



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti**

# I virus : virus dell'Epatite A, virus dell'Epatite E e Norovirus

**Annalaura Carducci**

Dipartimento di Biologia - Università di Pisa



**Hygiene and Environmental Virology Laboratory**

Dept. Biology - University of Pisa  
Via S. Zeno 35/39, 56127 Pisa, Italy  
[acarducci@biologia.unipi.it](mailto:acarducci@biologia.unipi.it)



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**

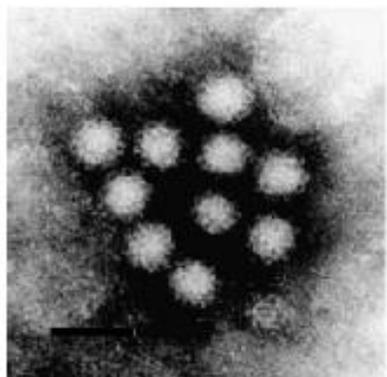


## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

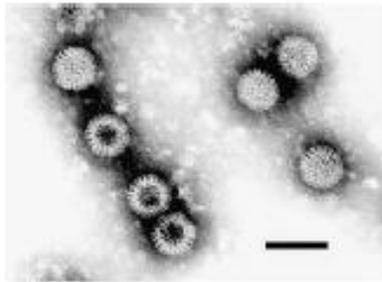
Probabilità di trasmissione attraverso il cibo e l'acqua	Malattia		
	Gastroenteriti	Epatiti	Altro
Frequenti	Norovirus	Virus dell' Epatite A	
Occasionali	Adenovirus enterici (tipi 40-41) Rotavirus (gruppo A-C) Sapovirus Astrovirus Coronavirus Aichivirus	Virus dell' Epatite E (attraverso l' acqua, ma anche carne di maiale poco cotta)	Enterovirus Nipah virus TBE HAI H5N1 (?) SARS CoV (?)



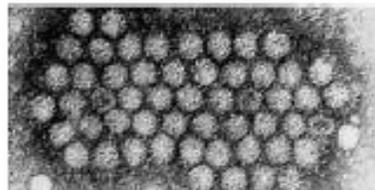
## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti



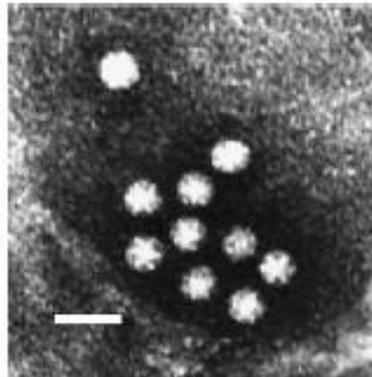
NoV  
30-38 nm  
ssRNA  
no envelope\*



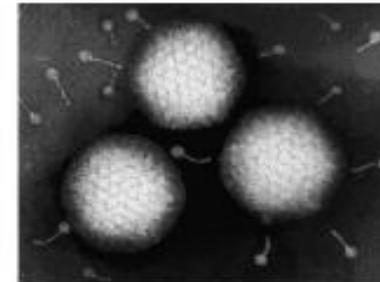
HRV  
90 nm  
dsRNA  
no envelope\*



Picornaviruses  
HAV (picture),  
PV, EV  
22-30 nm  
ssRNA  
no envelope\*\*



Astrovirus  
28-30 nm  
ssRNA  
no envelope\*



Adenovirus  
80-110 nm  
dsDNA  
no envelope\*\*\*



Hepeviridae  
34 nm  
ssRNA  
No envelope



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti**

## **CARATTERISTICHE DEI VIRUS TRASMESSI CON GLI ALIMENTI**

- 1 Hanno una bassa carica infettante (1-100 particelle virali)**
- 2 Sono eliminati in grande numero (fino a  $10^{11}$  particelle/g di feci)**
- 3 Hanno un'alta resistenza ambientale ed ai trattamenti (virus "nudi")**
- 4 Hanno un'alta variabilità genetica (numerosi ceppi e salti di specie)**
- 5 Possono causare infezioni asintomatiche**
- 6 Hanno molteplici vie di trasmissione (alimentare, interumana, respiratoria)**
- 7 Non si replicano nei cibi né li alterano**



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti**



European Food Safety Authority

EFSA Journal 2011;9(7):2190

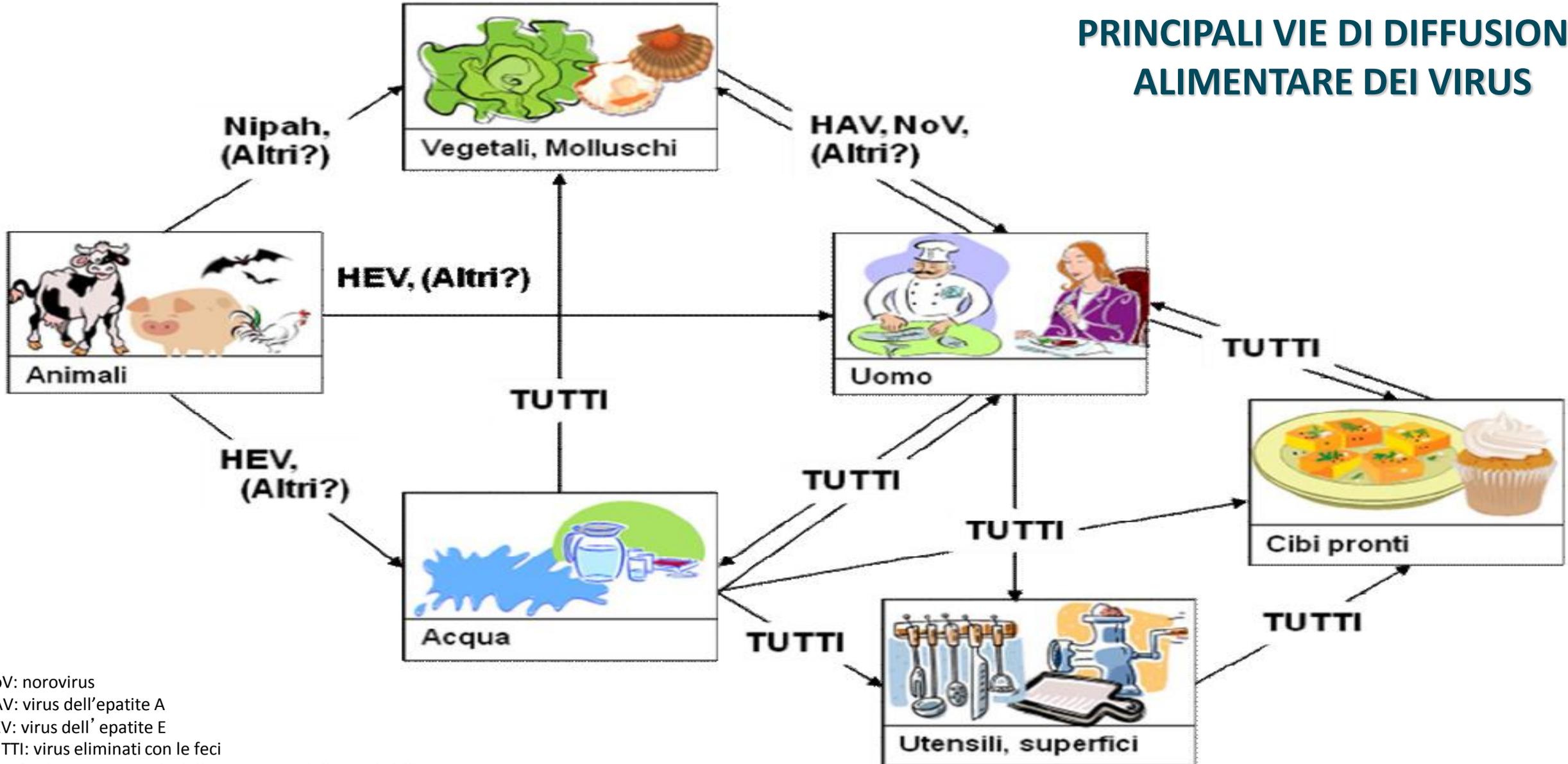
**SCIENTIFIC OPINION**

Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses<sup>1</sup>

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)<sup>2,3</sup>

	<b>FONTI DI CONTAMINAZIONE</b>		
	<b>Produzione primaria di prodotti di origine animale (virus da serbatoi animali)</b>	<b>Produzione primaria di alimenti vegetali e/o molluschi (virus da serbatoi umani)</b>	<b>Manipolazione (virus da serbatoi umani)</b>
<b>Trasmissione e veicoli</b>	Carne, sangue, latte, saliva	Liquami, acque ambientali o di irrigazione	Mani, ambiente
<b>Frequenza di malattia</b>	Rara	Frequente	Frequente
<b>Virus coinvolti (esempi)</b>	SARS-CoV HEV TBE Nipah	NoV HAV HEV	NoV HAV HEV

# PRINCIPALI VIE DI DIFFUSIONE ALIMENTARE DEI VIRUS



NoV: norovirus  
HAV: virus dell'epatite A  
HEV: virus dell'epatite E  
TUTTI: virus eliminati con le feci  
(Altri?): diversi a seconda della sorgente e della via di diffusione.



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**

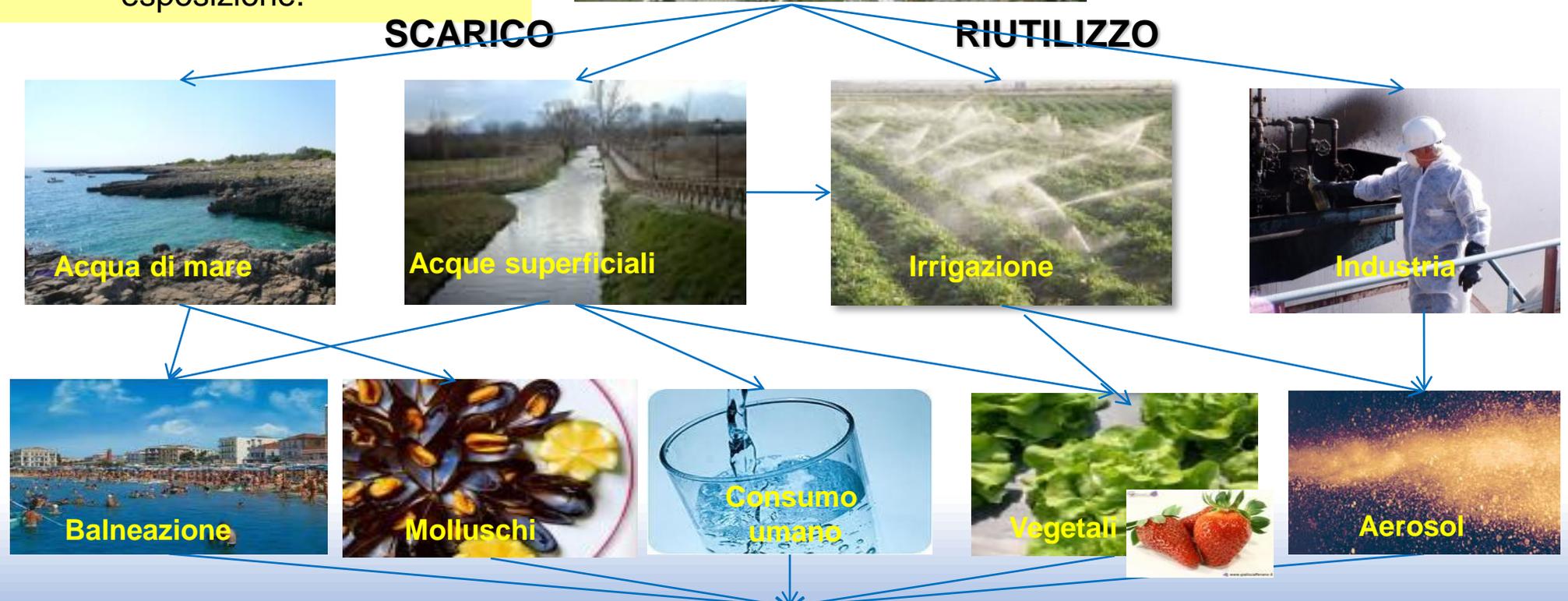


**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nelle comunità**

L' impatto sanitario dei virus enterici nelle acque dipende dai diversi usi delle acque stesse e dalle conseguenti vie di esposizione.



**CIRCOLAZIONE DEI VIRUS ENTERICI ATTRAVERSO LE ACQUE**



- Gastroenteritis
- Respiratory diseases



Pistoia 15-16 Dicembre 2015



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

*Int. J. Environ. Res. Public Health* **2015**, *12*, 8214-8227; doi:10.3390/ijerph120708214

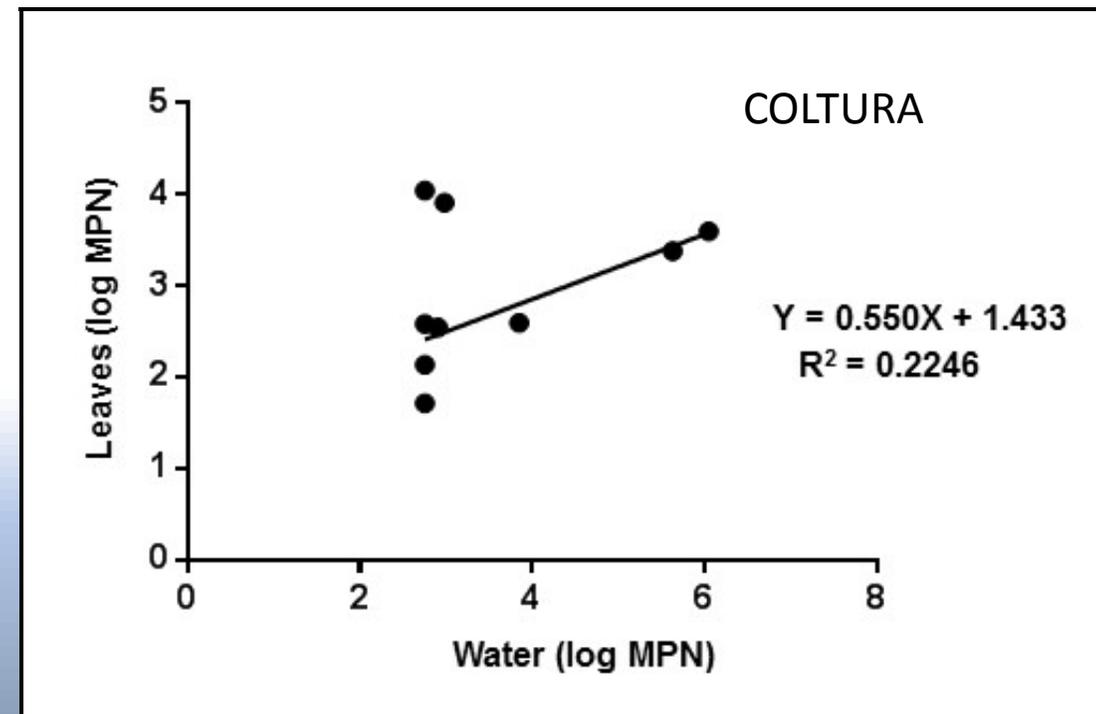
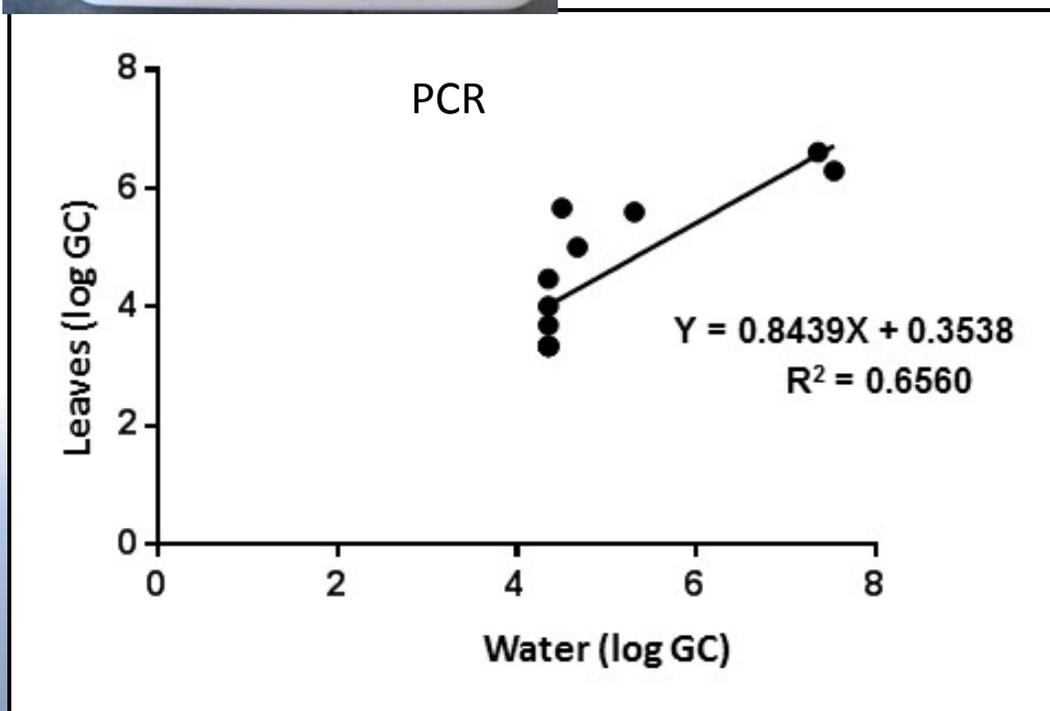
OPEN ACCESS

International Journal of  
Environmental Research and  
Public Health  
ISSN 1660-4601  
www.mdpi.com/journal/ijerph

Communication

# Possible Internalization of an Enterovirus in Hydroponically Grown Lettuce

Annalaura Carducci <sup>1</sup>, Elisa Caponi <sup>1</sup>, Adriana Ciurli <sup>2</sup> and Marco Verani <sup>1,\*</sup>



**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti**

PROCESSO	ALIMENTO	INATTIVAZIONE VIRALE	RISCHIO DI INFEZIONE DEL CONSUMATORE SE I VIRUS SONO PRESENTI PRIMA DEL PROCESSO	PROBABILITÀ DI PRESENZA PRIMA DEL PROCESSO
<i>Trattamento termico</i>				
Bollitura a 100° C	Latte	HAV e PV >4	Trascurabile	Improbabile
60° C, 30 min		HAV < 2 o HAV >4 PV <2 Norovirus completamente inattivato	Medio	
Pastorizzazione di alimenti solidi (70° C per 2 min)	Paté o altre carni cotte	HAV <2 Feline Calicivirus >3	Medio	Improbabile
Pastorizzazione di liquidi solidi (71.7° C per 15 sec)	Latte, gelati	HAV <2	Medio	Improbabile
<i>Altri trattamenti fisici/chemici/biologici</i>				
Liofilizzazione	Latte, Dessert, cioccolata	HAV <1 Feline Calicivirus <1	Alta	Improbabile
Congelamento	Gelati, dessert congelati	HAV <1 Feline Calicivirus <1 PV <1	Alta	Possibile
Acidificazione	Succhi di frutta	Norovirus: a pH 2.7 per 3h HAV: a pH 1 per 5h	Media	Possibile
Depurazione di mitili		Norovirus: incompleta	Alta	Probabile

**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti**

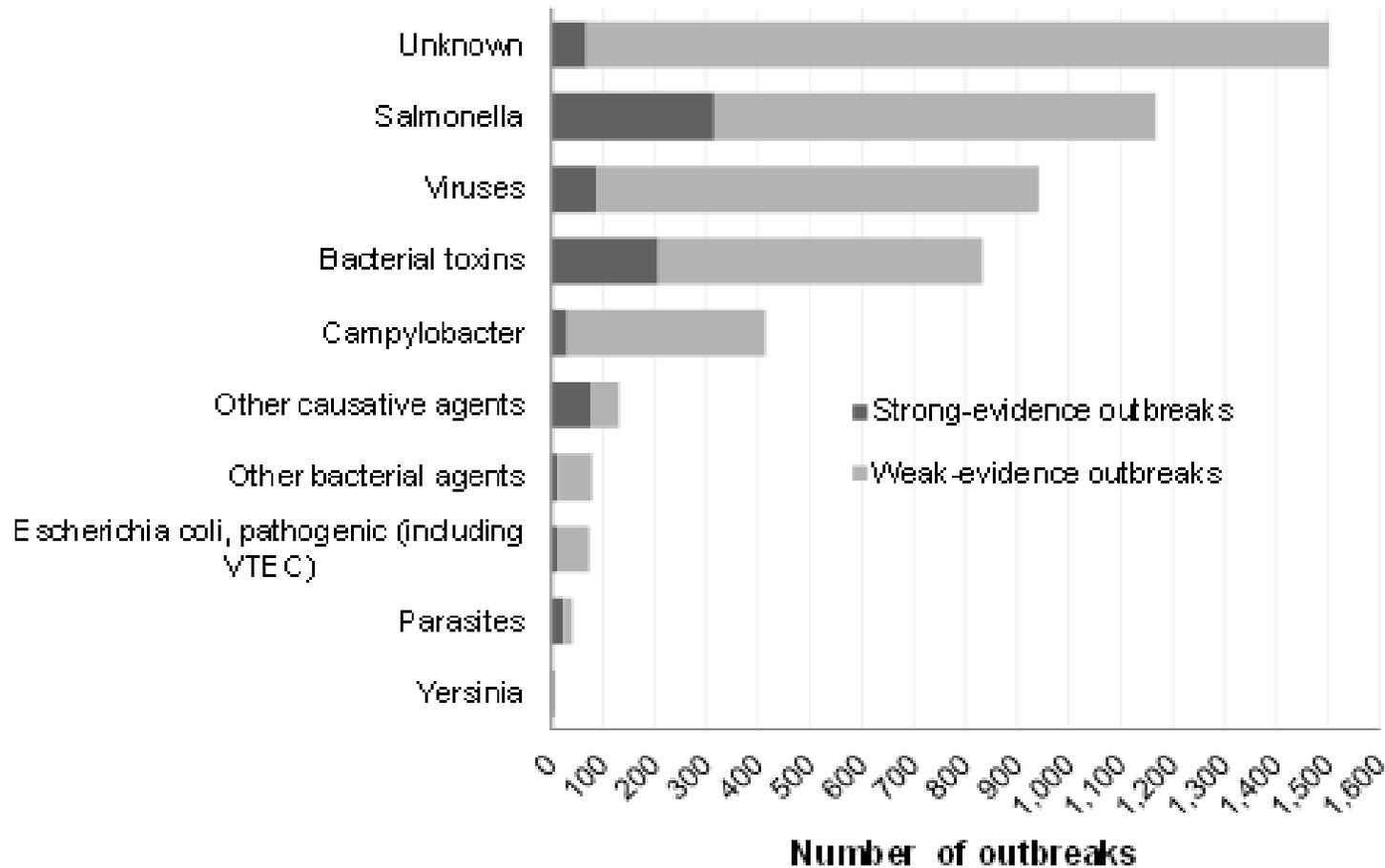
PROCESSO	ALIMENTO	INATTIVAZIONE VIRALE	RISCHIO DI INFEZIONE DEL CONSUMATORE SE I VIRUS SONO PRESENTI PRIMA DEL PROCESSO	PROBABILITÀ DI PRESENZA PRIMA DEL PROCESSO
Trattamento ad alta pressione		PV<1	Alto	
<i>Inattivazione virale in acqua</i>				
Clorazione (0.5 mg di cloro libero/l per 1 min)		HAV>3, HAV<2, HRV<2, PV>3	Variabile	Possibile (acqua potabile) Probabile (acque superficiali)
Radiazioni UV (20 mJ/cm <sup>2</sup> )		PV 3 o meno HRV <3	Bassa	
Ozono (0.2 mg/l per 10 min)		HAV >3, PV 2 o meno, HRV <1	Variabile	
<i>Pulizia delle superfici</i>				
Etanolo (70% per 10 min)		HAV <2, HRV <3	Medio	
Cloroexidina gluconato (0.05% per 10 min)		HAV <1, HRV <1	Alto	
Ipoclorito di sodio (0.125 % per 10 min)		HAV <3, HRV <3	Basso	
Ristorazione Lavaggio	Insalata, frutta	NO	Alta	Possibile



Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2013

DISTRIBUZIONE DELLE EPIDEMIE DI ORIGINE ALIMENTARE PER AGENTE CAUSALE IN EU, 2013



Nel 2013, sono state riportate in Europa nove epidemie idriche con forte evidenza: calicivirus (Norovirus, Norwalk-like virus), *E. coli* verocitotossigena (VTEC O128), *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis* e *Salmonella*. Tre da causa sconosciuta

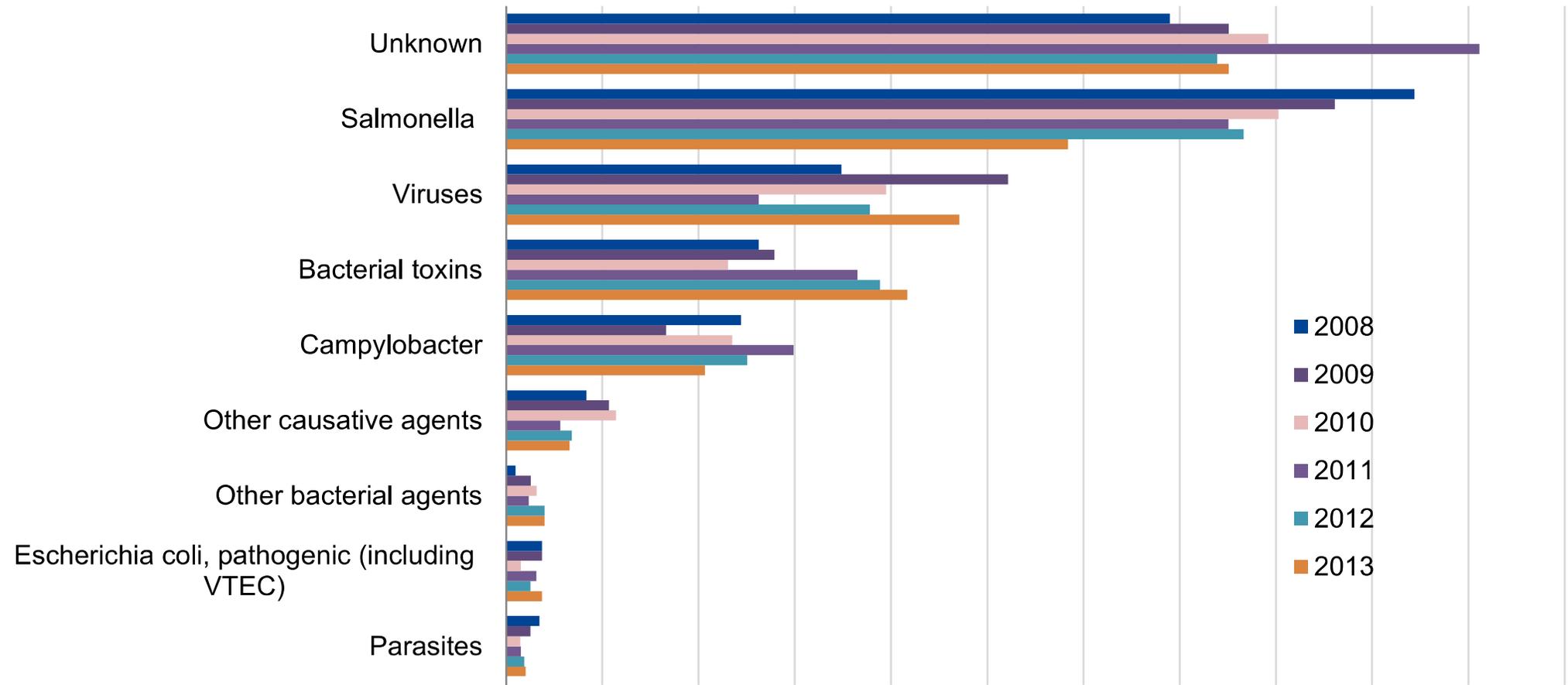


Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti



EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2013

Figure 45. Distribution of all food-borne outbreaks per causative agent in the EU, 2013



Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2013

Table 29. Strong-evidence food-borne outbreaks caused by viruses (excluding strong-evidence water-borne outbreaks) in the EU, 2013

Causative agent	Country	N outbreaks	Cases	Hospitalised	Deaths
Calicivirus - norovirus (Norwalk-like virus)	Austria	6	129	9	0
	Belgium	1	20	5	0
	Denmark	12	340	1	0
	Finland	6	139	2	0
	France	23	249	5	0
	Germany	2	16	0	0
	Hungary	1	124	0	0
	Netherlands	4	14	0	0
	Poland	1	10	3	0
	Portugal	2	96	0	0
	Spain	9	92	6	0
	Sweden	2	130	0	0
	United Kingdom	7	336	1	0
	Norway	1	78	0	0
Flavivirus	Lithuania	2	6	6	0
	Slovakia	1	5	5	0
Hepatitis virus - Hepatitis A virus	Austria	1	6	4	0
	Denmark	1	72	51	0
	Finland	1	15	11	0
	Ireland	2	23	13	0
	Sweden	1	22	0	0
	Norway	1	7	5	0
Rotavirus	Germany	1	5	4	0

Oltre a questi un'epidemia di Epatite A, dal 1° gennaio 2013 ha causato 1.444 casi in 12 Paesi Europei. L'Italia ha riportato il 90% dei casi.

In confronto al 2012 il numero di epidemie idriche con forte evidenza sono diminuite. La più grande di queste si è verificata in Finlandia, con 174 casi, causata da norovirus.



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

Year 2014

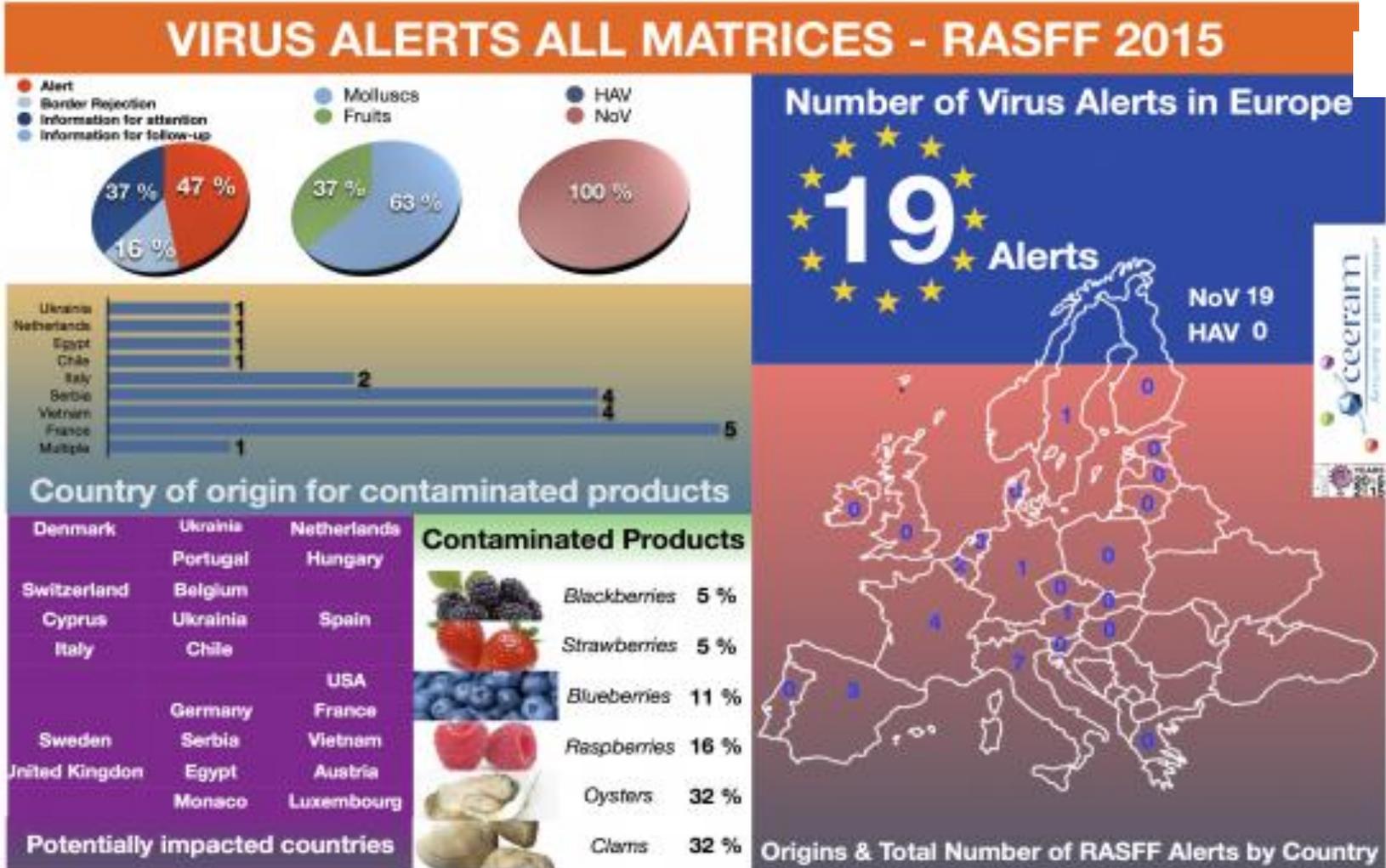
Year 2015

November 2015

**61**  
 15% Fruits  
 85% Molluscs  
 8% Hepatitis A virus  
 92% Norovirus GI/GII

**19**  
 37% Fruits  
 63% Bivalve Molluscs  
 100% Norovirus

**1**  
 100% Fruits  
 100% Norovirus



## RASFF – the Rapid Alert System for Food and Feed.

- official control on the market
- official control in non-member country
- monitoring of media
- border control - consignment under customs
- border control - consignment released
- border control - consignment detained
- food poisoning
- consumer complaint
- company's own check

Source : RASFF  
<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchByKeyword&NewSearch=1&Keywords=norovirus>

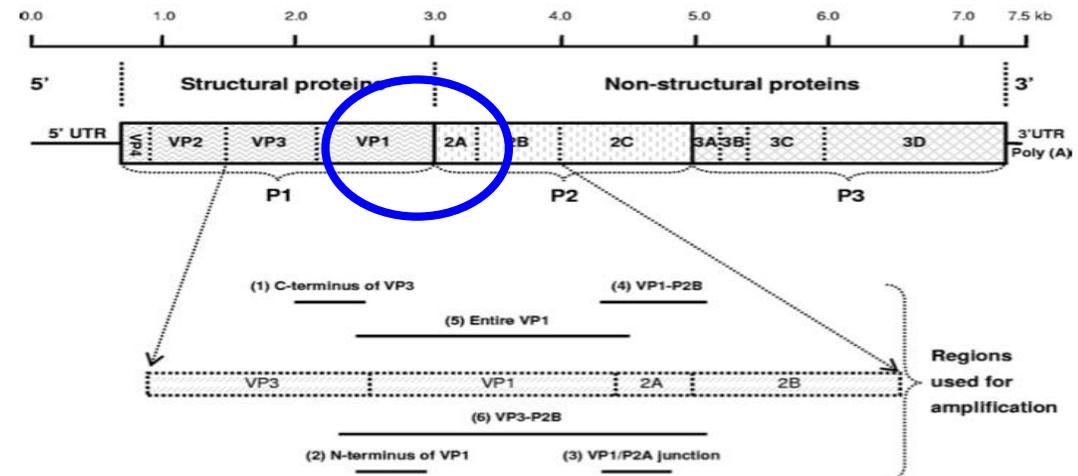
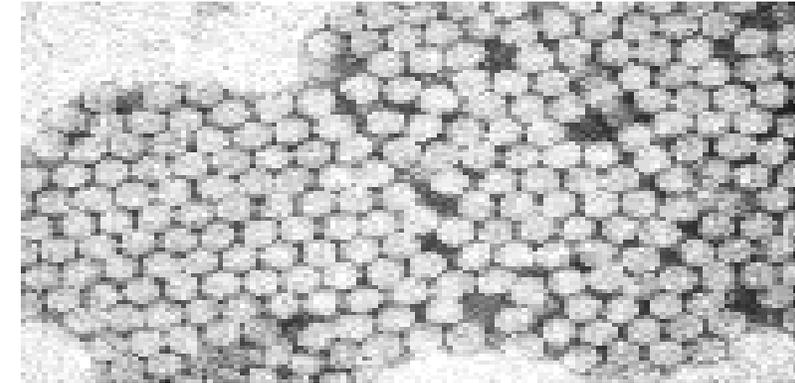
Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

# VIRUS DELL' EPATITE A- HAV

- Famiglia Picornaviridae, genere Hepatovirus
- Unico sierotipo (HAV)
- Epatite infettiva epidemica alimentare
- Trasmissione oro-fecale

## Struttura

- Diametro 28 nm
- Simmetria icosaedrica: 4 proteine capsidiche (VP1-4)
- Assenza di pericapside
- Genoma: RNA lineare a singola elica, polarità positiva, legato alla proteina VPg
- Identificati sette genotipi comparando la congiunzione VP1/2A.
- Alcuni ceppi coltivabili



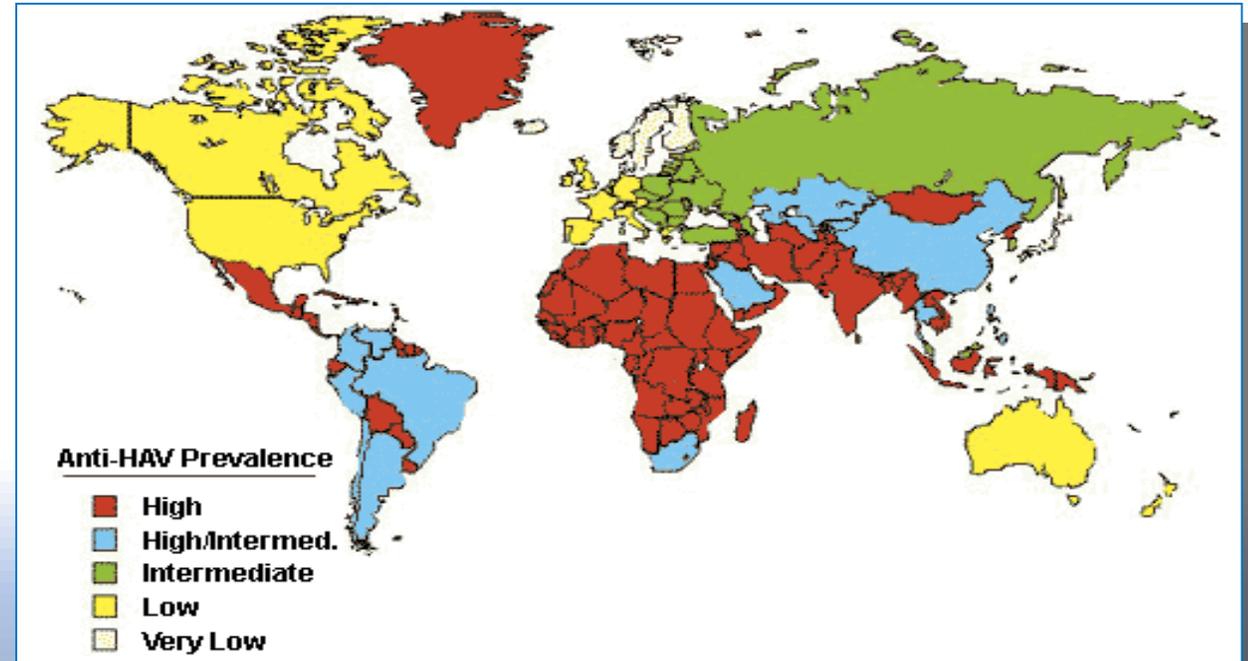
## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

### EPIDEMIOLOGIA

- Rispetto agli altri Picornavirus, HAV è più resistente al calore, all'essiccamento, a bassi valori di pH (pH 1 a 38° C per 90 min), é relativamente resistente alla clorazione dell'acqua (0,3-0,5 ppm di cloro libero). Nel latte HAV rimane infettivo dopo pastorizzazione (62,8° C per 30 min)
- Alimenti maggiormente incriminati sono i molluschi bivalvi, frutti di bosco congelati (contaminazione I), ma anche altri alimenti come succo di arancia, sandwiches, insalate (contaminazione II)

### Fattori di rischio principali:

- Contagio interumano
- Acqua o alimenti contaminati
- Consumo frutti di mare crudi o poco cotti
- Viaggi in aree endemiche



Distribuzione mondiale: 1,5 milioni casi clinici/anno.

(CDC, 2002)



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti**

**The Global Prevalence of Hepatitis A Virus Infection and Susceptibility: A Systematic Review**



Sono in commercio due vaccini inattivati

Figure 9. Estimated child immunity rate. Darker shades indicate a higher exposure rate.

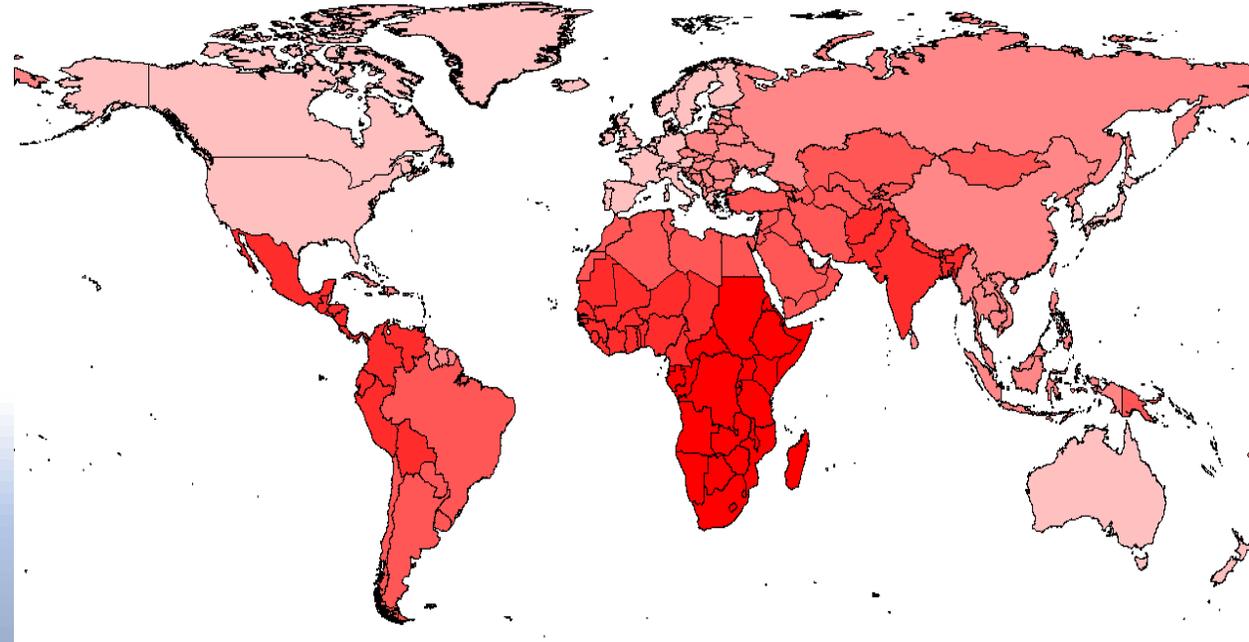
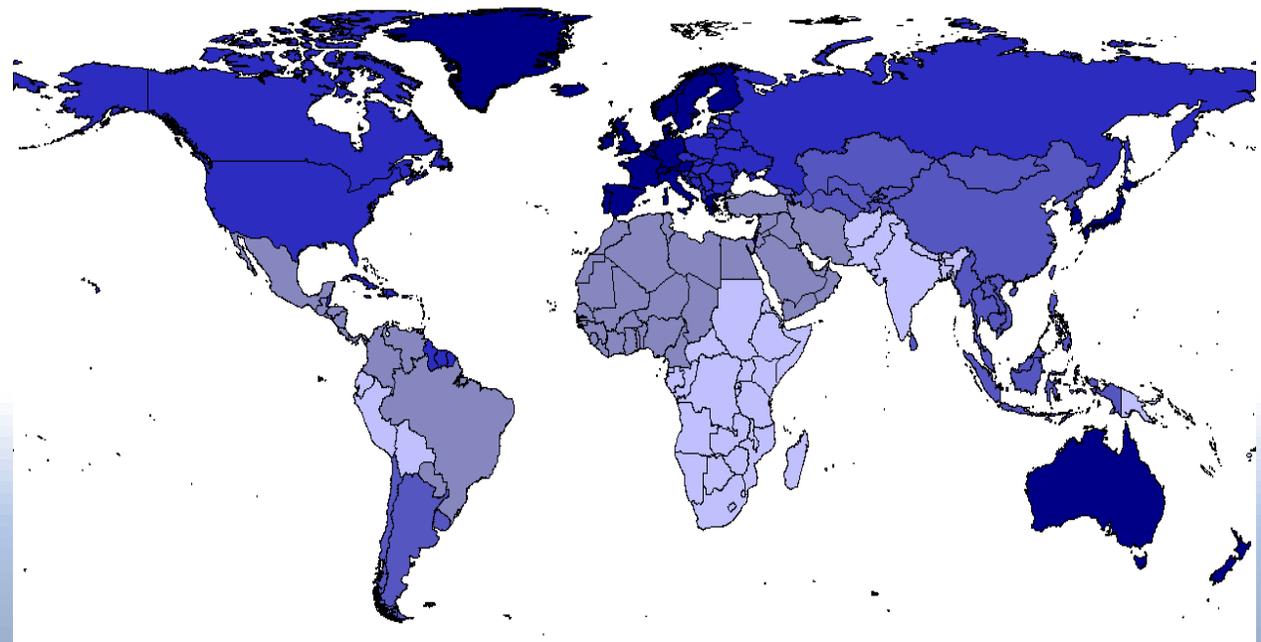


Figure 10. Estimated adult susceptibility rate. Darker shades indicate a greater proportion of at-risk adults.



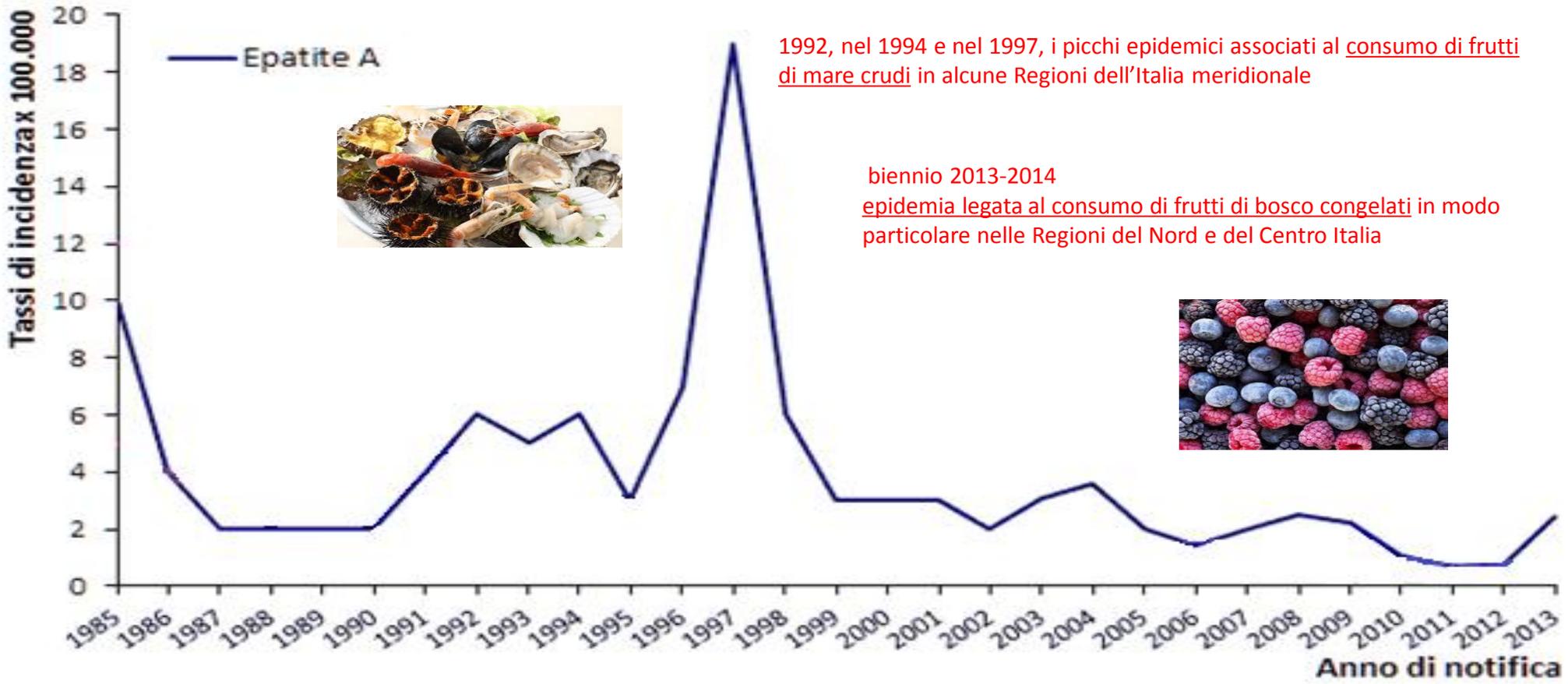


Pistoia 15-16 Dicembre 2015

## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

### Tassi di incidenza per 100.000 abitanti dell'epatite A, per il periodo 1985-2013 in Italia

Dati SEIEVA



1992, nel 1994 e nel 1997, i picchi epidemici associati al consumo di frutti di mare crudi in alcune Regioni dell'Italia meridionale



biennio 2013-2014 epidemia legata al consumo di frutti di bosco congelati in modo particolare nelle Regioni del Nord e del Centro Italia





Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti



Tracing food items in connection to hepatitis A

**Table 2:** Confirmed and probable hepatitis A cases by reporting country and travel history to an outbreak-country during the country's national outbreak period, European multinational HAV infection outbreak 2013–2014, as of 30 June 2014 (information for May and June 2014 may be incomplete)

Reporting country	Cases reported		Confirmed cases		Travel-related cases to an outbreak country <sup>(a), (b)</sup>	
	No	% overall	No	% reported	No	% reported <sup>(c)</sup>
Bulgaria	1	0.1	0	0.0 %	1	100.0
Denmark	1	0.1	1	100.0 %	1	100.0
Finland	11	0.8	5	45.5 %	0	0.0
France	5	0.3	5	100.0 %	0	0.0
Germany	35	2.4	9	25.7 %	25	71.4
Ireland	25	1.7	21	84.0 %	4	16.0
Italy	1 300	90.0	228	17.5 %	0	0.0
The Netherlands	15	1.0	15	100.0 %	1	6.7
Norway	31	2.1	31	100.0 %	0	0.0
Poland	6	0.4	3	50.0 %	6	100.0
Sweden	10	0.7	9	90.0 %	2	20.0
United Kingdom	4	0.3	4	100. %	2	50.0
<b>Total</b>	<b>1 444</b>	<b>100.0</b>	<b>331</b>	<b>22.9 %</b>	<b>42</b>	<b>2.9</b>

(a): For one French and one British case, this information is not available.

(b): As of 30 June 2014, these are Finland from January to June 2014; Ireland from January to October 2013; Italy from January 2013 onwards; Netherlands from August to December 2013; Norway from November 2013 to April 2014.

(c): Not including cases in residents of the same country (e.g. Finnish cases excluded from Finland).





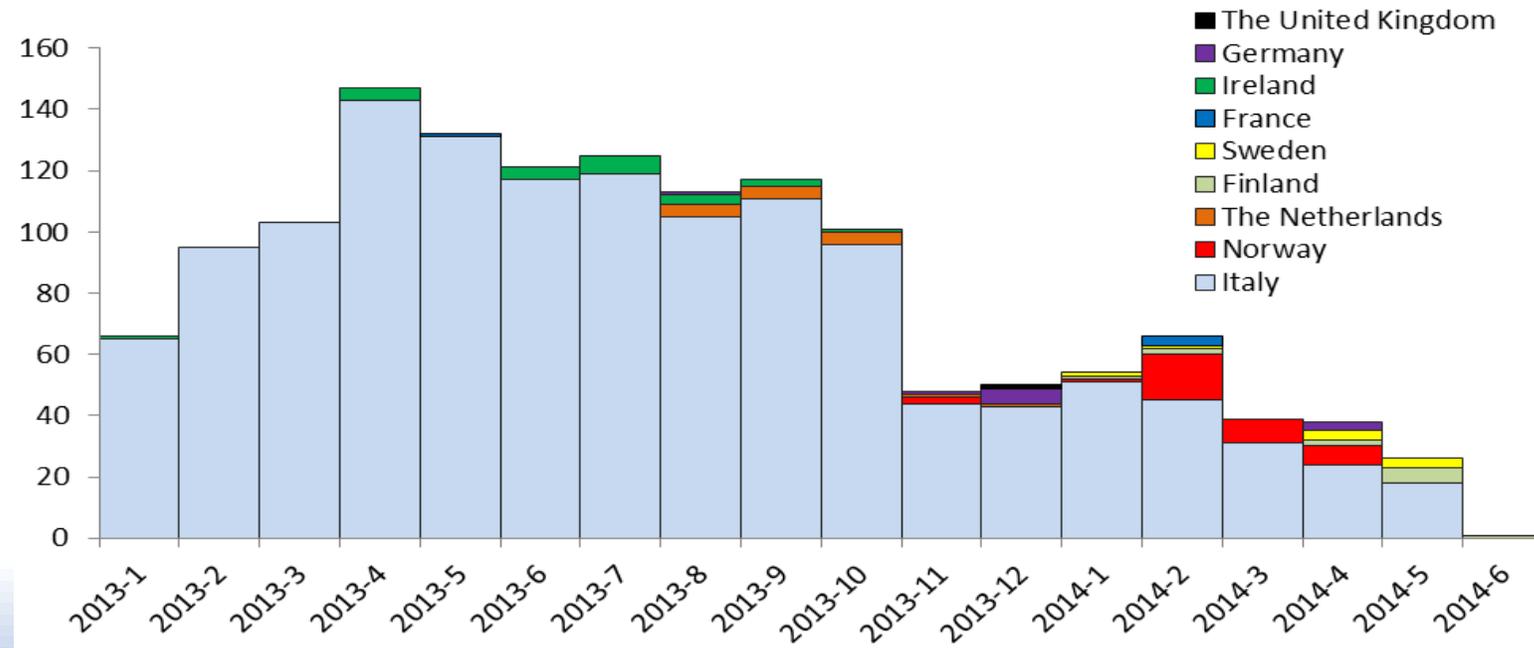
Pistoia 15-16 Dicembre 2015



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti



### Tracing food items in connection to hepatitis A



**Figure 1:** Distribution of total cases of hepatitis A by month of onset and by probable country of infection, European multinational HAV infection outbreak, January 2013 to June 2014, as of 30 June 2014 (n = 1 442; information for May and June 2014 may be incomplete). Information on the month of onset is not available for two cases (one British and one French)



Pistoia 15-16 Dicembre 2015



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

**Table 3:** Consumed foods and other risk factors positively associated with hepatitis A on univariate and multivariate analysis

Consumed foods and other risk factors	Odds Ratio, crude (95 % CI)	Odds ratio, adjusted (95 % CI)	p-value
Vegetables			
Fennel	1.03 (0.66–1.62)		
Fresh salad	1.02 (0.57–1.73)		
Bag salad	0.93 (0.59–1.45)		
Radishes	0.77 (0.44–1.34)		
Carrots	0.70 (0.43–1.12)		
Celery	1.29 (0.80–2.07)		
Raw seafood	4.65 (2.70–8.00)	3.83 (2.16–6.79)	< 0.001
Milk products (non-packaged)	0.62 (0.37–1.02)		
Untreated water	0.77 (0.39–1.50)		
Berries	4.42 (2.70–7.27)	4.22 (2.54–7.02)	< 0.001
Travel	2.34 (1.45–3.77)	1.98 (1.15–3.40)	0.014
Age	1.02 (0.93–1.13)		
Sex	0.83 (0.55–1.26)		

Escludendo la Puglia dallo studio, rimane solo l'associazione con i frutti di bosco

La caratterizzazione molecolare degli isolati era disponibile solo per 331 casi confermati.

Tutti appartenevano al sub genotipo IA ed avevano una sequenza identica (GenBank accession number: KF182323)

I casi/lotti HAV positivi in cinque paesi potevano essere collegati a 7 aziende di congelamento polacche e/o a 5 fornitori di frutti di bosco congelati.



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

Tale epidemia (come quella dovuta a fragole surgelate negli USA negli anni '70) ha dimostrato l'importanza dell'adesione a buone pratiche agricole e di fabbricazione e dell'applicazione di tutte le misure igieniche ad evitare la contaminazione primaria e secondaria nella produzione di vegetali surgelati.

Sebbene tutti i lotti risultati positivi alle analisi siano stati prontamente ritirati e richiamati dal mercato, non si esclude l'eventualità che altri mix di frutti di bosco surgelati/congelati contaminati, diversi da quelli oggetto di allerta possano essere presenti sul mercato.

Il Ministero della salute raccomanda di:

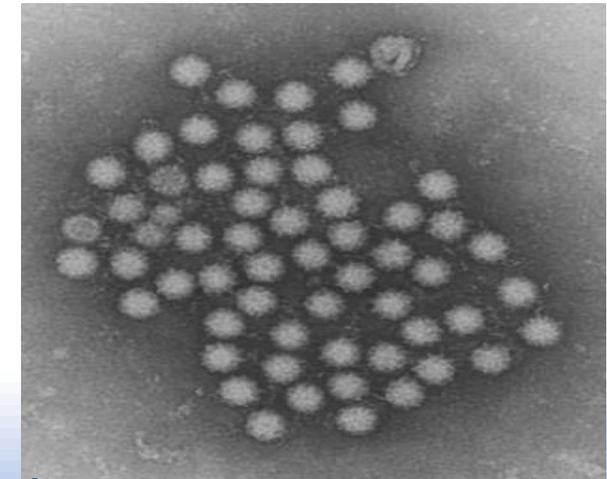
- utilizzare i frutti di bosco surgelati solo per preparazioni portate a 100° (temperatura di ebollizione) per almeno 2 minuti, ad esempio salse o marmellate
- non impiegare i frutti di bosco crudi per guarnire i piatti (ad esempio la superficie di una crostata, semifreddi, yogurt ecc.)
- lavare accuratamente i contenitori e gli utensili usati per maneggiare i frutti di bosco scongelati.



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

# CALICIVIRUS UMANI (HuCV)

- Appartengono alla Famiglia *Caliciviridae*
- 2 generi danno malattie nell'uomo (Norovirus e Sapovirus)
- Virus a RNA singola elica (ss)
- Privi di involucro
- Dimensione: 27-35 nm
- Possiedono una sola proteina nel capsid
- L'analisi genomica li divide in 4 gruppi: Norovirus, Sapovirus, Vesivirus e Lagovirus





Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

genus

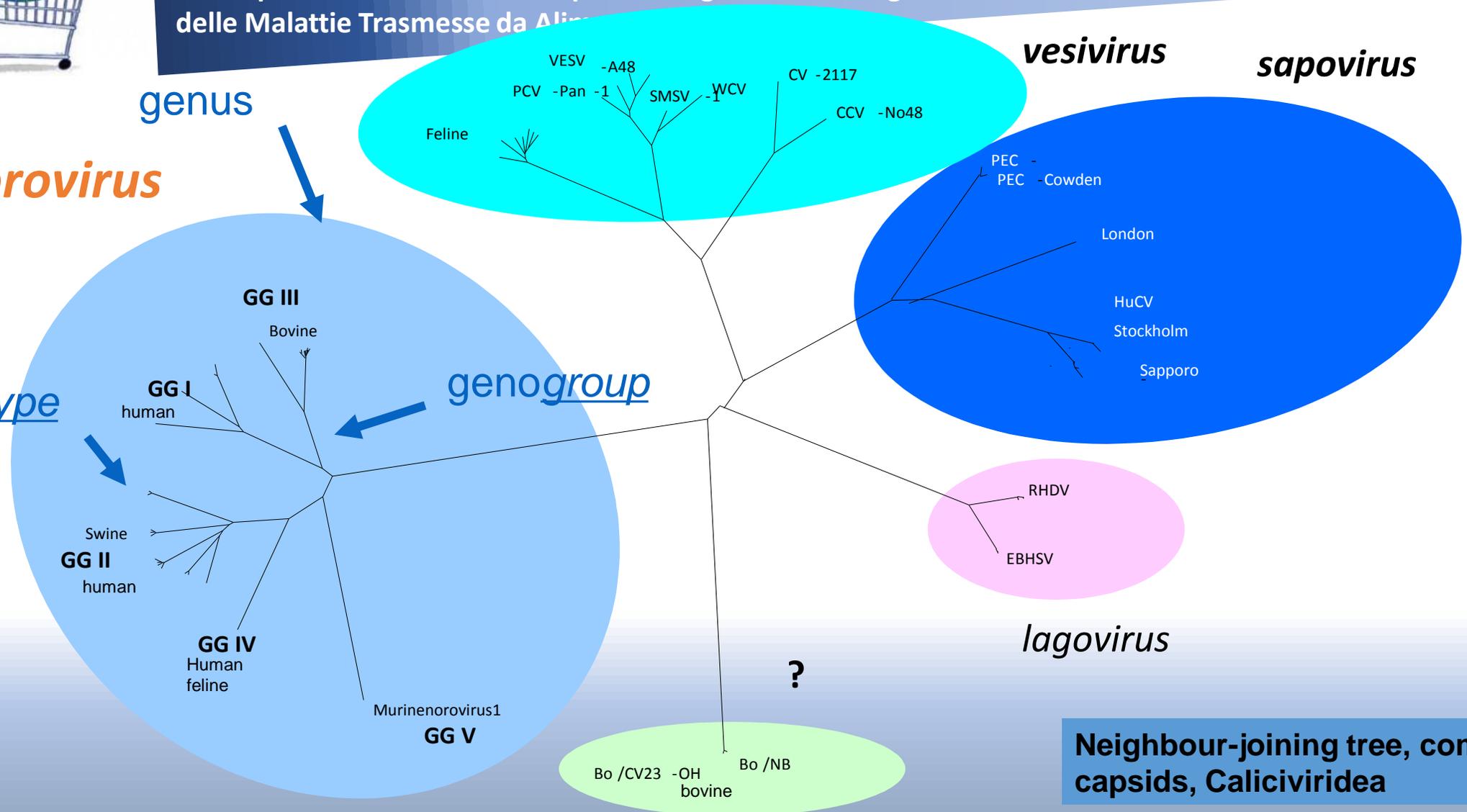
*norovirus*

*vesivirus*

*sapovirus*

genotype

genogroup

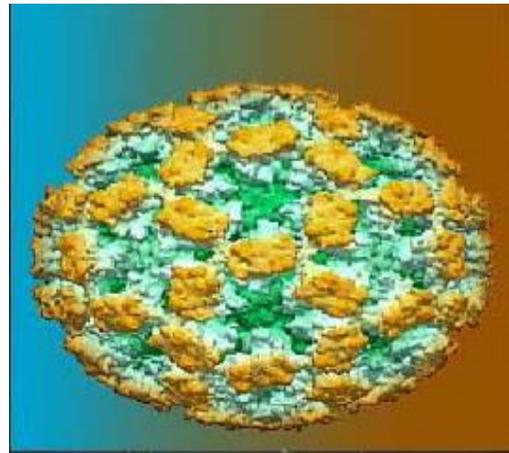


Neighbour-joining tree, complete capsids, Caliciviridea

**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza  
delle Malattie Trasmesse da Alimenti**

# **NOROVIRUS**

- **Famiglia Caliciviridae, genere Norovirus**
- **Virus a RNA a singolo filamento**
- **Alta resistenza alla temperatura**
- **Virus che sopravvive ad alti livelli di cloro (generalmente una concentrazione di 10 ppm o 10 mg/L per più di 30 minuti è adeguata per la disinfezione)**
- **Non cresce in coltura cellulare**



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti**

# CARATTERISTICHE CLINICHE

## PERIODO DI INCUBAZIONE

24 – 48 ore con un range di 10 – 50 ore

## SEGNI E SINTOMI

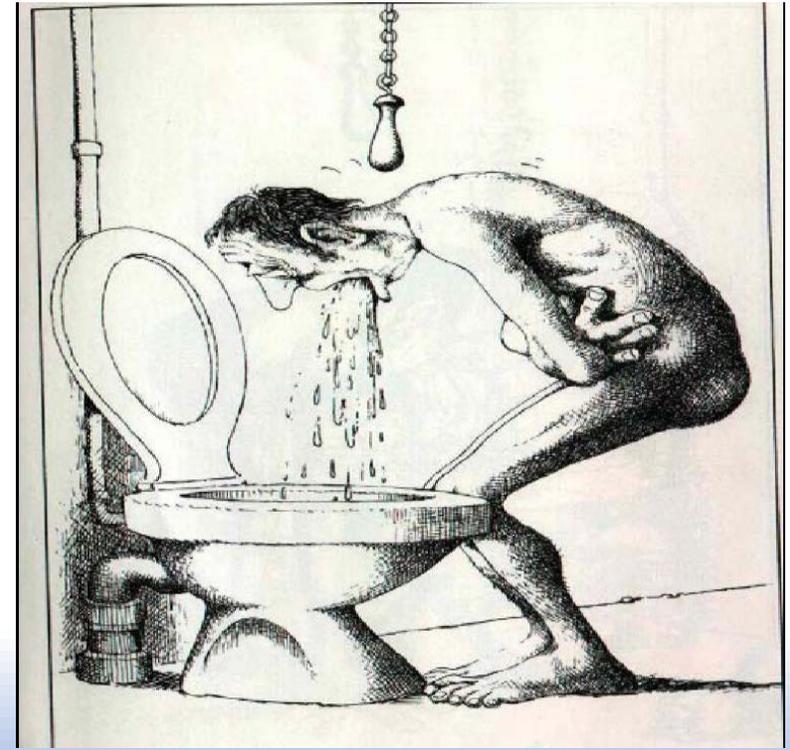
- Casi asintomatici
- Diarrea acquosa acuta
- Vomito (specialmente in bambini)
- Crampi addominali
- Nausea
- Febbre di bassa intensità

## DURATA

Generalmente breve: < 3 giorni

## CARATTERISTICHE

- 30% di infettati non presenta sintomi
- Virus molto contagioso: 10 –100 particelle virali sono sufficienti per dare infezione



Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

## EPIDEMIOLOGIA

- Distribuzione mondiale
- Stagione invernale
- Adulti e Bambini
- Diffusione:

interumana  
contaminazione fecale di cibo o acqua

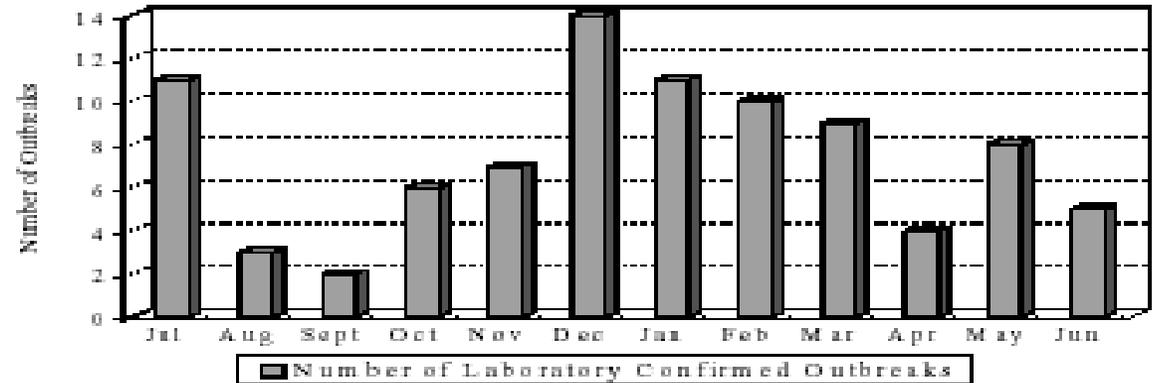
- La maggior parte delle persone ha avuto l'infezione dall'età di 4 anni (in base a studi sulla sieroprevalenza)

## DIAGNOSI

- Campioni di feci o cibi sospetti
- Immune EM
- RT-PCR
- Sierologia per scopi epidemiologici

### Winter vomiting disease

Seasonal Distribution of Norovirus Wisconsin, 1997 - 2003



Norovirus (USA; Reisdorf, 2004)

Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

Stima delle dimensioni delle infezioni da norovirus nella popolazione ed evidenza dei casi a vari livelli del sistema di diagnosi, cura e sorveglianza.

(tradotto da Verhoef L. et al., 2008)



**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti**

## **Caratteristiche dei NOROVIRUS che facilitano le epidemie**

<b>Caratteristiche</b>	<b>Osservazioni</b>	<b>Conseguenze</b>
<b>Bassa dose infettante</b>	<10 <sup>2</sup> particelle virali	Trasmissione persona-persona attraverso goccioline, trasmissione secondaria o attraverso le mani
<b>Diffusione asintomatica prolungata</b>	≤2 settimane	Aumenta il rischio per la trasmissione secondaria o ci sono problemi per il controllo della diffusione tramite le mani
<b>Resistenza ambientale</b>	Sopravvivono al cloro ≤10 ppm, congelamento e riscaldamento a 60° C	Difficoltà di eliminare il virus dall' acqua contaminata: sopravvive nel ghiaccio ed ostriche cotte al vapore
<b>Grande variabilità dei ceppi</b>	Molteplicità genetica e di tipi antigenici	Richiede diagnosi composte; l' infezione si ripete per la molteplicità dei tipi antigenici; facile sottostimare la prevalenza
<b>Mancanza di immunità permanente</b>	Possono avvenire reinfezioni	L' infezione contratta da bambini non protegge nell' età adulta; difficile sviluppare vaccini che proteggano tutta la vita

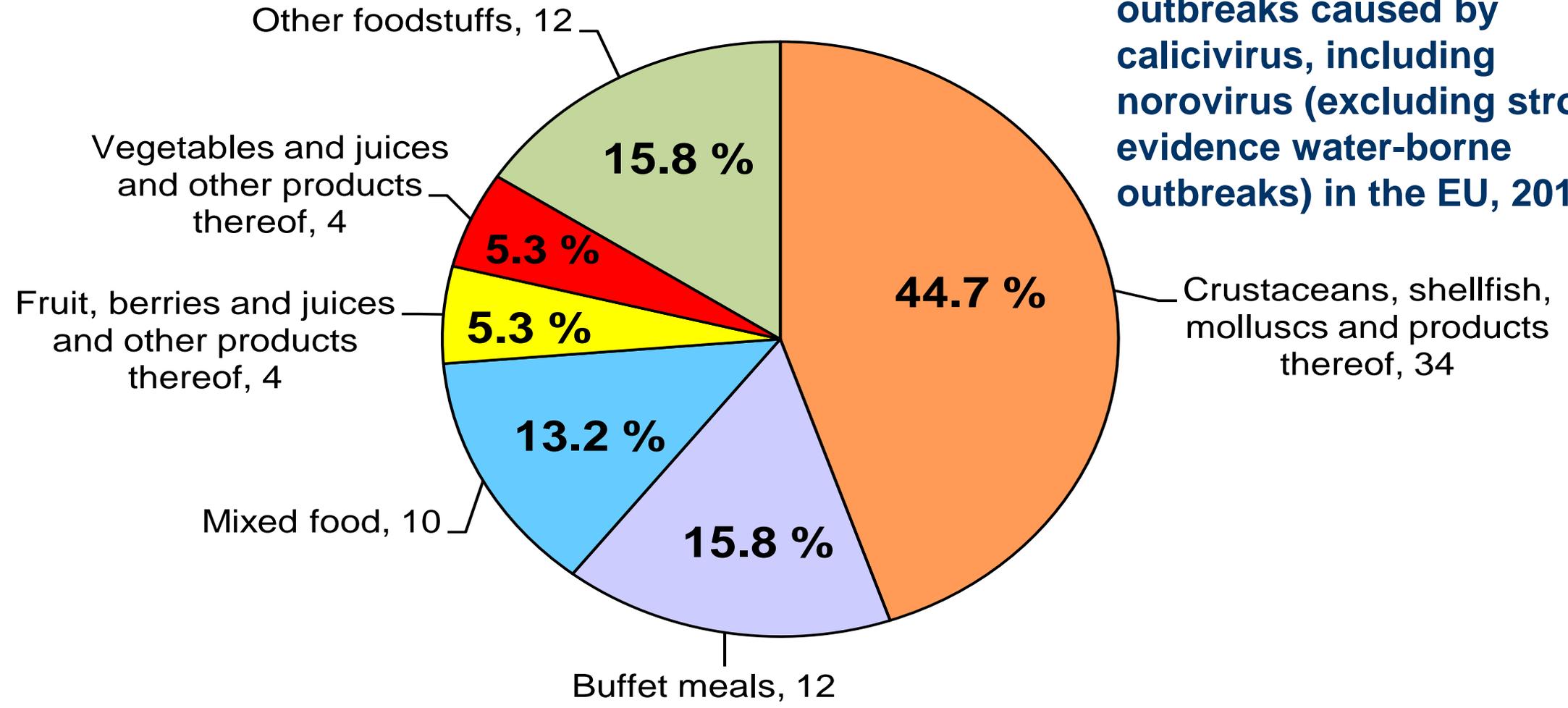


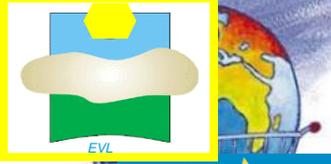
**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti**

**Distribution of food vehicles in strong-evidence outbreaks caused by calicivirus, including norovirus (excluding strong-evidence water-borne outbreaks) in the EU, 2013**



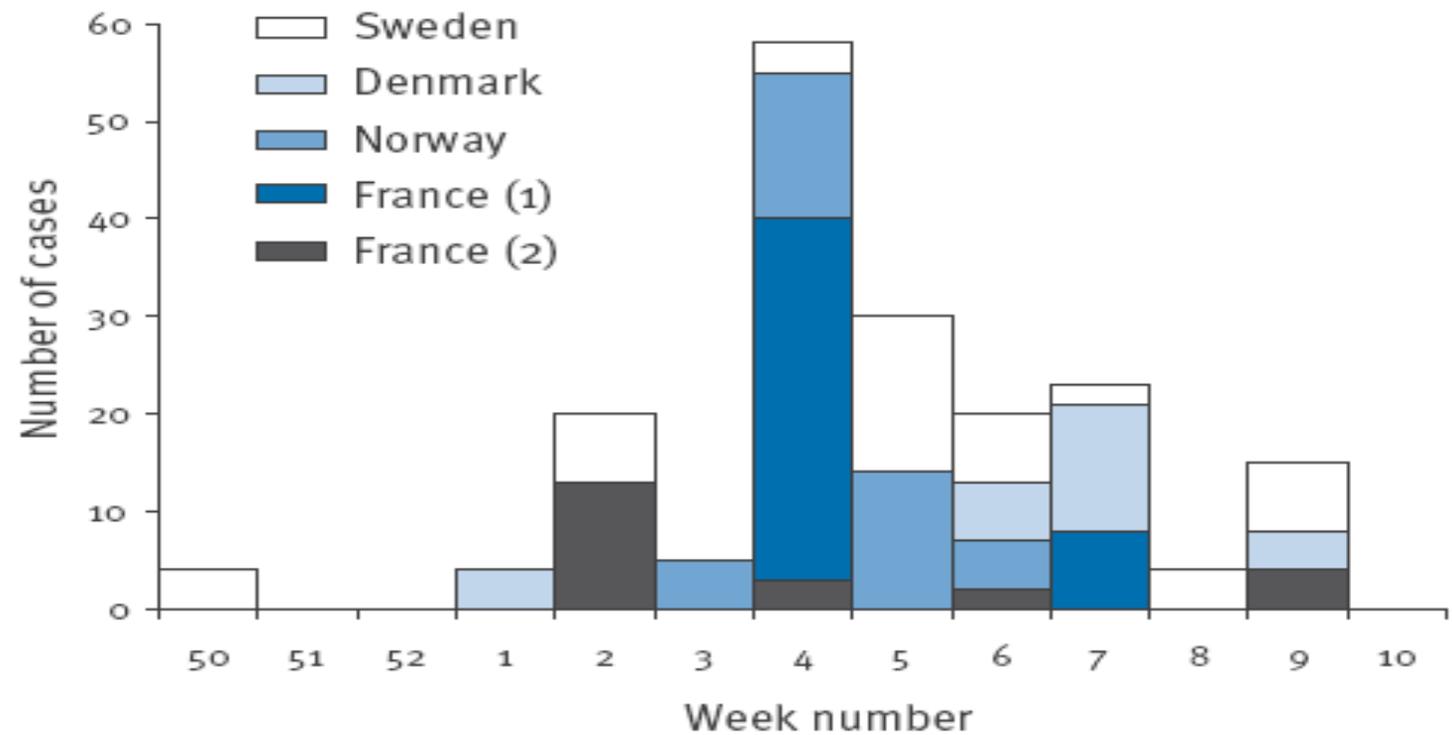


RAPID COMMUNICATIONS

# Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010

T Westrell (therese.westrell@ecdc.europa.eu)<sup>1</sup>, V Dusch<sup>2</sup>, S Ethelberg<sup>3</sup>, J Harris<sup>4</sup>, M Hjertqvist<sup>5</sup>, N Jourdan-da Silva<sup>6</sup>, A Koller<sup>7</sup>, A Lenglet<sup>1</sup>, M Lisby<sup>8</sup>, L Vold<sup>9</sup>

## Epidemic curve by week of onset of reported cases from Norway, France, Sweden and Denmark, December 2009 to March 2010 (n=183)



This paper reports on several simultaneous outbreaks of norovirus infection linked to the consumption of raw oysters. Since January 2010, 334 cases in 65 clusters were reported from five European countries: the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark.

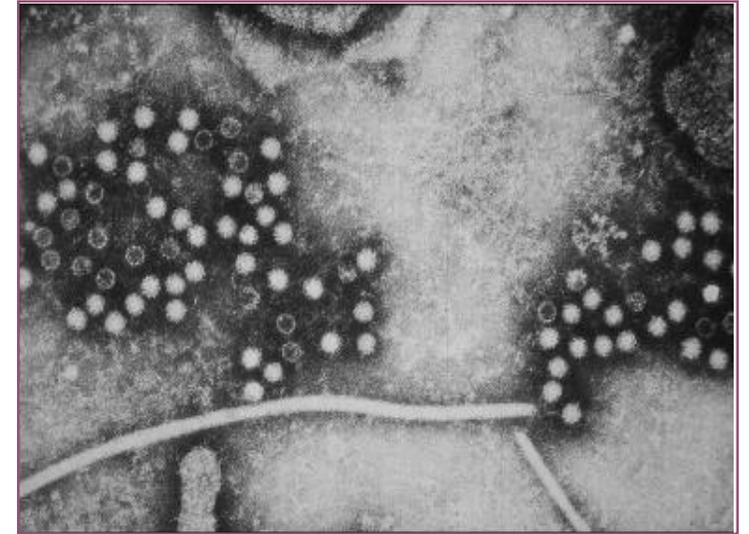


Pistoia 15-16 Dicembre 2015

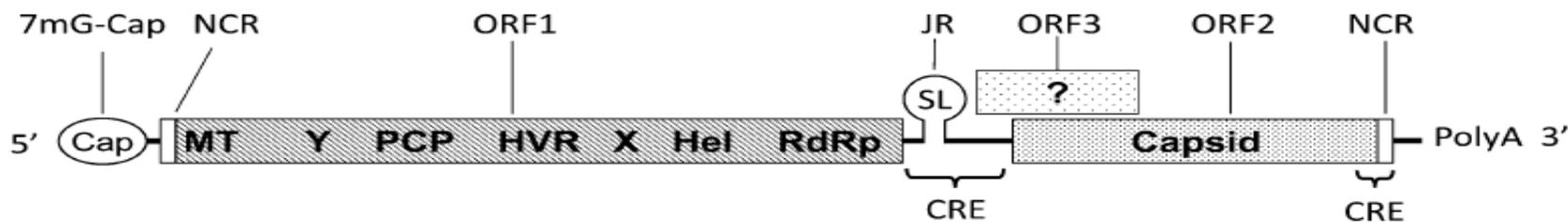
## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

### VIRUS DELL'EPATITE E - HEV

- Capside icosaedrico formato da una singola proteina
- Genere Hepevirus, Famiglia Hepeviridae
- Senza involucro
- ssRNA
- Genoma di 7.2 kb
- 4 genotipi In base alle sequenze dell'intero genoma
- Difficile coltura (molti ceppi non coltivabili)



#### Genomic RNA



#### Subgenomic RNA

2.0 kb

Cao D and Meng XJ. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerging Microbes & Infections* (2012) **1**, e17; doi:10.1038/emi.2012.7

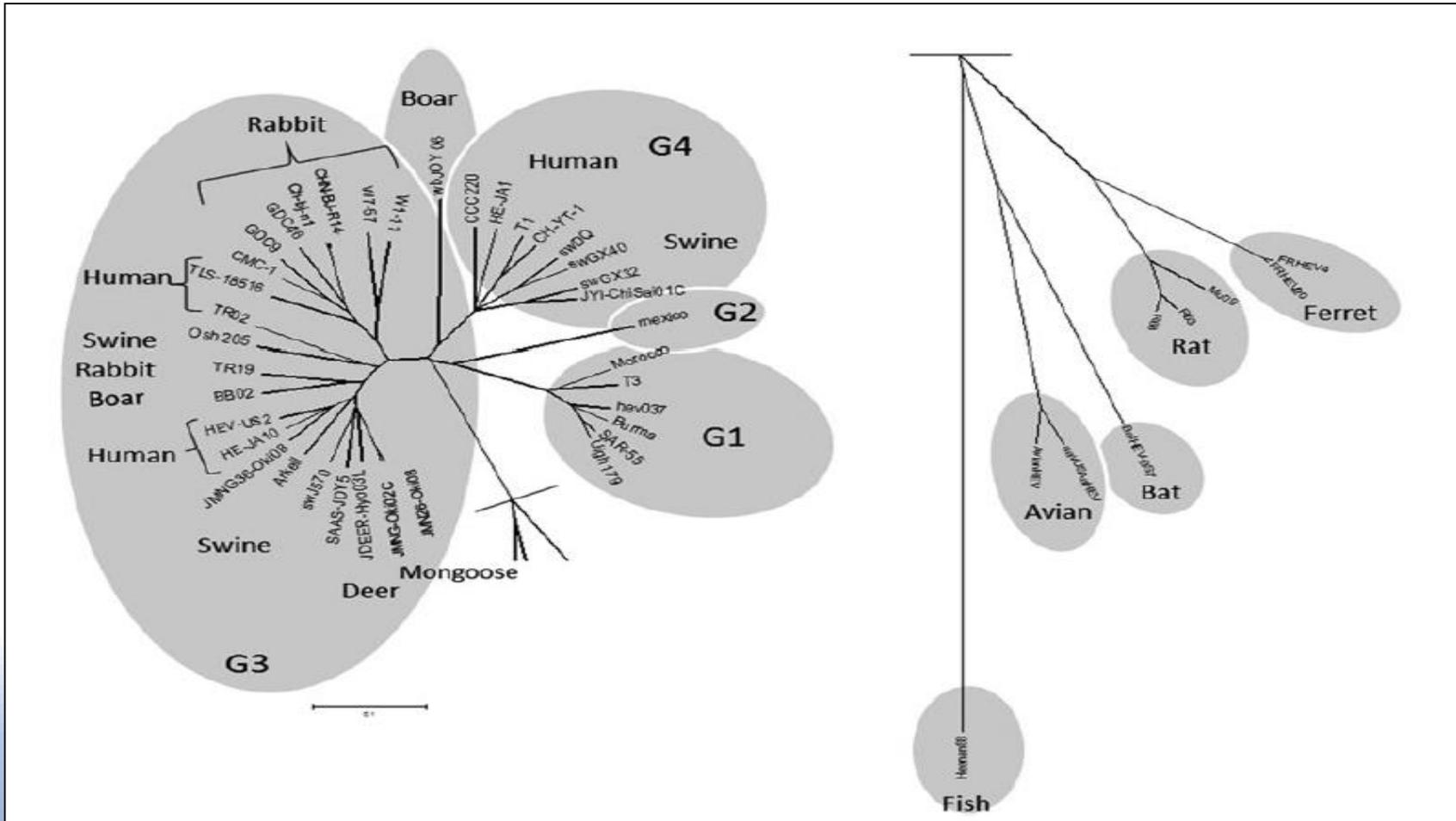
Emerging Microbes & Infections



Pistoia 15-16 Dicembre 2015

## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

### Albero filogenetico basato sulla sequenza dell'intero genoma

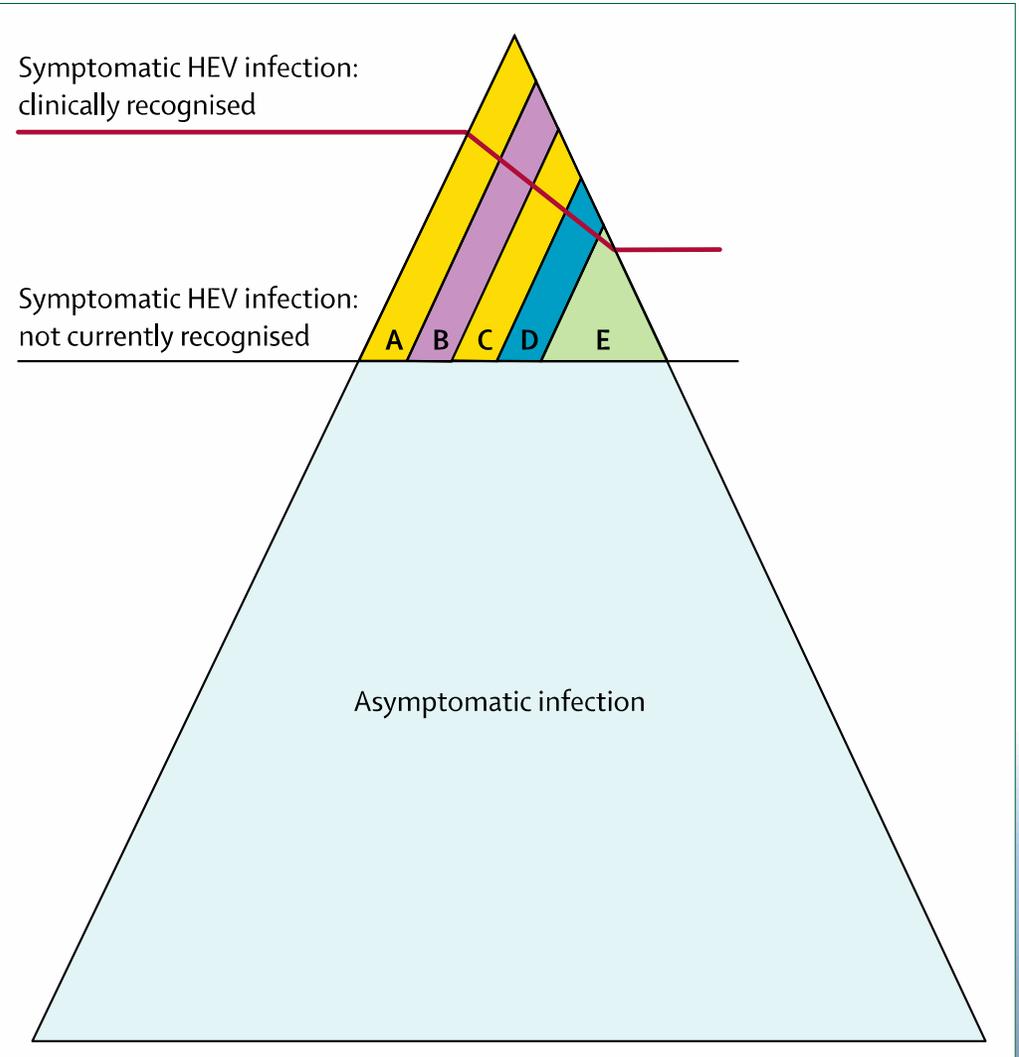




**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti



	Immunocompetent	Immunosuppressed
Presentation	Often symptomatic	Rarely symptomatic
ALT at diagnosis	≈1000–3000 IU/L	≈300 IU/L
HEV genotype	Genotype 1, 2, 3, or 4	Only genotype 3 HEV infection has been reported in this population
HEV diagnostics	Increase in IgG and IgM PCR is positive in 75%	Serological testing is unreliable, and seroconversion might never occur The diagnosis should be established by PCR
Outcome	Resolving hepatitis	Chronic infection occurs in 60% of patients, and 10% develop cirrhosis
Treatment	Ribavirin has been used in very few patients presenting with severe acute hepatitis	Interferon-α and ribavirin are effective treatments for treating chronic HEV infection in this population; a 3-month course of ribavirin therapy is recommended

ALT=alanine transaminase. HEV=hepatitis E virus.

**Table 1: Hepatitis E virus infection in immunocompetent and immunosuppressed patients**

Pischke S, Behrendt P, Bock CT, Jilg W, Manns MP, Wedemeyer H. Dtsch Arztebl Int. 2014 Sep; 111(35-36): 577–583. doi: 10.3238/arztebl.2014.0577

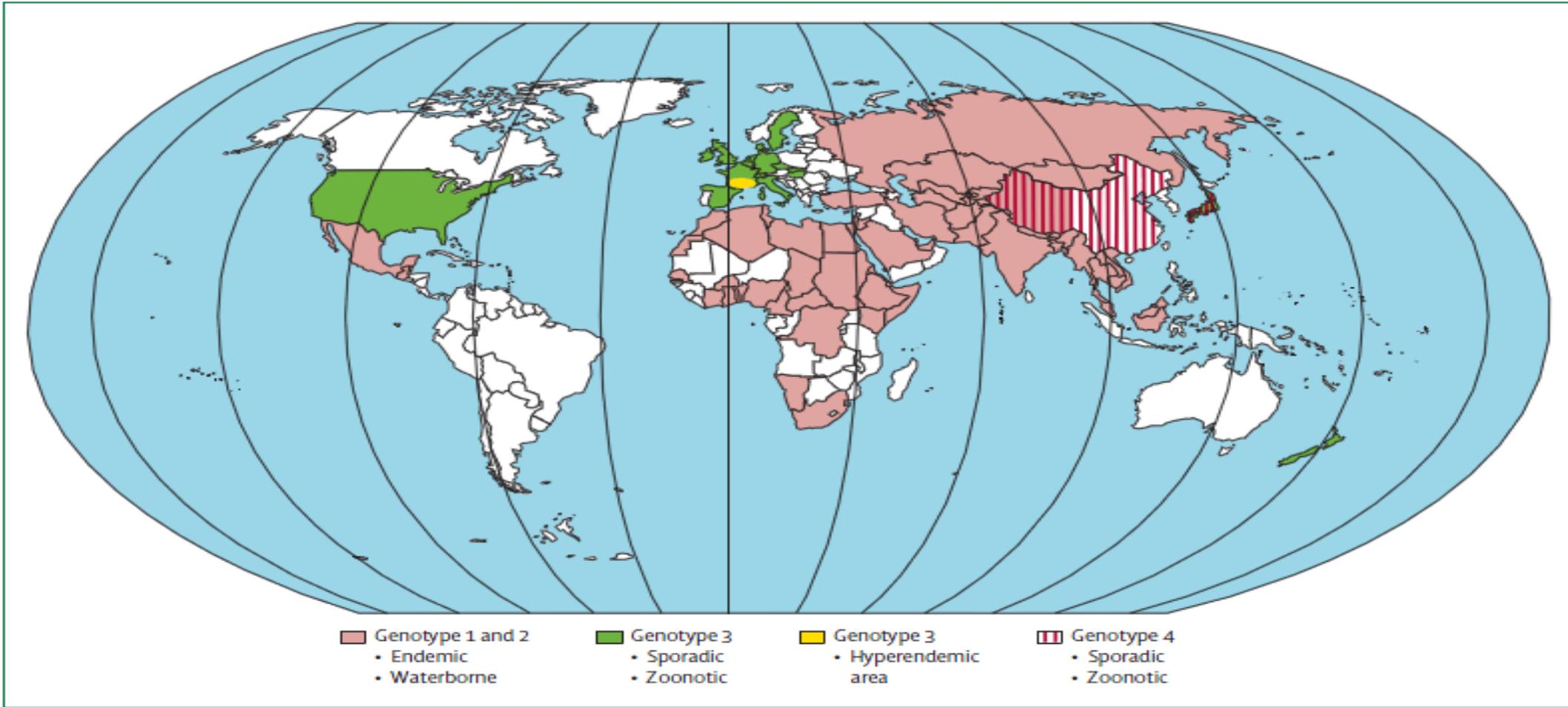


Pistoia 15-16 Dicembre 2015



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

### Distribuzione mondiale dei casi clinici di HEV



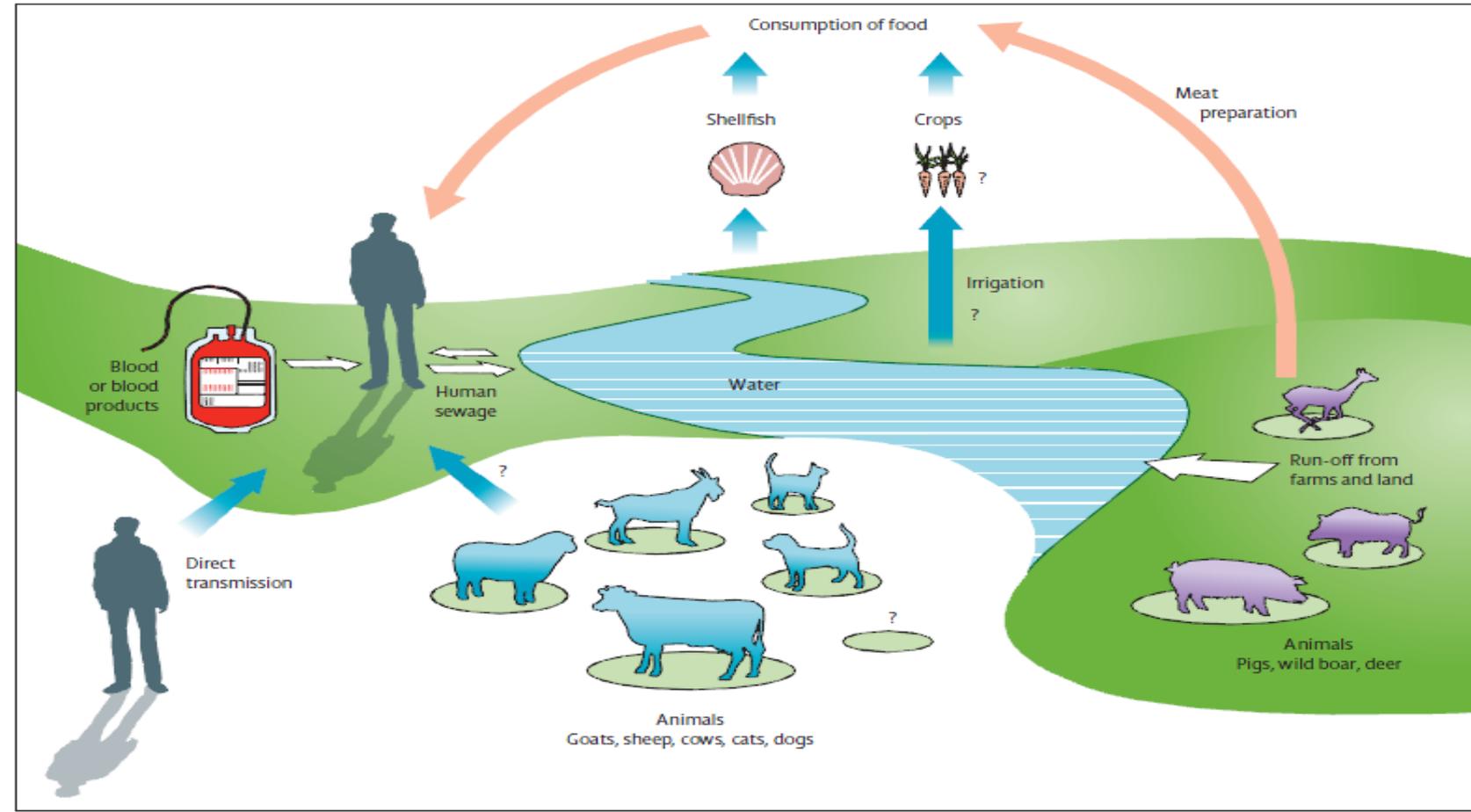


Pistoia 15-16 Dicembre 2015



# Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

## Source and route of HEV1-4 infection



Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, Dalton HR. Hepatitis E. Lancet. 2012; 30:2477-88. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61849-7





**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

### Prevalenza di anti-HHEV nella popolazione generale in Europa

	Number of samples	Anti-HHEV prevalence, %			Reference
		Children	Adults	Overall	
United Kingdom	710	-	3.9	-	Bernal et al., 1996
	1591	2.0 – 3.0	5.0 – 27.0	13.0	Ijaz et al., 2009
Italy	1889	-	2.6	-	Gessoni and Manoni, 1996
	3511	-	2.9	-	Vulcano et al., 2007
San Marino	2233	-	1.5	-	Rapicetta et al., 1999
Spain	2529	4.6	7.3	6.0	Buti et al., 2006, 2008
	2305	0.5	2.1	1.1	Fogeda et al., 2012
Germany	4422	-	17.0	-	Faber et al., 2012
The Netherlands	7072	0 – 0.3	1.4 – 6.4	1.9	Verhoef et al., 2012

Echevarria (2014) Autochthonous Hepatitis E Virus Infection in Europe: A Matter of Concern for Public Health?. Journal of Clinical and Translational Hepatology 2014; 2:7–14



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti**

## PREVENZIONE



- **Buone pratiche di produzione e di manipolazione**
- **Controllo delle acque**
- **Monitoraggio delle materie prime**
- **Vaccini**



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

### VACCINI

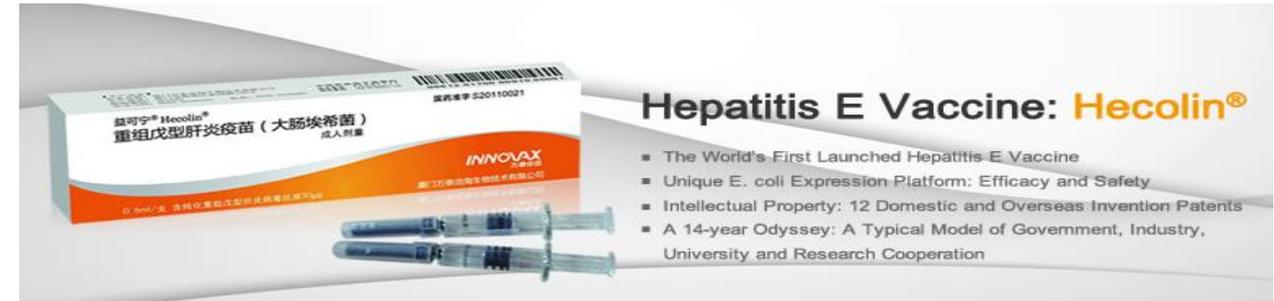
#### • Virus dell'Epatite E

Attualmente in Europa non sono disponibili vaccini anti-HEV.

Nel 2013 in Cina è stato autorizzato un vaccino ricombinante per la prevenzione dell'epatite E (HEV 239, come commerciale Hecolin®), approvato per soggetti di età superiore ai 16 anni e raccomandato per individui ad alto rischio di infezione

#### • Norovirus

Non è disponibile in commercio un vaccino anti-NoV. E' in fase di sperimentazione clinica di tipo I un vaccino multivalente con VLP (viral-like-particle) con risultati promettenti (Lindesmith et al., 2015)



RESEARCH ARTICLE

## Broad Blockade Antibody Responses in Human Volunteers after Immunization with a Multivalent Norovirus VLP Candidate Vaccine: Immunological Analyses from a Phase I Clinical Trial

Lisa C. Lindesmith<sup>1</sup>, Martin T. Ferris<sup>2</sup>, Clancy W. Mullan<sup>2</sup>, Jennifer Ferreira<sup>3</sup>, Kari Debbink<sup>1</sup>, Jesica Swanstrom<sup>1</sup>, Charles Richardson<sup>4</sup>, Robert R. Goodwin<sup>4</sup>, Frank Baehner<sup>5</sup>, Paul M. Mendelman<sup>4</sup>, Robert F. Bargatzke<sup>4</sup>, Ralph S. Baric<sup>1\*</sup>

**1** Department of Epidemiology, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, United States of America, **2** Department of Genetics, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, United States of America, **3** The EMMES Corporation, Rockville, Maryland, United States of America, **4** Takeda Vaccines, Deerfield, Illinois, United States of America, **5** Takeda Pharmaceutical International, Zurich, Switzerland





**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

**REGOLAMENTO (CE) N. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE** del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

22.12.2005

IT

Gazzetta ufficiale dell'Unione europea

I

*(Atti per i quali la pubblicazione è una condizione di applicabilità)*

**REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE**  
del 15 novembre 2005  
sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari  
(Testo rilevante ai fini del SEE)

Il regolamento (CE) 2073/2005 e s.m.i. fissa soltanto alcuni criteri microbiologici, mentre la scelta di ulteriori analisi e relativi criteri interpretativi viene demandata agli Stati membri. A questo proposito la Regione Piemonte (con D.D. n. 780 del 18.11.2011) ha emesso proprie **linee guida per l'analisi del rischio nel campo della microbiologia degli alimenti**

(12) Il 30 e 31 gennaio 2002 il CSMVSP ha emesso un parere sui virus Norwalk-simili (NLV. Norovirus), concludendo che gli indicatori fecali convenzionali non sono affidabili per dimostrare la presenza o l'assenza di NLV e che non è una pratica sicura basarsi sulla rimozione degli indicatori batterici fecali per determinare i tempi di depurazione dei frutti di mare. Il comitato ha raccomandato inoltre l'utilizzo di *E. coli* piuttosto che dei coliformi fecali, quando si utilizzano indicatori batterici per rilevare la contaminazione fecale nelle zone di raccolta dei frutti di mare.



### LINEE GUIDA PER L'ANALISI DEL RISCHIO NEL CAMPO DELLA MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI

Progetto regionale "Analisi del rischio microbiologico legato al consumo di alimenti finalizzato alla riduzione dei costi analitici", approvato con Determinazione della Direzione Sanità della Regione Piemonte n.780 del 18 ottobre 2011

#### **Analisi**

A partire dal 1° gennaio 2007 verranno effettuate le analisi per la determinazione dei virus dell'Epatite A e dei Norovirus su un totale di 100 campioni annui. I prelievi dovranno essere inviati al Laboratorio Controllo Alimenti della Sede, compilando il verbale allegato (**Allegato 5ter**). Le matrici sono rappresentate da molluschi e da preparazioni gastronomiche a base di prodotti ittici crudi. Il campione deve essere effettuato in aliquota singola.



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti**

## CARATTERISTICHE DEI METODI PER LA RICERCA DI PATOGENI NELL'AMBIENTE E NEGLI ALIMENTI

**1 Alta capacità di purificazione**

**2 Elevata sensibilità**

**3 Alta specificità**

**4 Rapidità**



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

### VIROLOGIA CLINICA

- ✓ Elevate concentrazioni
- ✓ Virus umani
- ✓ Presenza in genere di una sola specie
- ✓ Costanza nella composizione dei campioni

### VIROLOGIA AMBIENTALE / ALIMENTARE

- ✓ Basse concentrazioni
- ✓ Virus umani ed animali
- ✓ Frequente co-presenza di specie diverse
- ✓ Estrema variabilità nella composizione dei campioni



**ENVIRONET: 2006-2010**



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti**

# **METODI ATTUALI PER RICERCA VIRALE IN CAMPIONI CLINICI E AMBIENTALI**

- Colture cellulari/ Placche
- ME/EMI
- Ibridazione/ Sequenziamento
- ELISA
- PCR / RT-PCR
- Real-Time PCR
- Immunocromatografia
- Microarray





**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



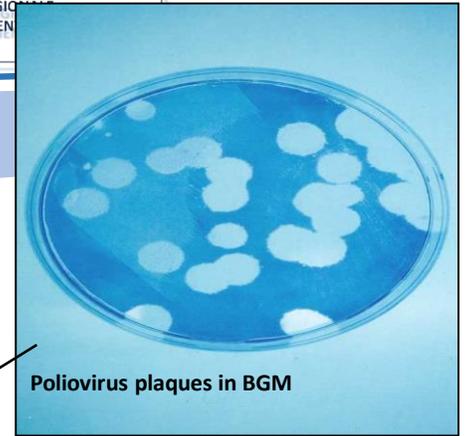
## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

### CONFRONTO TRA VARIE TECNICHE PER LA RICERCA DEI VIRUS

Test	Sensibilità	Specificità	Tempo richiesto
Colture Cellulari	1 PFU/ml	da Bassa a Alta	1 – 3 settimane
Microscopia Elettronica	$10^6$ particelle/ml	Bassa	2 - h
ELISA	$10^{4.5} - 10^5$ PFU/ml	Alta	2-3 h
Sonde molecolari	$10^3 - 10^5$ PFU/ml	Alta	24 – 48 h
PCR	1 PFU/ml	Alta	5 – 6 h



Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti



Poliovirus plaques in BGM

CONFRONTO TRA COLTURE CELLULARI E PCR PER LA RICERCA DI VIRUS NELL' AMBIENTE

TECNICHE	VANTAGGI	SVANTAGGI
Colture Cellulari	Molto sensibili Evidenziano l'infettività Quantificabile L'intero campione può essere analizzato	Tempi lunghi Utili solo per alcuni virus Fenomeni di interferenza e di tossicità Possono rilevare virus animali
PCR	Molto sensibile Utilizzabile per tutti i virus Tempi brevi Quantificabile Economica	No infettività Risente dell'effetto degli inibitori

Una soluzione: "Integrated Cell Culture RT-PCR (ICC-PCR)"

Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

. (Koopmans and Duizer, 2004)

Detection and typing methods for foodborne viral infections

Virus	Detection in:		Food		Water	
	Clinical samples	Category <sup>a</sup>	Methods	Category	Methods	Category
Calicivirus						
NoV	Stool, genome detection, EM <sup>b</sup>	S-R	Genome detection	S-E	Genome detection	S-R
SaV	Stool, genome detection, EM	S-R	Genome detection	S-E	Genome detection	S-E
Hepatitis A virus	serum, antibody detection	R	Genome detection, culture	S-E/R	Genome detection, culture	S-E/R
Rotaviruses						
Group A	Stool antigen detection	R	Culture, genome detection	S-E	Culture, genome detection	S-E
Non-group A	Stool antigen detection, EM	S-E/R				
Adenoviruses	Stool, antigen detection	R	Genome detection	S-E	Genome detection	S-E
Astroviruses	Stool, antigen detection	S-R	Genome detection, culture	S-E	Culture, genome detection	S-E
Enteroviruses	Stool culture	R	Culture	S-E	Culture, genome detection	S-R
Hepatitis E virus	Serum, antibody detection	R	Genome detection	NA	Genome detection	S-E

<sup>a</sup> Category of laboratory: R = routine; S-R is routinely available in specialised laboratories; S-E = experimentally available in specialised laboratories; S-E/R = routinely available in some of the specialised laboratories, experimentally available in more.

<sup>b</sup> EM = particle detection by electron microscope.



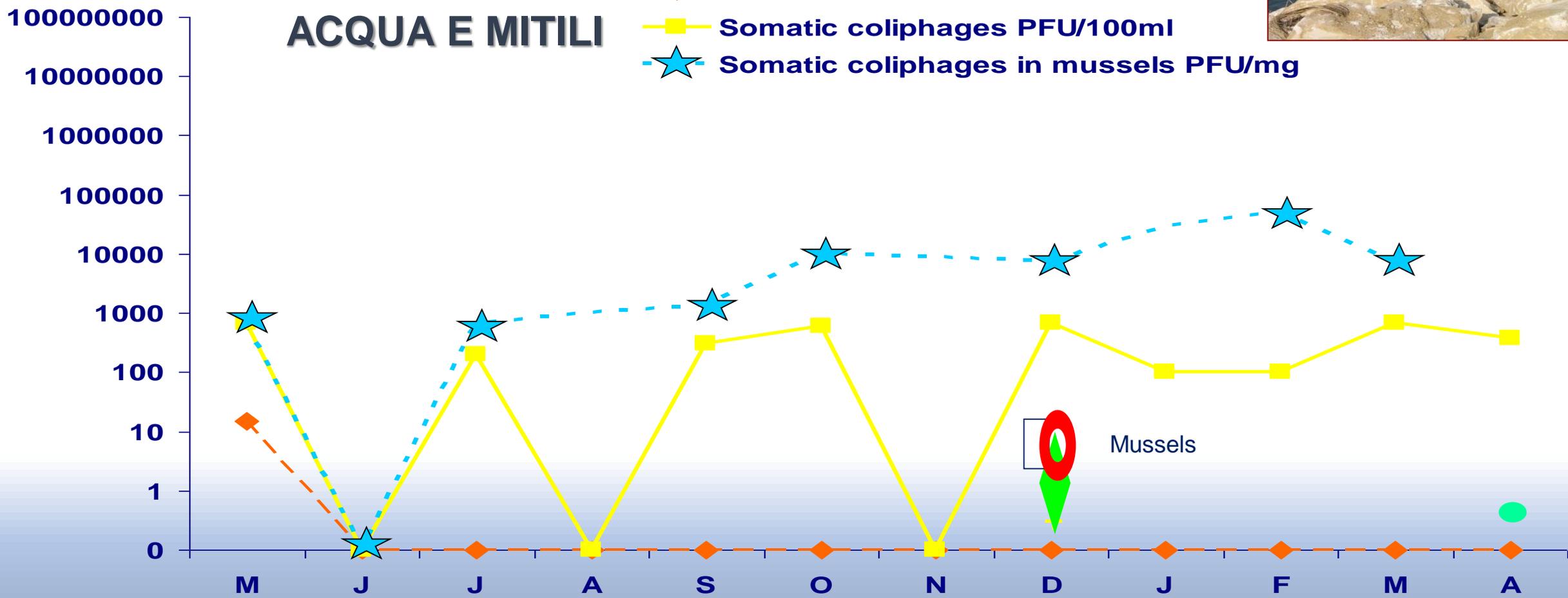
Pistoia 15-16 Dicembre 2015



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti



### ACQUA E MITILI



● ADENOVIRUS    ◆ NOROVIRUS I    + NOROVIRUS II    ○ HAV

Mussels



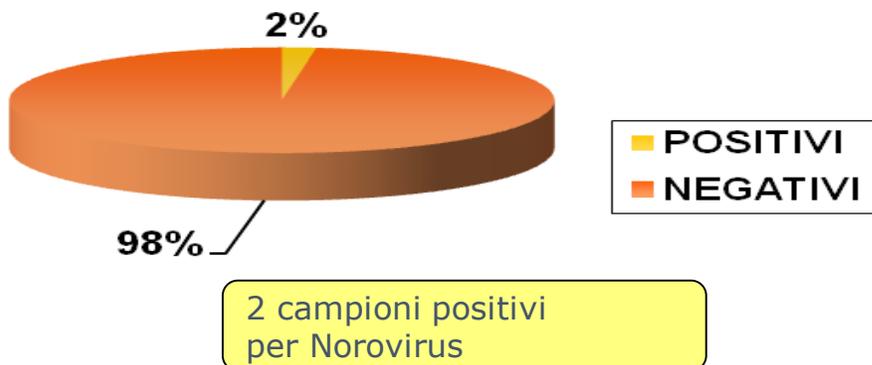
Pistoia 15-16 Dicembre 2015



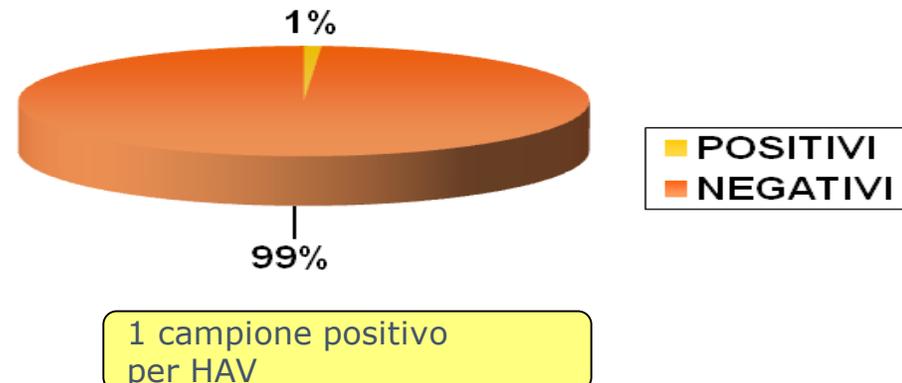
## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

Analisi di molluschi bivalvi (mitili, vongole e ostriche) per la ricerca di Norovirus, e virus dell' Epatite A tramite PCR e colifagi somatici tramite tecniche colturali (collaborazione con l' istituto Zooprofilattico di La Spezia)

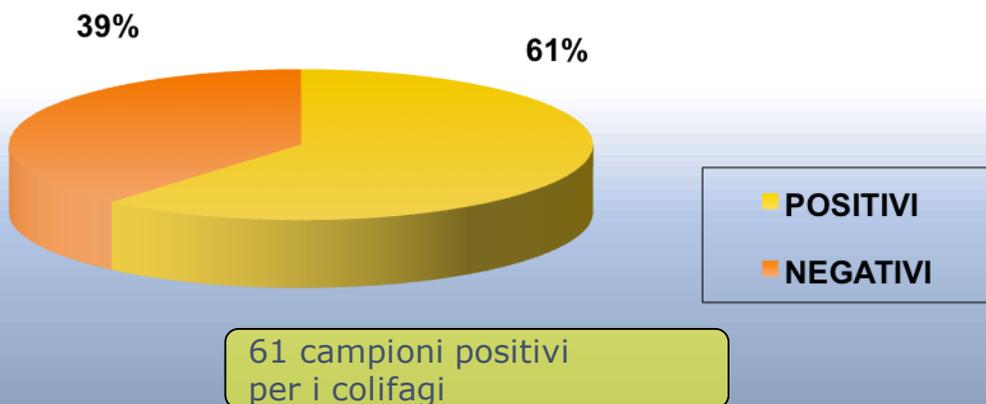
### NOROVIRUS



### HAV



### COLIFAGI



I campioni positivi per norovirus ed HAV erano negativi per *E. coli* e *salmonelle*. Nel campione positivo per HAV è stata riscontrata la contemporanea positività per colifagi



**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



## Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti

Il metodo di riferimento per la ricerca di HAV e NoV nelle matrici alimentari è descritto nella norma tecnica ISO (01/05/2013)

**ISO/TS 15216: “Microbiology of food and animal feed — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR”**

TECHNICAL SPECIFICATION	<b>ISO/TS 15216-2</b>
	First edition 2013-03-15 Corrected version 2013-05-01
<hr/> <hr/>	
<b>Microbiology of food and animal feed — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR —</b>	
Part 2: <b>Method for qualitative detection</b>	

TECHNICAL SPECIFICATION	<b>ISO/TS 15216-1</b>
	First edition 2013-03-15 Corrected version 2013-05-01
<hr/> <hr/>	
<b>Microbiology of food and animal feed — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR —</b>	
Part 1: <b>Method for quantification</b>	



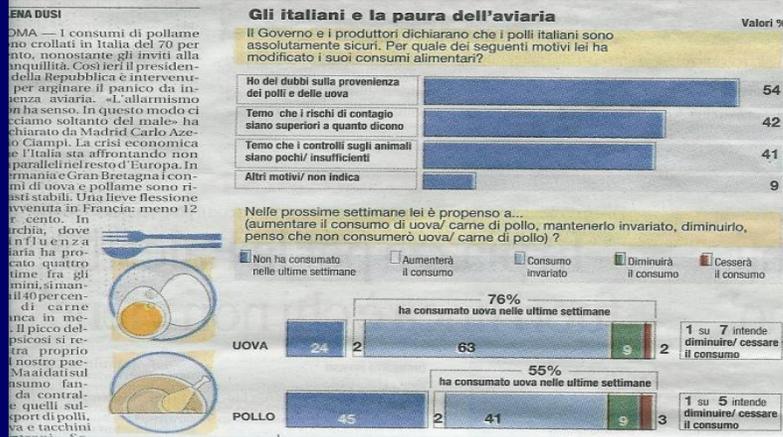
**Pistoia 15-16 Dicembre 2015**



**Nuovi pericoli e nuovi scenari epidemiologici nella sorveglianza delle Malattie Trasmesse da Alimenti**

## **CONCLUSIONI**

- Negli ultimi 10 anni è aumentata la consapevolezza dell'importanza dei virus come agenti di malattie trasmesse da alimenti, per il miglioramento delle tecniche diagnostiche e quindi la maggiore segnalazione di casi ed epidemie di origine virale
- I virus responsabili sono molteplici, accomunati da caratteristiche di diffusione e resistenza ambientale.
- L'HAV ed i norovirus sono quelli più frequentemente coinvolti.
- Molluschi e frutti di bosco sono gli alimenti più frequentemente incriminati
- L'HEV, sebbene meno diffuso è un patogeno emergente di grande rilievo
- La prevenzione si basa principalmente su buone pratiche di produzione e manipolazione, secondario il ruolo dei vaccini
- Il controllo analitico delle materie prime è oggi possibile con metodi standardizzati e quindi sempre più diffuso
- E' essenziale stabilire correlazioni fra i dati clinici e quelli del monitoraggio alimentare.



22/2/2006: Tg5, Sposini mangia pollo in diretta

60

50

40

30

20

10

0

FEB. 2004  
Pandemia mediatica annunciata

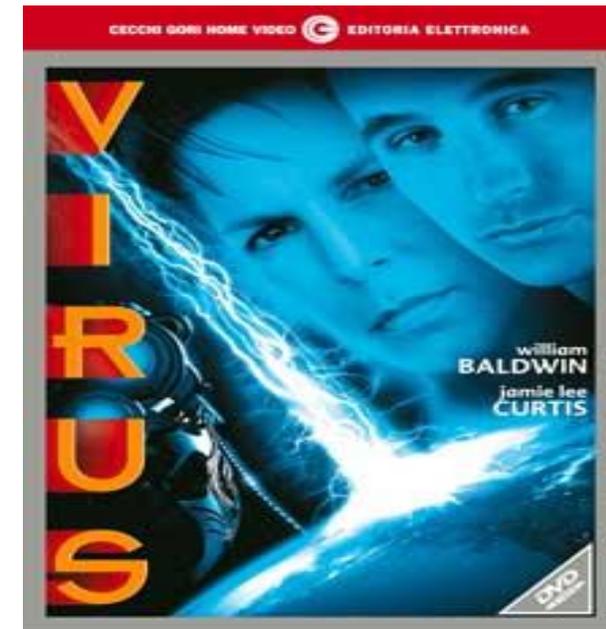
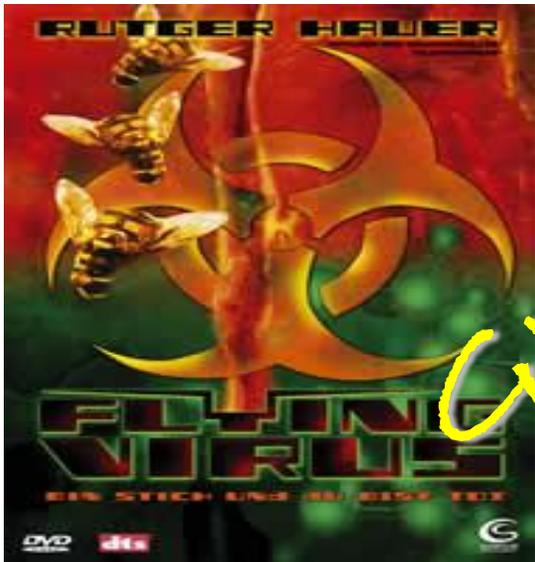
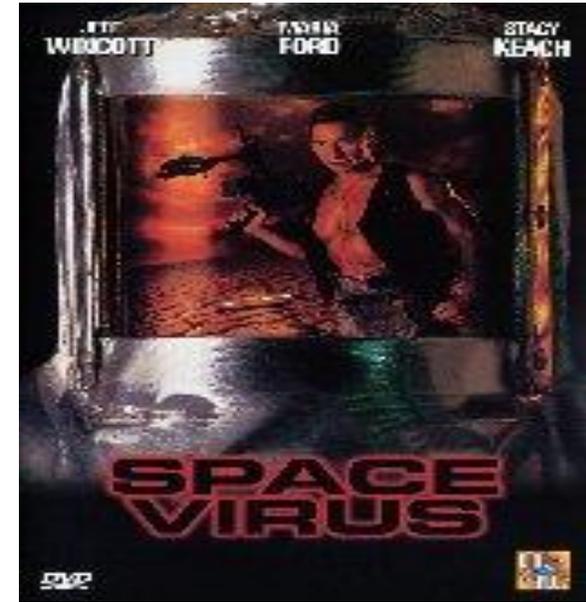
OTT 2005  
FEB. 2006  
Pandemia mediatica dilagante

g f m a m g l a s o n d g f m a m g l a s o n d g f m a m g

2004

2005

2006



Grazie per l'attenzione