



# I VIRUS NEI MOLLUSCHI BIVALVI:



# GLI ALIMENTI POSSONO TRASMETTERE ALL'UOMO AGENTI PATOGENI DI NATURA:

- *BATTERICA*
- *PARASSITARIA*
- *VIRALE*

MANIFESTAZIONI  
PATOLOGICHE

PROBLEMATICHE DI SANITA'  
PUBBLICA

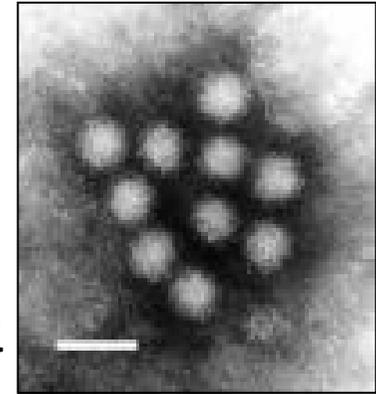


# Percentuali patogeni riscontrati in gastroenteriti (Europa 1992-2000)

- Norwalk-like viruses 38%
- Epatite A 17%
- Rotavirus 2.7%
- Astrovirus 0.5%
- Salmonella 20%
- Non identificati 21.8%



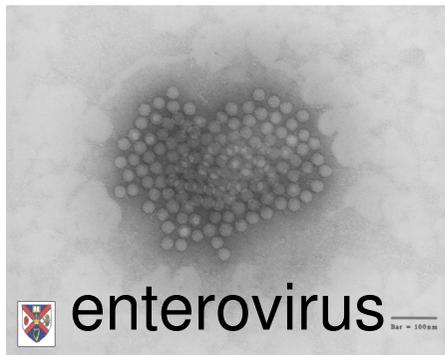
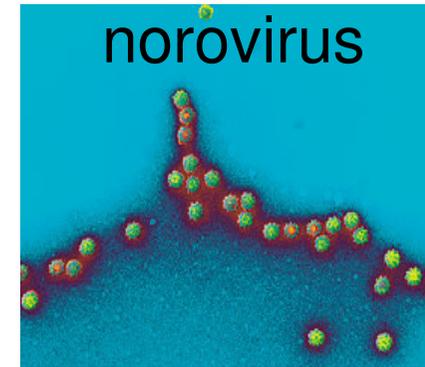
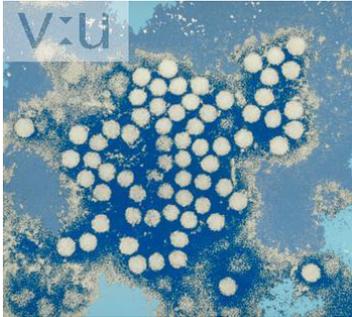
# I Virus



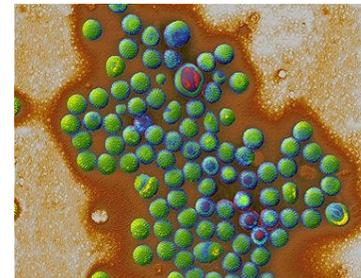
- Sono parassiti endocellulari che a differenza dei batteri non replicano fuori dall'ospite
- Per proteggere il genoma al momento della fase extracellulare, hanno proprietà che li rendono stabili alle variazioni delle condizioni ambientali
- I virus resistono alle fasi di produzione, processazione e conservazione degli alimenti che possono essere veicolo di contaminazione
- La loro presenza in bassa concentrazione non garantisce sicurezza in considerazione della dose infettante estremamente bassa ( $10^1$ - $10^2$  dosi infettanti)

# Virus trasmessi con gli alimenti:

Hepatitis A Virus (HAV)



Rotavirus





# Modalità di trasmissione

- ✓ Contatto diretto uomo-uomo
- ✓ Operatori a contatto con il cibo
- ✓ Consumo d'acqua contaminata (trasmissione diretta)
- ✓ Consumo di alimenti irrigati o lavati con acque contaminate (trasmissione indiretta)
- ✓ Contaminazione degli alimenti in qualsiasi punto della filiera alimentare (dai punti di raccolta alla tavola)
- ✓ Ruolo prevalente svolto da molluschi e vegetali



# Principali strutture e categorie a rischio

## STRUTTURE:

Asili – scuole

Mense

Ospedali

Case di riposo

Alberghi e ristoranti

Crociere



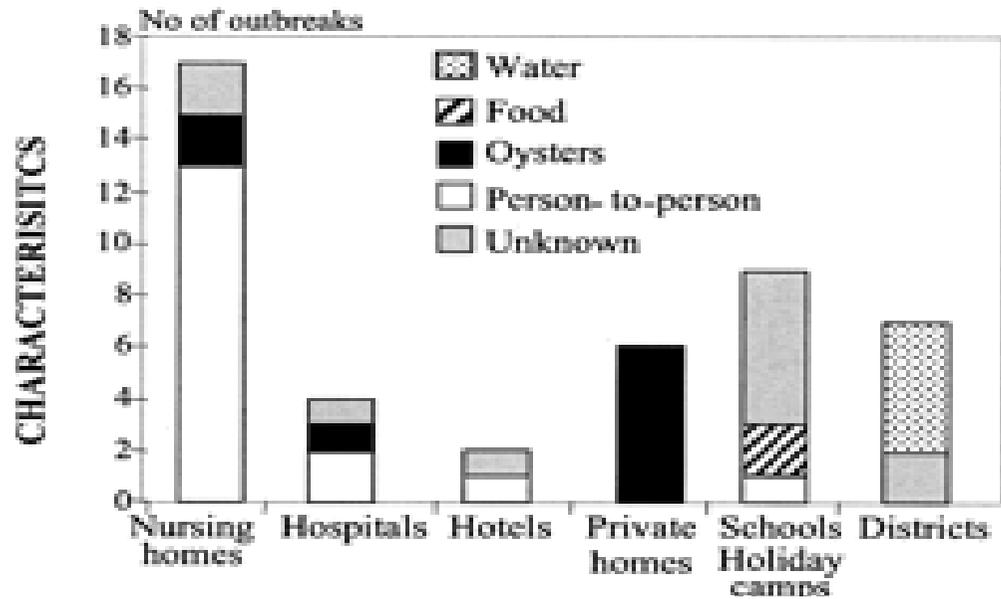
## CATEGORIE:

Bambini

Anziani

Adulti: operatori del settore alimentare, turisti, donne in gravidanza, soggetti immunodepressi

## A - SETTINGS

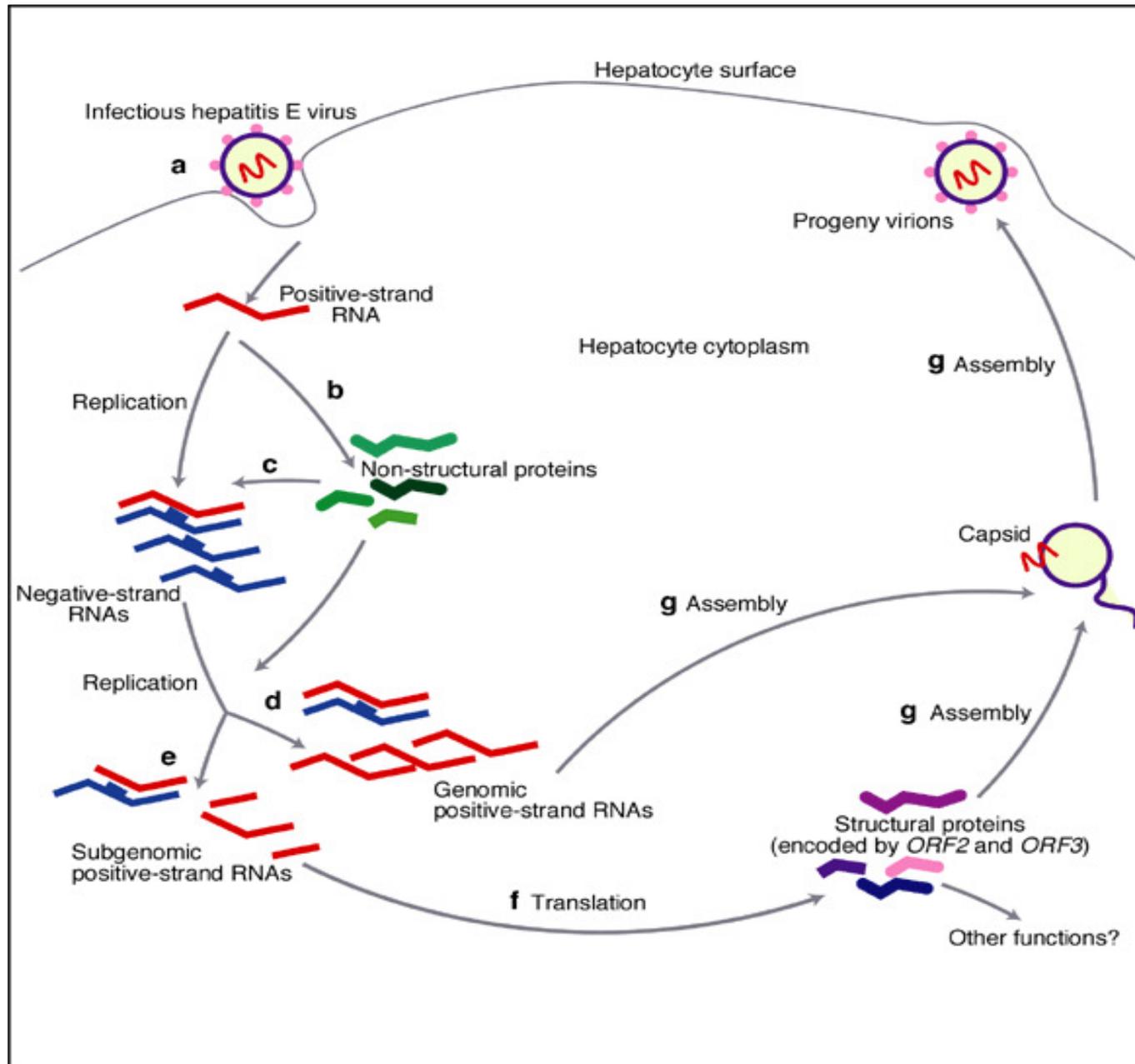


**MODALITA' DI  
TRASMISSIONE  
IN STRUTTURE  
AFFOLLATE**

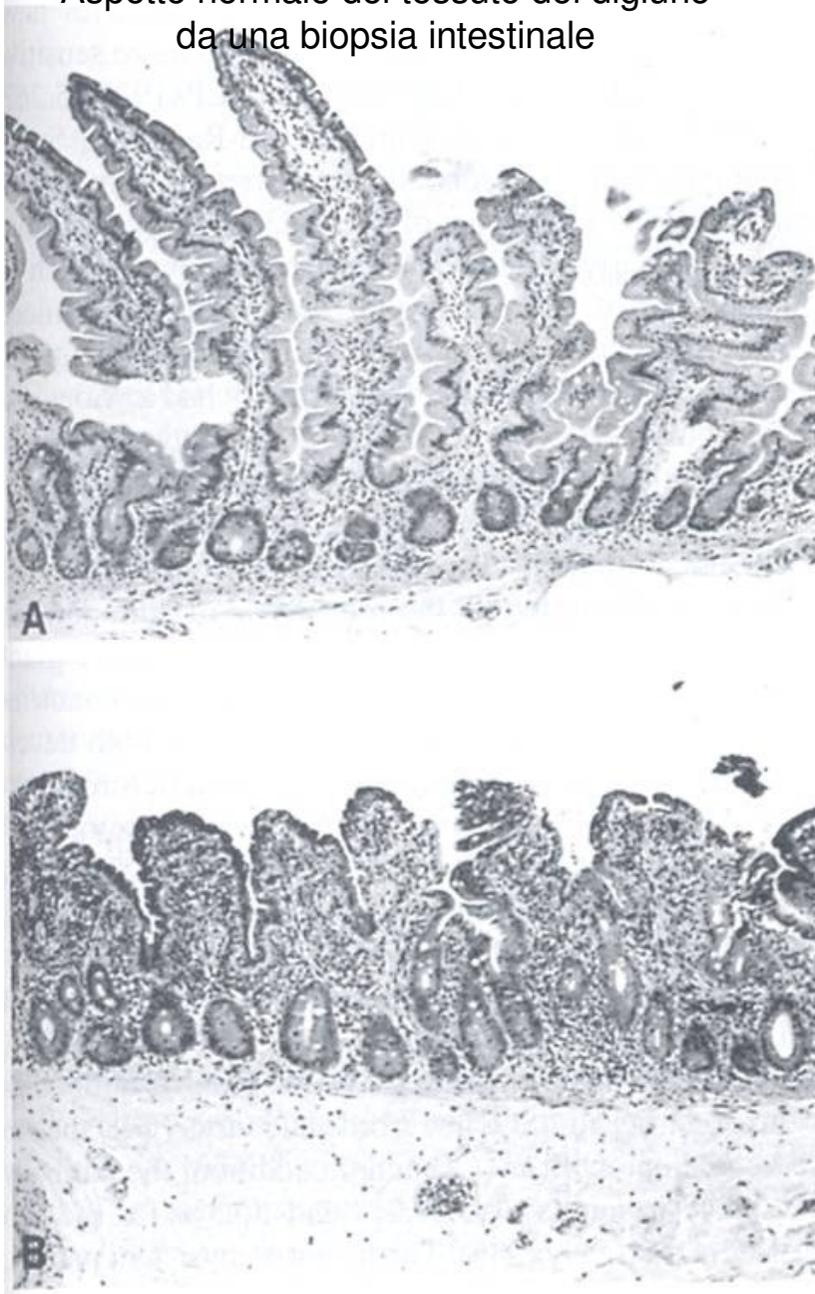




# CICLO REPLICATIVO



Aspetto normale del tessuto del digiuno  
da una biopsia intestinale



[Green KM et al., 2001].

## NOROVIRUS PATOGENESI

- ❑ Lesioni a livello dell'epitelio intestinale (già dal primo giorno dell'infezione)
- ❑ Alterazione nella forma delle cellule epiteliali
  - ❑ Accorciamento dei villi
  - ❑ Ipertrofia delle cripte
- ❑ Infiltrazione di cellule della risposta immunitaria (leucociti, polimorfonucleati e linfociti)

## Caratteristiche dei norovirus che facilitano la loro diffusione durante le epidemie

Caratteristiche	Osservazioni	Conseguenze
Bassa dose infettante	$< 10^2$ particelle virali	Trasmissione persona-persona Diffusione secondaria
Prolungata eliminazione asintomatica	Circa 2 settimane	Maggiore rischio di diffusione secondaria
Stabilità ambientale	Sopravvive a 10 ppm cloro, al congelamento ed al calore sino a 60°C	Difficile da eliminare dall'acqua contaminata, sopravvive in prodotti congelati o cotti al vapore
Sostanziale diversità dei ceppi	Presenza di molti tipi genetici ed antigenici	Richiede complesse procedure diagnostiche
Assenza di immunità di lunga durata	Elevate probabilità di reinfezione	Assenza di protezione e difficoltà nella messa a punto di presidi immunizzanti

# Sintomi e decorso

Periodo di incubazione 12-40 ore

Durata dell'infezione 12- 60 ore

**Sintomi: comuni alle gastroenteriti (nausea, vomito, soprattutto nei bambini: diarrea acquosa, crampi addominali. In qualche caso, si manifesta anche una leggera febbre).**

**Non esiste un trattamento specifico contro il norovirus né un vaccino preventivo.**

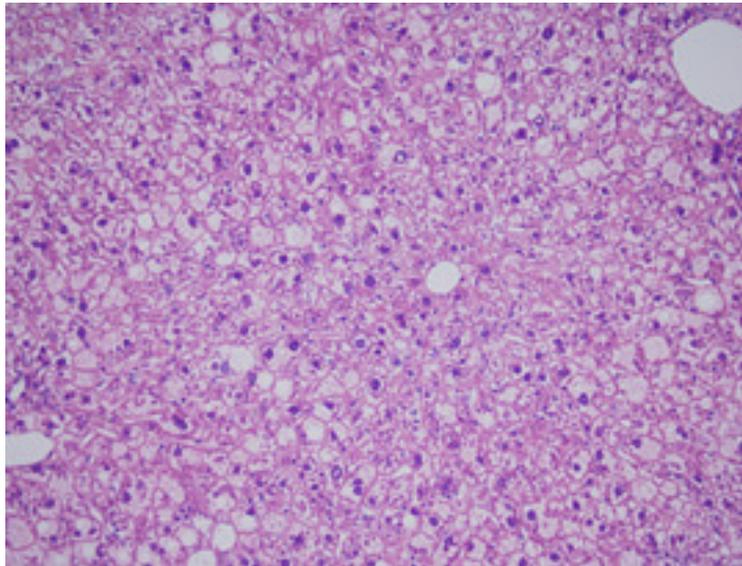
**I meccanismi di immunizzazione contro il norovirus sono poco conosciuti, l'immunità dura solo alcuni mesi: lo stesso individuo quindi può essere infettato dal virus più volte nel corso della vita**

**Scarse conseguenze cliniche, con completa guarigione in 1-2 giorni, senza complicazioni**

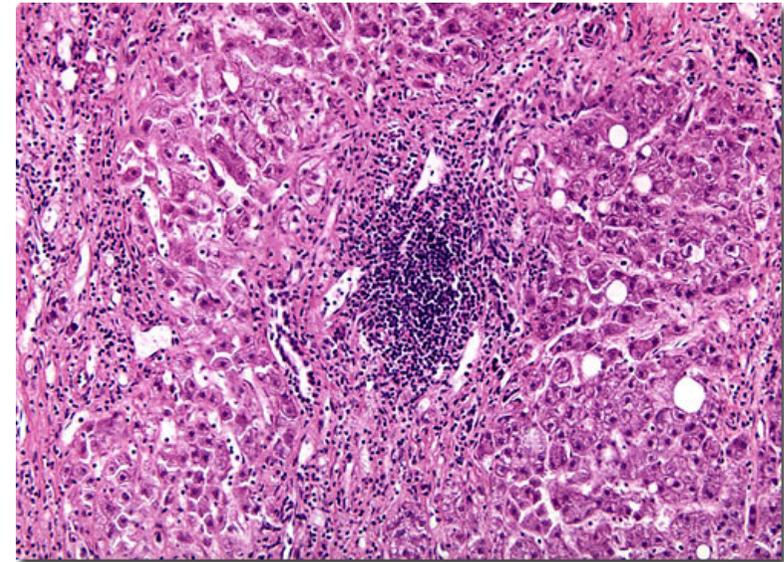
**Unica misura: assunzione liquidi**



# EPATITE A



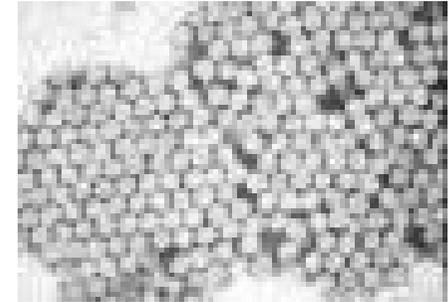
Tessuto epatico sano



Tessuto epatico infiammato



# Infezione da HAV: Epatite A



Ciclo oro-fecale

Colonizzazione intestinale ed epatica

Incubazione: 30 giorni

Picco di virus nelle feci: 2 settimane prima dei sintomi (ittero, febbre, spossatezza, inappetenza)

Prevalenza → variabile (nelle diverse aree geografiche) e sottostimata (elevato n° di casi asintomatici)

Classi di età → diversificate (giovani adulti e anziani)  
asintomatica nei bambini < 6 anni

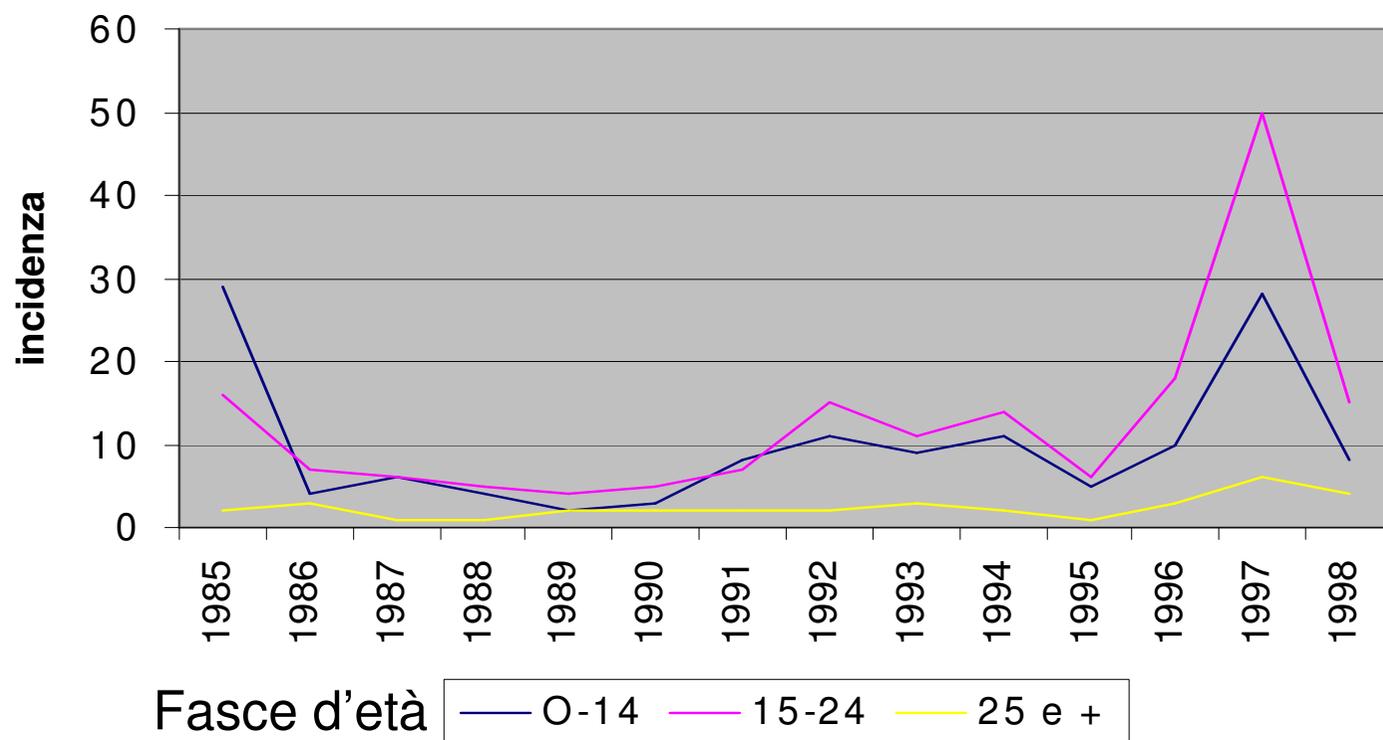
Puglia → regione endemica → 5.649 casi nel 1996

→ 11 mila casi nel 1997

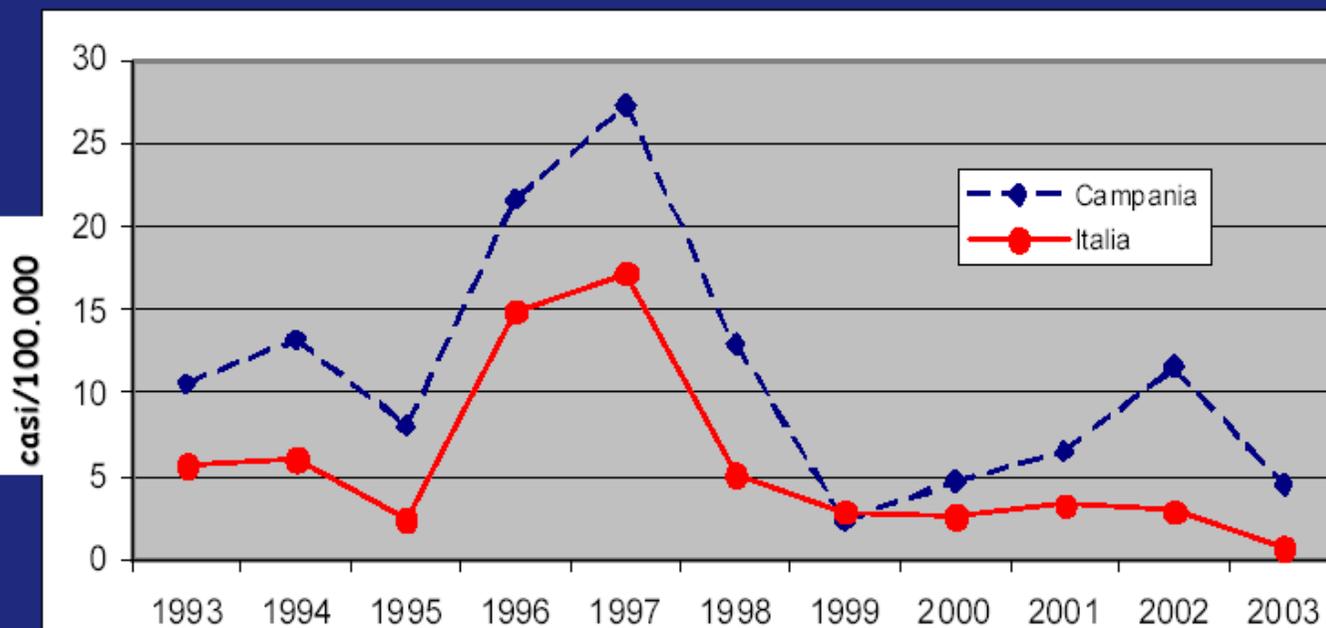
→ 438 casi nel 1999



# Virus Epatite A

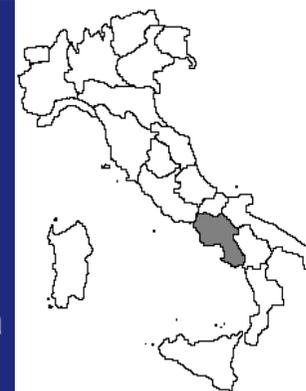


## Incidenza annuale di HAV (1993 to 2003)



### Epidemia di HAV Campania 2004

- Periodo gennaio – agosto 2004 : **882 casi di epatite A**  
frequenza su base regionale: 15/100.000 abitanti  
frequenza nazionale 3-5/100.000; max 30/100.000 Puglia e Campania
- Casi concentrati in **due aree costali** (attack rate **54.3/100.000** abitanti)

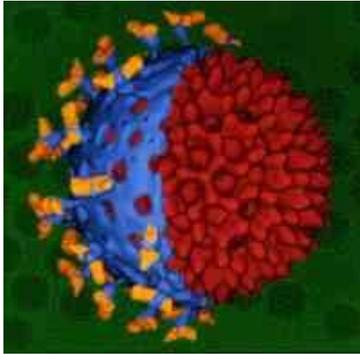




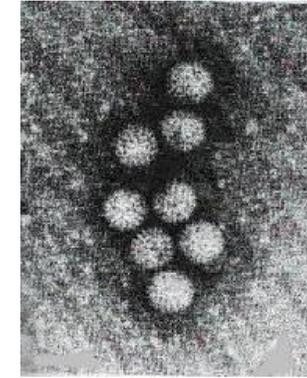
# Infezioni da *enterovirus*

- ✓ Neurologiche (meningite)
- ✓ Gastroenteriche
- ✓ Muscolari (mialgie)
- ✓ Esantematiche
- ✓ Respiratorie
- ✓ Cardiovascolari

Evidenziata presenza di enterovirus  
nelle acque marine e di estuario



# Rotavirus



- Responsabili di gastroenteriti acute
- Trasmessi per via oro-fecale
- Presenti nelle acque e potenzialmente presenti nelle verdure, frutta e alimenti consumati crudi
- Forme cliniche gravi in soggetti di età compresa tra i 6 mesi ed i 2 anni





# **Alimenti: problemi nell'individuazione delle contaminazioni**

- I prodotti contaminati appaiono normali alla vista, all'olfatto, al tatto ed al gusto
- Scarsa disponibilità delle metodiche di analisi e di impiego routinario delle stesse
- Metodi tradizionali poco sensibili
- Metodi molecolari più sensibili, ma ancora in fase di elaborazione



# Molluschi eduli lamellibranchi

- ampiamente distribuiti nel mondo (20.000 specie)
- importante apporto nutrizionale per l'uomo
- animali scavatori sessili o sedentari, che si nutrono di piccole particelle alimentari presenti nell'acqua o nei sedimenti, mediante un meccanismo di filtrazione pressoché ininterrotto.





# Attività di filtrazione dei molluschi

	°C	Litri/ora
Mitilo	14	1,5
Ostrica Europea	15	12
Ostrica Americana	20	18



**36-432 litri/giorno**



# RACCOLTA E CAMPIONAMENTO

Premessa:

- I prodotti contaminati appaiono normali alla vista, all'olfatto, al tatto ed al gusto
- I virus non crescono, ma si conservano all'interno dell'alimento

- Indossare sempre guanti
- Indossare mascherina (prodotti non confezionati)
- Lavare abbondantemente le mani
- Utilizzare il + possibile oggetti monouso
- Disinfettare le superfici di lavoro





# RACCOLTA E CAMPIONAMENTO

- Prelievo al mercato ittico di aliquote di 3-5 Kg
- Raccolta diretta nelle acque di mare adibite alla miticoltura
- Il campione può essere analizzato fresco oppure congelato a  $-20^{\circ}\text{C}$  prima delle prove (i virus resistono al congelamento)



*in questo caso il titolo di un virus eventualmente presente può diminuire dopo lo scongelamento*



## **Decreto Leg.vo n° 530 (30 dicembre 1992)**

Norme sanitarie per la produzione e la immissione sul mercato di molluschi bivalvi vivi destinati al consumo umano diretto o alla trasformazione prima del consumo

### *Area di raccolta tipo A:*

I molluschi sono destinati al consumo umano diretto

### *Area di raccolta tipo B:*

I molluschi provenienti da un'area B possono essere destinati al consumo umano diretto dopo stabulazione o depurazione (48h) in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona di tipo A

### *Area di raccolta tipo C:*

I molluschi provenienti da un'area C possono essere destinati al consumo umano diretto esclusivamente previa stabulazione per un periodo di tempo non inferiore ai due mesi in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona di tipo A





## Decreto Leg.vo n° 530 (30 dicembre 1992)

Art. 5: i centri di spedizione e depurazione devono effettuare controlli analitici finalizzati all'accertamento delle caratteristiche igienico-sanitarie dei prodotti su un numero rappresentativo di campioni di molluschi prelevati prima e dopo le operazioni di manipolazione

Art. 8: i colli delle partite di molluschi bivalvi vivi, destinati al consumo umano diretto devono essere muniti di bollo sanitario che consenta di identificare il centro di spedizione o di depurazione di provenienza in qualsiasi fase della distribuzione fino alla vendita al dettaglio

Art.12: le partite di molluschi di origine comunitaria destinate al consumo umano diretto non munite del bollo sanitario di cui all'art. 8 sono sequestrate e distrutte a spese del destinatario



## Decreto Leg.vo n° 530 (30 dicembre 1992) requisiti igienico-sanitari

I molluschi bivalvi devono:

- Possedere caratteristiche di freschezza, essere vivi e vitali e presentare un guscio privo di sudiciume, reagire a stimolazione
- Contenere: - coliformi fecali <300/100 g di polpa
  - E. coli <230/100 g di polpa
  - salmonella assente in 25 g di polpa
- Non contenere biotossine algali (Paralytic Shellfish Poison, Diarrhetic Shellfish Poison)

Non contempla la verifica dell'assenza di particelle virali



Anno 2004

Risultati del monitoraggio effettuato su 237 campioni di molluschi analizzati per *E.coli* [metodo MPN (D.M.31.7.95)], HAV e NoV.

<b>N. campioni</b>	<b><i>E.coli</i> (MPN/100g)</b>	<b>N. positivi per presenza di HAV</b>	<b>N. positivi per presenza di NoV</b>
<b>169</b>	<b>&lt; 230</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>42</b>	<b>&lt; 230</b>	<b>13</b>	<b>29</b>
<b>11</b>	<b>&gt; 230</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>2</b>	<b>&gt; 230</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>&gt; 230</b>	<b>0</b>	<b>3</b>



# Incidenza

Conferma dell'inefficacia dell'E.coli come indicatore della pericolosità dei molluschi

Non c'è correlazione tra contaminazioni batteriche e virali

(anche le zone di mare **cat.A** possono essere a rischio di contaminazione)





## Nuovi Regolamenti Comunitari in vigore dal 1.1.2006 (alimenti di origine animale)

\* [852/2004](#) e [853/2004 \(Art 11\)](#) prassi di igiene:  
possono essere fissate misure di attuazione per le procedure  
di analisi virologiche e le relative norme virologiche

\* [854/2004](#) controlli ufficiali sui prodotti

Alcune ASL associano già al piano di monitoraggio DL 530/92  
le analisi di tipo virologico per i molluschi



## Problemi nell'individuazione delle contaminazioni alimentari

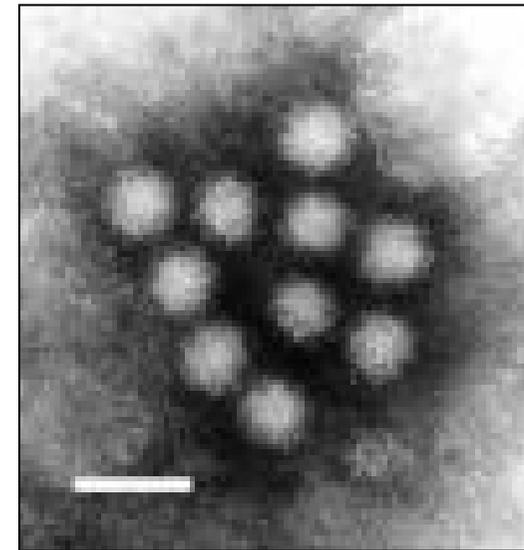
- Limitata disponibilità delle metodiche di analisi e di impiego routinario delle stesse
- Metodi tradizionali poco sensibili (microscopia elettronica, E.L.I.S.A.)
- Metodi molecolari più sensibili, ma ancora in fase di elaborazione



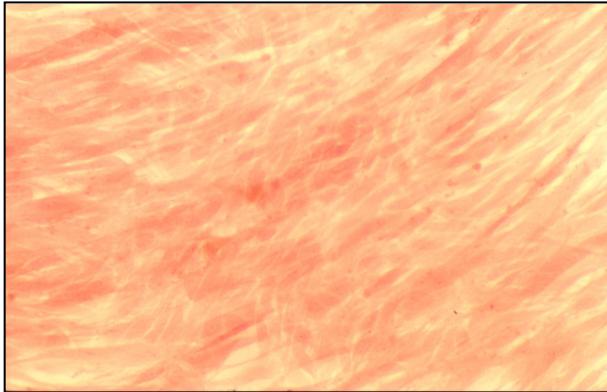
# Metodi tradizionalmente usati per la diagnosi di infezione da virus:

Scarsamente applicabili alla matrice alimento

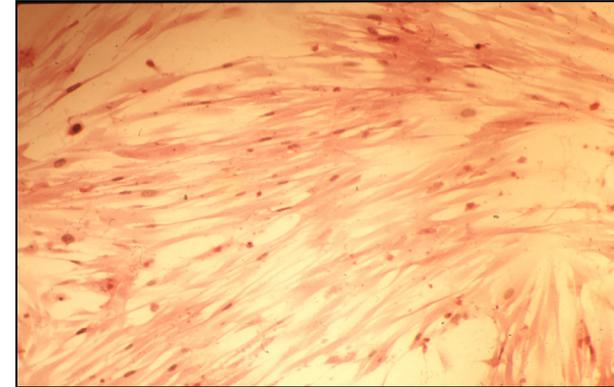
- Isolamento in colture cellulari
- E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
- Microscopia elettronica
- Immunofluorescenza



# ISOLAMENTO IN COLTURE CELLULARI



MRC-5



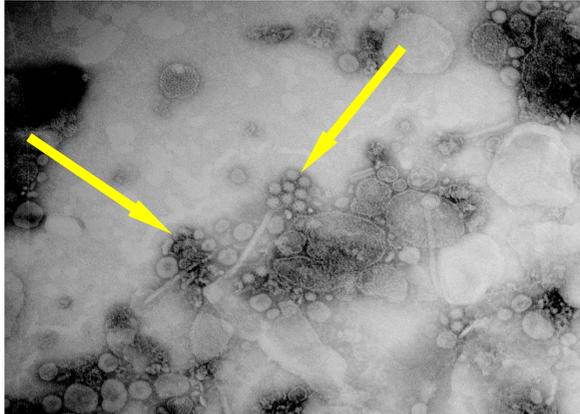
Effetto citopatico

Screening su tutte le linee cellulari sensibili alla crescita del virus (dotate cioè di recettori proteici di superficie in grado di interagire con le proteine del capsid)



**DISPENDIO DI TEMPO**





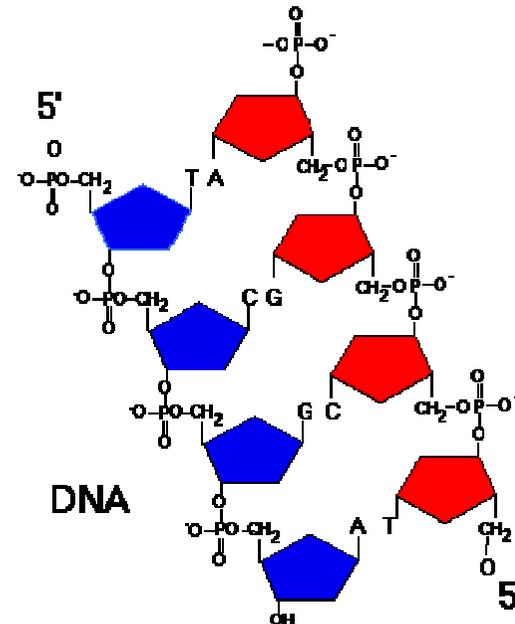
### **CAMPIONI FECALI ANIMALI E UMANI:**

- **MICROSCOPIA ELETTRONICA** poco sensibile:  
 $10^6$  particelle / ml; esperienza dell'operatore
- **TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE**  
( $10^2$  particelle / ml)

### **PER LE MATRICI ALIMENTARI:**

**SONO IDONEE LE TECNICHE DI  
BIOLOGIA MOLECOLARE:**

- **PCR**
- **SEQUENZIAMENTO**
- **GENOTIPIZZAZIONE**





# Metodi non molecolari: limiti e vantaggi

## LIMITI

- Poco sensibili
- Molto dispendiosi in termini di tempo
- Non tutti i virus sono coltivabili (Norovirus)

## VANTAGGI

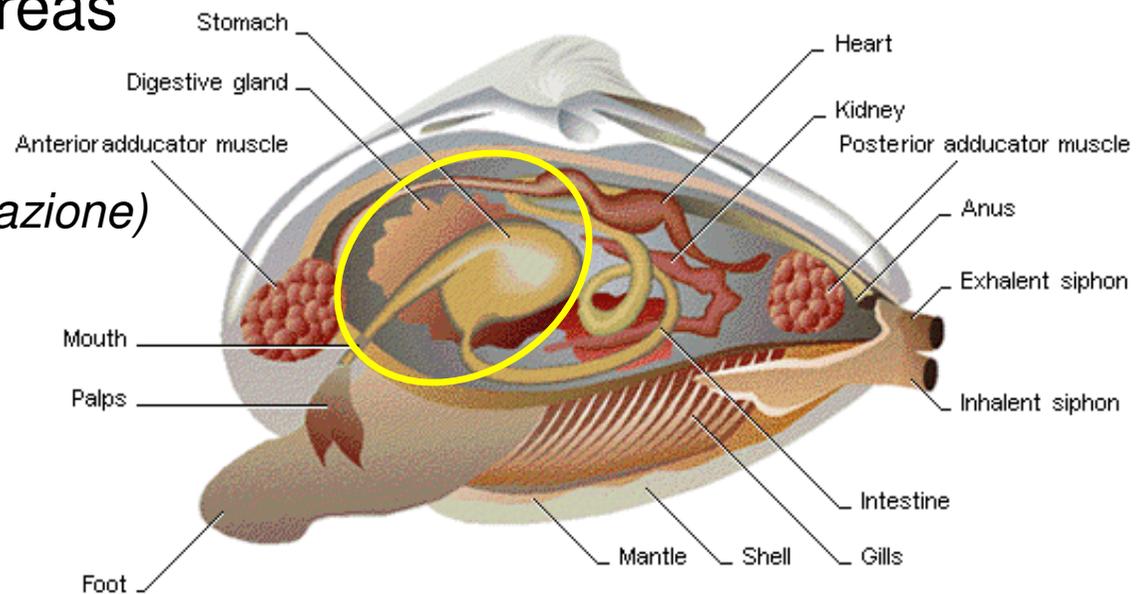
- Distinguono fra particelle virali infettive e non infettive
- Distinguere fra genogruppi (ELISA: tempi molto lunghi)



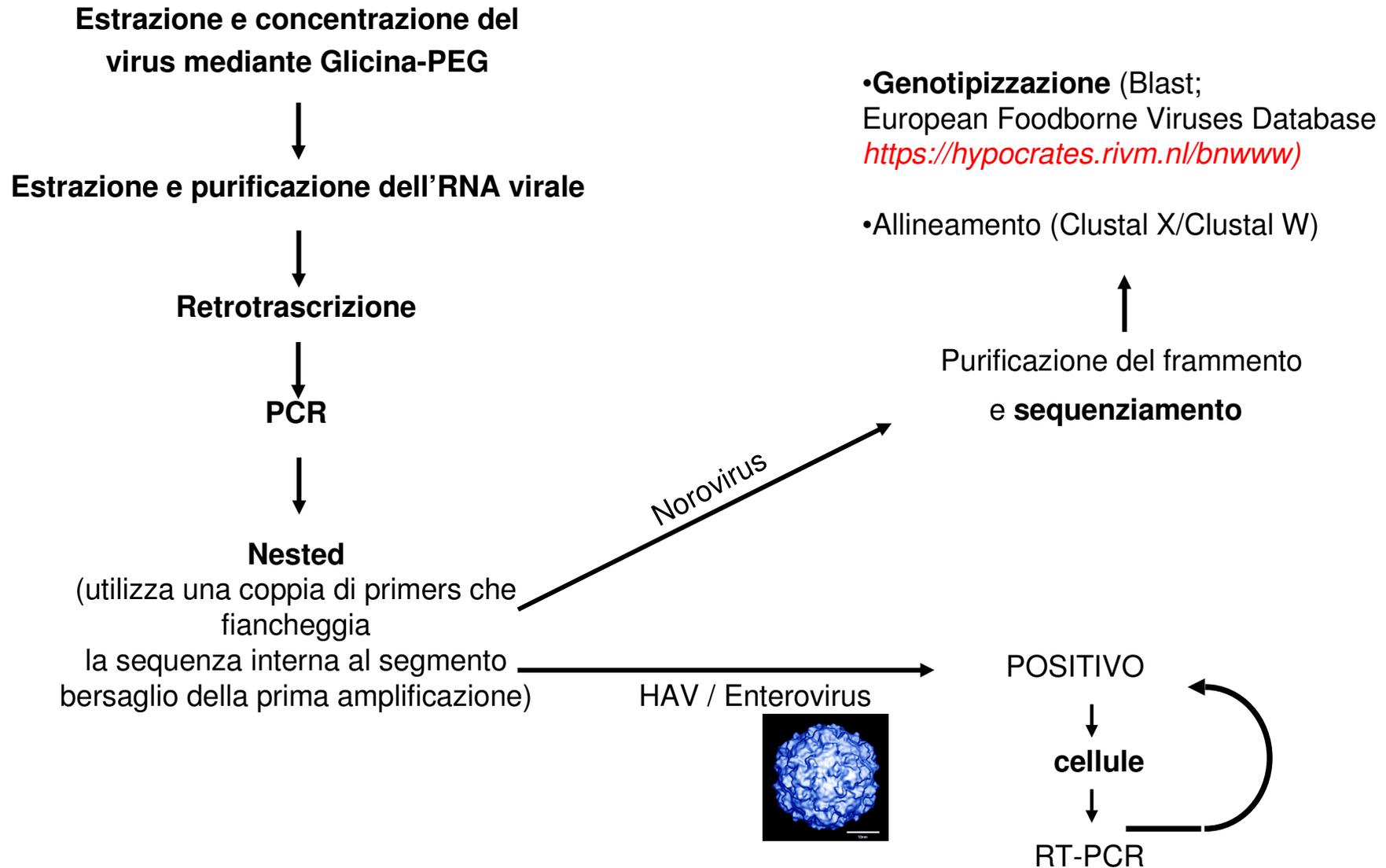
# PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- Il campione non viene lavato
- Detriti o tracce di fango asportate a secco
- Dopo apertura delle valve:
  - Eliminazione liquido intervalavare
  - Prelievo dell'epatopancreas

*(ghiandola nella quale sono concentrati i virus dalla filtrazione)*



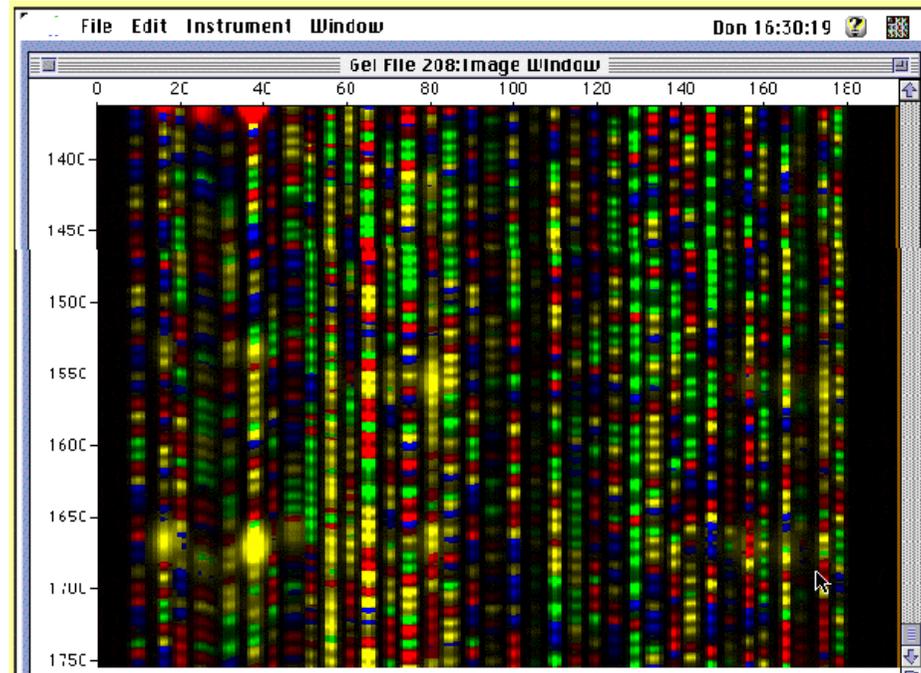
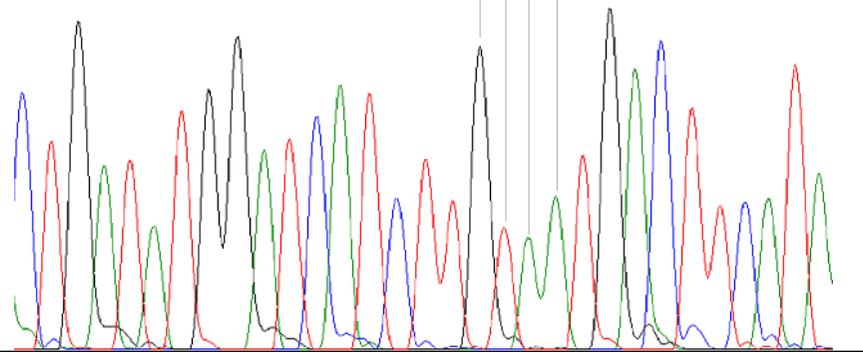
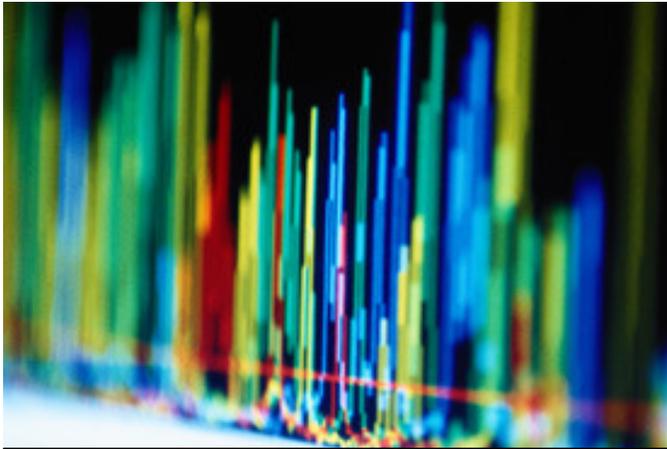
Natura complessa e non omogenea del campione; basso numero di virus presenti





# Output from automated sequencing

3890 3920 3960 4000 4040 4080 4120 4160 4200 4  
C T G A T A T G G A T C A T C T T G T A A T G A C T T C A T A



# GENOTIPIZZAZIONE

Start pages of the Norovirus database - Microsoft Internet Explorer

File Modifica Visualizza Preferiti Strumenti ?

Indietro Cerca Preferiti Multimedia

Indirizzo <https://hypocrates.rivm.nl/bnwww/Divine-Event/index.html>




FBVE Network

Click on the logo above to go to the FBVE website (HPA)

Related site:

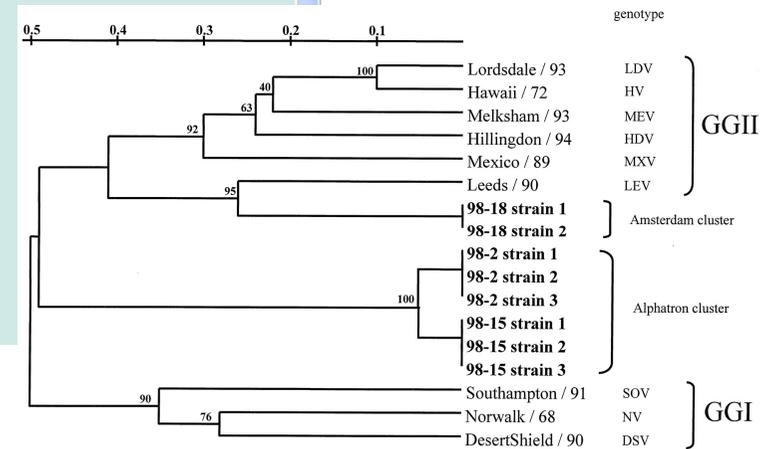
- [Rotavirusdatabase \(Jim Gray\)](#)

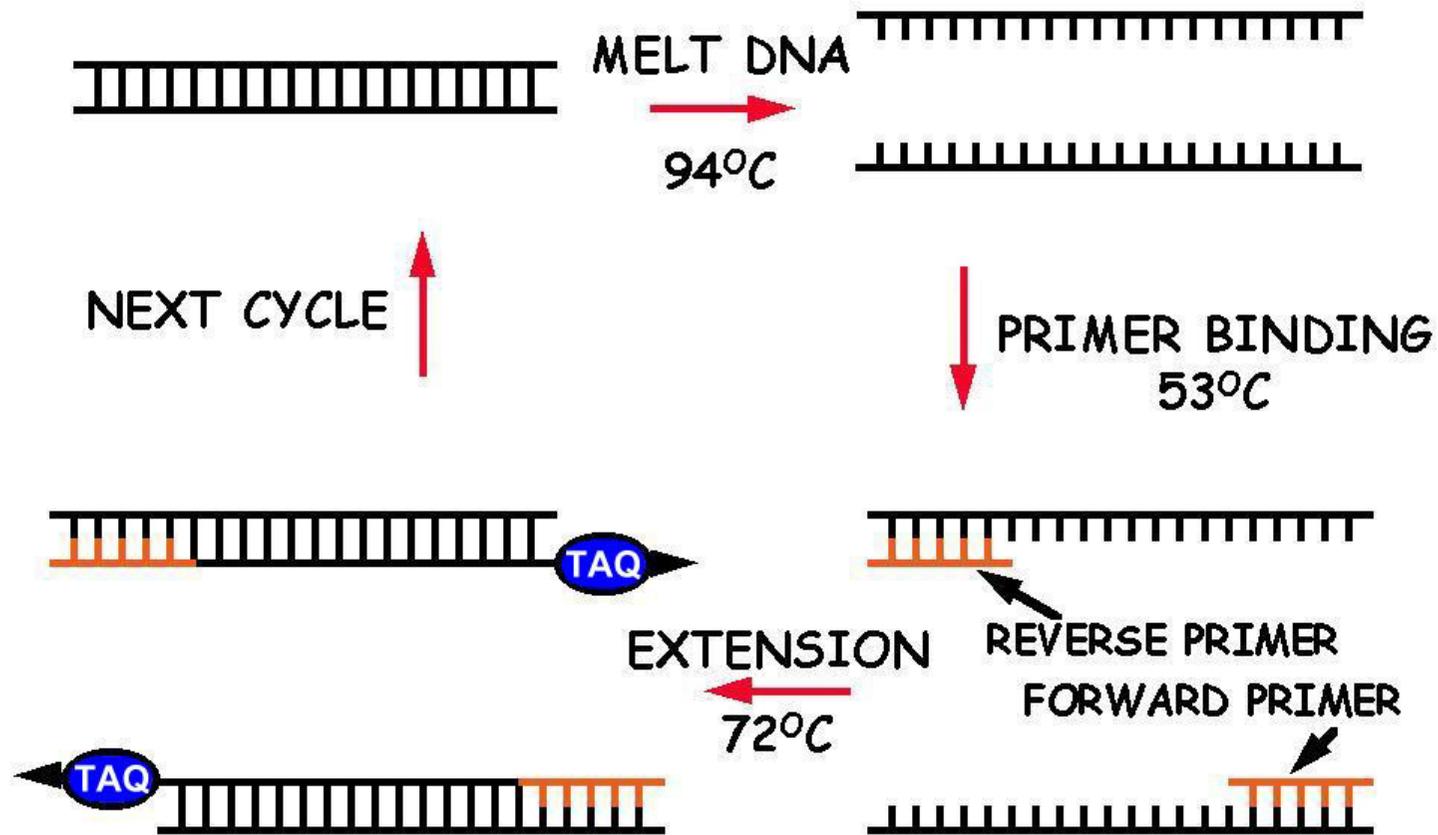
For questions about the content of the databases:

## Divine and Event FBVE Network

### Available sequences databases

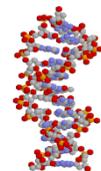
- Norovirus sequences (participants only) (last update: 24-01-2006)
  - [NLV-Capsid](#)
  - [NLV-Long](#)
  - [NLV-Pol3](#)
  - [NLV-Polymerase](#)
- Hepatitis A sequences (participants only) (last update: 30-01-2006)
  - [Complete genome](#)
  - [VP3/VP1](#)
  - [VP1/2A](#)





**PCR:**  
Polymerase  
Chain  
Reaction

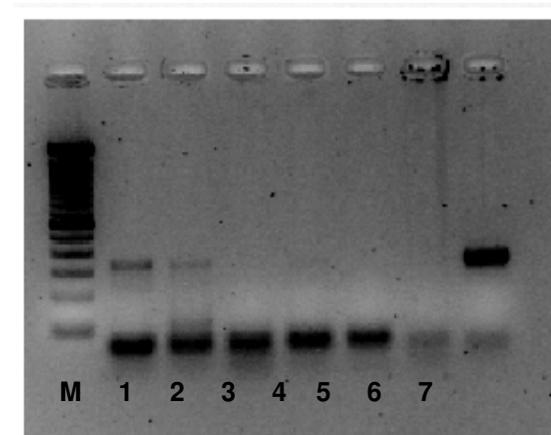
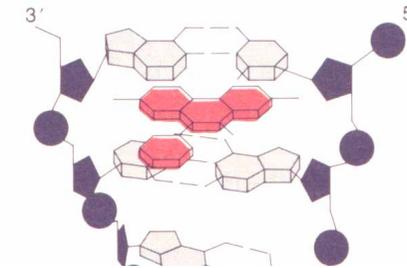
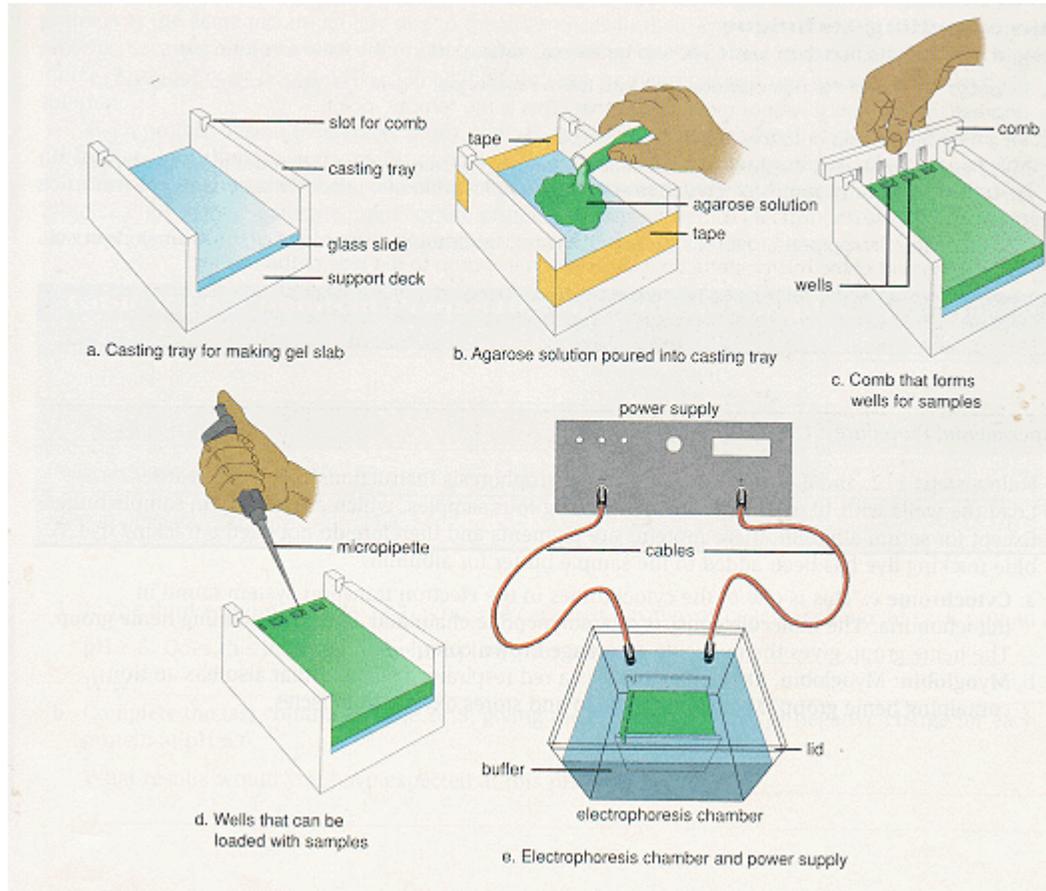
**PCR:  $2^n$  filamenti  $n =$  numero cicli**  
**Dopo 30 cicli:**  
 $2^{30} = 1,07 \times 10^9$   
**> 1 miliardo di molecole identiche**



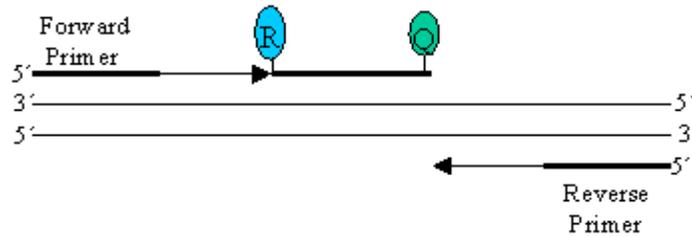


# Visualizzazione dei risultati

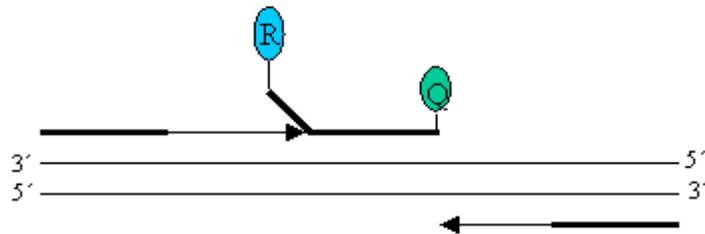
L'etidio bromuro è un intercalante del DNA  
[0,5 µg/ml]



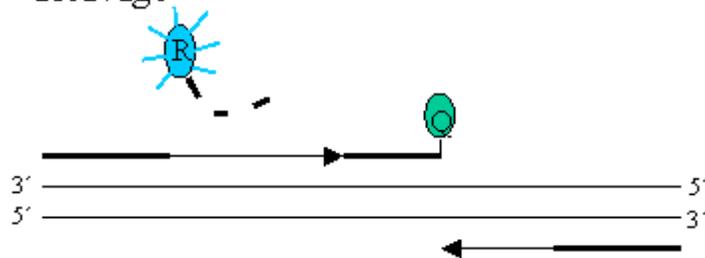
### Polymerization



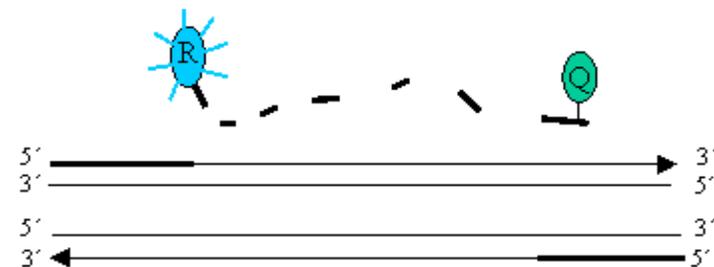
### Strand Displacement



### Cleavage



### Polymerization Completed



## Chimica della Real Time-PCR:

**La Pol trova come ostacolo la sonda TaqMan: R vicino a Q, non c'è emissione**

**La Pol comincia a rimuovere la sonda TaqMan (5' esonucleasi)**

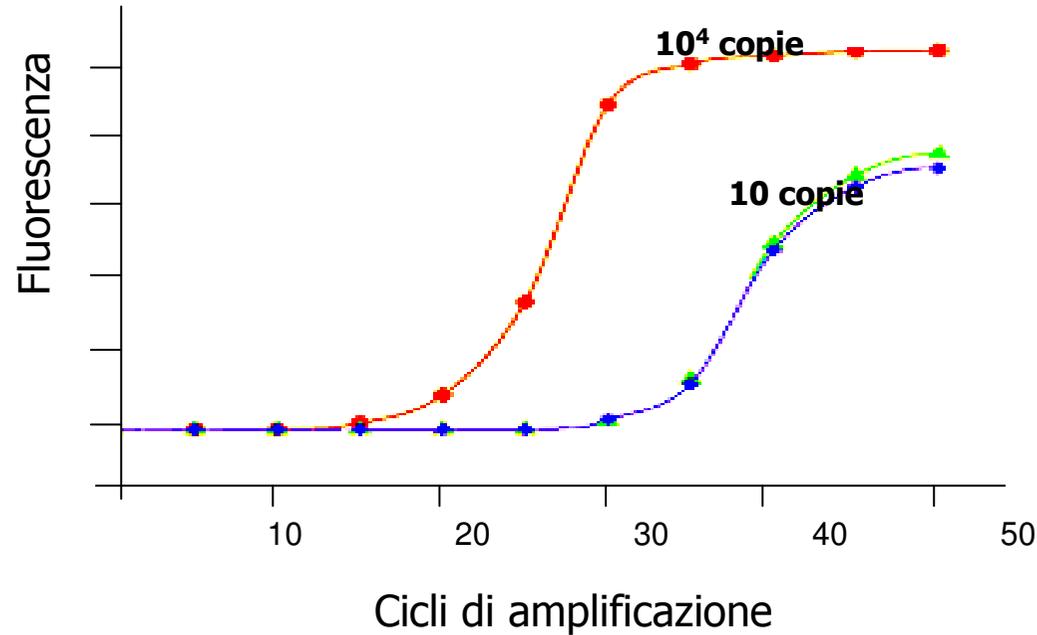
**Rottura della sonda: R si allontana da Q ed emette fluor.**

**La Pol completa la polimerizzazione: il DNA è raddoppiato**

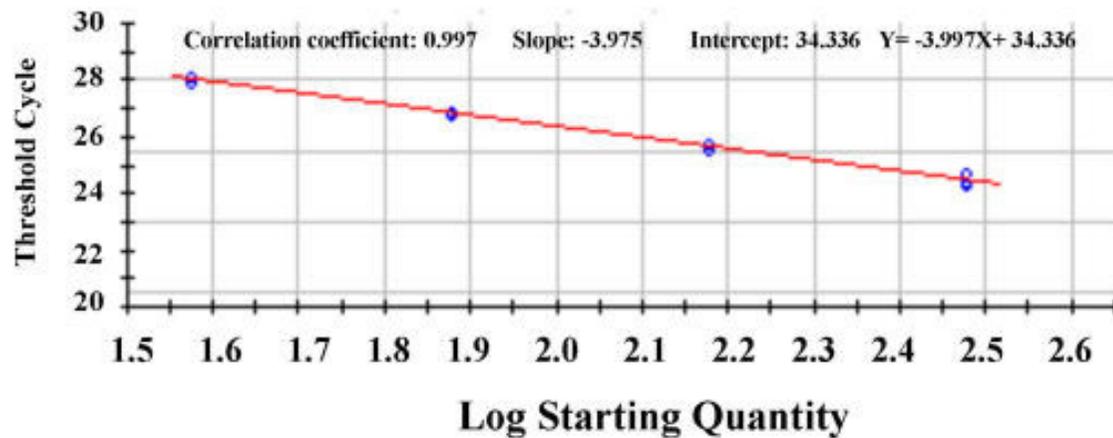


# INTERPRETAZIONE dei RISULTATI

Curva di fluorescenza



L'emissione di fluorescenza  
e' proporzionale alla quantita'  
di DNA

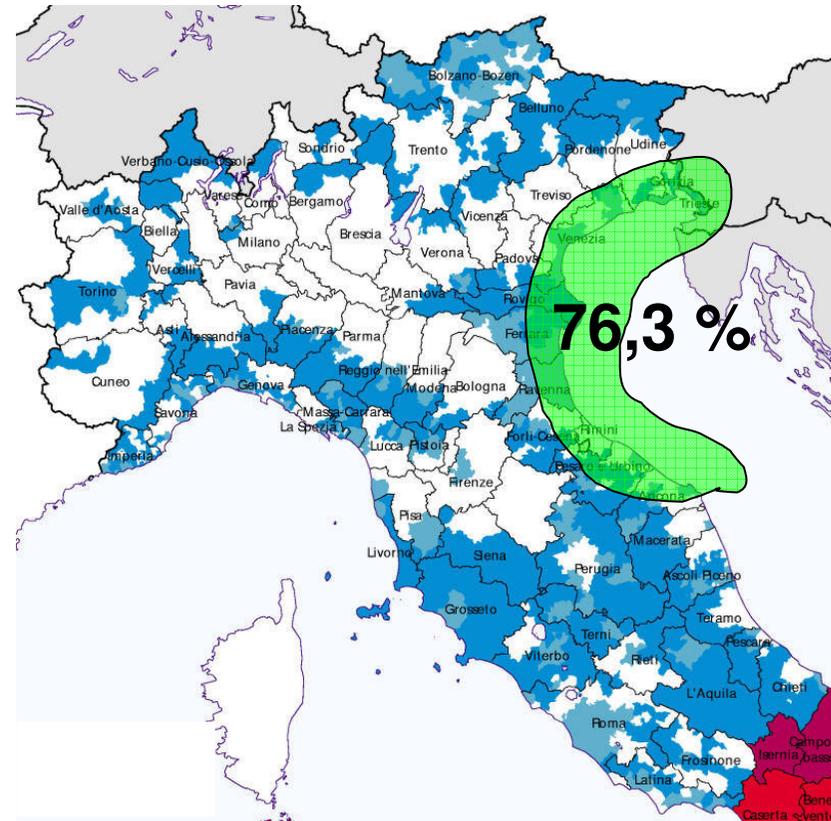
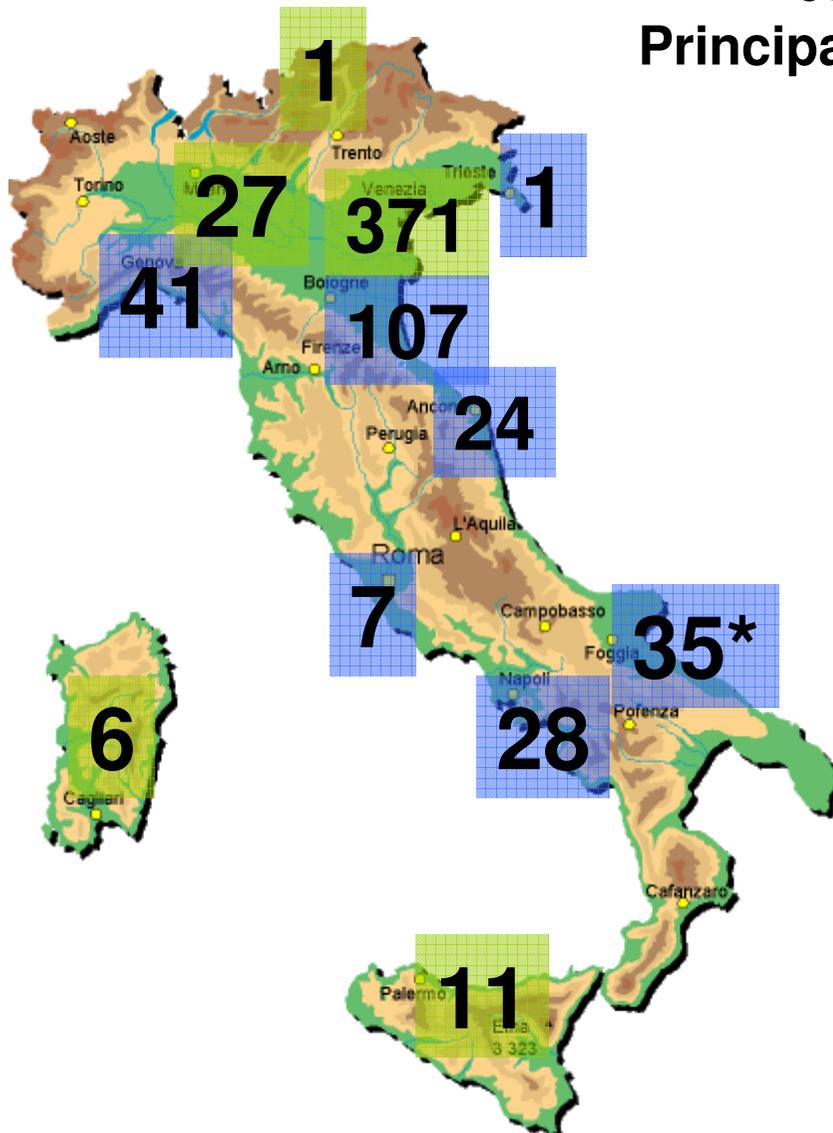


LA REAL TIME-PCR PUO'  
QUANTIFICARE IL DNA E L'RNA



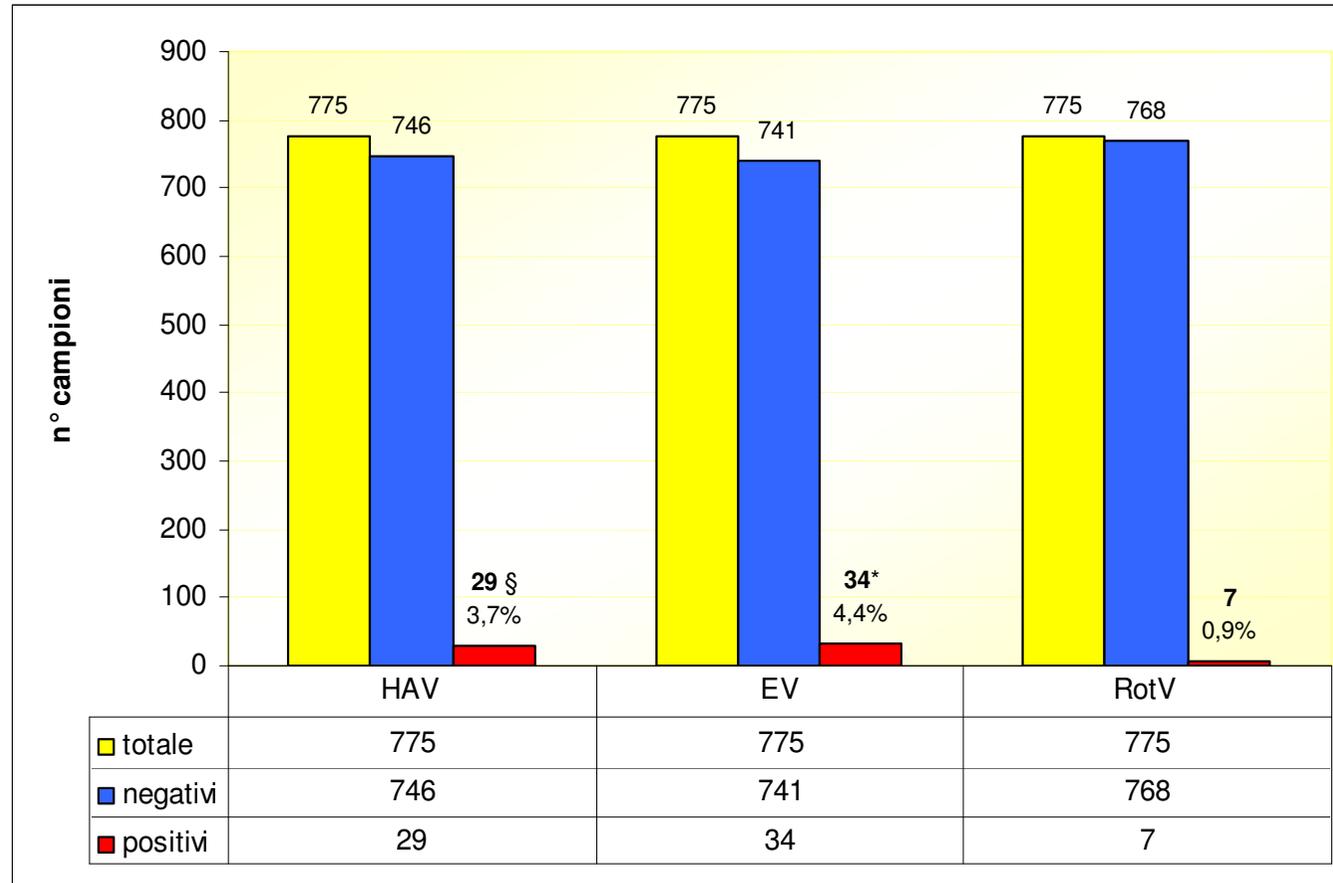


**MITILI DI PROVENIENZA ITALIANA:**  
675 (16 di provenienza ignota)  
Principale area di prelievo: *alto Adriatico*





# Risultati



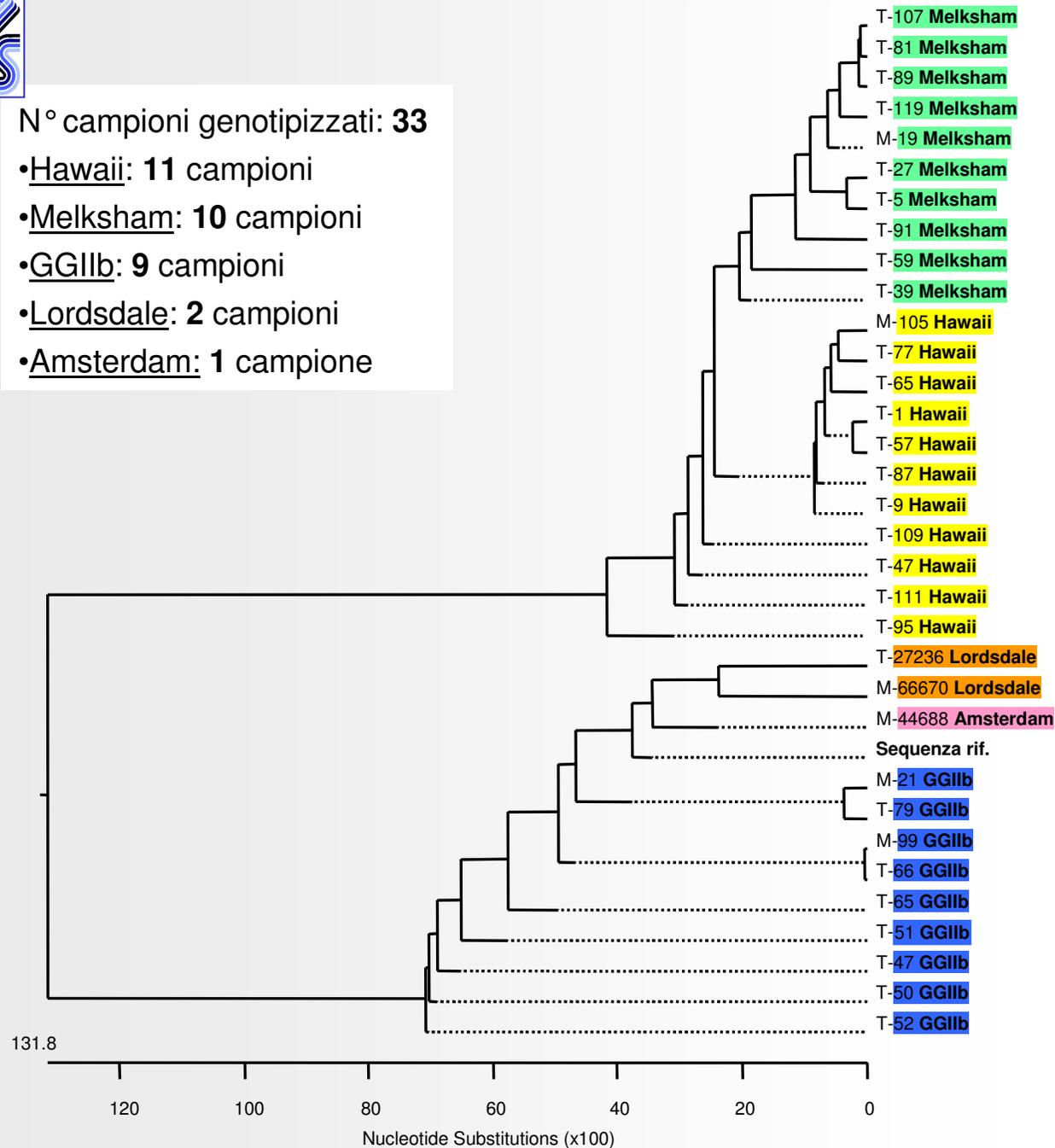
§ HAV: 3 campioni infettanti su Frp3 (*Fetal Rhesus Monkey Kidney*)

\* EV: 5 campioni infettanti su BGM (*Buffalo Green Monkey Kidney*)



N° campioni genotipizzati: **33**

- Hawaii: **11** campioni
- Melksham: **10** campioni
- GGIIb: **9** campioni
- Lordsdale: **2** campioni
- Amsterdam: **1** campione



**Albero filogenetico  
relativo ai campioni  
positivi sequenziati**



# Conclusioni

- Molluschi bivalvi: alimenti ad alto rischio
- Necessità di promozione di campagne informative per il consumatore
- Consumo di molluschi di provenienza sicura e solo dopo cottura
- Introduzione di parametri di legge