



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA

"TOR VERGATA"

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

MICROBIOLOGIA MEDICA ED IMMUNOLOGIA

XXI° CICLO

**Duplex Real Time RT-PCR per la determinazione del
Virus dell'Epatite A in campioni di molluschi eduli
lamellibranchi con l'utilizzo del Calicivirus Felino
come controllo di processo**

Coordinatore

Prof. Garaci Enrico

Tutor

Dott. De Medici Dario

Candidata

Paniconi Mara

A. A. 2008/2009

Indice

RIASSUNTO	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUZIONE	9
1. 1 Virus coinvolti nelle tossinfezioni alimentari.....	9
1.1.1 Il virus HAV.....	13
1.1.2 Modalità di infezione.....	17
1.1.3 Epidemiologia.....	18
1.1.4 Patogenesi, sintomatologia, diagnosi	23
1.2 I molluschi come veicolo di infezione dei virus enterici.....	27
1.3 Normativa per il controllo dei virus nei molluschi	28
1.4 Effetto dei sistemi di depurazione sulla contaminazione virale nei molluschi	31
2. SCOPO DEL LAVORO	33
3. MATERIALI E METODI	35
3.1 Descrizione del metodo utilizzato.....	35
3.2 Preparazione dei virus.....	39
3.3 Campioni.....	40
3.4 Contaminazione dei campioni.....	41
3.5 Estrazione e concentrazione dei virus.....	42
3.6 Estrazione e concentrazione dell'RNA virale.....	43
3.7 Definizione dei primers e delle sonde.....	43
3.8 RT-PCR	44
3.9 Real Time PCR.....	45
3.10 Curve standard e limite del metodo di determinazione.....	46
3.11 Analisi statistica.....	46
3.12 Prove sperimentali su molluschi naturalmente contaminati.....	46

4. RISULTATI	47
5. DISCUSSIONE	51
6. RINGRAZIAMENTI	54
7. BIBLIOGRAFIA	55

RIASSUNTO

I prodotti alimentari possono trasmettere all'uomo agenti patogeni di natura batterica o virale in grado di provocare varie patologie che, nonostante i progressi nel settore della prevenzione, rappresentano ancora oggi un grave problema nel settore della sanità pubblica.

Tra i principali alimenti fonte di infezione e/o di intossicazione, i molluschi bivalvi che vivono filtrando l'acqua e concentrando nel loro organismo oltre alle sostanze nutrienti anche virus e batteri, possono diventare un'importante fonte di rischio per la salute. Per tale motivo il loro consumo, diffuso anche in Italia, rappresenta una delle maggiori cause di infezione di Epatite A nel nostro Paese.

Il regolamento della Commissione Europea (CE) n.2073/2005 basa il giudizio di idoneità microbiologica dei molluschi bivalvi sulla determinazione di parametri batteriologici (*Salmonella* ed *E.coli*). Lo stesso regolamento sottolinea, però, che la determinazione degli indicatori fecali non risulta affidabile per dimostrare l'assenza di contaminazione virale e per valutare i tempi dei processi di depurazione.

L'assenza di un criterio microbiologico per la determinazione diretta dei virus enterici per il controllo dei molluschi nasce dalla mancanza di un metodo di analisi sufficientemente sensibile, semplice e affidabile da poter essere impiegato nei laboratori addetti al controllo ufficiale.

In questa sperimentazione è stato sviluppato un nuovo metodo per la determinazione dell'HAV partendo da campioni di epatopancreas di molluschi eduli lamellibranchi artificialmente contaminati. Inoltre, tenendo conto della complessità della matrice di partenza e della sua ricchezza di inibenti, è stato studiato l'utilizzo di un controllo di

processo che aggiunto al campione ed estratto ed amplificato insieme alla sequenza target è stato in grado di indicare la possibile presenza di falsi negativi. A tal fine è stato scelto come controllo di processo il Calicivirus Felino (FCV) ed è stata sviluppata una Duplex Real Time PCR in grado di determinare contemporaneamente sia l'HAV che l'FCV utilizzando due sonde marcate con differenti fluorocromi. La sonda specifica per la determinazione dell'HAV è stata marcata all'estremità 5' con FAM mentre quella specifica per l'FCV con VIC. Ambedue le sonde sono state legate all'estremità 3' con TAMRA che funge da quencher. Utilizzando tale metodica si è valutata anche l'efficacia di due metodi di estrazione e concentrazione del virus dell'HAV partendo sempre da campioni di epatopancreas di molluschi, il primo metodo si è basato sull'utilizzo della proteinasi K, mentre il secondo sull'impiego di glicina/PEG/Cloroformio-Butanolo/CatFloc.

Parole chiave: Epatite A, Calicivirus Felino, molluschi, Real Time PCR, controllo di processo.

ABSTRACT

Food can transmit pathogens to humans of a bacterial or viral infection that can cause various diseases that, despite progress in prevention, are still a serious problem in public health.

Bivalve shellfish is one of the main food correlated with outbreaks (infection and / or intoxication) in human. Shellfishes filter large volumes of water in which they live and concentrating in their body nutrient substances but also viruses and bacteria, may become an important source of risk for health. For this reason shellfishes represent a major cause of Hepatitis A infection in our country.

Regulation of the European n.2073/2005 bases the assessment of the microbiological suitability of bivalve molluscs on the determination of bacteriological parameters (*Salmonella* and *E. coli*). The same regulation stresses, however, that the determination of the indicators is not reliable faecal to demonstrate the absence of viral contamination and to assess the effectiveness of the purification processes.

The lack of an analytical method sufficiently sensitive, simple and reliable to be used in laboratories engaged in the official control laboratories does not allow to define a microbiological criterion for the enteric viruses for the control of shellfish safety.

In this thesis has a new method for determining HAV was developed. The method was evaluated using spiked shellfish samples. At the aim to indicate the absence of the reaction inhibitions and the efficiency of the procedure, a process control was added, extracted and amplified from the sample parallelly with the target. As process control Feline Calicivirus (FCV) was chosen. A Duplex Real Time PCR was developed for determining simultaneously both the HAV and FCV using two probes labelled with

different fluorochromes. The probe specific for the HAV determination was marked at 5' with FAM and the FCV specific one with VIC. Both probes were quenched at 3' using TAMRA. The effectiveness of two methods of extraction and concentration of the HAV virus from shellfish hepatopancreas was also evaluated.

Keywords: Hepatitis A, Feline Calicivirus, shellfish, Real Time PCR, process control.

1. INTRODUZIONE

1.1 Virus coinvolti nelle tossinfezioni alimentari

Lo studio dei dati epidemiologici disponibili per quanto riguarda le infezioni alimentari ha evidenziato che i virus enterici stanno assumendo un'importanza sempre maggiore anche in seguito al miglioramento delle tecniche di analisi che permettono di attribuire a questi agenti patogeni molti episodi epidemici prima classificati ad eziologia sconosciuta. Fino ai primi anni del 1970 infatti, le gastroenteriti virali nell'uomo erano diagnosticate solo utilizzando criteri epidemiologici [1] in quanto la scarsa sensibilità e disponibilità di metodi disponibili per l'identificazione dei virus enterici (quali la microscopia elettronica o l'immuno microscopia elettronica) non permettevano la loro determinazione diretta negli alimenti e talvolta anche dai campioni fecali [2].

L'aumento delle patologie gastrointestinali virali è stato anche correlato all'incremento nella popolazione di settori di individui a rischio, quali anziani, immunocompromessi, bambini e donne in stato di gravidanza. Recentemente è stato anche individuato lo stress come un fattore importante di suscettibilità dell'ospite alle malattie trasmesse da virus enterici. Infatti, sorprendentemente, individui sani ma sottoposti a situazioni di particolare pericolosità, quali soldati in teatri di guerra, hanno dimostrato essere molto suscettibili alla malattia [3]. L'incremento degli scambi internazionali di prodotti alimentari hanno contribuito alla rapida diffusione delle malattie trasmesse con gli alimenti, incluse quelle di origine virale, come è stato segnalato sia dall'Organizzazione Mondiale della Sanità [4] che dal Codex Alimentarius [5].

I virus enterici si replicano nell'intestino umano e possono essere presenti nelle feci di individui infetti con concentrazioni che possono arrivare fino a 10^{10} particelle virali per grammo [6,7,8]. Le feci disperse nelle acque fognarie possono provocare la contaminazione delle acque superficiali, incluse quelle marine, in quanto i processi di

trattamento dei liquami non sono generalmente capaci di rimuovere completamente i virus [9]. Tali virus possono sopravvivere a lungo in acqua [10,11,12,13,14], infatti vengono protetti dai trattamenti di disinfezione, dall'azione inattivante della temperatura, del pH e dei raggi UV ed infine dall'antagonismo microbico grazie a due fenomeni che sembrano essere alla base della loro persistenza e della loro diffusione nell'ambiente: l'aggregazione e l'adsorbimento [15,16].

Il primo corrisponde alla formazione di aggregati formati da 2-10 unità virali chiamate "Clumps" che garantiscono una maggiore resistenza delle singole particelle alle condizioni ambientali avverse. Inoltre il grande potenziale di adsorbimento nei confronti di qualunque tipo di materiale particolato (organico ed inorganico), come particelle argillose, silicati, batteri, cellule algali e particolati organici, aumenta i tempi di sopravvivenza dei virus nelle acque d'estuario e nei sedimenti spesso grazie alla creazione di una vera e propria barriera fisica. Così protetti essi riescono a sopravvivere per lunghi periodi nell'ambiente marino ed a percorrere anche lunghe distanze, spesso parecchi chilometri, rispetto ai punti di scarico in relazione anche alle correnti marine incontrate, nella tabella 1.1 sono mostrati i diversi virus patogeni che possono essere ritrovati in ambiente acquatico.

Diverse prove sperimentali hanno evidenziato che i virus sono più resistenti dei batteri ai comuni trattamenti di bonifica, compresa la clorazione ed è stato dimostrato che sopravvivono fino a 130 giorni in acqua di mare quindi più a lungo dell'*Escherichia coli* che è utilizzato come indicatore di contaminazione fecale sia dell'acqua che dei molluschi [17]. Quando tali acque contaminate sono utilizzate per irrigare i prodotti ortofrutticoli oppure per l'allevamento dei mitili tali virus possono essere ritrovati su questi alimenti, provocando malattia nei consumatori, nel caso venissero ingeriti crudi o poco cotti.

Tab. 1.1:Classificazione dei virus patogeni presenti nell'ambiente e negli alimenti.

<u>FAMIGLIA</u>	<u>GENERE</u>	<u>SPECIE</u>	<u>Numero di Sierotipi o Genotipi</u>	<u>MALATTIA PROVOCATA</u>
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	Virus poliomelite	3	Paralisi, meningiti, febbre, poliomielite
		Coxsackievirus A	23	Meningite, infezioni respiratorie
		Coxsackievirus B	6	Miocardite, eruzioni cutanee, febbre, meningite, infezioni respiratorie, pleurodinia
		Echovirus	32	Meningite, infezioni respiratorie, eruzioni cutanee, febbre, diarrea
		Enterovirus 68-71	4	Meningite, encefalite, infezioni respiratorie, congiuntivite emorragica
	<i>Hepatovirus.</i>	HAV	1	Epatite infettiva
<i>Reoviridae</i>	<i>Reovirus</i>	Reovirus umano	3	?
	<i>Rotavirus</i>	Rotavirus umano	7	Gastro-enterite
<i>Caliciviridae</i>	<i>Calicivirus</i>	Sapovirus	5	Gastro-enterite
		Norovirus	7	Gastro-enterite
<i>Hepeviridae</i>	<i>Hepevirus</i>	Virus Epatite E	1	Epatite-infettiva
<i>Astroviridae</i>	<i>Astrovirus</i>	Astrovirus umano	5	Gastro-enterite
	?	Parvovirus likevirus	1	Gastro-enterite
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i>	Coronavirus umano	1	Enterocolite
<i>Toroviridae</i>		Coronavirus like	?	Gastro-enterite
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadeno virus</i>	Adenovirus umano	41	Infezioni respiratorie, congiuntivite, gastroenterite

Diversamente dai batteri i virus non si moltiplicano nei diversi alimenti né producono tossine in quanto parassiti intracellulari obbligati e quindi incapaci di replicarsi al di fuori della cellula ospite. Per questo motivo nei diversi prodotti alimentari i virus possono essere semplicemente veicolati e perdere la loro infettività, ma mai duplicarsi. La loro dose infettante è molto bassa: generalmente tra 1 e 10 unità virali [18,19] e quindi il rischio d'infezione da virus presenti negli alimenti risulta molto più alto di quello per i batteri allo stesso livello di esposizione.

Si conoscono oltre 120 virus enterici classificati in diverse specie in base alle loro caratteristiche morfologiche, chimiche, fisiche, antigeniche e genetiche [20,21,22,23,24,25].

Non tutti questi virus sono stati correlati con casi di malattia nell'uomo trasmessi con il consumo di alimenti o acqua.

I virus enterici correlati con casi di tossinfezioni alimentari possono essere suddivisi in:

- virus che provocano gastroenteriti: Rotavirus, Adenovirus tipo 40 e 41 e due generi di Calicivirus enterici umani: i Norovirus (NV) e i Sapovirus (SV);
- virus dell'epatite a trasmissione oro-fecale: virus dell'Epatite A (Hepatitis A Virus, HAV) e virus dell'Epatite E (Hepatitis E Virus, HEV);
- virus che si replicano nell'intestino umano ma provocano patologie in altri organi, quali il sistema nervoso centrale o il fegato (Enterovirus) [26,27,13].

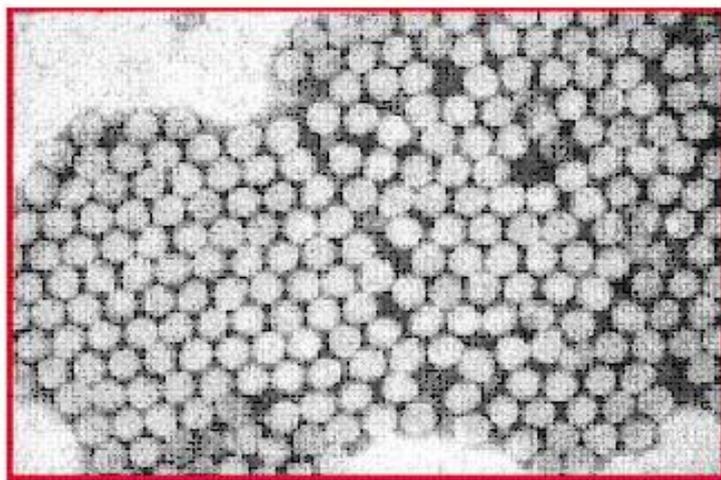
Per molti virus enterici sono state ritrovate in diverse specie animali varianti genomicamente differenti da quelle umane. Recentemente, NV sono stati isolati frequentemente sia in vitelli che in maiali, tali ceppi sono però geneticamente ben distinti da quelli isolati nell'uomo e non è stata mai documentata la trasmissione zoonotica di questi virus alla specie umana [28,29]. Anche i virus dell'Epatite E isolati in maiali sono risultati essere geneticamente molto simili a quelli ritrovati a livello clinico, anche se è da sottolineare che l'isolamento di HEV in questi animali è abbastanza comune anche in quei Paesi dove l'HEV è raramente diagnosticato nell'uomo [30]. Quanto detto suggerisce che il rischio di trasmissione zoonotica dei virus enterici è veramente molto basso anche se non può essere completamente escluso. C'è, quindi, la necessità, anche in relazione alla flessibilità genetica che tutti i virus a

RNA normalmente dimostrano di avere, di monitorare continuamente questi virus nell'ambiente per evidenziare qualsiasi cambiamento del loro comportamento [31].

1.1.1 Il virus HAV

Il virus dell'Epatite A (fig.1.1) appartiene alla famiglia *Picornaviridae* ed è stato classificato come unico rappresentante del genere degli *Hepatovirus* [32,33].

Fig. 1.1: Virus dell'Epatite A



Tale virus ha le dimensioni di circa 27-32 nm, il suo capsidè è icosaedrico, a simmetria cubica, formato da 32 subunità o capsomeri e contiene un singolo filamento di RNA a polarità positiva [34] di circa 7.5 kb. Come tutti i *Picornavirus*, il suo genoma può essere diviso in tre distinte regioni (fig 1.2):

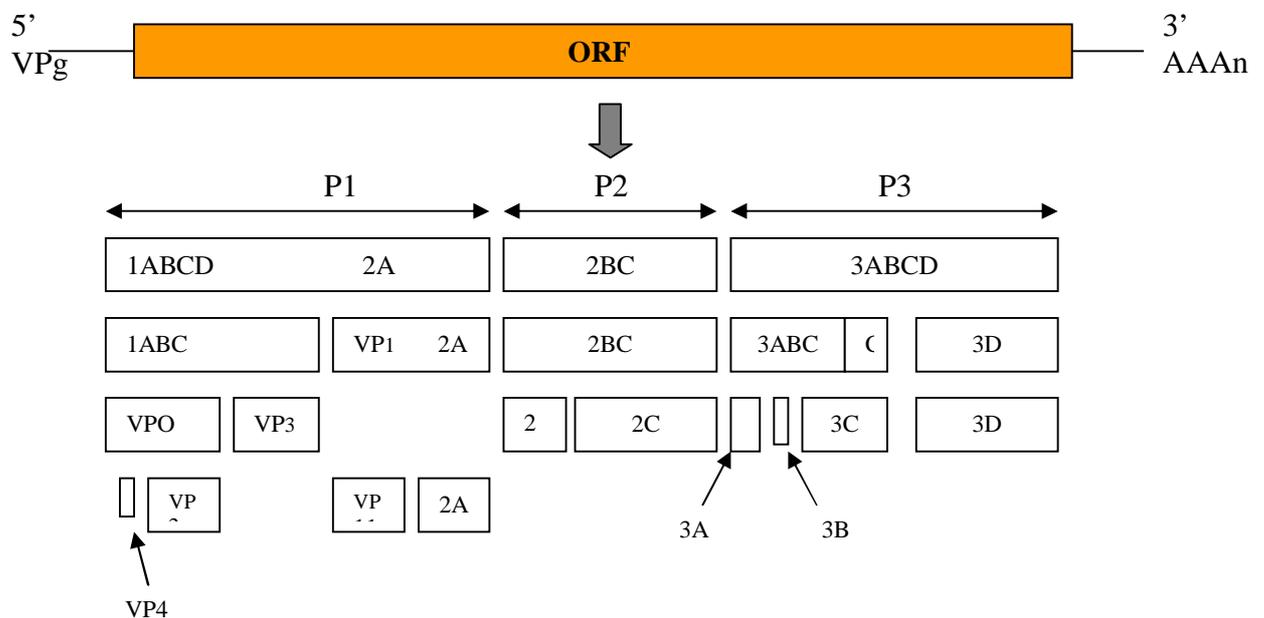
- una regione non codificante all'estremità 5' (5'NTR) che costituisce circa il 10% del genoma a cui è covalentemente legata una proteina virale (VPg) che interviene nella replicazione. Tale regione presenta numerose strutture secondarie che contengono segnali per il riconoscimento e per il legame da parte dei ribosomi dell'ospite al genoma

virale. Inoltre i nucleotidi compresi tra 1 e 150 sembrano essere necessari per l'inizio della sintesi di nuovo RNA virale (formazione del complesso replicativo);

- un lungo open reading frame (ORF) che codifica tutte le proteine virali;

- una corta regione non codificante all'estremità 3'(3'NTR), seguita da una coda poli-A, di 40-80 nucleotidi [35].

Fig. 1.2: Genoma del virus dell'Epatite A [36].



Le funzioni delle proteine e dei polipeptidi del virus dell'Epatite A sono mostrate nella tabella 1.2. La regione 5'NTR risulta essere la più conservata dell'intero genoma ed è stata molto utilizzata per sviluppare la maggior parte dei metodi di analisi fin qui proposti [37] per la diagnosi specifica di tale microrganismo in differenti substrati ambientali e clinici. La meno conservata è la regione codificante per la proteina virale 1 (VP1) che per questo motivo è stata ampiamente studiata per comprendere l'evoluzione molecolare e per definire la distribuzione geografica del virus dell'Epatite A [38]. La genotipizzazione del virus dell'Epatite A viene effettuata comparando la percentuale di

identità delle basi nella congiunzione tra la VP1 e la poliproteina non strutturale 2A (VP1/2A) del genoma anche se secondo alcuni autori la comparazione di solo questo tratto (circa 168 basi) non è sufficiente ed inoltre tutto il gene dovrebbe essere confrontato per comprendere l'evoluzione molecolare dell'HAV [39].

Tab 1.2: Funzioni delle proteine e dei polipeptidi del virus dell'Epatite A.

Regione P1 (strutturali)

VP1	Proteina capsidica. Presenta determinanti antigenici
VP2	Proteina capsidica.
VP3	Proteina capsidica. Presenta determinanti antigenici.
VP4	Non dimostrata nei virioni.

Regione P2 (non strutturali)

2A	Non analoga alle 2A degli altri Picomavirus. Interviene nell'assemblaggio del capside come VP1-2A.
2B	Interviene nel complesso replicativo.
2C	Interviene nel complesso replicativo. Ha attività elicastica per l'RNA.

Regione P3 (non strutturali)

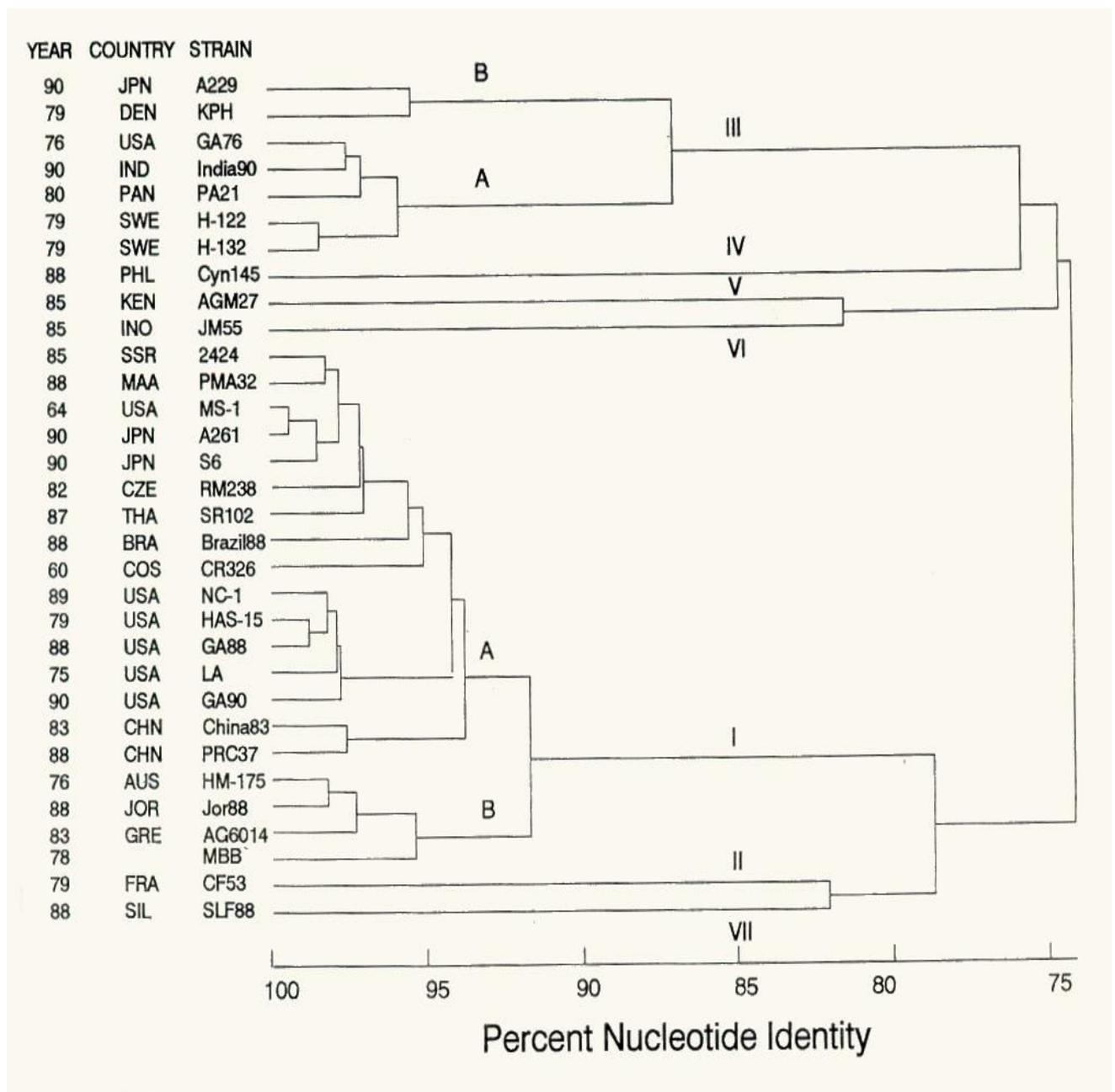
3A	Ancora la VPg (3B) alle membrane cellulari (come 3AB o 3ABC) dove avviene la sintesi di nuovo RNA virale.
3B	VPg. Primer per la replicazione virale.
3C	Proteasi virale. Catalizza tutti i tagli nella poliproteina.
3AB(C)	Ancora la 3B alle membrane cellulari. Interagisce con l'RNA virale durante la replicazione.
3D	RNA Polimerasi virale RNA-dipendente.

Considerando l'identità delle basi nella congiunzione VP1/2A sono stati identificati sette diversi genotipi (I-VII), diversi per più del 15% della sequenza genomica come riportato dalla fig. 1.3. I Genotipi I e III sono stati divisi in due diversi subgenotipi che sono diversi per non più del 7,5% delle posizioni delle basi. Alla variabilità a livello nucleotidico non consegue un equivalente grado di variazione a livello aminoacidico. A causa di questo basso livello di diversità antigenica tutti i virus di HAV sono dello

stesso sierotipo e l'immunità ottenuta a seguito di un'infezione, anche asintomatica, dura tutta la vita verso tutti i diversi genotipi umani.

I primati risultano essere i soli ospiti naturali dell'Epatite A: i virus appartenenti ai genotipi I, II, III e VII sono stati isolati in casi umani, mentre quelli appartenenti ai genotipi IV, V e VI sono stati isolati in scimmie in cattività che mostravano una malattia simile all'Epatite umana [40].

Fig 1.3.: Genotipi

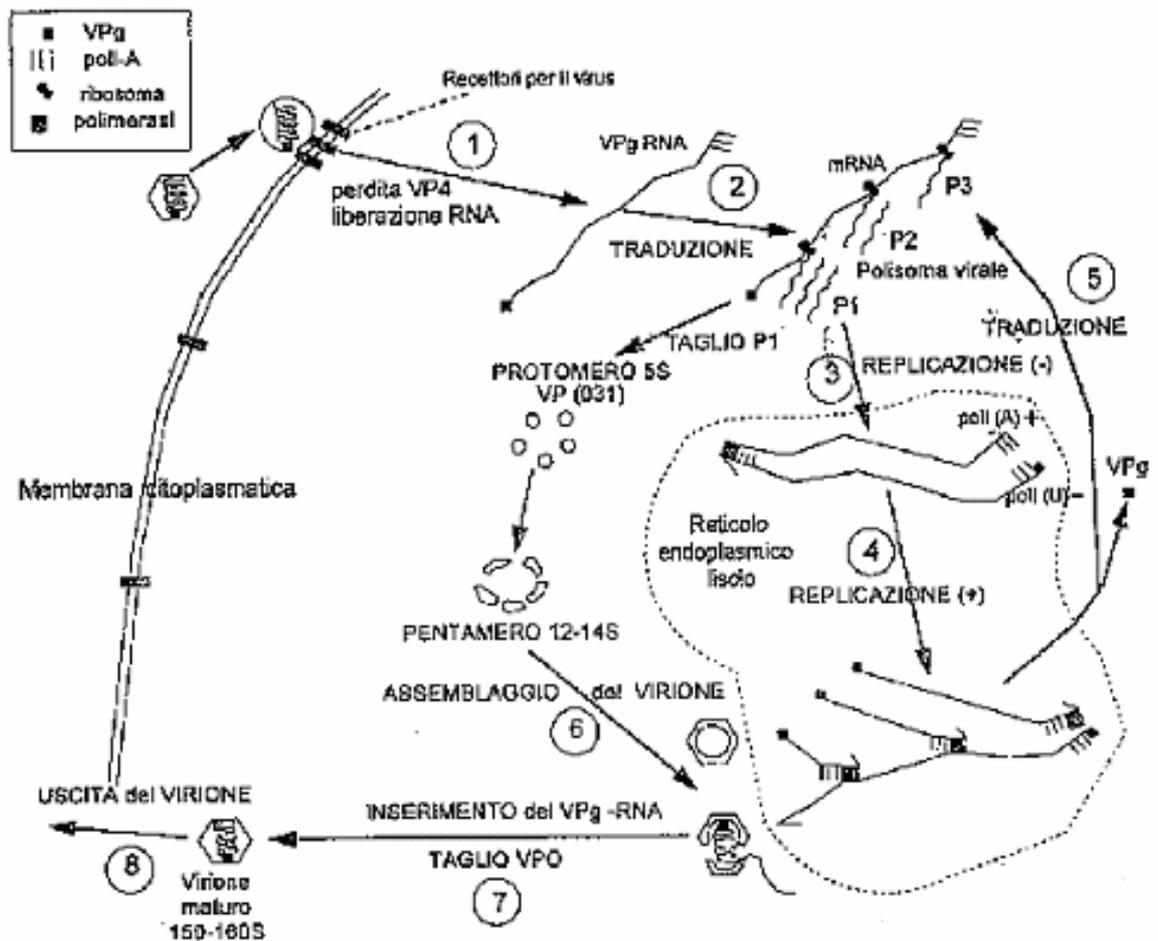


1.1.2 Modalità di infezione

Il virus penetra nella cellula ospite per endocitosi [36] dopo essersi legato al recettore specifico sulla membrana cellulare (fig.1.4), l'RNA viene tradotto nella lunga poliproteina che successivamente viene tagliata dalla proteinasi virale.

Parte dell'RNA virionico viene usato come stampo per la replicazione che avviene attraverso la sintesi intermedia di un RNA a polarità negativa, su cui viene poi sintetizzato l'RNA virionico, utilizzando la polimerasi virale 3D e la proteina VPg come primer, in un complesso replicativo a livello delle membrane cellulari. Nel complesso replicativo intervengono anche le proteine 2B, 2C, 3AB e 3C (o 3ABC).

Fig. 1.4: Ciclo vitale dell'HAV nell'epatocita



Le proteine strutturali si assemblano per formare un capsido che avvolge l'RNA. Le particelle virali complete vengono liberate all'esterno della cellula in vescicole citoplasmatiche che si rompono, rilasciando il virus, quando vengono a contatto con i sali e gli acidi biliari. Durante la replicazione virale non si osserva il blocco della sintesi proteica cellulare e tutte le sue fasi non provocano danni visibili alla cellula, contrariamente a quanto avviene nel caso degli altri Picornavirus [41].

1.1.3 Epidemiologia

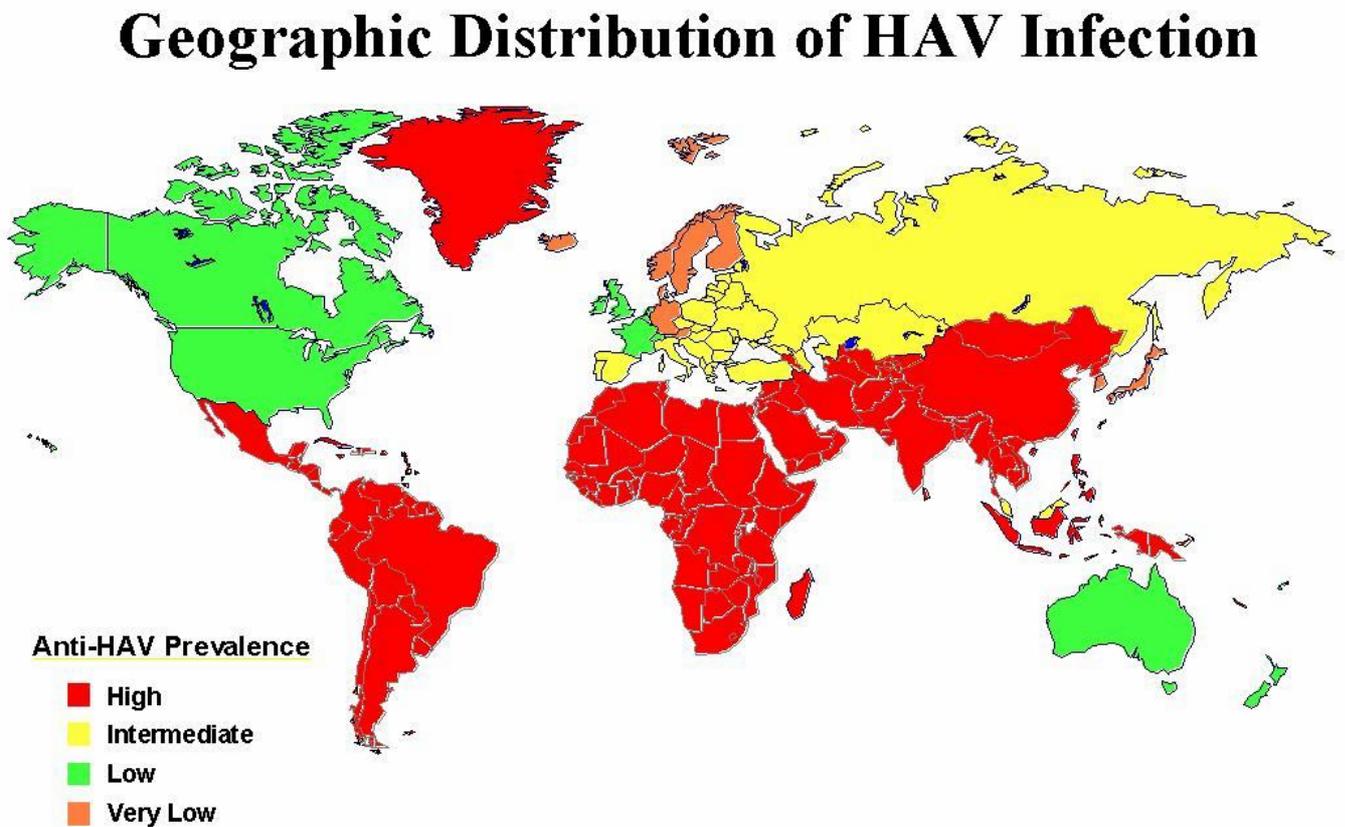
Anche se in teoria una sola particella virale è in grado di determinare l'infezione, lo sviluppo di uno stato di malattia clinica e il suo decorso dipendono da numerosi altri fattori, quali lo stato immunitario, l'età dell'ospite, le eventuali patologie intercorrenti e la virulenza del microrganismo. L'ingestione di alimenti contaminati o, direttamente, ma più raramente, di microscopiche particelle di materiale fecale provenienti dai malati sono i modi più comuni con cui si determina e si trasmette l'infezione.

Nelle regioni d'Europa in cui vi è una bassa prevalenza locale di HAV è stata alcune volte riportata come origine della malattia la trasmissione secondaria da parte degli infettati da HAV [42].

La relazione tra l'età in cui avviene l'infezione e l'espressione clinica della malattia è caratteristica dell'epidemiologia dell'Epatite A: in pratica, aumentando la prima (l'età) aumenta anche la seconda (l'espressione clinica). Tra i casi di Epatite A riportati in USA, la percentuale dei casi mortali aumenta dallo 0.2% tra i bambini di 5-14 anni all'1.8% tra gli adulti con più di 50 anni.

Il virus dell'Epatite A ha una distribuzione mondiale [43] come evidenziato dalla fig.1.5; ed ogni anno si manifestano circa 1.5 milioni di casi clinici di Epatite A nel mondo.

Fig.1.5: Endemicità (molto bassa, bassa, intermedia e alta) dell'HAV nel mondo.



I Paesi Nordici mostrano la percentuale più bassa di infezione con un'incidenza di circa il 15%. In Nord America e in Europa una piccola parte della popolazione viene infettata in età infantile, mentre la maggioranza rimane suscettibile durante tutta l'età adulta [44]. Nel Nord America le epidemie colpiscono soprattutto giovani adulti, ma anche bambini delle più basse classi socio-economiche; sono state anche riportate epidemie tra omosessuali e tra coloro che fanno uso di stupefacenti. L'epidemiologia dell'Epatite A negli Stati Uniti è fundamentalmente cambiata grazie all'utilizzo del vaccino: prima della sua distribuzione (iniziata nel 1995-1996) l'incidenza dell'Epatite A era stata prevalentemente ciclica, con picchi che si ripetevano ogni 10-15 anni. Negli Stati Uniti durante il periodo 1980-1995 sono stati riportati annualmente dal CDC approssimativamente da 22'000 a 36'000 casi di Epatite A (9.0-14.5 casi per 100'000

abitanti), ma studi sull'incidenza della malattia nella popolazione indicano che il numero effettivo di infezioni dovrebbe essere ben più alto. Da un gran numero di analisi si può stimare che il numero medio di infetti per anno sia stato di oltre 270'000 durante il periodo 1980-1999, rappresentando circa 10 volte il numero di casi denunciato. Si stima che ogni anno negli Stati Uniti, 100 persone muoiano a causa di complicazioni epatiche attribuite all'Epatite A [45].

L'epidemiologia delle epidemie di Epatite A nei Paesi in via di sviluppo è differente da quella dei Paesi industrializzati. In tali Stati, infatti, l'incidenza della malattia negli adulti è relativamente bassa a causa dell'esposizione alla malattia in età infantile e la maggior parte degli individui sopra i diciotto anni mostra un'immunità contro la reinfezione che fornisce una protezione naturale durevole per tutta la vita. In Africa, in America Latina ed in parte dell'Asia, la maggioranza delle infezioni accadono in età infantile e molti degli Stati di queste aree continentali sono caratterizzati da un'alta endemicità.

In alcuni paesi Asiatici essendo migliorati sia gli standard igienici che le condizioni socio-economiche si è avuta una riduzione dell'esposizione verso l'Epatite A nei bambini, con riduzione dell'endemicità.

In alcuni Stati ed in alcune aree specifiche dove le condizioni socio-economiche non sono molto migliorate l'endemicità rimane invece medio-alta [42]. Nel Paesi del Sud Est dell'Asia le modalità di origine e di diffusione delle epidemie del virus sono alquanto differenti nei diversi Stati, con frequenti variazioni regionali all'interno di essi. Le epidemie si originano più frequentemente da cibi contaminati e da acqua e comunemente si verificano in scuole, centri di soggiorno, ospedali, ristoranti [46].

L'infezione da virus dell'Epatite A rappresenta la forma di epatite più diffusa in Italia (tab.1.3) ove ancora oggi risulta essere un importante problema di sanità pubblica poiché, anche se l'endemia è progressivamente diminuita, in questi ultimi anni vi sono

state alcune aree nelle regioni meridionali (Campania, Puglia e Sicilia) in cui si sono periodicamente ripetute epidemie (ad intervalli di due-quattro anni).

Tab.1.3: Tassi annuali/100'000 per età sesso ed area geografica delle epatiti virali acute nel 2007 (SEIEVA).

TIPO DI EPATITE	ETA'	NORD-CENTRO*			SUD-ISOLE**			ITALIA		
		M	F	T	M	F	T	M	F	T
EPATITE A	0-14	1,2	1,8	1,5	1,9	1,4	1,7	1,5	1,7	1,6
	15-24	1,5	0,7	1,1	10,2	4,7	7,5	4,7	2,1	3,5
	25 e +	1,9	1,0	1,4	4,3	1,5	2,9	2,7	1,1	1,8
	TOTALE	1,7	1,1	1,4	4,8	2,0	3,4	2,7	1,4	2,0
EPATITE B	0-14	0,1	0,0	0,08	0,0	0,0	0,0	0,09	0,0	0,05
	15-24	0,9	1,0	1,0	0,1	0,4	0,3	0,6	0,8	0,7
	25 e +	4,6	1,0	2,7	1,1	0,5	0,8	3,6	0,9	2,2
	TOTALE	3,3	0,9	2,0	0,7	0,4	0,5	2,4	0,7	1,5
EPATITE Non-A,Non-B	0-14	0,0	0,05	0,03	0,0	0,08	0,04	0,0	0,06	0,03
	15-24	0,8	0,2	0,5	0,5	0,0	0,3	0,7	0,2	0,4
	25 e +	1,0	0,5	0,7	0,7	0,2	0,4	0,9	0,4	0,6
	TOTALE	0,8	0,4	0,6	0,5	0,2	0,3	0,7	0,3	0,5
EPATITE NON CLAS-SIFICATA	0-14	0,0	0,1	0,05	0,07	0,0	0,04	0,03	0,06	0,05
	15-24	0,2	0,0	0,09	0,0	0,2	0,1	0,1	0,08	0,09
	25 e +	0,4	0,1	0,3	0,4	0,1	0,3	0,4	0,1	0,3
	TOTALE	0,3	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2

Nord-Centro: Prov. Aut. Bolzano, Piemonte, Lombardia, Friuli Venezia Giulia, Veneto, Liguria, Emilia Romagna, Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Abruzzo.

Sud-Isole: Molise, Campania, Puglia, Basilicata, Calabria, Sardegna, Sicilia.

M = maschi; F = femmine; T = totale

Presso l'Istituto Superiore di Sanità è stato creato nel 1984 un sistema informativo specifico per l'Epatite Virale Acuta (SEIEVA) grazie al quale è possibile ottenere un'accurata valutazione dell'incidenza delle epatiti acute in Italia ed in questo modo impostare delle idonee strategie di prevenzione. L'attività di sorveglianza del SEIEVA ha avuto un ruolo assai rilevante nell'identificazione delle specifiche modalità di trasmissione dei diversi virus epatici e nel controllo di focolai epidemici grazie ai vari soggetti che partecipano attivamente alla sorveglianza: l'Istituto Superiore di Sanità, le Regioni e le ASL.

Il SEIEVA impiega le notifiche inviate al Centro di Riferimento dalle Regioni e dalle ASL che partecipano alla sorveglianza per calcolare i tassi di incidenza utilizzando un questionario "ad hoc" per elaborare i dati clinici ed i fattori di rischio.

I tassi di incidenza indicano negli ultimi anni una tendenza in diminuzione dei casi notificati, essendo passati da un valore di 10 per 100'000 nel 1985 ad un valore di 2 per 100'000 nel 2007 (SEIEVA 2007) (tab.1.4). Nel corso del 1997 a causa dell'epidemia accaduta nella regione Puglia, i casi di Epatite A notificati hanno raggiunto un tasso di incidenza particolarmente elevato (19 per 100'000).

Tab 1.4: Tassi di incidenza (x 100'000) dell'epatite A per fasce di età nel periodo 1985-2007. (SEIEVA).

Età	'85	'86	'87	'88	'89	'90	'91	'92	'93	'94	'95	'96	'97	'98	'99	'00	'01	'02	'03	'04	'05	'06	'07
0-14	29	4	6	4	2	3	8	11	7	11	5	10	31	8	3	3	5	2	3	4,1	2	2,2	1,6
15-24	16	7	6	5	4	5	7	15	9	14	6	18	57	15	5	5	5	3	4	5,5	3	1,4	3,5
25 e +	2	3	1	1	2	2	2	2	3	2	1	3	6	4	2	2	2	2	3	3	1,7	1,1	1,8
Totale	10	4	2	2	2	2	4	6	5	6	3	7	19	6	3	3	3	2	3,1	3,6	2	1,4	2,0

La classe di età maggiormente colpita risulta essere quella degli adulti, in cui la più probabile fonte di esposizione al virus Epatite A risultano essere il consumo di frutti di mare ed i viaggi in aree endemiche (tab. 1.5).

Tab 1.5: Casi* notificati di Epatite A con fattore di rischio identificato. SEIEVA 2007.

Tipo di fattore di rischio	Fattore di rischio	Fascia di età						TOTALE	
		0-14		15-24		25 e +		n°	(%)
		n°	(%)	n°	(%)	n°	(%)	n°	(%)
Oro-fecale	Consumo di frutti di mare	54	(53)	158	(87)	321	(77)	533	(76)
	Contatto con itterico nelle sei settimane	11	(13)	9	(5)	23	(6)	43	(7)
	Notte fuori città	43	(45)	26	(15)	132	(33)	201	(30)
Parenterale o sessuale	Trasfusione sangue	0	(0)	1	(0,6)	4	(1)	5	(0,7)
	Interventi chirurgici	2	(2)	4	(2)	15	(4)	21	(3)
	Ospedalizzazione	1	(1)	2	(1)	11	(3)	14	(2)
	Altre esposizioni parenterali**	1	(1)	19	(11)	46	(12)	66	(10)
	Terapia odontoiatrica	8	(9)	19	(11)	55	(14)	82	(12)
	Uso di droghe E.V.	0	(0)	2	(1)	8	(2)	10	(2)
	Convivente Tossicodipendente	0	(0)	0	(0)	3	(0,8)	3	(0,5)
	Contatto con itterico nei sei mesi	11	(13)	14	(8)	34	(9)	59	(9)
	Partner sessuali (>1 nell'ultimo anno)	0	(0)	10	(30)	47	(19)	57	(20)
	Convivente di soggetto HBsAg+	0	(0)	1	(0,6)	6	(2)	7	(1)
Convivente di soggetto HCV+	0	(0)	1	(0,6)	3	(0,8)	4	(0,6)	
TOTALE*** (100%)		104	(100)	184	(100)	428	(100)	716	(100)

* I casi possono avere più di un fattore di rischio

** Piercing, tatuaggi, agopuntura, manicure/pedicure, rasatura dal barbiere

*** Per alcuni casi l'informazione relativa ad alcuni fattori di rischio non è disponibile

1.1.4 Patogenesi, sintomatologia, diagnosi

La probabilità di manifestare sintomi clinici aumenta con l'età in cui avviene l'infezione, infatti, la malattia risulta essere più lieve nei bambini piuttosto che negli

adulti, fino a diventare più severa nelle persone più anziane, nelle quali l'ospedalizzazione e l'esito infausto diventano più probabili.

Nei bambini minori di 6 anni la maggior parte delle infezioni decorre in modo asintomatico e, nel caso si presentino i sintomi, di solito sono lievi e non specifici. Nei bambini più grandi e negli adulti l'infezione è invece di solito sintomatica, con il caratteristico ittero che si presenta nella maggior parte dei casi.

All'infezione segue un periodo di incubazione variabile tra 2 ed 8 settimane, al cui termine si manifesta una fase prodromica di 2-10 giorni con caratteristici sintomi clinici: malessere, nausea, anoressia, astenia, mialgie, cefalea, febbre moderata, fino a pervenire alla fase conclamata, caratterizzata dall'iperbilirubinemia, dall'ittero e dall'emissione di urine color marsala e di feci chiare (epatite itterica).

Le lesioni anatomiche consistono in genere in una congestione epatica, con moderata epatomegalia e fenomeni degenerativi parcellari degli epatociti, fino alla necrosi cellulare di questi ultimi. La bilirubina invade il circolo ematico anziché defluire normalmente nelle vie biliari. Le cellule istiocitarie dei sinusoidi epatici aumentano di numero e di volume. Le transaminasi sieriche aumentano fino al punto da raggiungere durante la fase itterica valori molto elevati proprio a causa della necrosi delle cellule epatiche infette e del passaggio di enzimi epatici nel torrente ematico. Trascorse 3-4 settimane le transaminasi e la bilirubina tornano ai valori normali ed i sintomi si attenuano fino a scomparire.

Alcune volte l'epatite acuta può provocare una necrosi massiva del fegato e pertanto il danneggiamento consistente delle funzioni epatiche con la successiva morte del malato. Questa forma di epatite, detta fulminante, risulta essere molto rara e si verifica in meno dell'1,5% dei casi di epatite acuta.

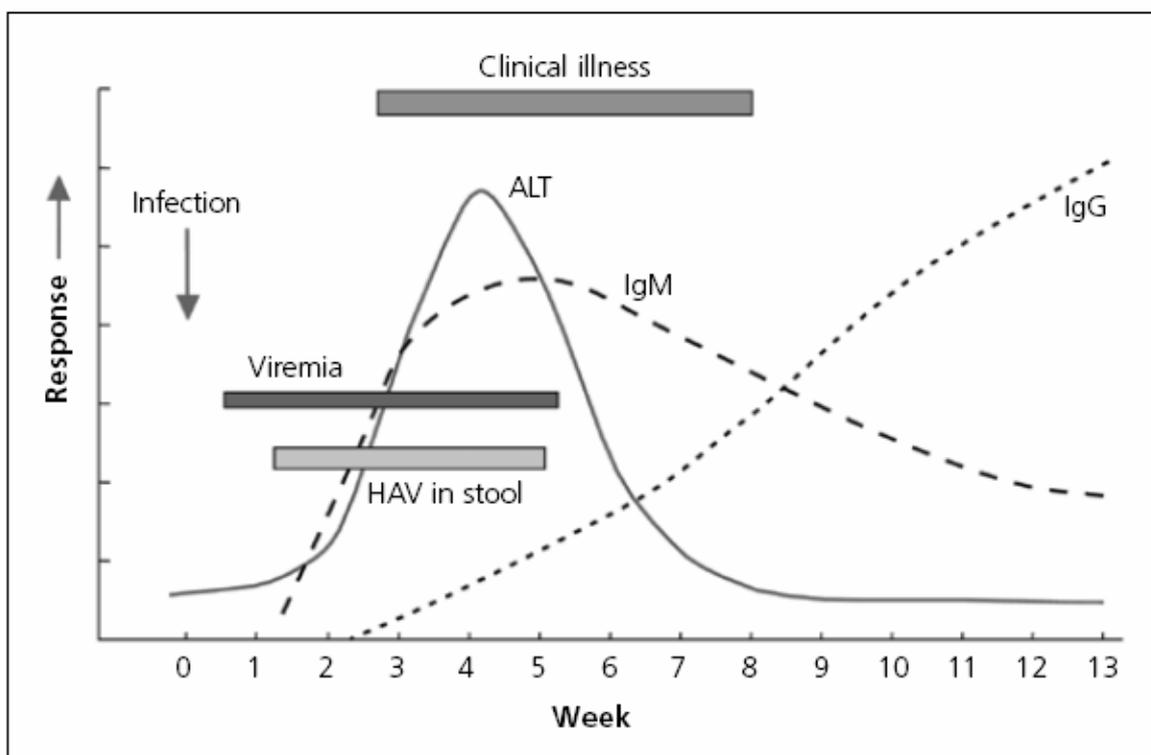
Tuttavia in molti altri casi, al termine del periodo di incubazione, la malattia evolve in forma anitterica o del tutto inapparente, come si può notare dalla tabella 1.6, in cui vengono mostrati i possibili esiti di un'infezione da HAV.

Tab 1.6: Possibili esiti di un'infezione da HAV

<u>Evento</u>	<u>Classi di età</u>	
	<i>Bambini</i>	<i>Adulti</i>
Infezione in apparente	80-90%	10-25%
Malattia (itterica o anitterica)	5-20	75-90%
Guarigione completa	>99%	>98%
Malattia cronica	NO	
Tasso di mortalità	<14 anni	0.1%
	15-39 anni	0,3%
	>40 anni	2.1%

Dalla figura 1.6 si può notare che l'HAV compare nel sangue dei pazienti e nelle feci circa due settimane dopo l'infezione e prima della comparsa dei sintomi clinici (v. anche tabella 1.7). Le feci sono molto infettanti poiché contengono un'altissima quantità di virus (fino a 10^9 virioni/g) per la durata di circa 2 settimane dopo la comparsa dei sintomi clinici. Per la *diagnosi*, data la difficoltà dell'isolamento del virus tramite le colture cellulari, si ricorre normalmente alla determinazione degli anticorpi anti-HAV, in particolare delle IgM, che compaiono circa 4 settimane dopo l'infezione e persistono per molti mesi, e delle IgG, che compaiono nel sangue poco dopo le IgM e permangono per tutta la vita. Gli anticorpi IgG sono protettivi contro tutti i ceppi di HAV, dal momento che esiste solamente un sierotipo del virus.

Fig 1.6: Eventi immunologici e clinici nel corso della malattia [47].



Tab.1.7: Dettaglio degli eventi clinici che si manifestano nel corso dell'infezione da HAV

Incubazione	Fase prodromica	Fase conclamata	Guarigione
<i>Durata</i> 10-50 giorni	<i>Durata</i> 2-10 giorni	<i>Durata</i> 3-4 settimane	
<u>Dati clinici e di laboratorio</u>	<u>Dati clinici e di laboratorio</u>	<u>Dati clinici e di laboratorio</u>	<u>Dati clinici e di laboratorio</u>
Assenti	Malessere generale Anoressia Febbre (< 39°C) Nausea Vomito Mialgie Aumento dei valori delle transaminasi Aumento del valore della bilirubina	Ittero sclerale, poi ittero diffuso Urine scure Feci ipocoliche Epato-splenomegalia Transaminasi elevate Bilirubina aumentata	Calo transaminasi (ai valori normali) Calo bilirubina (ai valori normali) Scomparsa ittero Normalizzazione delle dimensioni del fegato Feci normali Urine normali

1.2 I molluschi come veicolo di infezione dei virus enterici

La contaminazione delle acque di superficie con liquami di ogni genere è stata fonte negli ultimi anni, di problemi sanitari che hanno attirato l'attenzione delle competenti autorità sanitarie anche perché, a causa del depauperamento delle risorse idriche, sempre più spesso le acque fluviali, lacustri e marine vengono utilizzate, previo trattamento, come acque potabili. I liquami possono trasportare una grandissima quantità di microrganismi molti dei quali patogeni e responsabili di infezioni a trasmissione oro-fecale e, oltre a batteri noti, quali *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* o altri di più recente identificazione, quali *Yersinia* e *Campylobacter*, veicolano anche particelle virali di provenienza umana o animale. Ovviamente, le condizioni igienico-sanitarie delle acque si riflettono su quelle degli organismi acquatici che in esse vivono o vi sono allevati, come i molluschi bivalvi che sono in particolar modo dipendenti dalla qualità dell'ambiente marino, sia perché sono caratterizzati da una vita stanziale, sia perché il loro tipo di alimentazione facilita l'accumulo di alcune sostanze disciolte o di particelle in sospensione. Tali organismi, infatti, filtrano grandi quantità di acqua dalla quale trattengono le particelle alimentari ma anche i microrganismi dispersi nell'acqua. Attraverso delle ciglia vibratili tali sostanze sono convogliate verso la cavità boccale e quindi introdotte nel tubo digerente. Tale processo comporta una concentrazione degli eventuali patogeni presenti nelle acque (da 10 a 1000 volte) ed un accumulo di particelle virali nei tessuti dell'apparato digerente, specificatamente nell'epatopancreas.

A seconda delle dimensioni e della specie, un mitilo riesce a filtrare a 14°C circa 1,5 litri di acqua all'ora, l'ostrica europea a 15°C ne filtra 12 litri mentre quella americana a 20°C può superare i 18 litri [48]. La temperatura è un importante fattore che può influire sulla capacità di accumulo dei molluschi, che quindi risulta essere variabile nei diversi periodi dell'anno e per quanto riguarda i nostri mari risulta essere maggiore nei mesi più miti .

I molluschi sono stati identificati come veicoli di malattie enteriche di origine virale come l'Epatite A e di gastroenteriti da Norovirus fin dagli anni 50 e, nonostante il miglioramento delle tecniche di allevamento, rappresentano ancora oggi un alimento a rischio da non sottovalutare a causa dell'abitudine di alcune popolazioni di mangiarli crudo o poco cotti [49,50,51].

Sono vari gli episodi segnalati in cui un elevato numero di persone sono state infettate da virus enterici a causa del consumo di frutti di mare, come ad esempio in Australia ed a New York [52,53,54]. Nel 1988 sono stati segnalati più di 300.000 casi di Epatite A dovuti al consumo di molluschi nella città di Shanghai in Cina [55]. Anche nel nostro Paese l'Epatite A rappresenta un importante problema di sanità pubblica, infatti, dai dati del SEIEVA risulta un'incidenza di migliaia di casi all'anno, di cui il 62% associato al consumo di molluschi. Inoltre è da sottolineare che periodicamente si presentano epidemie da HAV dovute al consumo di molluschi quale quella registrata nella regione Puglia nel 1996 e nel 1997 con circa 11000 persone coinvolte e nel 2004 in Campania dove sono stati notificati 800 casi di malattia. Tali epidemie hanno causato oltre a un notevole problema sotto l'aspetto clinico, un danno economico per le economie di tali regioni. Nella tab.1.8 viene mostrato il numero di casi di Epatite A dovuti al consumo di frutti di mare dal 1991 al 2003 censiti dal SEIEVA. Come si può notare sono stati censiti solo i casi pugliesi del 1997, in quanto nel 1996 la regione Puglia non partecipava al sistema SEIEVA.

1.3 Normativa per il controllo dei virus nei molluschi

I molluschi eduli lamellebranchi sono considerati alimenti ad alto rischio data la loro capacità di trattenere nel loro organismo batteri, virus, microalghe, tossine algali e metalli pesanti eventualmente presenti nell'ambiente marino e quindi di provocare una grande varietà di sindromi gastroenteriche, per cui le più recenti disposizioni normative

hanno cercato di fissare dei criteri per la loro salubrità.

Tab 1.8: Numero di casi di Epatite A dovuti al consumo di frutti di mare censiti dal SEIEVA

Anno	Casi totali	Frutti di mare	%
1991	688	466	68
1992	1122	831	75
1993	1100	494	45
1995	595	342	58
1996	1635	1130	70
1997	5307	3965	75
1998	1501	940	66
1999	794	440	58
2000	934	597	68
2001	970	626	73
2002	711	434	65
2003	1013	592	63

La produzione e la commercializzazione dei molluschi bivalvi, destinati al consumo umano diretto o alla trasformazione prima del consumo, è disciplinato dal Regolamento (CE) N. 853/2004 che ha definito le seguenti norme-igienico sanitarie:

- limiti di tollerabilità per i contaminanti chimici e biologici;
- distinzione delle zone di provenienza;
- destino diversificato per i molluschi in base alla zona di provenienza.

Le acque destinate alla mitilicoltura sono state classificate dall'Autorità Competente in tre categorie:

– Zona A: i cui molluschi possono essere raccolti e utilizzati per il consumo umano diretto. Tali molluschi devono soddisfare i seguenti requisiti:

- contenere meno di 230 E. coli per 100 g di polpa e di liquido intervalvare;

- non contenere salmonelle in 25 g di polpa;
- non contenere sostanze tossiche o nocive di origine naturale o immesse nell'ambiente in quantità tale che l'assunzione tramite alimenti superi la DGA (dose giornaliera ammissibile) per l'uomo;
- Zona B: i cui molluschi possono essere destinati al consumo umano diretto solo dopo aver subito un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A. I molluschi raccolti da tali zone non devono superare i livelli di 4.600 E. coli per 100 g di polpa nel 90% dei campioni. Mediante depurazione o stabulazione, i molluschi provenienti da tali zone di produzione dovranno arrivare a soddisfare i requisiti fissati per i molluschi delle zone A.
- Zona C: i cui molluschi possono essere destinati al consumo umano diretto esclusivamente previa stabulazione, per un periodo non inferiore a due mesi, in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A; la stabulazione può essere associata o meno ad un processo di depurazione intensivo. I molluschi raccolti da tali zone non devono superare i livelli di 46.000 E. coli per 100 g di polpa e liquido intervalvolare.

Il regolamento della Commissione Europea (CE) n.2073/2005, integrato recentemente dal Regolamento 1441 del 2007, ha basato il giudizio di idoneità microbiologica dei molluschi bivalvi sulla determinazione di parametri batteriologici (*Salmonella* ed *E.coli*). Lo stesso regolamento ha sottolineato, però, che la determinazione degli indicatori fecali non rappresentano una prova affidabile per dimostrare l'assenza di contaminazione virale e per valutare i tempi dei processi di depurazione. Questo è stato anche dimostrato da molti studi [56,57] dal momento che i virus sono generalmente più resistenti all'inattivazione in acqua e sono rimossi più lentamente attraverso i normali

processi di depurazione [58,59]. Varie sperimentazioni hanno anche dimostrato che in acque fortemente contaminate da germi, in particolare Gram-negativi, il reperimento di virus è molto scarso e questo forse è dovuto all'azione inattivante di metaboliti batterici.

1.4 Effetto dei sistemi di depurazione sulla contaminazione virale dei molluschi

I metodi che fino ad oggi sono stati impiegati per la disinfezione delle acque destinate alla depurazione dei molluschi si basano sull'utilizzazione di particolari agenti chimici, quali cloro, iodofori ed ozono o agenti fisici quali UV e filtrazione.

La prima tecnica ad essere impiegata è quella che prevede l'impiego del cloro ma sebbene esso sia efficace nel ridurre la contaminazione batterica non risulta altrettanto efficace nei confronti dei virus enterici. Inoltre il cloro, anche a bassi livelli di concentrazione, può influenzare l'attività di filtrazione dei molluschi e quindi la quantità che rimane come residuo nell'acqua deve essere abbattuta mediante tiosolfato ed aereazione prima che l'acqua venga immessa nelle vasche di depurazione.

In molti Paesi europei ed in particolare in Italia vengono impiegati gli iodofori con concentrazioni che vanno da 0.1 a 0.4 mg/l, essi non hanno alcuna conseguenza sull'attività dei molluschi ma riducono solo la quantità di batteri presenti e non hanno alcun effetto nei confronti degli enterovirus se non a concentrazioni che possono danneggiare i molluschi stessi (HAV viene inattivato a concentrazioni di iodio: attivo superiori a 100 ppm).

L'utilizzo dei raggi UV rappresenta un altro processo di disinfezione: questo sistema è capace di distruggere i microrganismi solo quando questi vengono a stretto contatto con i raggi e risulta essere efficace sia per i batteri che per i virus inoltre non lascia residui come gli altri metodi e non influenza i processi fisiologici dei molluschi. E' un metodo

molto utilizzato negli USA anche se ha costi di esercizio molto elevati e per il suo funzionamento l'acqua deve essere poco torbida ed il flusso a strato sottile a lampade sempre efficienti. Se queste condizioni non vengono rispettate, la disinfezione potrebbe risultare inefficace [60].

In questi ultimi anni l'utilizzo della disinfezione mediante ozonizzazione ha avuto un grande incremento nel nostro Paese, questa tecnica si basa sull'ossidazione delle proteine, sull'alterazione delle strutture molecolari (aggredisce in particolare i gruppi HS) e sul blocco enzimatico attraverso l'utilizzo di ozono [61].

Sia i virus che i batteri sono soggetti allo stesso processo di eliminazione, con la differenza che l'ossidazione delle loro proteine avviene più facilmente rispetto a quelle dei batteri in quanto privi di membrana cellulare.

L'acqua, una volta depurata, viene immessa in apposite vasche in cui vengono posti a stabulare i mitili che, mediante un meccanismo di rilascio graduale, si purificano dei microrganismi accumulati.

Anche se è stato ormai più volte provato che i tempi di rilascio dei virus risultano essere più lunghi di quelli necessari per i batteri coliformi o altri batteri patogeni, ancora oggi i tempi di depurazione che vengono impiegati si fondano su parametri batteriologici, inoltre è stato dimostrato che il virus dell'Epatite A viene eliminato più difficilmente rispetto agli altri enterovirus [62].

2. SCOPO DEL LAVORO

La determinazione di virus nel corso di una gastroenterica virale nell'uomo è una procedura che è stata largamente utilizzata già negli anni '70 [63].

Tale diagnosi era effettuata in tempi sufficientemente rapidi (circa 3 ore) utilizzando tecniche analitiche quali la microscopia elettronica o l'immuno elettroscopia elettronica [64]. Tali metodiche sono però poco sensibili (10^5 - 10^6 particelle/ml) [65], anche se sufficienti a determinare particelle virali nelle feci dove la contaminazione è di circa 10^{9-11} particelle virali/g. Nell'analisi dei prodotti alimentari, invece, le metodiche diagnostiche devono essere in grado di determinare basse quantità di virus.

Nel corso degli anni sono stati proposti diversi metodi finalizzati all'isolamento e all'identificazione del virus dell'Epatite A negli alimenti soprattutto nei molluschi, nei vegetali e nelle acque vegetali [66,67]. Inizialmente la determinazione dei virus enterici negli alimenti avveniva utilizzando linee cellulari suscettibili a un determinato agente virale [68,69].

La presenza del virus veniva rilevata o attraverso l'effetto citopatico [70] o attraverso tecniche quali l'immunofluorescenza per evidenziarne la crescita. L'isolamento dei virus enterici su colture cellulari sebbene rappresenti una prova inconfutabile della presenza di virus infettivo è un processo lungo e indaginoso, e non tutti i virus enterici possono essere determinati utilizzando questo sistema. Infatti, non tutti i virus sono coltivabili su cellule [31], il virus dell'Epatite A è coltivabile solo in misura limitata e normalmente i virus isolati dall'ambiente si adattano difficilmente a crescere anche su linee cellulare adatte a tale scopo [71]. Successivamente sono stati proposti, con scarsi risultati, l'utilizzo di tecniche immunologiche (radioimmunologiche o immunoenzimatiche) per la determinazione di tali agenti [72].

Solo l'applicazione di tecniche di biologia molecolare quali in particolare la reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction - PCR) [73] ha permesso il rapido sviluppo di tecniche sufficientemente sensibili e specifiche da utilizzarsi per l'analisi di campioni alimentari.

Differenti metodi per la determinazione di vari virus enterici sono stati in primo momento sviluppati utilizzando tecniche basate sull'utilizzo della PCR classica convenzionale che rilevano lo specifico amplicone utilizzando un gel di agarosio [74,75]. Questo metodo di amplificazione, oltre ad essere indaginoso, presuppone l'utilizzo di composti tossici, cancerogeni o mutageni come il bromuro di etidio. Recentemente sono state proposte l'utilizzo di tecniche di Real Time PCR [76,77,78] che oltre ad essere quantitativamente più sensibili e specifiche della PCR convenzionale, riducono l'utilizzo di molecole pericolose per la salute dell'operatore. La reazione di amplificazione può essere però inibita dalla presenza di sostanze inibenti in una matrice complessa come quella dei molluschi. Inoltre l'efficacia dei metodi di estrazione e purificazione dei virus e dell'RNA virale dai tessuti di mollusco rappresenta un passaggio veramente critico per la determinazione dei virus attraverso i metodi molecolari, così che la loro efficienza deve essere verificata in ogni campione analizzato. Per questo motivo l'utilizzo di un Controllo di Processo (PC) aggiunto al campione ed estratto e coamplificato con la sequenza target può indicare se l'estrazione ha avuto successo [79]. Recentemente il Comitato di Normazione Europeo (CEN) attraverso il lavoro di un gruppo di esperti sta elaborando delle linee guida per la determinazione del virus dell'Epatite A e dei Norovirus dalle matrici alimentari. Le prove sperimentali di questa tesi sono state effettuate anche allo scopo di supportare il lavoro di tale gruppo di lavoro, ed i risultati parziali sono stati presentati nel corso delle riunioni periodiche di questo gruppo.

Lo scopo di questa tesi è quello di valutare la possibilità di usare come controllo di processo il Calicivirus Felino (FCV), un piccolo virus dell'apparato respiratorio felino (35 nm di diametro) [80] appartenente alla famiglia Caliciviridae, caratterizzato da un genoma di circa 7.7 kb nella determinazione dell'HAV nei molluschi. Il metodo è basato sull'utilizzo di una Duplex Real Time PCR per la simultanea determinazione dell'HAV e dell'FCV utilizzando due sonde marcate differentemente, inoltre sono stati confrontati due diverse procedure di estrazione virale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Descrizione del metodo utilizzato

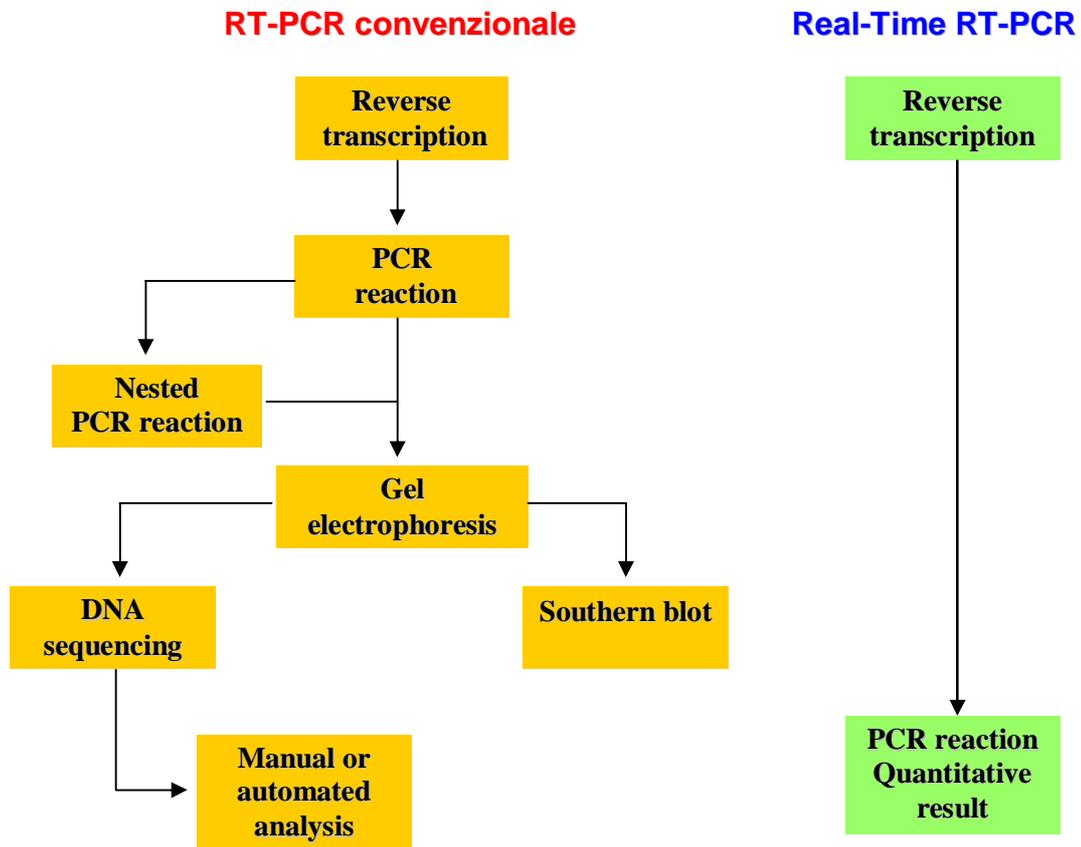
In questi ultimi anni, si è molto diffusa la biologia molecolare non solo per il rilevamento di batteri patogeni in differenti matrici alimentari ma anche per la determinazione della presenza di virus enterici. Tra le varie metodiche vi è la Real Time PCR che, oltre ad offrire tutti i vantaggi della PCR classica, come la sensibilità, la specificità e la rapidità di risposta, presenta il vantaggio di poter monitorare la reazione di amplificazione in tempo reale [81]. Questa peculiarità viene sfruttata per eliminare tutte quelle fasi post-PCR quali l'elettroforesi, il blotting o il sequenziamento, necessari per caratterizzare l'amplicone, ma che allungano i tempi di analisi e necessitano dell'uso di reagenti tossici o mutageni. (fig.3.1). La Real Time PCR permette, inoltre, di rendere quantitativa la risposta della reazione determinando l'accumulo degli ampliconi all'inizio della fase esponenziale della PCR.

I sistemi di rilevamento di questa metodica si basano o sull'utilizzo di molecole fluorescenti che si legano specificamente ai doppi filamenti di DNA sintetizzati o di sonde specifiche legate a molecole fluorescenti [81,82].

Il primo sistema utilizza coloranti, che emettono fluorescenza quando si legano alla struttura

secondaria del doppio filamento di DNA che si crea durante l'amplificazione [83] come il SYBR Green I.

Fig 3.1: Confronto tra PCR convenzionale e Real Time PCR



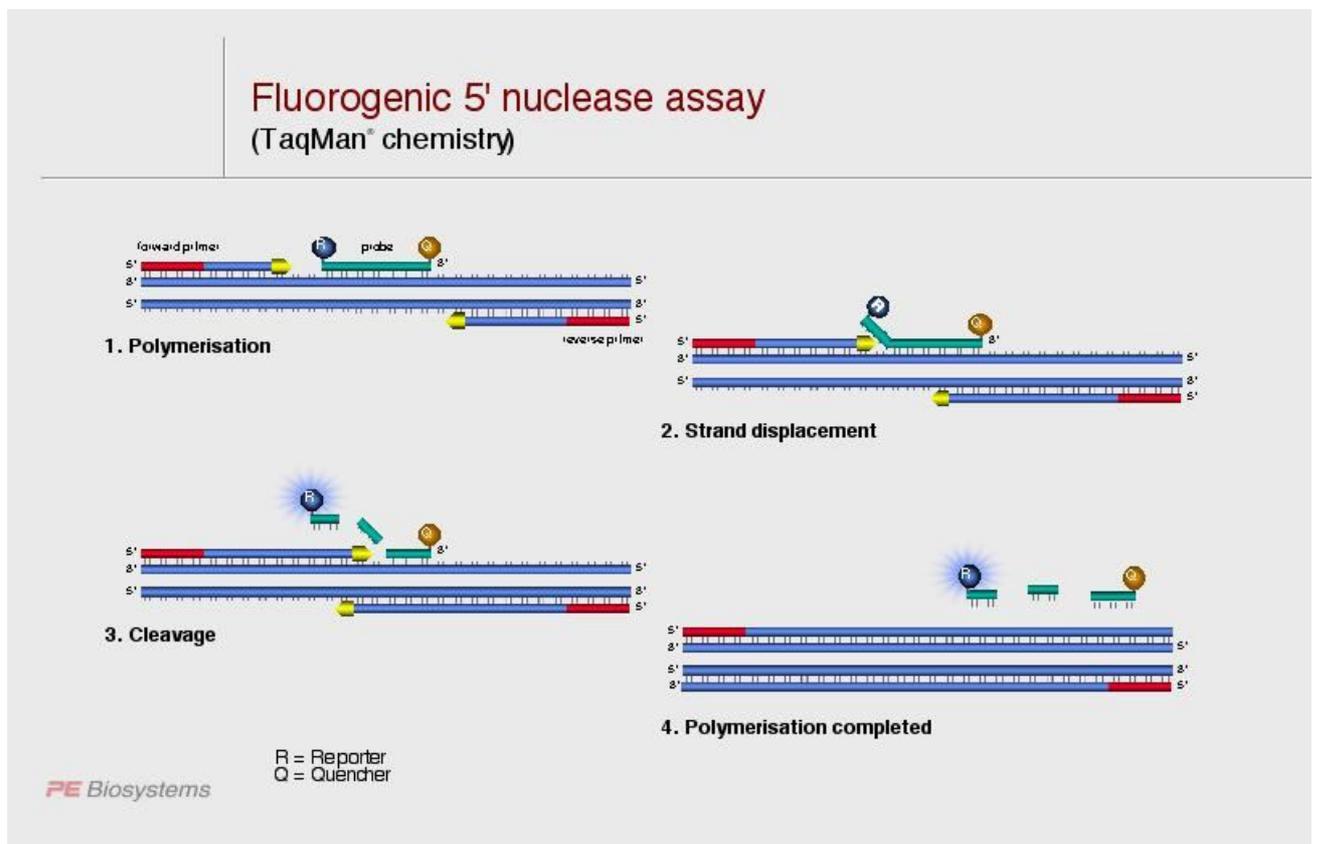
Mentre il secondo utilizza una sonda fluorescente, che si lega in modo specifico alla sequenza del genoma compresa tra i primer, aumentando la specificità del sistema sopra descritto [81,82].

Vi sono vari tipi di sonde, quella utilizzata in questo lavoro è di tipo TaqMan. Essa risulta costituita da un oligonucleotide che, in prossimità della posizione 5', lega una molecola fluorescente ad alta energia detta "reporter", mentre in prossimità della posizione 3', lega una molecola fluorescente a bassa energia, il "quencher". Le molecole fluorescenti che possono essere utilizzate come reporter sono varie quali: FAM (6-carboxy-fluorescein), TET (tetrachloro-6-carboxy-fluorescein), JOE (2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxy-

fluorescein), HEX (hexachloro-6-carboxy-fluorescein) e il VIC; mentre per quanto riguarda il quencher, viene normalmente utilizzato il TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine).

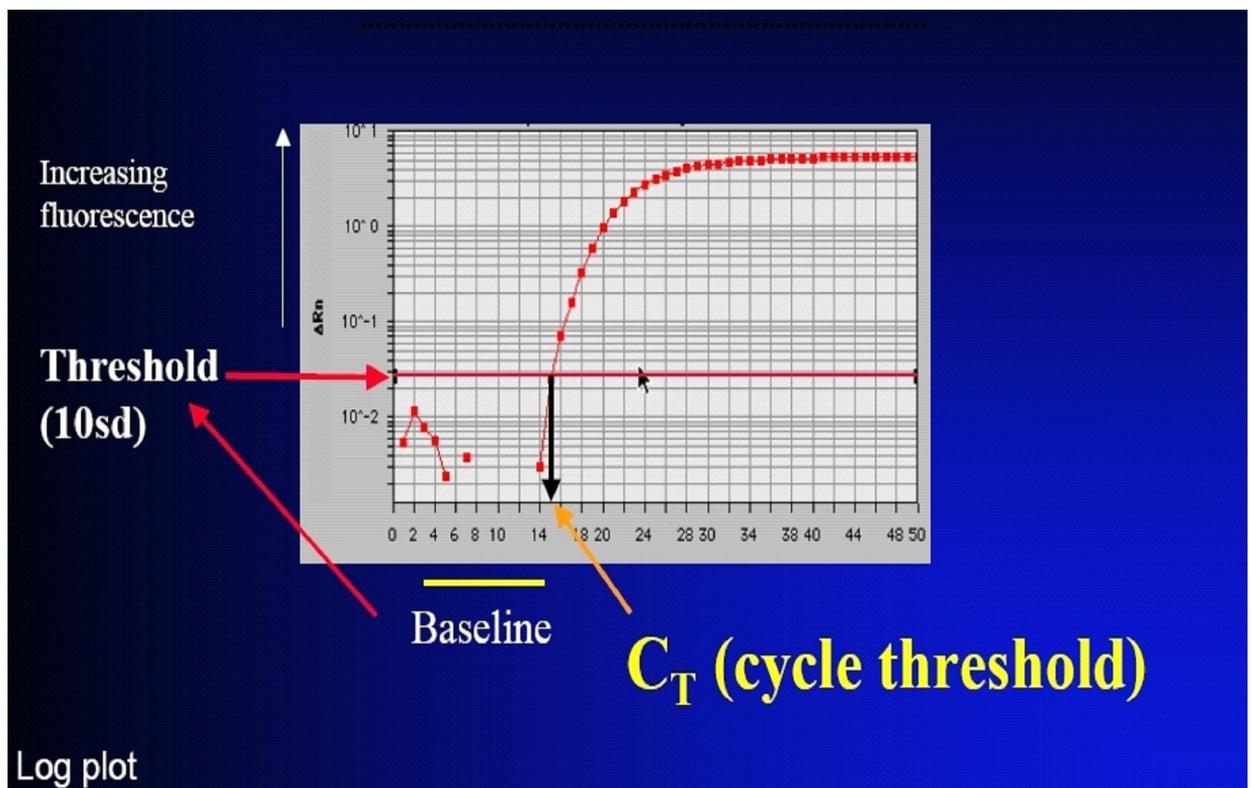
Durante la reazione, la sonda fluorescente si ibridizza per prima alla sequenza di DNA complementare (fig.3.2), successivamente si legano i due primer che innescano l'attività 5'-esonucleasica della DNA polimerasi. Tale enzima catalizza sia la degradazione della sonda che la contemporanea estensione di un nuovo filamento. Quando la sonda è integra il quencher limita l'emissione da parte del reporter, così la fluorescenza emessa è molto bassa, mentre quando la sonda è degradata ed il quencher viene separato dal reporter, quest'ultimo emette fluorescenza alla sua specifica lunghezza d'onda.

Fig 3.2: Meccanismo d'azione della sonda TaqMan



La fluorescenza così emessa, è registrata in automatico dallo strumento ed analizzata da un apposito software che correla il suo incremento con il numero dei cicli di amplificazione; la media della fluorescenza e la sua deviazione standard, evidenziata durante i primi cicli (solitamente i primi 15), vengono utilizzate per calcolare la linea di base (threshold line), cioè un rumore di fondo il cui superamento segnala un aumento visibile dei risultati di amplificazione. Il ciclo, in cui si evidenzia questo aumento della fluorescenza, costituisce l'inizio della fase esponenziale e viene definito ciclo soglia (Cycle Threshold, CT) (fig.3.3). Il CT dipende dal numero di copie iniziali di DNA, dall'efficienza della reazione di PCR e dalla capacità di distacco della sonda fluorescente. Più è alto il numero di copie di DNA in un campione, minore sarà il numero di cicli (valore del CT) necessario per raggiungere un livello rilevabile della fluorescenza.

Fig.3.3: Ciclo soglia (cycle threshold)



3.2 Preparazione dei virus

Il virus HAV (ATCC HM175/18f) è stato propagato in cellule Frp/3. Queste cellule derivate dalla linea cellulare FRhK-4, sono particolarmente idonee alla crescita del virus dell'Epatite A e sono state prodotte a metà degli anni '80 dal gruppo del prof. Panà [69]. Le cellule sono state mantenute nel terreno Eagle's Minimum Essential Medium con 2mM L-glutamina, 0.1 mM amminoacidi non essenziali e 10% di siero bovino ed incubate a 37°C con il 5% di CO₂ in un termostato convenzionale. Gli stock virali sono stati preparati attraverso il congelamento e lo scongelamento ripetuto del monostrato cellulare infettato incubato per 15 giorni. Il lisato cellulare così ottenuto veniva conservato a -80°C fino all'utilizzo. Il titolo infettivo dell'HAV è stato espresso mediante le TCID₅₀ (dose infettante colture cellulari al 50%) determinato attraverso il metodo di Reed and Muench [84] utilizzando diluizioni scalari in piastre Multiwell™ 24 dove in ogni pozzetto contenente terreno Eagle's Minimum Essential Medium con il 10% (v/v) di siero fetale bovino. In ogni pozzetto sono state distribuite 10⁴ cellule Frp/3 ed incubate fino alla formazione del monostrato cellulare. Dopo 48 ore aggiunte quattro aliquote di 100µl di diluizioni seriali di virus per ogni diluizione venivano messe a contatto per un' ora con i monostrati cellulari. Dopo aver allontanato le diluizioni seriali dei virus, ad ogni pozzetto veniva aggiunto Eagle's Minimum Essential Medium con il 2% (v/v) di siero fetale bovino. Le piastre sono state incubate per quindici giorni a 37°C con il 5% di CO₂ ed osservate giornalmente per riscontrare l'effetto citopatico.

Il virus FCV (ATCC VR-782, ceppo F9) è stato propagato nelle cellule Crandell-Reese Feline Kidney (CRFK) (ATCC CCL-94) [85]. Le cellule CRFK sono state mantenute nel terreno Eagle's Minimum Essential Medium con 2mM L-glutamina, 0.1 mM amminoacidi non essenziali e 10% di siero di cavallo ed incubate a 37°C con il 5% di CO₂. Gli stocks virali sono stati preparati attraverso congelamento e scongelamento

ripetuto del monostrato cellulare infettato ed incubato per sette giorni; lo stock virale è stato mantenuto a -80°C fino all'uso.

Il titolo infettivo dell'FCV è stato espresso mediante le TCID₅₀ (dose infettante colture cellulari al 50%) determinato attraverso il metodo di Reed and Muench utilizzando diluizioni scalari in piastre Multiwell™ 24 dove in ogni pozzetto contenente terreno Eagle's Minimum Essential Medium con il 10% (v/v) di siero di cavallo. In ogni pozzetto sono state distribuite 10⁴ cellule CFRK e incubate fino alla formazione del monostrato cellulare. Dopo 48 ore aggiunti quattro aliquote di 100µl di diluizioni seriali di virus per ogni diluizione venivano messe a contatto per un'ora con i monostrati cellulari. Dopo aver allontanato le diluizioni seriali dei virus, ad ogni pozzetto veniva aggiunto Eagle's Minimum Essential Medium con il 2% (v/v) di siero di cavallo. Le piastre sono state incubate per quindici giorni a 37°C con il 5% di CO₂ ed osservate giornalmente per riscontrare l'effetto citopatico.

La titolazione dell'HAV e dell'FCV è stata ripetuta tre volte ed il titolo virale è stato calcolato facendo la media dei risultati.

3.3 Campioni

Gli esperimenti sono stati effettuati su molluschi sperimentalmente contaminati (*Mytilus galloprovincialis*) e, per testare l'efficacia del metodo sviluppato, sono stati utilizzati 11 campioni naturalmente contaminati.

Tutti i molluschi sono stati asetticamente aperti (fig. 3.4) ed in ognuno è stato asportato l'epatopancreas. Trasferiti in piastre di Petri sterili, tutti gli epatopancreas sono stati

finemente tagliati con una lama di rasoio sterile e divisi in aliquote da sei grammi per i successivi test e sono stati conservati a -80°C fino all'utilizzo.

Fig.3.4: Epatopancreas prelevato dai campioni di mollusco



3.4 Contaminazione dei campioni

Un'aliquota degli epatopancreas sezionati è stata utilizzata come controllo negativo e le rimanenti aliquote sono state contaminate come segue:

- A) aggiunta in ogni aliquota di epatopancreas di diluizioni scalari di soluzione virale di HAV per ottenere concentrazioni finali di virus da 5×10^5 fino a $5 \text{ TCID}_{50} \text{ g}^{-1}$
- B) aggiunta in ogni aliquota di epatopancreas di diluizioni scalari di soluzione virale di FCV per ottenere concentrazioni finali di virus da 5×10^6 fino a $5 \text{ TCID}_{50} \text{ g}^{-1}$
- C) aggiunta in ogni aliquota di epatopancreas di diluizioni scalari di soluzione virale di HAV per ottenere concentrazioni finali di virus da 5×10^5 fino a $5 \text{ TCID}_{50} \text{ g}^{-1}$ e simultaneamente aggiunta di una singola diluizione di virus FCV per ottenere una concentrazione di $5 \times 10^6 \text{ TCID}_{50} \text{ g}^{-1}$

I campioni A e B sono stati usati per costruire le rette di regressione in modo da valutare i limiti di determinazione, la linearità ed il recupero del metodo e definire la più adatta concentrazione di FCV da utilizzare per il suo utilizzo come controllo di processo. I campioni C sono stati utilizzati per valutare l'efficacia dell'FCV, alla concentrazione precedentemente individuata, ad essere utilizzato come controllo di processo in campioni con differenti concentrazioni del virus target HAV. Ogni prova è stata ripetuta tre volte ed è stata calcolata la media dei risultati.

3.5 Estrazione e concentrazione dei virus

Ogni aliquota contaminata sperimentalmente è stata divisa in due parti di tre grammi ciascuna e la concentrazione del virus è stata realizzata secondo due differenti metodi:

- A) *Metodo della Proteinasi K*: 3ml di soluzione di proteinasi K (30U/mg) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) sono stati aggiunti in ogni campione. I campioni sono stati incubati a 37°C in un agitatore basculante per 60 minuti e successivamente in bagnomaria a 65°C per 15 minuti. I campioni sono stati poi centrifugati a 3000xg per 5 minuti ed il surnatante (approssimativamente 4.5 ml) è stato recuperato e conservato a -20°C.
- B) *Metodo Glicina/PEG/Cloroformio:Butanolo/CatFloc*: l'estrazione è stata realizzata secondo il metodo Le Guyader et al. con alcune modificazioni [86]. Brevemente, il tampone glicina (pH 9.5) è stato aggiunto ai 3 g di campione in proporzione 1:1 (v/w) ed agitato utilizzando un vortex per 2 minuti, poi è stato aggiunto un volume di soluzione cloroformio:butanolo. Il campione è stato nuovamente agitato utilizzando un vortex per 2 minuti, aggiunto 0,1 volume di

CatFloc (polydiallyl dimethyl ammonium chloride) e successivamente centrifugato a 10000xg per 15minuti a 4°C ed il surnatante è stato trasferito in un provettone da centrifuga da 50 ml. Una soluzione di PEG 6000-NaCl è stato aggiunta al campione al fine di avere una concentrazione finale dell'8% di PEG 6000-0.4M NaCl. Il campione è stato incubato a 4°C per 60 minuti su un agitatore. Infine il campione è stato centrifugato a 10000xg per 20 minuti a 4°C, il surnatante eliminato ed il pellet risospeso in 3ml di tampone fosfato salino (PBS) pH 7.3± 0.2.

3.6 Estrazione e concentrazione dell'RNA virale

Per estrarre l'RNA dai campioni è stato utilizzato il QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Valencia, CA) seguendo le istruzioni del produttore. L'estrazione è stata realizzata a partire da 140µl di soluzione virale o dallo stesso volume del campione di epatopaneas in tampone fosfato salino (PBS) pH 7.3±0.2 preparato come precedentemente descritto. Dopo estrazione i 50µl di RNA ottenuti, sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

3.7 Definizione dei primers e delle sonde

Per l'HAV i primers e la sonda sono stati selezionati nella regione 5'-UTR (circa 600 nucleotidi), la regione più conservata del genoma sulla base degli allineamenti delle sequenze genomiche dei ceppi Los Angeles, BGM e FG del genogruppo 1A (i rispettivi numeri d'accesso al GenBank sono [K02990](#), [X75214](#) e [X83302](#)) ed i ceppi HM175 e MBB del genogruppo 1B (numeri d'accesso al GenBank sono [M14707](#) e [M20273](#)).

Per l'FCV i primers e la sonda sono stati selezionati nella regione ORF1 (nucleotidi 20 fino a 5308 della sequenza GenBank [M86379](#)).

I primers e le sonde selezionate sono riportate nella tab 3.1. Le sequenze sono state allineate usando il software MTT Navigator (Applied Biosystem, Branchburg, NJ, USA) o BioEdit (Ibis Bioscience Carlsbad, CA, USA). I primers e le sonde sono state scelte usando il software Primer Express 1.0 (Applied BioSystems) e testate per verificare eventuali omologie delle sequenze con altri virus enterici utilizzando le applicazioni del programma NCBI's Primer Blast.

Tab. 3.1: Primers e sonde per la determinazione del virus HAV e del virus FCV

Primers e Sonde	Sequenza (5'-3')	Posizione
HAV		
Primer forward	GCGGCGGATATTGGTGAG	458-476
Primer reverse	CAATGCATCCACTGGATGAGA	535-515
Sonda	FAM-TTAAGACAAAAACCATTCAACGCCGGAG-TAMRA	480-507
FCV		
Primer forward	ACAAGTCCGTTGGAGCAATTGA	4881-4902
Primer reverse	CCCCTGAGGTGTCCTTGTGAT	4963-4943
Sonda	VIC-CCTATTGATCCTGACTCTGTTGTTTTCTTGAAGAGAAC-TAMRA	4904-4941

3.8 RT-PCR

I campioni A e B sono stati trattati come segue: 10µl di RNA sono stati aggiunti a 15µl di mix RT contenente 1x StrataScript Buffer (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA), 3mM MgCl₂ (Fermentas, York, UK), 0.2 U di RNase inhibitor (Eppendorf), 10U di AMV reverse transcriptase (Stratagene) e 0.5µM di primer antisenso HAV (campioni A) o di primer antisenso FCV (campioni B). Tale mix è stata incubata a 42°C per 60 minuti e poi è stata portata a 95°C per 5 minuti. I campioni C, contenenti entrambi i virus, sono

stati trattati nello stesso modo aggiungendo 0.5 μ M di entrambi i primers antisenso HAV e FCV.

3.9 Real Time PCR

Tutte le reazioni di amplificazione sono state realizzate in un volume totale di 25 μ L ed analizzate con ABI Prism 7700 sequence detector (Applied BioSystems) in piastre da 96 pozzetti (MicroAmp; Applied BioSystems). Dopo l'ottimizzazione delle concentrazioni dei primers e della sonda, le piastre sono state caricate come segue: in ogni pozzetto, 2.5 μ l di cDNA ottenuti precedentemente sono stati aggiunti a 22.5 μ l di mix Real Time PCR contenenti 1x TaqMan MasterMix (Applied BioSystem), 900nM di ogni primer e 200nM di ogni sonda. Per normalizzare il segnale è stato usato come riferimento interno passivo il ROX. La reazione è stata fatta iniziare riscaldando i campioni a 50°C per 2 minuti e 95°C per 10 minuti, successivamente sono stati effettuati 50 cicli in cui i campioni sono stati portati ripetutamente alla temperatura di 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto.

Due controlli negativi (acqua per biologia molecolare) ed un controllo positivo (RNA estratto da stock HAV o FCV alla concentrazione di 5x10⁶ TCID₅₀ml⁻¹) sono stati introdotti in ogni corsa.

In assenza di amplificazione dei controlli negativi i campioni con un ciclo soglia (Ct) inferiore a 50 sono considerati positivi. Ogni reazione è stata fatta correre in triplicato ed ogni esperimento è stato replicato tre volte.

3.10 Curve standard e limite del metodo di determinazione

Le curve standard sono state ottenute per l'HAV e l'FCV preparando diluizioni scalari degli stock di soluzioni virali. La quantità dei virus è stata espressa in TCID₅₀ ml⁻¹ e la curva standard è stata utilizzata per stimare la quantità di virus determinati nei campioni naturalmente contaminati.

Le curve di regressione dell'HAV e dell'FCV ottenute nei campioni sperimentalmente contaminati sono state usate per stabilire il limite di determinazione del metodo. La curva di regressione FCV è stata anche usata per definire la concentrazione ottimale per il controllo di processo.

L'efficienza dell'amplificazione (E) è stata calcolata usando la seguente equazione: $E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$ [87]. Le percentuali di recupero dell'HAV e dell'FCV sono state valutate con l'equazione $R = 2^{-\Delta C_t}$ [88] tenendo conto del fattore di diluizione.

3.11 Analisi statistica

Le analisi di regressione log-lineari ed il test per il parallelismo sono state realizzate usando il programma GraphPad Prism versione 5.1. Le pendenze delle rette di regressione, le intercette ed i valori di Ct di differenti esperimenti sono stati confrontati usando l'analisi ANOVA comparando i risultati utilizzando il test del Bonferroni. L'ipotesi nulla è stata rifiutata con un valore di P inferiore a 0.05.

3.12 Prove sperimentali su molluschi naturalmente contaminati

Tre grammi di epatopancreas dei diversi campioni (n = 11) sono stati inoculati con il virus FCV fino ad arrivare ad una concentrazione finale di 5×10^6 TCID₅₀ g⁻¹. I campioni sono stati poi sottoposti alla concentrazione del virus attraverso il metodo della

proteinasasi K e l'estrazione dell'RNA, la trascrizione inversa e la Real Time PCR come descritto precedentemente.

4. RISULTATI

I risultati delle prove sperimentali sulle sospensioni virali e sugli epatopancreas inoculati sono riportati nelle tabelle 3.2 e 3.3. Secondo i test sulle sospensioni virali la più bassa concentrazione determinabile è stata $5 \text{ TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ per l'HAV (Ct medio = 36.96 ± 1.68), $5 \times 10^2 \text{ TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ per l'FCV (Ct medio = 35.62 ± 2.06) mentre negli epatopancreas sperimentalmente contaminati il limite di determinazione è stato rispettivamente per l'HAV $5 \times 10^2 \text{ TCID}_{50} \text{ g}^{-1}$ (Ct medio = 37.10 ± 0.66), $5 \times 10^3 \text{ TCID}_{50} \text{ g}^{-1}$ per l'FCV (Ct medio = 39.05 ± 1.48). Inoltre gli esperimenti sui campioni contaminati mostrano che solamente l'estrazione con la proteinasasi K rende possibile la determinazione del virus. Infatti, i campioni soggetti all'estrazione tramite Glicina/PEG/Clor:But/CatFloc hanno sempre dato risultati negativi (Ct > 50).

I parametri delle curve ottenuti dalle sospensioni virali e dai campioni sperimentalmente contaminati sono state riportate nelle tabelle 3.2 e 3.3. Le pendenze delle quattro curve non sono state significativamente differenti ($P=0.73$), mentre le differenze tra le intercette con l'asse delle y sono state molto significative ($P<0.0001$). La linearità è risultata essere accettabile per tutte le curve ($R^2>0.98$) e l'efficienza della reazione va dal 91% al 95% per le amplificazioni dell'HAV e dell'FCV nei campioni contaminati fino al 100% per le amplificazioni delle sospensioni virali.

La percentuale media di recupero dei campioni contaminati è stata dell'1.98% per l'HAV (tra 1.71% – 2.64%) e del 3.35% per l'FCV (tra 2.21 – 4.69%).

Nella tabella 3.4 vengono mostrati i risultati degli esperimenti sui campioni contaminati con diluizioni scalari di HAV e di FCV in una concentrazione tale da poter essere utilizzato come controllo di processo (5×10^6 TCID₅₀ g⁻¹; i valori di Ct erano compresi nell'intervallo 28.77–29.16 con il 95% della probabilità). L'analisi statistica mostra differenze non significative tra i valori di Ct ottenuti per il controllo di processo FCV in presenza di differenti concentrazioni di HAV (P=0.20).

Tab. 3.2: Valori di Ct ottenuti per differenti concentrazioni di HAV e FCV nelle sospensioni virali

Concentrazione (TCID ₅₀ ml ⁻¹)	HAV (Media Ct ±SD)	FCV (Media Ct ±SD)
5x10 ⁷	n.d.	18.88 ± 0.45
5x10 ⁶	17.07 ± 0.41	23.71 ± 1.35
5x10 ⁵	20.25 ± 0.19	27.16 ± 0.78
5x10 ⁴	23.92 ± 0.15	29.91 ± 0.85
5x10 ³	27.47 ± 0.28	33.42 ± 1.19
5x10 ²	30.64 ± 0.28	35.62 ± 2.06
5x10 ¹	33.41 ± 0.99	>50
5	36.96 ± 1.68	n.d.
Parametri delle rette		
Pendenza ± SD	-3.311 ± 0.05	-3.302 ± 0.18
Y-intercetta ± SD	38.69 ± 0.12	44.63 ± 0.99
R ²	0.9988	0.9873
Efficienza (%)	100.44	100.90

n.d. = non determinato

Per gli undici campioni di molluschi naturalmente contaminati, 10 sono risultati essere negativi per l'HAV con valori di Ct dell'FCV che attestano il recupero del virus e la rimozione degli inibitori attestando le caratteristiche del metodo. Un campione, al contrario ha mostrato un valore medio di Ct pari a 35.51 ± 1.42 corrispondente, sulla base della curva standard e della media del recupero del virus, ad una concentrazione di HAV nei campioni di epatopaneas di circa 6×10^3 TCID₅₀ g⁻¹.

Tab 3.3: Valori di Ct ottenuti per differenti concentrazioni di HAV e di FCV in campioni di epatopaneas contaminati.

Concentrazione (TCID ₅₀ g ⁻¹)	HAV		FCV	
	Proteinasi K (Media Ct ± SD)	Gly/PEG/ Chl:But/CatFloc (Media Ct ± SD)	Proteinasi K (Media Ct ± SD)	Gly/PEG/ Chl:But/CatFloc (Media Ct ± SD)
5x10 ⁶	n.d	n.d.	28.71 ± 0.22	>50
5x10 ⁵	26.64 ± 0.72	> 50	32.60 ± 0.36	>50
5x10 ⁴	29.75 ± 0.30	> 50	36.00 ± 0.68	>50
5x10 ³	33.87 ± 0.63	> 50	39.05 ± 1.48	>50
5x10 ²	37.10 ± 0.66	> 50	>50	>50
5x10 ¹	> 50	> 50	n.d	n.d
Parametri della retta				
Pendenza ± SD	-3.550 ± 0.14	-	-3.442 ± 0.06	-
Y- intercetta ± SD	49.59 ± 0.70	-	54.74 ± 0.81	-
R ²	0.9971	-	0.9970	-
Efficienza(%)	91.29	-	95.20	-

n.d. = non determinato

Tab 3.4: Valori di Ct ottenuti contaminando campioni di epatopancreas di molluschi con differenti concentrazioni di HAV ed utilizzando il virus FCV come controllo di processo.

Epatopancreas di mollusco inoculati con HAV		Controllo di processo (FCV)
Concentrazione (TCID₅₀ g⁻¹)	Media Ct ± SD	Media Ct ± SD
5x10 ⁵	27.02 ± 0.20	28.54 ± 0.20
5x10 ⁴	29.76 ± 0.72	28.81 ± 0.32
5x10 ³	33.93 ± 0.78	28.52 ± 0.13
5x10 ²	37.55 ± 0.92	28.71 ± 0.43
5x10 ¹	> 50	29.02 ± 0.25
5	> 50	28.99 ± 0.28
Parametri della retta		
Pendenza ± SD	-3.576 ± 0.20	
Y- intercetta ± SD	47.05 ± 0.85	
R ²	0.9939	
Efficienza (%)	90.39	

5. DISCUSSIONE

In questa tesi di dottorato è stata sviluppata una Duplex Real Time PCR per la simultanea determinazione nei molluschi del virus Epatite A e del Calicivirus Felino scelto come controllo di processo. Il metodo sviluppato, oltre ai vantaggi forniti dall'uso della Real Time PCR (stima del numero di particelle virali in un campione, riduzione dei rischi di contaminazione dovuta alla manipolazione dei campioni, etc...) permette, con l'applicazione del controllo di processo l'identificazione dei potenziali falsi negativi che possono risultare a causa della forte presenza di sostanze inibenti nella matrice di origine. L'uso come controllo di processo dell'FCV, un virus che può essere replicato facilmente nelle colture cellulari e commercialmente acquistabile da collezioni internazionali, si è dimostrato essere una valida opzione in questo studio. Le curve ottenute per l'HAV e l'FCV partendo dalle sospensioni virali hanno mostrato infatti una stretta inversa correlazione tra i valori di Ct e la concentrazione virale, una sensibilità della determinazione attraverso la PCR di 5 TCID₅₀ per l'HAV e di 5x10² TCID₅₀ per l'FCV e un'efficienza di reazione del 100% per entrambe le PCR.

Il confronto tra i due metodi di estrazione (proteinasasi K e Glicina/PEG/Clor:But/CatFloc) mostrano che la proteinasasi K dà migliori risultati nelle prove che hanno interessato sia l'HAV che l'FCV. Infatti solo questo metodo garantisce la determinazione dei virus nei campioni contaminati nonostante la presenza nell'altro metodo del CatFloc, caratterizzato da molecole policationiche che aiutano la flocculazione dei virus aumentando il loro recupero [89,90]. Questo risultato negativo potrebbe essere dovuto o alla perdita del virus durante le numerose fasi di manipolazione del campione o all'intrinseca capacità del composto di concentrare oltre ai virus enterici anche le sostanze inibenti presenti nella matrice di mollusco che possono poi compromettere la reazione di polimerizzazione.

La metodica analitica che si basa sull'utilizzo di proteinasi K, al contrario, ha mostrato un'accettabile rimozione delle sostanze inibenti la PCR come dimostrato dall'efficienza di reazione calcolata sui campioni contaminati (91.29% e 95.20% rispettivamente per la determinazione dell'HAV e dell'FCV) le quali sono leggermente inferiori rispetto ai valori ottenuti con le sospensioni virali.

I risultati avuti con i campioni di epatopaneas contaminati mostrano un recupero virale approssimativamente tra il 2% per l'HAV e del 3% per l'FCV. Tale perdita di particelle virali viene evidenziata da valori più alti di Ct (Δ Ct tra 5.0 e 6.5) ritrovati nelle determinazioni delle soluzioni virali di quanto evidenziato analizzando i campioni sperimentalmente contaminati con le stesse quantità di virus. Tale basso recupero del virus presente nei campioni di mollusco potrebbe essere dovuto alla manipolazione richiesta per la preparazione del campione ed alla scarsa efficacia dell'estrazione dei virus dal campione da parte della proteinasi K.

Il parziale recupero virale e la presenza di inibitori della reazione influenzano la sensibilità del metodo che, sulla base delle curve costruite sui campioni contaminati con l'HAV, mostrano un limite di determinazione di 5×10^2 TCID₅₀g⁻¹, approssimativamente 100 volte più alto del limite stabilito con la sospensione virale (5 TCID₅₀ ml⁻¹).

L'efficacia del metodo proposto è stata alla fine confermata dall'analisi di undici campioni di molluschi comprati in una locale pescheria. Nei campioni che sono risultati negativi, i valori di Ct ottenuti per il controllo di processo FCV hanno confermato l'assenza di risultati falsi negativi. Solamente un campione è risultato essere positivo per la presenza di HAV e la concentrazione virale è stata stimata essere approssimativamente 6×10^3 TCID₅₀ g⁻¹.

Questo metodo di Duplex Real Time PCR potrebbe essere utilizzato sia come metodo qualitativo per determinare la presenza o l'assenza del virus HAV nei campioni analizzati, sia come metodo semi-quantitativo. Esso mostra un recupero confrontabile a quello riportato in precedenti metodi pubblicati [76], anche se diversamente dai metodi fin qui proposti, offre il vantaggio di amplificare simultaneamente sia il controllo di processo che il target di reazione nello stesso pozzetto avendo in tal modo una sostanziale diminuzione dei tempi e dei costi di analisi.

6. RINGRAZIAMENTI

Il mio primo ringraziamento è rivolto alla Dott.ssa Laura Toti ed al Dott. Dario De Medici per l'aiuto, la disponibilità e la cortesia che hanno sempre avuto nei miei confronti e per la possibilità che mi hanno dato di lavorare nel loro laboratorio.

A Simona un sincero ringraziamento per tutto quello che mi ha insegnato, per la pazienza con cui l'ha fatto e per l'affetto che mi ha dimostrato nel corso di questi anni e spero per gli anni che verranno. Mille grazie a Leucio per il suo impagabile supporto tecnico e morale.

Infine grazie di cuore alla mia famiglia ed a Fabrizio a cui dedico questa tesi.

7. BIBLIOGRAFIA

1. **Kaplan, J.E., Feldman, R., Campbell, D.S., Lookabaugh, C. and Gary, G.W.** (1982): The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am. J. Publ. Health* 72: 1329-1332;
2. **Atmar, R.L., Neill, F.H., Romalde, J.L., Le Guyader, F., Woodley, C.M., Metcalf, T.G. and Estes, M.K.** (1995): Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3014-3018;
3. **Ahmad, K.**, (2002): Norwalk-like virus attacks troops in Afghanistan. *Lancet Infect Dis* 2: 391;
4. **Motarjemi, Y., Käferstein, F., Moy, G., Miyagishima, K., Miyagawa S., Reilly A.** (1995): Food technologies and public health. Geneva: Food Safety Unit Division of Food and Nutrition, World Health Organization;. (WHO/FNU/FOS/95.12; Food Safety Issues);
5. **Codex Committee on Food Hygiene.** (1999): Discussion paper on viruses in food. Roma. FAO - Codex Alimentarius Commission. (CX/FH 99/11);
6. **Feachem, R.G., Bradley, D.J., Garelick, H., Mara D.D.** (1983): Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management. John Wiley and sons Inc. New York, N.Y;
7. **Yates, M.V., Yates, S.R.** (1988): Modeling microbial fate in the subsurface environment. *Crit. Rev. Environ. Control*, 17:307-344;
8. **Gerba, C.P.** (2000): Assessment of enteric pathogen shedding during recreational activities and its impact on water quality. *Quant. Microbiol.* 2: 55-68;
9. **Block J.C., Schwartzbrod L.** (1989): Detection and identification of viruses in water systems, John Wiley and sons ed.;

10. **Abad, F.X., Pinto, R.M., Bosch, A.** (1997): Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiol. Lett.* 156: 107-111;
11. **Carducci A. Muscillo M., Cantiani L., Vigetti M., Zucchini A., La Rosa G., Marianelli C.** (1996): Monitoraggio virologico delle acque del Mar adriatico (provincia di Pesaro) in relazione agli indici batterici di balneazione. Atti seduta Scientifica S. It. Sez. Toscana, Firenze, 15 novembre 1996, 39-44;
12. **Enriquez, C.E., Hurst, C.J. and Gerba, C.P.** (1995): Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. *Water Research*, 29: 2548–2553;
13. **Koopmans M., Duizer E.** (2004): Foodborne viruses: an emerging problem. *Intern. J. Food Microbiol.*, 90: 23-41;
14. **Payment, P.** (1998): Waterborne viruses and parasites: resistance to treatment and disinfection. OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water. Interlaken 1998;
15. **Sobsey, M.D., Dean, C.H., Knuckles, M.E. and Wagner, R.A.,** (1980): Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. *Appl Environ Microbiol.* 40: 92-101;
16. **Croci L., Toti L., De Medici D.,** Ricerca degli enterovirus nei molluschi in L. Orefice, Aggiornamenti su alcuni argomenti di microbiologia degli alimenti. Rapporto Istisan 92/36 pag 13-22;
17. **Gary P.R.** (1988): Microbial purification of shellfish, a review of depuration and relaying. *J. Food Prot.* 51: 218-251;
18. **Leclerc, H., Schwartzbrod, L., Dei-Cas, E.** (2002): Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28 (4): 371-409;
19. **Ward, R. L., Akin, E. K.** (1984): Minimum infectious dose of animal viruses. *CRC Crit. Rev. Environ. Contr.*, 14: 2797-310;

- 20. Rao, V.C., Metcalf, T.G., Melnick, J.L.** (1986): Human viruses in sediments, sludges, and soils *Bulletin of the W.H.O.* 64: 1-14;
- 21. Durkop, J.** (1992): Virus. contamination of Surface, Water Trends in Microbial Ecology Proceeding of the Sixth International Symposium on Microbial Ecology Barcelona, 6-11;
- 22. Wilhelmi, I., Roman, E. and Sanchez-Fauquier, A.,** (2003): Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*, 9: 247-62;
- 23. Phan, T.G., Kaneshi, K., Ueda, Y., Nakaya, S., Nishimura, S., Yamamoto, A., Sugita, K., Takanashi, S., Okitsu, S. and Ushijima, H.,** (2007): Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in Noroviruses. *J Med Virol.* 79: 1388-400;
- 24. Panda, S.K., Thakral, D. and Rehman, S.,** (2007). Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 17: 151-80;
- 25. Hansman, G.S., Oka, T., Katayama, K. and Takeda, N.,** (2007). Human sapoviruses: genetic diversity, recombination and classification. *Rev Med Virol* 17, 133-41;
- 26. Koopmans M, von Bonsdorff CH, Vinje J, De Medici D, Monroe S.** (2002): Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev*; 26(2):187-205;
- 27. De Medici D., Paniconi, M.,** Virus trasmessi con i prodotti ittici in B. Pasolini, E Alessi e D. De Medici, Workshop di aggiornamento su problematiche emergenti nel settore dei prodotti ittici, Rapporto Istisan 05/24 pag 65-72;
- 28. Sugieda, M., Nagaoka, H., Kakishima, Y., Ohshita, T., Nakamura, S., Nakajima, S.** (1998): Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol.* 143(6): 1215-21;

- 29. Sugieda, M. and Nakajima, S.** (2002): Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus "Norwalk-like viruses". *Virus Res*: 87: 165-72;
- 30. Worm, H.C., Van der Poel, W.H. and Brandstatter, G.,** (2002): Hepatitis E: an overview. *Microbes Infec*, 4: 657-66;
- 31. Duizer, E., Schwab K.J., Neill F.H., Atmar, R.L., Koopmans, M.P., Estes, M.K.** (2004): Laboratory efforts to cultivate Noroviruses. *J Gen Virol*; 85 (Pt 1): 79-87;
- 32. Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., Brown., F.** (1991): Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. Suppl.*, 2: 320-326;
- 33. Costa-Mattioli, M., Di Napoli, A., Ferre, V., Billaudel, S., Perez-Bercoff, R. and Cristina, J.** (2003): Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* 84: 3191-201;
- 34. Koff RS.,** (1998): Hepatitis A. *Lancet*. 341(9116): 1643 -1649;
- 35. Hollinger, F.B., Ticehurst, J.R.** (1996): Hepatitis A virus. "*Field Virology*", 3rd Edition. (B.N. Fields et al. ed). Lippincott-Raven, Philadelphia, pag.735-782;
- 36. Morace, G.:**Virus dell'Epatite A: aspetti clinici e molecolari in L.Croci e D. De Medici Epatite A trasmessa con gli alimenti. Rapporti Istisan 00/2, pag.13-23;
- 37. Sanchez, G., Bosch, A. and Pinto, R.M.,** (2007). Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects. *Lett Appl Microbiol*, 45: 1-5;
- 38. Robertson, BH, Jansen, RW, Khanna, B, Totsuka, A, Nainan, O.V, Siegl, G, Widell, A, Margolis, HS, Isomura, S, Ito, K, et al.** (1992): Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol*; 73(Pt 6):1365-77;

- 39. Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercof R, Casane D, Colina R, Garcia L, Vega I, Glikman G, Romanowsky V, Castello A, Nicand E, Gassin M, Billaudel S, Ferre V.** (2002): Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol*; 76(18): 9516-25;
- 40. Arankalle, V.A. and Ramakrishnan, J.** (2009): Simian hepatitis A virus derived from a captive rhesus monkey in India is similar to the strain isolated from wild African green monkeys in Kenya. *J Viral Hepat*, 16: 214-8;
- 41. Gauss, Moller, V., Deinhar D.T.** (1984): Effect of hepatitis A virus infection on cell metabolism in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 175: 10-15;
- 42. David, AM.** (2004): The Steering Committee for Prevention and Control of Infectious Diseases Hepatitis A outbreaks: methods of intervention in South-East Asian countries. *Int J Infect Dis.*, 8(4): 201 – 209;
- 43. Purcell, R. H., Feinstone S. M., Ticehurst, J. R., Daemer R. J., Baroudy B. M.** (1984): Hepatitis A virus. 9 - 22. In: Vyas Girish N, Dienstag Jules L, Hoofnagle Jay H. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Grune & Stratton, Inc. (Harcourt Brace Jovanovich, Publishers), Orlando. San Diego . New York . London . Toronto . Montreal . Sydney . Tokyo;
- 44. CDC 2002a:** Global epidemiology of hepatitis A: implications for control strategies [http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/a/global_hepA_epi.pdf];
- 45. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).** (2006): Fiore AE, Wasley A, Bell BP. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2006; 55(RR-7): 1 - 23;
- 46. Barzaga, B.N.,** (2000): Hepatitis A shifting epidemiology in South-East Asia and China. *Vaccine* 18 Suppl 1, S61-4;

- 47. Brundage, S.C. and Fitzpatrick, A.N.,** (2006): Hepatitis A. *Am Fam Physician* 73: 2162-8;
- 48. Richards G.P.** (1988): Microbial purification of shellfish. *J. Food Prot.* 51: 218-251;
- 49. Appleton, H.** (1987): Small round viruses: classification and role in food-borne infections. *CIBA Found. Symp.* 128:108-125;
- 50. Dougherty, W. J., and R. Altman.** (1962): Viral hepatitis in New Jersey 1960-1961. *Am. J. Med.* 32: 704-716;
- 51. Chironna, M., Germinario, C., De Medici, D., Fiore, A., Di Pasquale, S., Quarto, M. and Barbuti, S.** (2002): Detection of hepatitis A virus in mussels from different sources marketed in Puglia region (South Italy). *Int J Food Microbiol* 75: 11-8;
- 52. Kuritsky, J.N., Osterholm M.T., Korlath, J.A., White, K.E., Kaplan., J.E.** (1985): A statewide assessment. of. the role of Norwalk virus in outbreaks of foodborne gastroenteritis. *J Infect. Dis.*, 151: 568-572;
- 53. Morse, D.L., Guewich, J.J., Hanranhan J.P., Strigof R., Shavegani, M., Deibel R., Grabau, J.C., GRABAU J.C., Nowak, N.A., Herman, J.E., Cukor, G., Blacklow, N.R.** (1986): Widespread outbreaks of clam and oyster associated gastroenteritis. Role of Norwalk virus. *New Eng. J. Med.* 314: 678-672;
- 54. Cliver D.O.** (1988) -Virus Transmission via Foods. *Food-Technology*; 241-248;
- 55. Wang, J. X., Y. W. Tang, and Z. Y. Xu.** (1988): A seroepidemiological survey of viral hepatitis during an epidemic in Shanghai. *Acta Acad. Med. Shanghai* 15: 517;
- 56. Douglas A.W., Hackeney C.R., Carrick R.J., Lovelace g., Sobsey M.D.** (1983): Enteric bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in hard shell clams. *J. Food Prot.* 46: 493-496;

- 57. Croci, L.**, Alimenti come veicoli di trasmissione di virus enterici in L.Croci e D. De Medici Epatite A trasmessa con gli alimenti. Rapporti Istisan 00/2, pag.1-10;
- 58. Croci L., De Medici D., Gabrieli R., Franco E., Di Pasquale S., Toti L.** (1992): Effectiveness of water disinfection treatment on depuration of shellfish. *Microb Alim. Nutr.* 10: 129-232;
- 59. Schwab, K.J., Neill, F.H., Le Guyader, F., Estes, M.K. and Atmar, R.L.**, (2001): Development of a reverse transcription-PCR-DNA enzyme immunoassay for detection of "Norwalk-like" viruses and hepatitis A virus in stool and shellfish. *Appl Environ Microbiol*, 67: 742-9;
- 60. Toti, L., Croci, L. and De Medici, D.**, (1992): Food as enteric viruses vehicle. *Ann Ig* 4: 323-8;
- 61. De Medici, D., Ciccozzi, M., Fiore, A., Di Pasquale, S., Parlato, A., Ricci-Bitti, P. and Croci, L.**, (2001): Closed-circuit system for the depuration of mussels experimentally contaminated with hepatitis A virus. *J Food Prot.* 64: 877-80;
- 62. Sobsey, M.D., Davis, A.L., Rullman, V.A.** (1987): Persistence of Hepatitis A virus and other viruses in depurated Eastern oysters., *Proc Oceans 87*, Halifax, Nova Scotia; 5: 1740-1745;
- 63. Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R. and Chanock, R.M.**, (1972): Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10: 1075-81;
- 64. Svensson, L.** (2000): Diagnosis of foodborne viral infections in patients. *Int J Food Microbiol.* 59: 117-26;
- 65. Rabenau, H.F., Sturmer, M., Buxbaum, S., Walczok, A., Preiser, W. and Doerr, H.W.** (2003): Laboratory diagnosis of Norovirus: which method is the best?

Intervirology, 46: 232-8;

66. Cook, N. (2003): The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *J Microbiol Methods*; 53(2):165-74;

67. Leggitt PR, Jaykus LA.(2000): Detection methods for human enteric viruses in representative foods. *J Food Prot*; 63(12):1738-44;

68. Lee, L.H., Phillips, C.A., South, M.A., Melnick, J.L. and Yow, M.D., (1965): Enteric virus isolation in different cell cultures. *Bull World Health Organ*, 32: 657-63;

69. Venuti, A., Russo, C., Del Grosso, N., Patti, A.M., Ruggeri, F.M., De Stasio, R., Martiniello, M.G., Pagnotti, P., Degener, M., Midulla, M., Panà, A. and Perez-Bercoff, R. (1985): Isolation and molecular cloning of a fast-growing strain of human hepatitis A virus from its double-stranded replicative form. *J. Virol.* 57: 579-598;

70. Cromeans, T., Sobsey, M.D. and Fields, H.A., (1987): Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J Med Virol*, 22: 45-56;

71. Konduru K., Kaplan G. G. (2006): Stable Growth of Wild-Type Hepatitis A Virus in Cell Culture. *Journal of Virology*, 80 (3): 1352-1360;

72. Polish, L.B., Robertson, B.H., Khanna, B., Krawczynski, K., Spelbring, J., Olson, F. and Shapiro, C.N., (1999): Excretion of hepatitis A virus (HAV) in adults: comparison of immunologic and molecular detection methods and relationship between HAV positivity and infectivity in tamarins. *J Clin Microbiol*, 37: 3615-7;

73. Mullis, K.B. and Faloona, F.A., (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155: 335-50;

74. Atmar, R. and Estes, M. (2001): Diagnosis of non-cultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin. Microbiol. Rev.*14: 15-37;

- 75. De Medici, D., Croci, L., Suffredini, E. and Toti, L.** (2004): Reverse transcription-booster PCR for detection of noroviruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6329-6332;
- 76. Costafreda, M.I., Bosch, A. and Pinto, R.M.** (2006): Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3846-3855;
- 77. Dubois, E., Hennechart, C., Merle, G., Burger, C., Hmila, N., Ruelle, S., Perelle, S. and Ferre, V.** (2007): Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: characterization of the method performances. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 141- 149;
- 78. Houde, A., Guevremont, E., Poitras, E., Leblanc, D., Ward, P., Simard, C. and Trottier, Y.L.**,(2007): Comparative evaluation of new TaqMan real-time assays for the detection of hepatitis A virus. *J. Virol. Methods* 140, 80-89;
- 79. Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A. and Fach, P.** (2003): Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5835;
- 80. Stanislav, V. S., Garfield, M., Green K.Y.** (2002): Processing Map and Essential Cleavage Sites of the Nonstructural Polyprotein Encoded by ORF1 of the Feline Calicivirus Genome. *Journal of Virology*; 76(14): 7060-7072;
- 81. McKillip JL, Drake M,** (2004): Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J Food Prot*; 67(4): 823-32;
- 82. De Medici D, Di Pasquale S, Delibato E, Gonzalez-Mejuto R, Ciccaglioni G, Toti L.** (2002): Application of quantitative PCR to foodborne pathogenic microorganisms to evaluate preventive measures applied in food safety. *Alimentaria*; 336:11-16;

- 83. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP** (1997): Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*; 22(1):130-1, 134-8;
- 84. Reed, J.L. and Muench, H.**, (1938): A simple method of estimating per cent endpoint. *Amer. J. Hyg.* 27: 493-497;
- 85. Doultree, J.C., Druce, J.D., Birch, C.J., Bowden, D.S. and Marshall, J.A.**, (1999): Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Infect.* 41: 51-57;
- 86. Le Guyader, F.S., Le Saux, J.C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P. and Atmar, R.L.**, (2008): Aichi virus, Norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 46: 4011-4017;
- 87. Klein, D., Janda, P., Steinborn, R., Muller, M., Salmons, B. and Gunzburg, W.H.**, (1999): Proviral load determination of different feline immunodeficiency virus isolates using real-time polymerase chain reaction: influence of mismatches on quantification. *Electrophoresis* 20, 291-299;
- 88. Fleige, S., Walf, V., Huch, S., Prgomet, C., Sehm, J. and Pfaffl, M.W.** (2006): Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol. Lett.* 28: 1601-1613;
- 89. Speirs, J.I., Pontefract, R.D. and Harwig, J.** (1987): Methods for recovering poliovirus and rotavirus from oysters. *Appl Environ Microbiol*, 53: 2666-70;
- 90. Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E. and Pommepuy, M.**, (2000): Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol*, 66: 3241-8.