanti virali** che mescolano le loro mutazioni individuali rendono imprevedibili gli effetti sul comportamento virale e la virulenza

- Virus animali e vegetali che troviamo *all'interno degli alimenti*

Emerging Hazards (World Health Organization e Food and Agricoltural Organization)

Virus dell'Epatite E (HEV)
Nipah Virus
Virus dell'Influenza Aviare H5N1

Virus il cui rischio di infezione è legato ad **alimenti specifici**; il **ruolo** di un determinato alimento nel causare la malattia virale, così come le **possibilità di associazione** tra virus e alimento impongono l'adozione di scrupolose misure di **prevenzione**

Zoonosi a trasmissione alimentare si verificano per consumo di carni, organi ed altri prodotti che contengono il virus in quanto provenienti da animali infetti

Per i virus questa è una via di trasmissione molto rara, sebbene vada sempre ipotizzata ed investigata all'insorgere di ogni focolaio di malattia alimentare

Questo è il caso specialmente dell'HEV, dal momento che **fegati** di **suidi** domestici e selvatici consumati crudi o poco cotti rappresentano la principale fonte di contaminazione/infezione

In aggiunta sindromi da Nipah virus si sono verificate in seguito ad ingestione di alimenti contaminati

Norovirus NoV

Solo negli USA:

21 milioni di casi di gastroenterite
71.000 ospedalizzazioni
800.000 morti

In passato conosciuti come

- *Small Round Structured Virus - SRSVs (piccoli virus strutturati rotondi)*
- *Norwalk-Like Virus - NLVs (Norwalk-like virus)*

Attualmente sono i più frequenti agenti di gastroenteriti virali epidemiche conseguenti a consumo di alimenti o di acqua

Tra le più importanti cause di gastroenterite acuta umana nel mondo

Genere *Norovirus* - Famiglia *Caliciviride*

Il virione ha forma di calice
Dimensioni: 27 -40 nanometri (nm)
Privo di envelope
RNA monocatenario
Dose infettante: da 10 a 100 particelle virali

Il Norovirus prototipo

Norwalk virus

Scoperto da Kapikian et al. (1972) in seguito ad un **focolaio di gastroenterite in una scuola in Norwalk (Ohio).**

Come fu identificato ?????

Immune electron microscopy :

esame feci di volontari che avevano consumato filtrati fecali provenienti da casi di malattia

(Kapikian, A. Z.,Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., and Chanock, R. M. (1*972) : Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis, J. Virol.* 10:1075–1081)

Norovirus (NoV): vengono classificati su base filogenetica in 6 genogruppi, da GI a GVI.

GI e GII: i più frequenti in corso di epidemie gastroenteriche umane (anche GIV)

GII anche riscontrato nei maiali; GIII infetta bovini e suini; GV è stato isolato dai topi: GVI infetta cani e gatti.

Infezioni nell'uomo

analisi filogenetica
proteine del capside

Resistenza (studi condotti su volontari umani)

- Conserva infettività dopo esposizione **a pH 2.7 per 3 h a T° ambiente**
- In mitili sottoposti a **trattamento termico e marinati a pH 3.75** infettività conservata per **un mese**
- Conserva **infettività in condizioni di refrigerazione e di congelamento**
- Resiste all'essiccamento

Nelle ostriche in ambiente naturale sono evidenziabili **dopo 4/6 settimane**

- Conserva infettività a **60°C x 30**’
- **Non è** inattivato dalla pasteurizzazione

Inattivati dopo trattamento a 90°C x 5’

Sono resistenti al trattamento da 3,75 a 6,25 mg/l di cloro

(che equivale ad un livello di cloro libero pari a 0,5/1,0 mg/ml, concentrazione normalmente presente nell'acqua da bere clorinata)

Standard europei per l'acqua potabile: 2-3 mg/l di cloro (quantità massima 5 mg/l)

Il virus è inattivato dopo trattamento con 10 mg/L di ***cloro***

(concentrazione applicata alle riserve idriche dopo un evento di contaminazione)

Cheesbrough J. S., Green J., Gallimore C. I., Wright P. A. and Brown D.W. (2000),
"*Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV)* ***detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis***".
Epidemiol. Infect. 125:93–98

Sarvikivi E, et al. Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries. Epidemiol Infect. 2012;140:260–7. https://doi.org/10.1017/S0950268811000379.

Hall AJ, et al. Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, United States, 2001–2008. Emerg Infect Dis. 2012;18:1566–73.https://doi.org/10.3201/eid1810.120833

Bellou M, et al. Shellfish-borne viral outbreaks: a systematic review. Food Environ Virol. 2013;5:13–23. https://doi.org/10.1007/s12560-012-9097-6.

La maggior parte degli alimenti incriminati include molluschi, che si nutrono filtrando l'acqua in cui si trovano immersi, quindi frutti di bosco e vegetali verdi, contaminati da operazioni di fertilizzazione effettuate poco prima della loro raccolta o irrigati con acque contaminate

Virus dell’Epatite A - HAV

Virus Epatite A (HAV) è un epatovirus

Famiglia : *Picornaviridae*

Genere *Hepatovirus*

Gli Hepatovirus sono stati isolati solo da uomo e primati → altre specie che fungono da reservoir non sembrano coinvolte nella diffusione del virus

Virus Epatite A (HAV)
è un epatovirus

La **frequenza di mutazione HAV è bassa e quindi il suo genoma è relativamente conservato nel tempo**

Particelle virali, due versioni:

- Virioni icosaedrici nudi, senza envelope (diametro 27 nm) eliminati con le feci
- Virioni pseudo-enveloped presenti nel sangue dei soggetti infetti e nelle colture cellulari.

Sono stati definiti sei genotipi di HAV: i genotipi da I a III infettano l'uomo e sono suddivisi in sottogenemici A e B. Il sottotipo IA è predominante in Europa

Resistenza

- HAV è altamente resistente all'inattivazione indotta con diversi metodi sia chimici e sia fisici
  - (Flehming et al., 1985; Sattar et al., 1989; Mbithi et al., 1990, 1993).

- Ben scientificamente documentata è, in particolare, la **tolleranza termica** e la sopravvivenza di HAV in differenti matrici alimentari (es. bivalvi e derivati del latte)
  - (Millard et al., 1987; Abad et al., 1997; Croci et al., 1999; Hewitt &Greening, 2006; Sow et al., 2011; Parry&Mortimer, 1984; Bidawid et al., 2000; Shin Young Park &Sang-Do Ha 2015);

Resistenza

HAV può sopravvivere nell'ambiente inclusa l'acqua di mare e il sedimento marino per più di tre mesi (Sobsey et al., 1988)

Dopo 60' a 60°C mantiene ancora l'integrità e la infettività. Dopo 10-12 ore a 56°C risulta solo parzialmente inattivato

In condizioni di refrigerazione e di congelamento HAV rimane intatto e infettivo per diversi anni

E' resistente all'essiccamento

E' stabile a pH 1 e sopravvive per 4 settimane in cozze marinate a pH 3,75 (Hollinger and Emerson, 2001; Hewitt and Greening, 2004).

Resistenza

- 300 mg/L di acido percloroacetico non lo inattivano così come non è inattivato da 1 g/L di cloramine a 20°C x 15’
- (Hollinger and Emerson, 2001)

L’ WHO ha stimato che l’ HAV nel 2010 è stato responsabile di **14 milioni di *foodborne illnesses* e di 27.731 decessi**

Secondo la *Food and Drug Administration”* (Food and Drug Administration, 2012) la dose infettante di HAV è presumibilmente compresa tra **10^1 a 10^2 particelle virali**;

Trasmissione

- ***L'HAV è generalmente trasmessa all'uomo attraverso la via oro-fecale.***

- Il periodo di incubazione dell'epatite A (HA) è di circa 28-30 giorni (range: 15-50).

- **La malattia, acuta e generalmente auto-limitante, colpisce il fegato ed è caratterizzata da febbre, diarrea e ittero.**

- **La proporzione di infezioni sintomatiche è molto bassa nei bambini piccoli (sotto i sei anni di età), ma l'espressione clinica e la gravità aumentano con l'età;**

- **il tasso di mortalità globale è intorno allo 0,3%, ma può arrivare fino all'1,8% negli adulti oltre i 50 anni e nei pazienti immunocompromessi**

Il virus è presente nelle feci 7-10 giorni prima dell'esordio dei sintomi e fino a una settimana dopo, mentre è presente nel sangue solo per pochi giorni

Pintó, R.M., Costafreda, M.I., Bosch, A., 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. Applied and. Environmental. Microbiology, 75, 7350–7355.

- Studio su livelli di HAV in molluschi bivalvi coinvolti in epidemie di epatite A VS il rischio per la salute umana

- Determinando come, a partire dalle cariche virali finali riscontrate nei bivalvi, la probabilità di infezione (Pi) vari **da 0.37 a 0.95 per le cozze crude**, da **0.005 a 0.63 per le cozze leggermente cotte/sbollentate** e da **0.00001 a 0.01 per le cozze ben cotte.**

- **In termini di rischio per il consumatore, una riduzione media pari al 90% (1 log) insieme a un'adeguata preparazione dei bivalvi, potrebbe ridurre, almeno in alcuni casi, il rischio d'infezione**. **Queste stime sottolineano, secondo gli Autori, l'importanza di stabilire un limite critico di particelle virali sia prima sia dopo il processo di depurazione dei bivalvi;**

Polo, D, Varela, M.F., Romalde, J.L., 2015.

Detectio and quantification of hepatitis A virus and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas. International Journal of Food Microbiology, 193, 43-50.

- **in uno studio sulla prevalenza di norovirus e virus dell'epatite a in molluschi allevarti in Galizia (NW Spagna), che è la più grande area di produzione di molluschi d'Europa, hanno trovato per HAV una prevalenza pari al 10,1%;**

Prevalenza ed incidenza molto variabili

In base al livello di anticorpi anti-HAV
l'endemicità è distinta in:

Bassa (< 15%), Intermedia (15–50%), Alta (> 50%)

Paradox of hepatitis A risk

Un esempio:

2013/2014 bacche contaminate con HAV (paesi a bassa endemicità)

=

severi focolai clinici dovuti all'alto grado di suscettibilità di soggetti non vaccinati e anziani

Da gennaio 2013 ad agosto 2014 sono stati segnalati 1.589 casi di epatite A associati all'epidemia multistato; 1.102 (70%) dei casi sono stati ospedalizzati per un tempo medio di sei giorni; sono stati segnalati due decessi correlati.
La maggior parte dei casi (n = 1.438; 90%) è stata segnalata in Italia. Germania, Irlanda e Norvegia hanno riportato ciascuno circa 30 casi, gli altri paesi europei hanno segnalato un numero inferiore di casi. Austria, Bulgaria e Danimarca hanno segnalato ciascuno un singolo caso associato a questo focolaio.

Le indagini epidemiologiche e microbiologiche hanno implicato bacche congelate miste come veicolo di infezione del focolaio.

Virus dell’Epatite E genotipi 1 e 2

1° epidemia a Dehli nel 1955,
coinvolte 52.000 persone, 1560 decessi

HEV

Clinicamente indistinguibile da HAV
tassonominamente non correlato a HAV

Famiglia Hepeviridae, genere Orthohepevirus

I casi umani sono sostenuti dalla specie Orthohepevirus A
Orthohepevirus A ulteriormente suddiviso in genotipi da 1 a 8

Solo i genotipi 1 e 2 sono considerati patogeni primari per l'uomo

Trasmissione: via oro-fecale.

HEV

Molto resistente nell'ambiente

Smith DB, Paddy JO, Simmonds P.
The use of human sewage screening for community surveillance of hepatitis E virus in the UK.
J Med Virol. 2016;88:915–8. https://doi.org/10.1002/jmv. 24403
Dalton HR, Seghatchian J.
Hepatitis E virus: emerging from the shadows in developed countries. Transfus Apher Sci. 2016;55: 271–4. https://doi.org/10.1016/j.transci.2016.10.016.

Nell'Europa occidentale episodi da HEV-1 or 2
sono generalmente considerati *imported or travel disease*

Rotavirus A

Genere Rotavirus
Famiglia Reoviridae,

Generalmente specie-specifico

Esistono **reports di trasmissione zoonotica,**

Agbemabiese Caet al. Whole genome characterisation of a porcine-like human reassortant G26P19 Rotavirus A strain detected in a child hospitalised for diarrhoea in Nepal, 2007.
Infect Genet Evol. 2017;54:164–169.
https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.026

Anche se…… la più importante fonte di Infezione per l'uomo è l'uomo!!

Le piante, i Virus, *l'Internalizzazione*

- *DiCaprio E, Culbertson D, Li J.*

Evidence of the internalization of animal caliciviruses via the roots of growing strawberry plants and dissemination to the fruit.

Appl Environ Microbiol. 2015;81:2727–34.

- Yang Z, et al

Internalization and dissemination of human norovirus and Tulane virus in fresh produce is plant dependent. Food Microbiol. 2018;69:25–32.

Epatite E Virus – genotipi 3 e 4

Tossinfezione zoonotica virale emergente

Epatite E Virus – genotipi 3 e 4

Garbuglia AR, Scognamiglio P, Petrosillo N, Mastroianni CM,
Sordillo P, Gentile D, et al.
Hepatitis E virus genotype 4 outbreak, Italy, 2011
Emerg Infect Dis. 2013;19:110–4. https://doi.org/10. 3201/eid1901.120983.

Tessé S, Lioure B, Fornecker L, Wendling M-J, Stoll-Keller F,
Bigaillon C, et al.
Circulation of genotype 4 hepatitis E virus in
Europe: first autochthonous hepatitis E infection in France.
J Clin Virol. 2012;54:197–200

Italia

In Italia, è stato registrato l'aumento di casi autoctoni di HEV con **sospetta trasmissione zoonotica** da cinghiali, cervi e suini domestici

In Italia la sieroprevalenza nei suini varia tra il 31,0% e il 50,2%, nell'uomo oscilla tra l'1% e il 5%

Studi condotti in Paesi europei e negli Stati Uniti hanno rilevato una sieroprevalenza umana più elevata

Di Bartolo et al.
Serological and virological survey of HEV in wild boar populations in northwestern Italy: detection of HEV subtypes 3e and 3f. Archives of Virology DOI: 10.1007/s00705-014-2246-5

During the hunting season, 594 serum and 320 liver samples were collected and screened for antibodies to HEV and HEV RNA. Overall, the ***seroprevalence was 4.9 %,*** *and HEV RNA was detected in 12 liver samples (p = 3.7 %).*

Phylogenetic analysis of the ORF2 region revealed that ***the isolates clustered within genotype 3, subtypes 3e and 3f, and were closely related to HEV strains previously detected in domestic pigs farmed in the same geographic area. Although the routes of viral transmission are still poorly understood, our data show that HEV genotypes 3e and 3f circulate in wild boars in northwestern Italy.***

EFSA PANEL Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen - ADOPTED: 8 June 2017

doi: 10.2903/j.efsa.2017.4886

una piccola percentuale (< 10%) di suini risulterebbe viremica durante la macellazione e rappresenterebbe quindi la principale causa di "carne di primo taglio" infetta da HEV

La percentuale di animali viremici alla macellazione varia a seconda della tipologia produttiva, età di macellazione e contesto epidemiologico

Di Bartolo I, et al.

Detection of hepatitis E virus in pork liver sausages.

Int J Food Microbiol. 2015

Jan 16;193:29-33. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.005. Epub 2014 Oct 13.

- ***La presenza, dunque, di HEV in carne suina potrebbe***
- ***essere l'esito di una viremia transitoria associata a disseminazione del virus in muscolo e altri tessuti (suini viremici al macello), piuttosto che l'esito di una cross-contaminazione durante le fasi di macellazione e lavorazione.***

Epatite E Virus – genotipi 3 e 4

Epatite E Virus – genotipi 3 e 4

Suinetti nati da scrofe sieropositive acquisiscono immunità passiva tramite le IgG colostrali che persistono fino a 9 settimane di vita circa.

Negli allevamenti intensivi i suinetti possono infettarsi quando l'immunità passiva decresce (circa 2 mesi), sieroconvertendo ad 1-2 settimane post infezione.

Considerazione!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

l’allevamento italiano :
l’orientamento produttivo verso il suino
pesante (≥160 kg / macellazione a 10-12 mesi),

agli altri Paesi UE ed Extra-UE dove suino a 90-110 kg (suino magro).

Virus dell’Epatite E - HEV

Chi è HEV (Hepatitis E virus)?

- E’ una **”foodborne zoonosis”.**
- Famiglia: *Hepeviridae.*
- Specie: *Paslahepevirus balayani*.
- Quasi-enveloped RNA virus.
- Il genoma di HEV è caratterizzato da tre Overlapping Open Reading Frame (ORF):
  - ORF 1 → proteina non strutturale.
  - **ORF 2 → proteina capsidica (pORF 2).**
  - ORF 3 → proteine multifunzionali di piccole dimensioni.

Chi è HEV (Hepatitis E virus)?

- Specie animali reservoir: cinghiale e suino domestico.

FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE
Volume XX, Number XX, 2021
Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/fpd.2020.2896

Hepatitis E Virus in the Food of Animal Origin: A Review

Gianluigi Ferri[1] and Alberto Vergara[2]

8 genotipi identificati.

HEV1 e **HEV4** principalmente dall'uomo (HEV4 suino domestico in Asia).

HEV3 da cinghiale (*Sus scrofa*) e suino domestico (*Sus scrofa domesticus*).

HEV5 e **HEV6** dal cinghiale (*Sus scrofa*).

HEV7 e **HEV8** camel variant.

TABLE 1. ANIMAL SPECIES RESERVOIR OR RECEPTIVE TO THE VIRUS (HEPATITIS E VIRUS)

Species	*References*
Pig	Sasaki *et al.* (2018)
Wild boar	Fredriksson-Ahomaa (2019)
Cattle	Tritz *et al.* (2018)
Sheep	Wang and Ma (2010)
Goat	Tritz *et al.* (2018)
Deer	Prpić *et al.* (2015)
Chicken	Marek *et al.* (2010)
Rat	Lack *et al.* (2012)
Rabbit	Liu *et al.* (2017)
Mongoose	Nakamura *et al.* (2006)
Bat	Drexler *et al.* (2012)
Ferret	Raj *et al.* (2012)
Fish	Batts *et al.* (2011)
Moose	Meng *et al.* (2016)
Camels	Woo *et al.* (2016)
Marine mammals	Montalvo Villalba *et al.* (2017)

Geographical distribution

HEV1 e HEV2	Paesi in via di sviluppo: - **Africa**; - **Asia**. Principale fonte: **acque contaminate «*wastewater management*».** **Acute hepatitis cases.**
HEV3	Paesi industrializzati: - **Europa → Italia HEV3 subtypes c, f, l, m**; - **Nord America**. Ingestione di **alimenti contaminati**. Causa **casi sporadici di ospedalizzazione.** **Immunocompetenti → asintomatici ma sieropositivi.**
HEV4	Genotipo prevalentemente Asiatico **«mixed farm genotype»**. Identificato anche in Europa.

Viral life-cycle

- Patogeno a carattere **“circolare”**.

- **Ambiente**.
- **Attività antropiche**.
- **Consumatore finale**.
- **One-Health issue**.

HEV peculiarities

Dose infettante stimata: **3.6 10^4 IU** (soggetti immunocompromessi).

Viremia (da **8 fino a 28 giorni** post infezione) → **masse muscolari.**

Sintomatologia GE …

HEV peculiarities

… ed in casi più gravi foci necrosi epatica

HEV peculiarities

72°C per **20 minuti** a cuore del prodotto → **VIRUCIDA** (Barnaud et al., 2012).

Carica virale inziale nel prodotto→ fattore cruciale.

Case report: paziente infettato da ingestione carne cruda-poco cotta (Spagna)
(Rivero-Juarez A, Frias M, Martinez-Peinado A, Risalde MA, Rodriguez-Cano D, Camacho A, Garcı́a-Bocanegra I, Cuenca-López F, Gomez-Villamandos JC, Rivero A. Familial hepatitis E outbreak linked to wild boar meat consumption. Zoonoses Public Health 2017;64:561–565).

HEPATITIS E VIRUS RNA DETECTION IN MEAT PRODUCTS

Country	*Meat products*	*Percentage of HEV RNA detection*	*References*
The Netherlands	255 raw pork sausages		Boxman *et al.* (2020)
	Cervelaat	10.8%	
	Salami	18.5%	
	Metworst	26.1%	
	Snijworst	16.3%	
Switzerland	90 ready-to-eat products		Moor *et al.* (2018)
	Local liver sausages	18.9%	
	Raw meat sausages	5.7%	
Germany	120 meat products		Szabo *et al.* (2015)
	Raw pig liver sausages	22%	
	Raw pig salami	20%	
	Raw wild boar sausages	10%	
Italy	99 traditional pork meat products	0.0%	Montone *et al.* (2019)
	63 wild boar homemade meat and liver sausages	6.3%	
France	394 samples		Pavio *et al.* (2014)
	Typical pig liver sausages	30%	
	Dry salted liver	3%	
	Liver quenelles	25%	
China	107 retail samples		Hao *et al.* (2018)
	Retail pork meats	33%	
	Retail pig livers	8.3%	
	Pig intestines	18.7%	
	Pig spleens	33.3%	
	Pig ureters	26.3%	
China	413 retail samples		Geng *et al.* (2019b)
	Pig livers	6.1%	
	Pig kidneys	3.1%	
	Typical "blood curd"	1.2%	
The Netherlands	537 samples:		Boxman *et al.* (2019)
	Liver	12.7%	
	Liver sausages ("Liverwurst")	70.7%	
	Liver pate	68.9%	
	Pork chops	0.0%	

HEV, hepatitis E virus; RNA, ribonucleic acid.

Carni fresche e trasformate

- La prima identificazione da **carne cruda-poco cotta** di **suino domestico** e **cervo** (Giappone, Matsuda et al., 2003).
- **Cross-contamination** → superficial layers.
- **Fegato** → primo sito di moltiplicazione
- **Viremia** → diffusione intra-tissutale.
- **Technologies impact**…

Latte

INTERNATIONAL SCENARIO ABOUT HEPATITIS E VIRUS RNA DETECTION IN MILK PRODUCTS

Continent	*Species*	*Samples*	*Percentage of HEV RNA detection*	*References*
Europe (Belgium)	Bovine	504 milk samples (collected from 416 dairy farms)	0.0%	Vercouter *et al.* (2018)
Europe (Germany)	Bovine	400 milk samples	0.0%	Baechlein and Becher (2017)
Europe (Turkey)		231 raw milk		Demirci *et al.* (2019)
	Bovine	48 cow milk	29.16% (positive for HEV RNA)	
	Caprine	65 goat milk	18.46% (positive for HEV RNA)	
	Ovine	65 sheep milk	12.3% (positive for HEV RNA)	
	Donkey	53 donkey milk	24.5% (positive for HEV RNA)	
North Africa (Egypt)	Bovine	480 milk samples (collected from 12 farms)	0.2% (positive both for HEV RNA and anti-HEV IgG) 1.6% (positive for anti-HEV IgG)	Sayed *et al.* (2020)
Asia (China)	Bovine	140 milk samples	37.1% (positive for HEV RNA)	Huang *et al.* (2016)
	Bovine	416 milk samples	0.0%	Geng *et al.* (2019c)
	Caprine	54 milk samples	74.07% (positive for anti-HEV IgG)	Long *et al.* (2017)

IgG, immunoglobulin G.

Molluschi bivalvi

HEPATITIS E VIRUS RNA DETECTION IN SHELLFISH AND WATER SAMPLES

Screened species	*Percentages of HEV RNA positive samples*	*References*
81 *Mytilus galloprovincialis*	14.81%	Mesquita *et al.* (2016)
384 samples		La Rosa *et al.* (2018)
298 *Mytilus* spp.	2.08%	
41 *Siliqua patula* Vongola del rasoio del Pacifico	0.52%	
33 *Chamelea gallina* Vongola lupino	0.0%	
12 *Donax* spp.	0.0%	
39 seawater samples	12.8%	
168 samples:		
70 cultured mussels (*M. galloprovincialis*)	28.5%	Rivadulla *et al.* (2019)
35 wild mussels (*M. galloprovincialis*)	37.1%	
31 clams (*Ruditapes* spp.) Vongola verace	16.1%	
32 cockles (*Cerastoderma edule*) Vongola comune	9.3%	
108 mollusk samples	1%	Pupari *et al.* (2019)
23 water samples	4.3%	
63 Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)	9.5%	Suffredini *et al.* (2020)
58 clams (*Meretrix lyrata*) Vongola del Pacifico	13.8%	

Categorie lavorative a rischio

Medici Veterinari, **allevatori**, **personale del mattatoio** e **cacciatori**.

Fattori cruciali: corretto uso dei **DPI**, **cross contaminazioni** (attrezzature e degli operatori), non corretta applicazione delle **GHP**.

Fasi a rischio: **evisceraton phase** e **bile waste dispersion.**

Rilevati **elevati titoli anticorpali** (IgM e IgG): **stesso genotipo** riscontrato nelle matrici alimentari.

Asintomatici.

Non solo il suino domestico e cinghiale, ma anche altre specie quali: **capra** e **coniglio**.

Pazienti immunocompromessi

Sintomatici.

Spesso a causa di talune patologie gravi sono necessarie **trasfusioni**.

Blood and Blood products found positive for high immunoglobulin titers e/o HEV RNA detection.

Trasmissione **interumana** (soprattutto HEV3 e HEV4).

Canada e **USA** hanno introdotto HEV tra i patogeni da monitorare nella **medicina trasfusionale**.

In **Italia**, Spada et al., 2019 ha valutato i titoli di anti-HEV in **Sardegna** e **Abruzzo** → il **30%** postivi con anti-HEV IgG elevate.

Stretta correlazione ad una **attività venatoria spinta**.

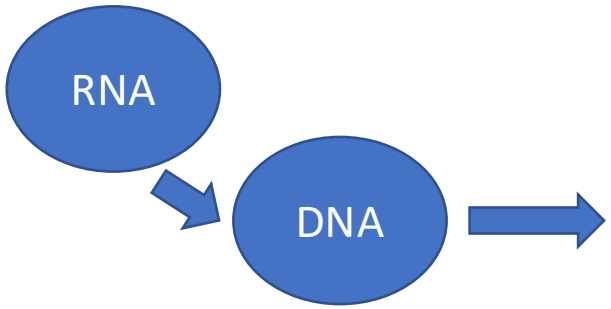
Diagnostica biomolecolare

La biologia molecolare ha un ruolo chiave.

Diagnosi di certezza mediante **Nested RT-PCR** e/o **RT-qPCR**.

Risultati ottenuti in tempi brevi.

Importanza delle attività di **sequencing** e **phylogenetic analysis**.



Stagione Venatoria 2019-2020

microorganisms

MDPI

Article

Hepatitis E Virus Detection in Hunted Wild Boar Liver and Muscle Tissues in Central Italy

Gianluigi Ferri [1,*], Carlotta Lauteri [1], Anna Rita Festino [1], Andrea Piccinini [1], Alberto Olivastri [2] and Alberto Vergara [1]

Abstract: In different European countries, including Italy, hepatitis E virus (HEV) has been recognized as an emerging public health concern. Humans are infected through the orofecal route by the ingestion of contaminated uncooked or undercooked animal-origin foodstuffs. Wild boars (*Sus scrofa*) have gained a crucial role as viral reservoirs. HEV-3 is the most frequently identified genotype from hunted wild boar liver and muscle tissues. The Marche region, more specifically Ascoli Piceno province, is characterized by a rooted hunting tradition and related product consumption. In this research study, 312 liver and 296 muscle specimens were screened using biomolecular assays, and HEV RNA was detected from 5.45% and 1.35% of liver and muscle samples, respectively. Phylogenetic analysis revealed that positive animals were infected by genotype 3 subtype c. Based on the environmental pathogen characteristics, HEV has also evolved to guarantee its survival in a wild environment. Therefore, wild boars and ruminants have a key role in its persistence. Epidemiological data regarding HEV circulation have resulted as necessary, and biomolecular analysis represents an important means of monitoring and establishing preventive measures. A multidisciplinary approach could provide a wide perspective regarding HEV and infectious implications on human, animal, and environmental health.

Keywords: hepatitis E virus; RNA; wild boar; liver; muscle; food-chain; one-health

pagepress

Hepatitis E virus detection in hunted wild boar (*Sus scrofa*) livers in Central Italy

Gianluigi Ferri,[1] Andrea Piccinini,[1] Alberto Olivastri,[2] Alberto Vergara[1]

[1]Faculty of Veterinary Medicine, Post-Graduate Specialization School in Food Inspection "G. Tiecco", University of Teramo; [2]Veterinary Service I.A.O.A., ASUR Marche, Area Vasta 5 Ascoli Piceno/San Benedetto del Tronto, Italy



Positive animal samples: hunting localization. Red circles identify where animals were hunted.

Screened population for HEV RNA detection.

Sex	Age-Based Classification
148 M	3 J 41 P 104 A
164 F	2 J 57 P 105 A

M: Male; F: Female. J: Juvenile (weight < 15 kg and estimated age between 0–12 months). P: Puberal (15 kg < weight < 40 kg, and estimated age between 13–24 months). A: Adult (weight > 40 kg and estimated age between 24–48 months).

Positive subjects reported basing on tissue types, age, sex and hunting geographical area.

Positive Samples N	Positive Tissues	Estimated Age and Sex	Hunting Area
1	LV; MS	AF	Comunanza (AP)
1	LV	AF	Funti (AP)
2	LV	AF	Vena Piccola (AP)
2	LV	AF	Venarotta (AP)
4	LV	PF	Vena Piccola (AP)
1	LV	PF	Comunanza (AP)
1	LV; MS	PM	Vena Piccola (AP)
1	LV	PM	Comunanza (AP)
2	LV; MS	AM	Vena Piccola (AP)
2	LV	AM	Roccafluvione (AP)

LV: Liver; MS: Muscle; A: Adult; P: Puberal; M: Male; F: Female.

Positive animals to the HEV RNA detection classified basing on sex and tissue.

Sex and Liver Positivity		Sex and Muscle Positivity	
11 F (65.0%)	5 P (45.45%) 6 A (54.55%)	1 F (25.0%)	1 A (100.0%)
6 M (35.0%)	2 P (33.33%) 4 A (66.67%)	3 M (75.0%)	1 P (33.33%) 2 A (66.67%)
Total: 17 animals		Total: 4 animals	

M: Male; F: Female. J: Juvenile (weight < 15 kg and estimated age between 0–12 months). P: Puberal (15 kg < weight < 40 kg, and estimated age between 13–24 months). A: Adult (weight > 40 kg and estimated age between 24–48 months).

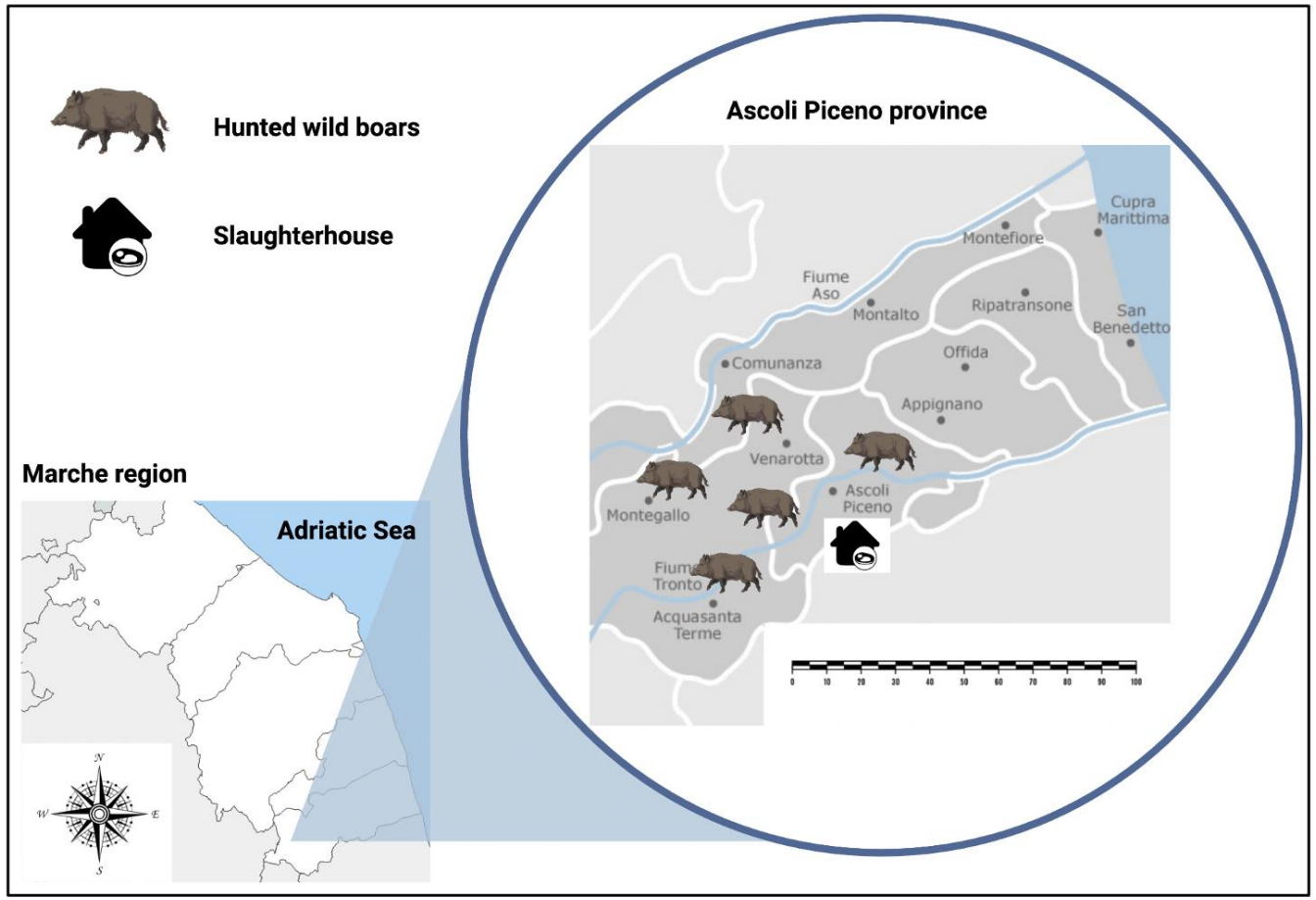
Stagione Venatoria 2020 -2021

Hepatitis E virus RNA detection from hunted wild boars in Central Italy: An epidemiological investigation

Gianluigi Ferri[1,*] · Giorgia Giantomassi[2]· Andrea Piccinini[1] · Alberto Olivastri[3] · Alberto Vergara[1]

Received: date / Accepted: date

Abstract: Every year, foodborne pathogens, including the hepatitis E virus (HEV), cause thousands of infections in different continents. Final consumers become infected through the ingestion of contaminated animal origin foodstuffs. Generally, in industrialized countries, HEV genotype 3 is involved in sporadic outbreaks. Infections have been described, in Europe and Japan as consequence of pork products and contaminated wild boar's primary or processed products (liver and muscle tissues) consumption. In Central Italy, hunting activities are largely practiced. In these small and rural communities, game meat and liver are ingested by hunters' families or at local and traditional restaurants. Therefore, these food chains can be considered critical HEV reservoirs. In this study, 506 liver and diaphragm tissues were collected from hunted wild boars in the Southern Marche region (Central Italy) and were screened for HEV RNA detection. From the 10.87% of liver and 2.76% of muscle samples, HEV3 subtype c was discovered. The observed prevalence values resulted in line with previous investigations performed in other Central Italian regions, but higher than Northern ones (3.7% and 1.9% from liver tissue). Therefore, the obtained epidemiological data highlighted the wide occurrence of HEV RNA circulation in a low-investigated area. Basing on results, a One-health approach was adopted due to the sanitary relevance of this Public Health concern.



. Hunted wild boars' distributions among Ascoli Piceno province, Central Italy.

Classification of screened animals based on sex and weight.

Males	**Age & weight categories**
252	J* → 6 P* → 111 A* →135
Females	**Age & weight categories**
254	J* → 2 P* → 115 A* →137

*J = juvenile (weight < 15 Kg and estimated age between 0-12 months).
*P = puberal (15 Kg < weight < 40 Kg, and estimated age between 13-24 months).
*A = adult (weight > 40 Kg and estimated age between 24-48 months).

. Sex-related organs HEV RNA positivity.

Sampled organs		**Positive livers**	**Sex-related livers' positivity**		**Positive diaphragms**	**Sex-related diaphragms' positivity**	
Liver	*Diaphragm*		*Female*	*Male*		*Female*	*Male*
506	506	55	38 (69.09 %)	17 (30.90 %)	14	4 (28.57 %)	10 (71.43 %)

GenBank Accession Numbers

Geographical localization: hunting areas & GenBank registered positive animals.

ID	Positive subjects	Positive tissues	HEV Target genes	Localization
MN20202101	AF	LV	ORF1	Comunanza (AP): 42.57 N; 13.24 E.
MN20202102	AM	LV		Ripatransone (AP): 42.59 N; 13.45 E.
MN20202103	AF	LV		Mozzano (AP): 43.58 N; 10.32 E.
MN20202104	AF	DG		Mozzano (AP): 43.58 N; 10.32 E.
MN2020210201	AF	LV	ORF2	Roccafluvione (AP): 42.51 N; 13.28 E.
MN2020210208	AF	LV		Comunanza (AP): 42.57 N; 13.24 E.
MN20202101212	AF	DG		Rotella (AP): 42.57 N; 13.33 E.

ID: identification on GenBank; A: adult subject; M: male; F: female; LV: liver; DG: diaphragm.

Raccolta campioni: anni 2022 - 2023

Title: *Hepatitis E virus detection in liver and muscle tissues sampled from home slaughtered domestic pigs in Central Italy*

Authors: (1) Gianluigi Ferri, (2) Giorgia Giantomassi, (3) Daniele Tognetti, (3) Alberto Olivastri, (1) Alberto Vergara

Hepatitis E virus is a cosmopolitan emerging foodborne pathogen, and raw or undercooked liver and pork products can cause infection through the orofecal route. The domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) represents the main "*urban reservoir*" both for humans and wild animals (Priemer et al., 2022). In Central-Southern Italy, the small traditional farming method, and the possibility of environmental sharing with wild species can represent crucial aspects for HEV diffusion and persistence. The aim of this study was to detect HEV RNA (genotype and subtype) from home slaughtered domestic pigs in the Ascoli Piceno province (Central Italy) and more specifically from Monti Sibillini National Park. For this purpose, a total of 236 liver and muscle tissue samples were collected from subjects with a final age of 1 year and half with and weight 200±20 Kg. Each tissue aliquot (15g) was conferred at slaughterhouse level. Laboratory *workflow* started from homogenization, followed by the RNA extraction using the Trizol LS method. The last analytical steps were bio-molecular screenings: nested RT-PCR and qRT-PCR amplifying specific genetic determinants belonging to the HEV ORF-1, ORF-2, and ORF-3 genes. Sanger sequencing and phylogenetic analysis were performed. The IBM® SPSS® Statistics Software was used for the statistical data analysis calculating the chi-square value (with Yates's correction). A total of 42/236 (17.79% CI 95%: 12.92-22.66%) liver samples resulted positive for the HEV RNA detection (ORF-1 and 2); while 8/42 (19.04% CI 95%: 7.17-30.91%) of positive subjects (liver organ) detected HEV RNA from diaphragm specimens too. Sequences presented high nucleotide similarities (over than 98.00%) with genotype 3. The discovered HEV-3 was the same amplified from wild boars' populations screened in the same province (Ferri et al., 2022). Basing on the farming systems and on the possible environmental sharing with wildlife, the scientific hypothesis of cross-infection possibility was supported by the obtained data. This study wants to focus further attention on the importance of HEV environmental surveillance that represents a crucial public health concern (following a One-health approach).

Qualitative results: A schematical representation about the screened food matrices.

Sample types	Positive LV	LV & Gender	Positive DG	DG & Gender	Positive S
236 LV 236 DG 6 S (30 subjects)	42/236	32 F 10 M	8/236	5/8 F 3/8 M	0 F 0 M

LV: Liver; DG: Diaphragm; S: Salami; F: Female; M: Male.

Positive sample types: Results according to the gender & localization variables.

N. Positive LV & Gender	N. Positive DG & Gender	Geographical localization
6F; 3M	2F	AP 42.51 N; 13.34 E
5F; 1M	2F	Roccafluvione 42.51 N; 13.28 E
1F; 1M	1M	Folignano 42.49 N; 13.38 E
3F	-	Venarotta 42.53 N; 13.29 E
2F	-	Offida 42.56 N; 13.42 E
1F	-	Grottammare 42.59 N; 13.52 E
1F; 2M	-	Rotella 42.57 N; 13.33 E
3F	1M	Ripatransone 42.59 N; 13.45 E
2F	-	Castignano 42.56 N; 13.37 E
1F; 1M	1M	Cupra Marittima 43.1 N; 13.51 E
2F; 1M	-	Acquaviva Picena 42.56 N; 13.48 E
2F; 1M	1F	Massignano 43.3 N; 13.47 E
3F	-	Appignano 43.21 N; 13.20 E

LV: Liver; DG: Diaphragm; F: Female; M: Male; AP: Ascoli Piceno districts.

Biologia molecolare

3 step prima della valutazione biomolecolare:

1. Omogenizzazione;
2. Estrazione degli **acidi nucleici**;
3. Stoccaggio degli estratti a **– 80°C**;

… Fino a esecuzione della **Nested PCR**.
… valutazione biomolecolare in due fasi:

- **RT-PCR** (da RNA a cDNA);
- **Nested PCR** (DNA).

Corsa elettroforetica su gel di agarosio (1.5-2%).

Primers used for HEV RNA detection through nested RT-PCR assay.

Gene	Primer	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Annealing (T°C)	Amplicon's size	Reference
ORF1	ConsORF1-s1	CTGGCATYACTACTGCYATTGAGC	48°C	418 bp	Wang *et al.*, 1999
	ConsORF1-a1	CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC			
	ConsORF1-s2	CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG	50°C	287 bp	
	ConsORF1-a2	GGCAGWRTACCARCGCTGAACATC			
ORF2	ConsORF2-s1	GACAGAATTRATTTCGTCGGCTGG	48°C	197 bp	
	ConsORF2-a1	CTTGTTCRTGYTGGTTRTCATAATC			
	ConsORF2-s2	GTYGTCTCRGCCAATGGCGAGC	50°C	145 bp	
	ConsORF2-a2	GTTCRTGYTGGTTRTCATAATCCTG			

ORF, Overlapping Open Reading Frame; HEV, hepatitis E virus; RNA, ribonucleic acid.
Nucleotides → Y: T or C; R: A or G; K: G or T; W: A or T.

HEV: a Public Health Issue

Fattori che influiscono sui dati

(differenze tra diverse regioni italiane):

- **Area geografica**.
- **Numerosità** della popolazione selvatica.
- Aspetti **ambientali** e **etologici**.

HEV: a new challenge

- Ruolo fondamentale della **biologia molecolare**.
- Approccio integrato di **medicina preventiva**.
- Maggiori chiarimenti sull'impatto che le **tecnologie alimentari** hanno sulla **carica virale**.
- Implementazione delle **misure igieniche**.
- Rischio sanitario non solo per il consumatore finale → **patologia professionale**.