

VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DEL VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) IN UN ALLEVAMENTO A CICLO CHIUSO DEL NORD ITALIA

EVALUATION OF THE PRESENCE OF HEPATITIS E VIRUS (HEV) IN A FARROW-TO-FINISH HERD IN NORTHERN ITALY

BINI G. ¹, DI BARTOLO I.², OSTANELLO F.¹

¹*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Italy*

²*Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299, 00161, Roma, Italy*

Parole chiave: virus dell'epatite E, HEV, suini, sorveglianza

Keywords: Hepatitis E virus, HEV, swine, surveillance

RIASSUNTO

Il virus dell'epatite E (HEV) è un virus a RNA, unico membro della famiglia *Hepeviridae*. Nei Paesi in via di sviluppo l'infezione è endemica e si trasmette per via oro-fecale attraverso il consumo di acqua contaminata. Nei Paesi industrializzati la malattia è considerata una zoonosi emergente, correlata al consumo di prodotti contaminati a base di carne e/o fegato di suino o cinghiale, crudi o poco cotti. I suidi domestici e selvatici sono considerati i principali *reservoir* di HEV nei Paesi industrializzati dal momento che i ceppi da essi isolati sono filogeneticamente correlati con quelli umani. La prevalenza di allevamenti infetti è elevata sia in Italia sia in altri Paesi. Nei suini l'infezione da HEV decorre in modo asintomatico e quindi non vi è interesse economico nel tentare di controllarla. L'obiettivo dello studio è stato quello di indagare la presenza di HEV in un allevamento di suini del nord-Italia, mai esaminato in precedenza. Nell'arco di un anno sono stati raccolti 59 campioni fecali da animali di differenti fasce d'età e 3 pool di emosieri testicolari (PF). I campioni fecali sono stati analizzati tramite RT-PCR al fine di rilevare il genoma virale mentre nei PF sono stati ricercati anticorpi anti-HEV utilizzando un kit ELISA. I risultati ottenuti mostrano una situazione atipica all'interno dell'allevamento dove, a fronte di una sieropositività fra le scrofe, l'RNA virale non è stato messo in evidenza nei campioni fecali degli animali di tutte le fasce d'età. Alla luce di questi risultati sono state discusse tre diverse ipotesi: una falsa positività al test ELISA, una bassa prevalenza di animali eliminatori o un'effettiva circolazione di HEV limitata alle scrofe con successiva eradicazione del virus. L'ipotesi più probabile sembra essere l'ultima ma questo pone ulteriori interrogativi sulla reale prevalenza di HEV negli allevamenti, così come sulla sua epidemiologia.

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is an RNA virus, the only member of the *Hepeviridae* family. In developing countries, the infection is endemic and is transmitted via the faecal-oral route through the consumption of contaminated water. In industrialized countries the disease is an emerging zoonosis, related to the consumption of contaminated raw or undercooked meat and/or liver products of pig or wild boar. In developed countries, domestic and wild pigs are considered the main *reservoirs* of HEV since the strains isolated from them are phylogenetically correlated with human ones. The prevalence of infected farms is high both in Italy and in other countries. In pigs, HEV infection is asymptomatic and therefore farmers have no economic interest in trying to control it. The aim of the study was to investigate the

presence of HEV inside a pig farm in Northern Italy, never examined previously. Over a year, 59 faecal samples (individual and pooled) were collected from animals of different age groups and three processing fluids (PF) taken at the time of castration. Faecal samples were analysed by RT-PCR in order to detect the viral genome while anti-HEV antibodies were detected in PF using a commercial ELISA kit. The results obtained show an atypical situation inside the farm where the sows are anti-HEV positive in PF while the search for viral RNA in the stool samples has given negative results in all age groups. On the basis of these results, three different hypotheses have been formulated: a false positivity to the ELISA test, a low prevalence of infected animals or a circulation of single HEV in sows. The most probable hypothesis seems to be the last but this raises further questions on the real prevalence of HEV in farms, as well as on its epidemiology.

INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite E (HEV) è causa di epatite negli animali e nell'uomo (Purcell e Emerson, 2008). HEV è un RNA virus a singolo filamento dotato di quasi-envelope classificato nella famiglia *Hepeviridae*, genere *Orthohepevirus* (Purdy *et al.*, 2017). Le specie del genere *Orthohepevirus A* comprendono 8 genotipi (da HEV-1 a HEV-8) in grado di infettare l'uomo ed altri mammiferi. Solo i ceppi appartenenti ai genotipi da HEV-1 a HEV-4 sono stati messi in evidenza in Europa.

HEV-1 e HEV-2 infettano solo l'uomo, sono endemici in molti Paesi in via di sviluppo dove causano focolai epidemici di epatite acuta, generalmente correlati al consumo di acqua contaminata da feci e alle scadenti condizioni igienico-sanitarie. In questi Paesi, HEV è la causa più comune di epatite virale acuta ed è responsabile di circa 20 milioni di casi ogni anno, di cui 70.000 letali. I ceppi appartenenti ai genotipi HEV-3 e HEV-4 sono zoonosici. In Europa, i casi umani di epatite E causati da HEV-1 e HEV-2 vengono messi in relazione con soggiorni in aree endemiche (Paesi in via di sviluppo). Tuttavia, negli ultimi 10 anni, è stato descritto un numero crescente di casi umani di epatite E autoctoni, causati dalla trasmissione zoonosica dei genotipi HEV-3 e HEV-4 (Aspinall *et al.*, 2017). In Europa, la trasmissione alimentare di HEV-3 e HEV-4 sembra essere una delle principali modalità di infezione ed è correlata al consumo di prodotti a breve stagionatura (principalmente salsicce contenenti fegato di suino) e carne poco cotta di cinghiale (Kamar *et al.*, 2017).

I suidi (domestici e selvatici) rivestono quindi un ruolo centrale nell'epidemiologia della malattia in quanto riconosciuti come *reservoir* di HEV nei Paesi industrializzati.

Se nell'uomo la malattia può assumere differenti manifestazioni cliniche – da asintomatica fino a casi di insufficienza epatica acuta – nel suino e negli altri *reservoir* la patologia è sempre a carattere subclinico con lesioni epatiche rilevabili solamente a livello istologico. Anche nel suino, l'infezione ha un ciclo oro-fecale. Si ritiene che, in genere, l'immunità passiva materna protegga i suinetti dall'infezione fino a circa due mesi di età. Successivamente, la maggior parte degli animali si infetta mediante l'assunzione di feci o di materiale contaminato presente nell'ambiente. Di conseguenza, la prevalenza più elevata si osserva in animali di età compresa fra i 2 e 4 mesi.

La presenza di HEV-3, il genotipo più frequente in Europa, è stata largamente descritta nelle popolazioni di suini (Pavio *et al.*, 2017). La trasmissione all'uomo può quindi essere favorita dall'elevata prevalenza di aziende e capi infetti.

In Europa, la sieroprevalenza intra-aziendale per HEV varia dal 30% al 98% (Salines *et al.*, 2017), con alcune differenze relative ai singoli Paesi (Casas *et al.*, 2009, Lange *et al.*, 2017, Rose *et al.*, 2011). Anche la prevalenza di animali infetti è molto variabile: da un minimo del 10% fino a un massimo del 100% (Salines *et al.*, 2017). Tuttavia,

la comparazione dei dati epidemiologici a livello internazionale è resa difficile dalla mancanza di un gold standard nella diagnosi.

A causa delle implicazioni di sanità pubblica e della sua grande diffusione nelle popolazioni di suini, è importante determinare la prevalenza di allevamenti infetti. Sono quindi necessari programmi di sorveglianza per HEV allo scopo di acquisire maggiori conoscenze sulla presenza, prevalenza e caratteristiche dei ceppi circolanti negli allevamenti, al fine di implementare eventuali misure di controllo con lo scopo di ridurre il rischio di infezione nei suini e, di conseguenza, il rischio di trasmissione di HEV all'uomo (EFSA, 2017, Salines *et al.*, 2017).

Uno dei maggiori problemi legati alla presenza di HEV all'interno degli allevamenti suini è che il virus può persistere nell'ambiente, incrementando il rischio che gli animali possano infettarsi tardivamente o re-infettarsi, aumentando così la probabilità che vengano macellati suini viremici. La macellazione di animali viremici rappresenta uno dei fattori di rischio principali per la trasmissione zoonosica dell'infezione attraverso il consumo di carni o organi (in particolare il fegato) freschi o prodotti a breve stagionatura (es. salsicce, in particolare quelle che contengono fegato).

Inoltre, risulta importante l'interazione fra HEV, Circovirus suino tipo 2 (PCV2) e il virus della Sindrome Riproduttiva Respiratoria del suino (PRRSV). La co-infezione con questi virus sembra causare un aumento della quantità di particelle di HEV escluse con le feci e un allungamento della finestra di eliminazione. Anche in questo caso, la conseguenza sarebbe un aumento della probabilità che i suini arrivino infetti all'età di macellazione.

L'assenza di una normativa specifica (sia a livello nazionale che Comunitario) relativa all'infezione negli allevamenti suini, associata al fatto che HEV è poco o nulla patogeno per il suino, rende questo virus economicamente poco rilevante per gli allevatori che quindi non hanno interesse a controllarne la circolazione all'interno degli allevamenti intensivi.

È evidente che la riduzione del rischio per il consumatore deve focalizzarsi sulla diminuzione della probabilità che la carne e gli organi di suini infetti entrino nel circuito delle carni e dei prodotti a base di carne. In termini di misure di salvaguardia della salute del consumatore e secondo un principio di massima precauzione, la valutazione della prevalenza degli animali infetti al macello appare poco efficace e, potenzialmente, estremamente costosa. Un'alternativa potrebbe essere rappresentata dall'individuazione di allevamenti indenni o a bassa prevalenza che possano rappresentare la fonte di una filiera HEV-free.

Lo scopo dello studio è stato quello di rilevare il virus dell'epatite E in un allevamento intensivo a ciclo chiuso mai esaminato in precedenza.

MATERIALI E METODI

Allevamento

La ricerca è stata condotta in una azienda a ciclo chiuso del nord Italia, con circa 300 scrofe e 5000 capi mediamente presenti. L'allevamento, che da circa sei anni pratica una rimonta esclusivamente interna, è gestito a bande tri-settimanali. Il seme viene acquistato da centri genetici. L'azienda è positiva stabile nei confronti di PRRSV; i riproduttori vengono vaccinati nei confronti di PRRSV e i suinetti nei confronti di PCV2.

Campioni esaminati

Al fine di valutare l'eventuale presenza di HEV in allevamento, nel periodo marzo 2018 - gennaio 2019 sono stati raccolti tre tipologie di campioni: pool di feci, feci individuali e pool di emosieri testicolari (PF).

I pool di feci degli animali da ingrasso sono stati prelevati dalle seguenti classi di età: 2 da soggetti di circa 40 giorni di vita; 33 da animali di 60-100 giorni di vita (categoria a maggiore

rischio); 4 da suini di 140 giorni di vita e 8 da animali di circa 170 giorni di vita.

I pool sono stati costituiti raccogliendo direttamente dal pavimento dei box che ospitavano gli animali (circa 25 capi/box), 3-5 campioni individuali di feci fresche. I campioni individuali sono andati a costituire un pool, di circa 150 grammi.

Per quanto riguarda i riproduttori, sono stati prelevati 12 campioni individuali da altrettante scrofe presenti in due distinte sale parto. Complessivamente, sono stati raccolti 59 campioni fecali (47 pool e 12 individuali). I campioni fecali sono stati posti all'interno di un sacchetto di polietilene, trasportati in condizioni di refrigerazione fino all'arrivo al laboratorio e successivamente congelati a -20°C fino all'esecuzione delle analisi.

Sono stati inoltre prelevati 3 pool di emosieri testicolari (PF). Ogni PF era composto dagli emosieri ricavati dai testicoli di tutti i suinetti maschi nati (complessivamente 91) da cinque diverse scrofe (per un totale di 25 scrofe con numero di parto compreso tra 2 e 9. Dopo la raccolta, gli emosieri sono stati congelati a -20°C fino all'esecuzione delle analisi.

Ricerca del genoma di HEV

I campioni fecali raccolti sono stati analizzati con metodica RT-PCR al fine di rilevare l'eventuale presenza dell'RNA virale. Per l'estrazione dell'RNA, le feci sono state sospese in acqua bidistillata sterile (10% p/v) e successivamente centrifugate a 6000 g per 10 minuti. L'RNA è stato estratto a partire da 140 µL di sospensione utilizzando il QIAamp® Viral RNA mini kit (QIAGEN, Milano) ed eluito in 80 µL di acqua *RNase-free*. Successivamente si è proceduto con il protocollo di retrotrascrizione e amplificazione usando il kit RT-PCR OneStep QIAGEN® (QIAGEN, Milano). Per rilevare l'RNA di HEV è stato impiegato un protocollo di nested RT-PCR condotto utilizzando la coppia di primer HE40-HE044, amplificando così un frammento di 506 paia di basi appartenente alla regione del capsido. I campioni sono stati poi sottoposti a un protocollo di nested PCR utilizzando una DNA polimerasi e la coppia di primer HE110-HE041 che amplifica un frammento di 458 paia di basi. La PCR è stata eseguita come segue: un ciclo a 94°C per 9 minuti seguito da 35 cicli a 94°C per 45 secondi, 49°C per 45 secondi e 72°C per 1 minuti; la fase di allungamento per 7 minuti a 72°C.

Ricerca di anticorpi specifici anti-HEV

Per la ricerca degli anticorpi anti-HEV negli emosieri testicolari (PF) è stato utilizzato un kit ELISA commerciale (HEV-Ab, Wantai Biopharmaceutical Inc., Beijing, China). Come specificato dal produttore, il valore di cut-off è stato calcolato come media dei valori di densità ottica (OD) di tre sieri di controllo negativi (forniti con il kit) + 0,12. I PF che hanno restituito un valore di assorbanza maggiore del valore del cut-off sono stati considerati positivi alla ricerca di anticorpi specifici anti-HEV.

RISULTATI

La ricerca di HEV-RNA ha fornito un risultato negativo sia nei campioni fecali individuali delle scrofe sia nei pool di feci degli animali da ingrasso. Al contrario, i 3 campioni di emosiero testicolare hanno fornito risultati nettamente positivi, con valori di densità ottica (OD) compresi tra 2,760 e 2,806, ampiamente superiori al valore di cut-off (0,155).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti indicano una situazione insolita all'interno dell'allevamento. A fronte dell'assenza dell'RNA virale nei campioni fecali (prelevati sia dai riproduttori sia dagli animali da ingrasso di diverse fasce di età) è stata rilevata la presenza di anticorpi

specifici anti-HEV nei PF, indicativa della presenza di immunoglobuline nel colostro e, di conseguenza, di una condizione di sieropositività delle scrofe esaminate. Nel complesso, i risultati ottenuti portano ad ipotizzare la presenza di una immunità specifica anti-HEV nei riproduttori esaminati, in assenza di circolazione virale nei soggetti all'ingrasso. Alla luce di questi risultati contrastanti è possibile formulare alcune ipotesi.

La prima ipotesi è che i risultati ottenuti dall'esame sierologico dei PF siano dei falsi positivi. Questa ipotesi appare poco probabile in quanto il kit ELISA utilizzato è considerato uno dei migliori, in termini di attendibilità diagnostica, tra quelli commercialmente disponibili. Nell'uomo, la sensibilità diagnostica di questo kit ELISA è di circa il 97% con una specificità del 99%. Inoltre, al momento non sono noti altri patogeni del suino che, presentando determinanti antigenici in comune con HEV, possano causare cross-reattività sierologiche.

La seconda ipotesi è che HEV circoli in allevamento ma con una prevalenza estremamente bassa. In questa situazione, la numerosità dei campioni esaminati potrebbe essere stata insufficiente a rilevare la presenza del genoma di HEV in almeno uno di questi. Per aumentare la probabilità di rilevazione di HEV, la maggioranza dei pool fecali esaminati (33/47; 70%) è stata prelevata da animali di età compresa tra 60 e 100 giorni di vita, fascia di età in cui è più probabile rilevare animali eliminatori fecali del virus. Ipotizzando un numero di soggetti di questa fascia di età presenti in allevamento pari a 2000 capi, la massima prevalenza possibile, a fronte di nessun campione positivo su 33 esaminati, può essere calcolata utilizzando la seguente formula (Thrusfield, 2018): dove D è il numero massimo di animali positivi, n il numero di campioni esaminati tutti con esito negativo (33), N il numero di animali presenti (2000) e CL è il livello di confidenza (95%).

Nel nostro caso, la massima prevalenza possibile è dell'8,6%. Una prevalenza così bassa per HEV nei soggetti di questa fascia di età non è mai stata segnalata in precedenza all'interno di allevamenti infetti. Alla luce di questi rilievi è quindi improbabile che nell'allevamento preso in esame la prevalenza nei soggetti di 2-3 mesi di età sia così bassa.

La terza ipotesi è che HEV sia entrato nell'allevamento, abbia circolato tra le scrofe senza diffondersi alle altre categorie di animali e che, successivamente, l'infezione si sia esaurita. L'allevamento è però a ciclo chiuso con una rimonta esclusivamente interna da sei anni. In assenza di acquisto di riproduttori dall'esterno, l'esatta via di introduzione del virus è difficile da stabilire. Il virus potrebbe essere entrato mediante un contatto con suini selvatici, oppure veicolato dagli operai che lavorano nell'azienda. Queste ipotesi sono state escluse considerando la localizzazione geografica dell'azienda e le misure di biosicurezza adottate e comunque spiegherebbero l'ingresso del virus in allevamento ma non per quale motivo si sia diffuso solo alle scrofe senza coinvolgere gli animali all'ingrasso. Un recente studio (Li *et al.*, 2019) ha evidenziato la presenza dell'RNA virale nel seme di verro suggerendo quindi l'ipotesi che la fecondazione artificiale possa essere una ulteriore via di trasmissione. Se il materiale genetico viene acquistato all'esterno da centri genetici, si potrebbero delineare nuove modalità di ingresso del virus in allevamento, in particolare nel settore di riproduzione. Tuttavia, la trasmissione per via venerea non è ancora stata dimostrata. Occorre inoltre considerare anche i motivi per i quali il virus non si è diffuso ad altri settori dell'allevamento. È possibile che le rigide misure di biosicurezza e le pratiche igienico sanitarie attuate nell'allevamento possano aver confinato l'infezione nel solo settore riproduzione. Ciò potrebbe aver contribuito a interrompere la persistenza dell'infezione in allevamento: le scrofe hanno esaurito l'infezione, vi è stata la clearance virale e, contestualmente, è stata evitata la persistenza del virus in sala parto e la sua diffusione ad altri settori mediante l'adozione di efficaci pratiche di pulizia e disinfezione e l'applicazione di corrette misure di biosicurezza. Una ulteriore possibilità è che non siano

stati rilevati dei campioni fecali positivi prelevati dalle scrofe semplicemente perché il numero di campioni esaminati non era sufficiente. Con 300 scrofe presenti in allevamento, la massima prevalenza possibile a fronte di zero campioni positivi su 12 esaminati è del 22%. Se la prevalenza in questi animali fosse inferiore a questo valore, il numero di campioni esaminati sarebbe troppo basso per avere il 95% di probabilità di rilevare almeno un campione positivo fra i 12 esaminati (Thrusfield, 2018).

Considerando i risultati ottenuti, è altamente probabile che nel settore ingrasso di questo allevamento il virus non circoli fra gli animali. Qualche dubbio rimane per il settore riproduzione ma resta il fatto che nello scenario peggiore, rappresentato dall'infezione dei riproduttori, le misure di biosicurezza hanno probabilmente impedito la diffusione del virus negli altri settori. Al momento, è quindi possibile considerare l'allevamento HEV-free. Per tale motivo, i risultati di questo lavoro delineano una situazione relativamente inconsueta. Precedenti studi condotti nel nord Italia allo scopo di valutare la prevalenza di allevamenti infetti (Di Bartolo *et al.*, 2008; Monne *et al.*, 2015; Caruso *et al.*, 2017) hanno chiaramente evidenziato che la presenza dell'infezione nelle aziende è la situazione più frequente (con circa il 97% di allevamenti sieropositivi e il 31% in cui è stata rilevata la presenza dell'RNA virale). Il fatto che gli animali all'ingrasso siano indenni dall'infezione potrebbe rappresentare un vantaggio competitivo per l'azienda. Lo stato di HEV-free potrebbe aprire nuove prospettive di commercializzazione sia per gli animali vivi che per i prodotti derivati da questi animali, ponendo l'allevamento in una posizione vantaggiosa rispetto ad altri per quanto riguarda soprattutto l'esportazione.

Ad oggi, non è ancora stata stabilita una regolamentazione relativa alle misure di profilassi/controllo da adottare nelle aziende infette da HEV e non è presente nemmeno un sistema di qualifica sanitaria che privilegi gli allevamenti indenni. Non è da escludersi che in futuro attestazioni sanitarie relative all'indennità da HEV verranno richieste da alcuni Paesi europei o extraeuropei. Considerando che i controlli sanitari effettuabili sugli animali al macello sono poco efficaci in termini di riduzione del rischio per il consumatore, la strategia migliore è quella di creare filiere e linee produttive separate solamente per gli animali provenienti da allevamenti indenni dall'infezione. Questa manovra permetterebbe di avere prodotti sicuri per il consumatore finale, soprattutto se a base di fegato e se destinati ad essere consumati crudi.

BIBLIOGRAFIA

1. Aspinall E.J., Couturier E., Faber M., Said B., Ijaz S., Tavošchi L., Takkinen J., Adlhoeh C., on behalf of the country experts (2017). Hepatitis E virus infection in Europe: surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015. *Euro surveillance*, 22(26):pii=30561.
2. Caruso, C., Peletto, S., Rosamilia, A., Modesto, P., Chiavacci, L., Sona, B., Balsamelli, F., Ghisetti, V., Acutis, P. L., Pezzoni, G., Brocchi, E., Vitale, N., & Masoero, L. (2017). Hepatitis E virus: A cross-sectional serological and virological study in pigs and humans at zoonotic risk within a high-density pig farming area. *Transboundary and emerging diseases*, 64(5), 1443-1453.
3. Casas M., Pujols J., Rosell R., de Deus N., Peralta B., Pina S., Casal J., Martin, M. (2009). Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Veterinary microbiology*, 135, 248-252.
4. Di Bartolo, I., Martelli, F., Inglese, N., Pourshaban, M., Caprioli, A., Ostanello, F., & Ruggeri, F. M. (2008). Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Veterinary microbiology*, 132(1-2), 47-55.
5. EFSA Panel on Biological Hazards: Ricci A., Allende A., Bolton D., Chemaly M., Davies

- R., Fernandez-Escamez P.S., Herman L., Koutsoumanis K., Lindqvist R., Nørrung B., Robertson L., Ru G., Sanaa M., Simmons M., Skandamis P., Snary E., Speybroeck N., Ter Kuile B., Threlfall J., Wahlström H., Di Bartolo I., Johne R., Pavio N., Rutjes S., van der Poel W., Vasickova P., Hempen M., Messens W., Rizzi V., Latronico F., Girones R. (2017). Scientific Opinion on the public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *EFSA Journal*, 15, 4886, 89 pp.
6. Kamar N., Izopet J., Pavio N., Aggarwal R., Labrique A., Wedemeyer H., Dalton H.R. (2017). Hepatitis E virus infection. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17086.
 7. Lange H., Overbo J., Borgen K., Dudman S., Hoddevik G., Urdahl A.M., Vold L., Sjurseth S.K. (2017). Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine. *Epidemiology and infection*, 145, 181-186.
 8. Li H., Wu J., Sheng Y., Lu Q., Liu B., Chen Y., Sun Y., Zhou E., Zhao Q. (2019). Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in various pig farms from Shaanxi Province, China: First detection of HEV RNA in pig semen. *Transboundary and emerging diseases*, 66, 72-82.
 9. Monne, I., Ceglie, L., Di Martino, G., Natale, A., Zamprogna, S., Morreale, A., Rampazzo, E., Cattoli, G., & Bonfanti, L. (2015). Hepatitis E virus genotype 4 in a pig farm, Italy, 2013. *Epidemiology & Infection*, 143(3), 529-533.
 10. Pavio N., Doceul V., Bagdassarian E., Johne R. (2017). Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human. *Veterinary research*, 48, 78.
 11. Purcell R.H., Emerson S.U. (2008). Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *Journal of hepatology*, 48, 494-503.
 12. Purdy M.A., Harrison T.J., Jameel S., Meng X.J., Okamoto H., Van der Poel W.H.M., Smith D.B., ICTV Report Consortium (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *The Journal of general virology*, 98, 2645-2646.
 13. Rose N., Lunazzi A., Dorenlor V., Merbah T., Eono F., Eloit M., Madec F., Pavio, N. (2011). High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 34, 419-427.
 14. Salines M., Andraud M., Rose N. (2017). From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Veterinary research*, 48, 31.
 15. Thrusfield M.V. (2018). *Veterinary epidemiology*, 4th ed., Wiley-Blackwell.