

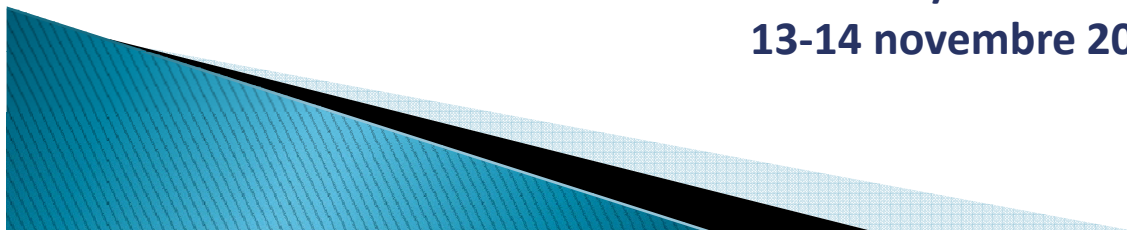


# **IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI ADENOVIRUS E NOROVIRUS NELLE ACQUE**

**Giuseppina La Rosa**

**Istituto Superiore di Sanità  
Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria**

**Corso  
Acque destinate al consumo umano: l'applicazione del Decreto Legislativo  
31/2001  
13-14 novembre 2008**



# MALATTIE IDROTRASMESSE O “WATERBORNE DISEASE”

Le “waterborne disease” rappresentano una problematica di grande rilevanza per la salute umana;

L’ OMS negli ultimi anni ha pubblicato in una serie di documenti una rassegna dei rischi associati alla qualità delle acque in diverse matrici



- Guidelines for Drinking-Water Quality, 2006
- Guidelines for the Safe Use of Wastewater Excreta and Greywater, 2005
- Guidelines for safe recreational waters, 2006
- Protecting Groundwater for Health, 2005
- Water treatment and Pathogen Control, 2004
- Safe Piped Water Managing microbial water quality in piped distribution systems, 2004
- Assessing Microbial Safety of Drinking Water, 2003.



## Virus

Adenovirus  
Enterovirus  
Epatite A virus  
Epatite E virus  
Norovirus e sapovirus  
Rotavirus

## Elminti

*Dracunculus medinensis*  
*Schistosoma* spp.

# PATOGENI RESPONSABILI DI EPIDEMIE DI ORIGINE IDRICA

## Batteri

*Burkholderia pseudomallei*  
*Campylobacter jejuni*, *C. coli*  
*Escherichia coli* – Pathogenicid  
*E. coli* – Enterohaemorrhagic  
*Legionella* spp.  
Non-tuberculous mycobacteria  
*Pseudomonas aeruginosae*  
*Salmonella typhi*  
Altre salmonelle  
*Shigella* spp.  
*Vibrio cholerae*  
*Yersinia enterocolitica*

## Protozoi

*Acanthamoeba* spp.  
*Cryptosporidium parvum*  
*Cyclospora cayetanensis*  
*Entamoeba histolytica*  
*Giardia intestinalis*  
*Naegleria fowleri*  
*Toxoplasma gondii*

Guidelines for Drinking-water Quality, Terza edizione, modificata

# PATOGENI RESPONSABILI DI EPIDEMIE DI ORIGINE IDRICA: VIRUS

Waterborne pathogens and their significance in water supplies  
Guidelines for Drinking-water Quality terza edizione, modificata

<b>Viruses</b>	<b>Health Significance (a)</b>	<b>Persistence in Water Supplies (b)</b>	<b>Resistance to Chlorine (c)</b>	<b>Relative Infectivity (d)</b>	<b>Important Animal Source</b>
Adenoviruses	High	Long	Moderate	High	No
Enteroviruses	High	Long	Moderate	High	No
Hepatitis A virus	High	Long	Moderate	High	No
Hepatitis E virus	High	Long	Moderate	High	Potentially
Noroviruses and sapoviruses	High	Long	Moderate	High	Potentially
Rotaviruses	High	Long	Moderate	High	No

(a) Waterborne transmission confirmed by epidemiological studies and case histories;

(b) Detection period for infective stage in water at 20 °C: short, up to 1 week; moderate, 1 week to 1 month; long, over 1 month;

(c) Resistance moderate, agent may not be completely destroyed;

(d) From experiments with human volunteers or from epidemiological evidence.

# La “Drinking Water Contaminant Candidate List” (CCL) dell’ Environmental Protection Agency americana (USEPA)



L’USEPA ha introdotto diversi virus enterici nella “Contaminant Candidate List” inserendoli tra i principali microrganismi da monitorare per le acque potabili.

## CCL 1 1998

*Acanthamoeba*  
Adenoviruses  
Aeromonas hydrophila  
Caliciviruses  
Coxsackieviruses  
Cyanobacteria (blue-green algae),  
other freshwater algae, and their  
toxins  
Echoviruses  
Helicobacter pylori  
Microsporidia (Enterocytozoon &  
Septata)  
Mycobacterium avium intracellulare  
(MAC)

## CCL 2 2005

Adenoviruses  
Aeromonas hydrophila  
Caliciviruses  
Coxsackieviruses  
Cyanobacteria (blue-green algae),  
other freshwater algae, and their  
toxins  
Echoviruses  
Helicobacter pylori  
Microsporidia (Enterocytozoon &  
Septata)  
Mycobacterium avium intracellulare  
(MAC)

## CCL 3 2008

Caliciviruses  
Campylobacter jejuni  
Entamoeba histolytica  
Escherichia coli (0157)  
Helicobacter pylori  
Hepatitis A virus  
Legionella pneumophila  
Naegleria fowleri  
Salmonella enterica  
Shigella sonnei  
Vibrio cholerae

# ADENOVIRUS E NOROVIRUS

Considerati patogeni “waterborne” emergenti a causa della grande varietà di patologie da essi causata, della loro elevata resistenza ambientale e del loro frequente rilevamento in diversi tipi di ambienti acquatici

## Progetti nazionali ed internazionali

2005-2007: progetto europeo VIROBATHE, "Sixt Framework Programme - Specific targeted research project. Methods for the concentration and detection of adenoviruses and noroviruses in European bathing waters with reference to the revision of the Bathing Water Directive 76/160/EEC".

Il progetto ha visto coinvolti 9 stati (Italia, Francia, Germania, Spagna, Portogallo, Olanda, Regno Unito, Polonia e Cipro) per un totale di 16 gruppi di ricerca compreso l'ISS.



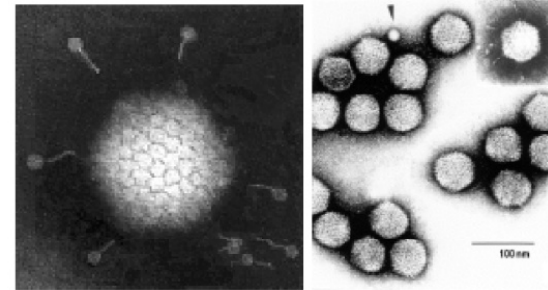
2008 - 2009: Progetto CCM (Centro nazionale per la prevenzione e il controllo delle malattie) del Ministero della Salute riguardante la **diagnostica rapida dei virus (enterovirus, adenovirus, norovirus) nei liquami.**





# ADENOVIRUS: CLASSIFICAZIONE

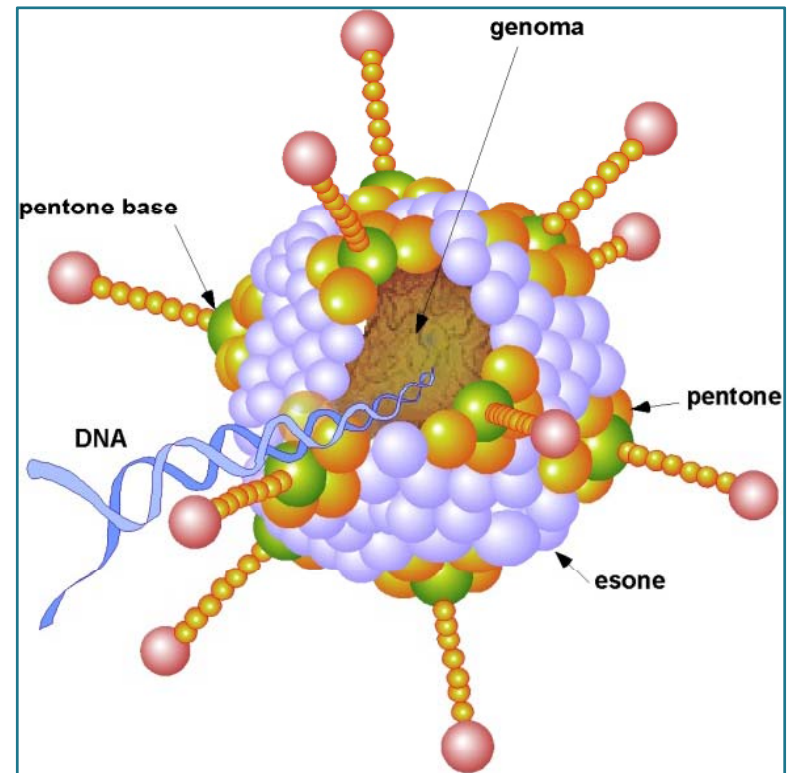
- famiglia *Adenoviridae*
- 51 sierotipi noti di adenovirus umani divisi in sei specie (A-F) sulla base delle loro caratteristiche biologiche, antigeniche e molecolari.



<b>SIEROTIPO</b>	<b>SPECIE</b>
12, 18, 31	A
3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	B
1, 2, 5, 6	C
8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	D
4	E
40, 41	F

# ADENOVIRUS: STRUTTURA E CARATTERISTICHE

- virus a DNA di dimensioni 75 -100 nm
- simmetria icosaedrica (252 capsomeri)
- privi di involucro pericapsidico
- esoni, pentoni e fibre rappresentano i tre antigeni principali
- molto resistenti ad agenti fisici e chimici, resistono a lungo nell'ambiente (più stabili di enterovirus o HAV)





# ADENOVIRUS: MANIFESTAZIONI CLINICHE

## Patologie dell'apparato respiratorio:

- malattia acuta respiratoria (MAR), epidemica;
- faringite acuta febbrile, frequente nei bambini; faringo-congiuntivite febbrile
- broncopolmonite (polmonite atipica virale)
- tracheo-bronchite acuta, più frequente nell'età infantile

## Patologie oculari:

- congiuntivite follicolare
- cheratocongiuntivite epidemica

## Patologie gastro-enteriche:

- gastroenteriti sporadiche ed epidemiche

## Altre patologie:

- febbre esantematica, in particolare nei bambini; complicanze encefaliche, meningitiche, miocarditiche, pericarditiche, renali, infezioni vie urinarie



# ADENOVIRUS: MANIFESTAZIONI CLINICHE

RECENTEMENTE ALCUNI SIEROTIPI "EMERGENTI" SI SONO  
MOSTRATI PARTICOLARMENTE VIRULENTI

2007

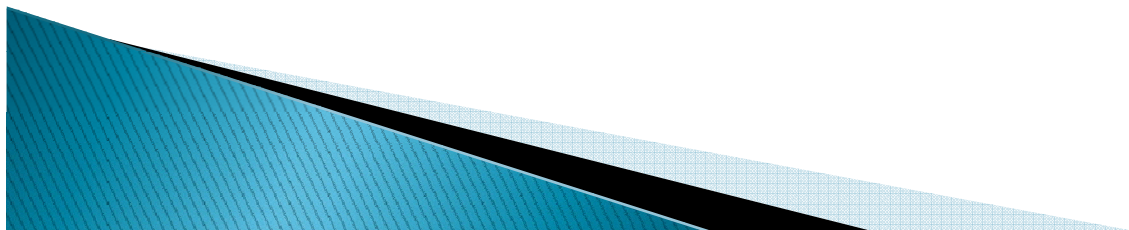
Usa: Adenovirus 14, almeno 10 morti

Vittime di forte costituzione, almeno 140 individui colpiti

(ANSA) - WASHINGTON, 15 NOV - Un nuovo tipo di adenovirus ha già ucciso almeno 10 persone negli Usa mentre altre 24 persone hanno rischiato di morire. L'adenovirus 14 ha già colpito in 4 stati - New York, Oregon, Washington e Texas - attirando l'attenzione dei ricercatori perché tra le vittime vi sono giovani adulti di forte costituzione. Come è il caso di una recluta di 19 anni in addestramento in una base aerea. L'adenovirus ha colpito almeno 140 persone mandandone una cinquantina in ospedale.

**Stephen G. Baum, MD** *An unusual adenovirus, type 14, has caused several outbreaks of respiratory disease, with considerable morbidity and mortality.*

**Journal Watch Infectious Diseases December 5, 2007**



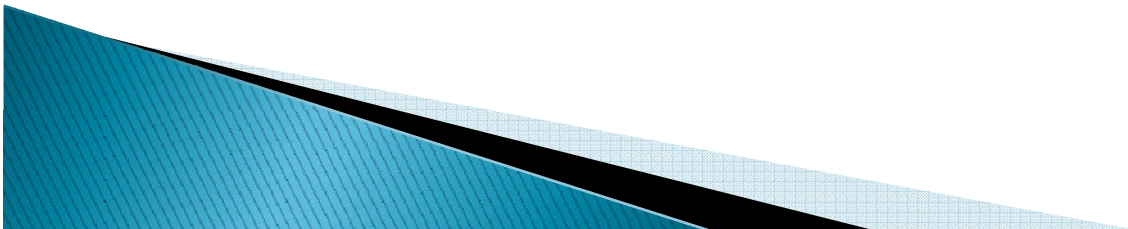
# ADENOVIRUS: TRASMISSIONE

## Eliminazione all'esterno tramite:

- feci
- urina
- secrezioni oro-faringee
- liquido congiuntivale

## Vie di contagio

- oro-fecale (anche attraverso alimenti ed acqua)
- respiratoria
- contatto diretto (mani, occhi)

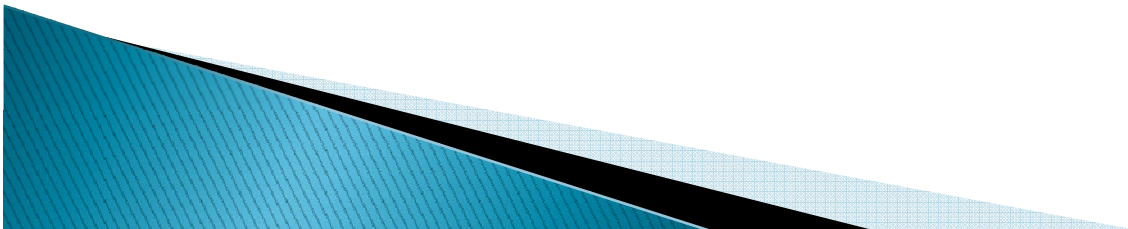


# ADENOVIRUS: DIFFUSIONE NEGLI AMBIENTI IDRICI

Numerosi dati bibliografici testimoniano il rilevamento di adenovirus in diversi ambienti idrici:

- acque reflue
- acque destinate ad uso ricreativo (fiume, mare, laghi, piscine)
- acque destinate alla potabilizzazione

Jiang SC. **Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review.** Environ Sci Technol. 2006 Dec 1;40(23):7132-40. Review.



## **ADENOVIRUS: DIFFUSIONE NELLE ACQUE SUPERFICIALI**

### **REPORTS**

Tani et al. 1992, 1995

Grohmann et al. 1993

Puig et al. 1994

Genthe et al. 1995

Pina et al. 1998

Vantarakis and Papapetropoulou  
1998

Castignolles et al. 1998

Chapron et al. 2000

Cho et al. 2000

Jiang et al. 2001

Greening et al. 2002

Van Heerden et al. 2003, 2004,  
2005

Jiang and Chu 2004

Lee and Jeong 2004

Lee et al. 2004

Lee et al. 2005

Pusch et al. 2005

Fong et al. 2005

Haramoto et al. 2005

Choi and Jiang 2005

### **SAMPLE SOURCE**

river water, Japan

river water, coastal water, and  
stormwater, Australia

river water, Spain

surface water, South Africa

river and coastal water, Spain

bathing beach water, Greece

Seine River, France

surface water, U.S.

river water, South Korea

coastal water, Southern California,  
U.S.

river water, New Zealand

river and dam water used as sources  
for drinking water, South Africa

river water, Southern California, U.S.

surface water used as source for  
drinking water, South Korea

river water, South Korea

surface water, South Korea

mining Lake, German

coastal water, Georgia, U.S.

surface water, Japan

river water, Southern California, U.S.

### **METHODS OF DETECTION**

tissue culture

tissue culture

nested PCR

gene probe

nested PCR

nested PCR

Nested PCR

ICC-nested PCR

RT-multiplex- nested PCR

nested PCR

ICC-PCR and nested PCR

ICC-nested PCR, QPCR

nested PCR

tissue culture CPE assay and ICC-  
nested PCR

Two cell lines-ICC- multiplex- nested  
RT-PCR

one cell line-ICC- multiplex- nested  
RT-PCR

nested PCR

nested PCR

QPCR

QPCR and tissue culture



## **ADENOVIRUS: DIFFUSIONE NELLE ACQUE DI PISCINA**

<b>REPORTS</b>	<b>SAMPLE SOURCE</b>	<b>METHODS OF DETECTION</b>
D' Angelo et al. 1979	pool water in a private recreational facility, U.S.	tissue culture
Martone et al. 1980	pool water in a private recreation center, U.S.	tissue culture
Turner et al. 1987	pool water, U.S.	tissue culture
Papapetropoulou and Vantarakis 1998	pool water, Greece	nested PCR
McMillan et al. 1992	swimming pond water for summer camp recreation, U.S.	tissue culture
Harley et al. 2001	pool water for summer camp recreation, Northern Queensland, Australia	tissue culture
van Heerden et al. 2005	pool water, South Africa	nested PCR

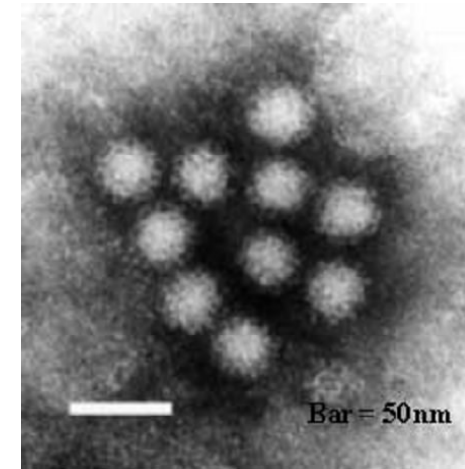


## **ADENOVIRUS: DIFFUSIONE NELLE ACQUE POTABILI**

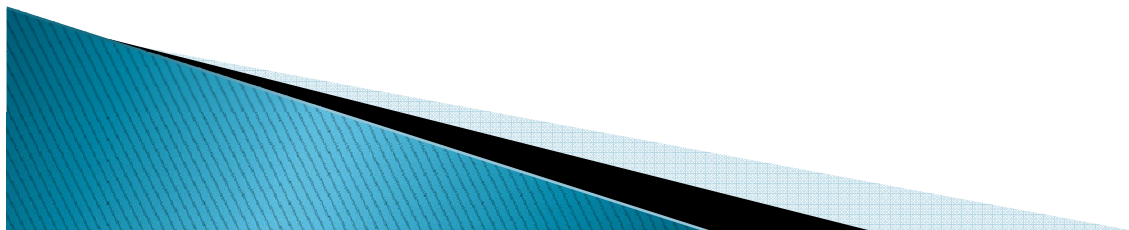
<b>REPORTS</b>	<b>SAMPLE SOURCE</b>	<b>METHODS OF DETECTION</b>
Genthe et al. 1995	treated drinking water, South Africa	gene probe
Cho et al. 2000	tap water, South Korea	RT-multiplex-nested PCR
Grabow et al. 2001	treated drinking water, South Africa	nested PCR
Van Heerden et al. 2003, 2004, 2005	treated drinking water, South Africa	ICC-nested PCR, real-time PCR
Lee and Kim 2002	tap water, South Korea	ICC-multiplex-nested RT-PCR, followed by sequence identification
Lee and Jeong 2004	finished drinking water and tap water, South Korea	tissue and ICC-nested-PCR
Lee et al. 2005	tap water, South Korea	one cell line tissue culture and ICC-multiplex-nested PCR
Albinana-Gimenez et al., 2006	drinking-water treatment plant, Spain	Real-Time PCR
Lambertini et al., 2008	in municipal wells, Wisconsin	(ICC)-Real-Time-PCR

# NOROVIRUS : INTRODUZIONE

➤ I norovirus presentano diffusione mondiale e nei paesi industrializzati sono i più comuni agenti virali responsabili di epidemie di gastroenterite (ruolo importante anche nelle gastroenteriti sporadiche)

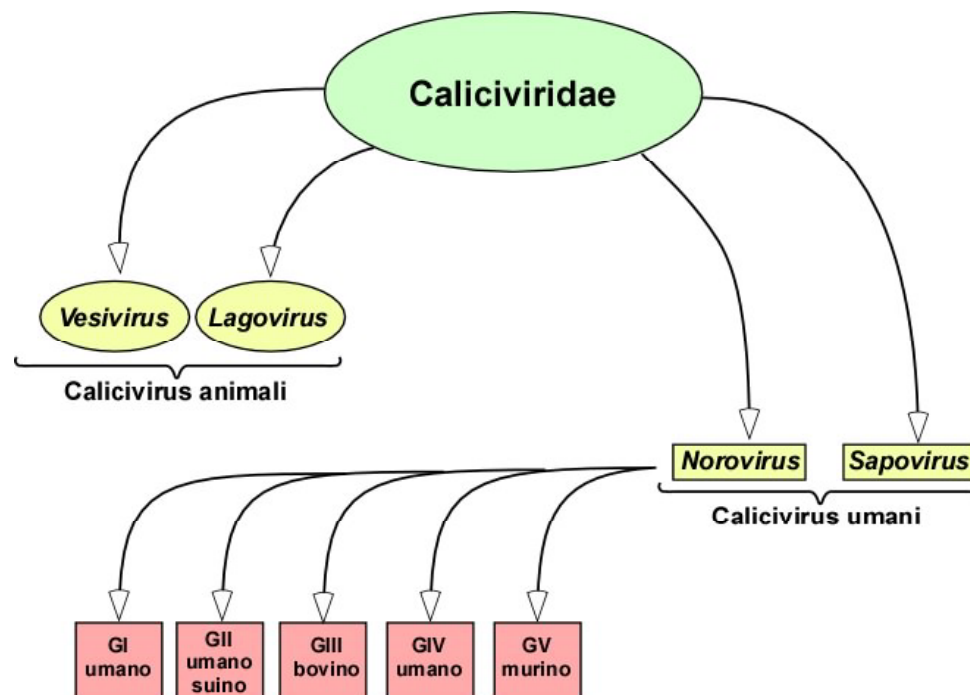


➤ possono dare origine ad epidemie idrotrasmesse legate a consumo diretto di acqua o ad attività ricreative.



# NOROVIRUS : CLASSIFICAZIONE

➤ la famiglia **Caliciviridae** comprende quattro generi: **Lagovirus**, **Vesivirus**, **Sapovirus** e **Norovirus** di cui i primi due sono di pertinenza veterinaria mentre gli altri sono agenti eziologici di gastroenterite umana.



➤ classificati in cinque diversi genogruppi (GI – GV) suddivisi in 30 *cluster* genetici (8 in GI, 17 in GI I, 2 in GI II, 2 in GI V e 1 in GI V) a loro volta comprendenti diversi genotipi.

# NOROVIRUS : CLASSIFICAZIONE

Ospite	GI	GII	GIII	GIV	GV
--------	----	-----	------	-----	----

uomo	1-8	1-10, 12-17		1	
------	-----	-------------	--	---	--

maiale		11, 18, 19			
--------	--	------------	--	--	--

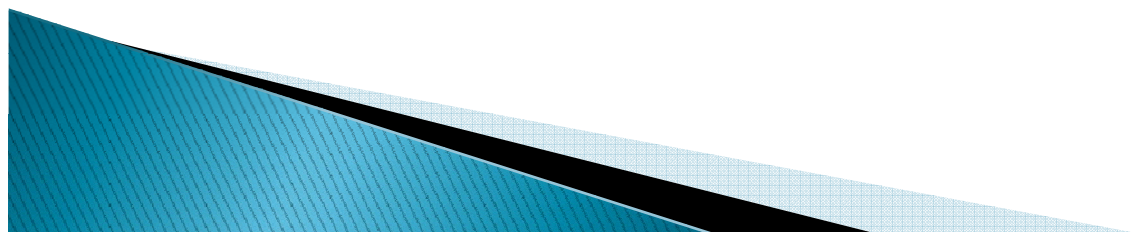
bovino			1, 2		
--------	--	--	------	--	--

leone				2	
-------	--	--	--	---	--

cane				2	
------	--	--	--	---	--

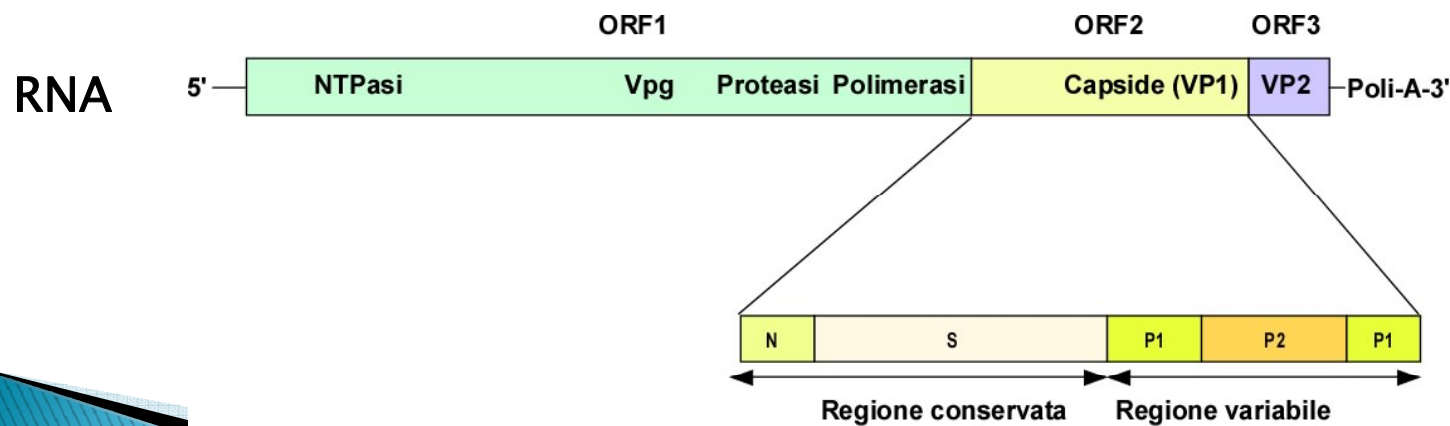
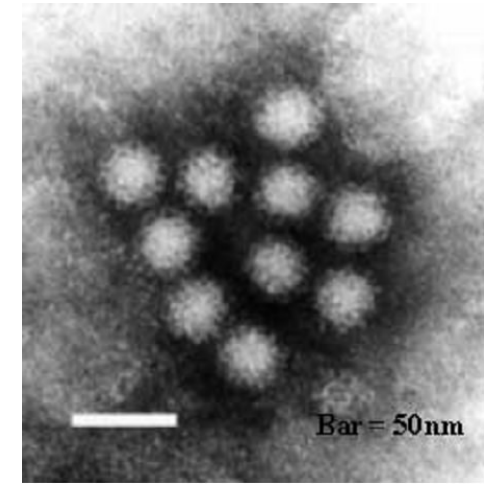
topo					1
------	--	--	--	--	---

\*Martella et al. Emerg Infect Dis. 2008 14(8):1306-8, modificata



# NOROVIRUS : STRUTTURA VIRALE

- piccoli virus a RNA a singola elica, privi d'involucro, con una coda poliadenilata all'estremità 3' ed una proteina (VPg) legata al 5'
- caratterizzati da una struttura circolare e dal tipico asse di simmetria icosaedrico con dimensioni medie comprese tra 27 e 35 nm.



# NOROVIRUS : CARATTERISTICHE

Principali caratteristiche che facilitano la diffusione dei norovirus:

Bassa dose infettante (10-100 particelle virali); nelle feci di pazienti infetti il livello di particelle virali può raggiungere le 10.000.000 unità per grammo mentre un solo episodio di vomito può disseminare nell'ambiente 30.000.000 particelle virali.



la contagiosità dei norovirus è molto elevata

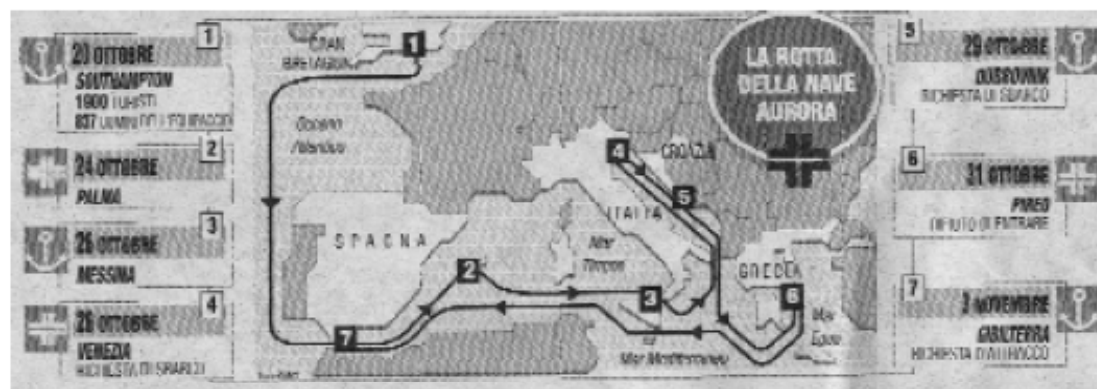


in comunità più o meno ristrette come ospedali, ristoranti, scuole, navi da crociera.. possono verificarsi vaste epidemie a rapida diffusione.





# NOROVIRUS E LE NAVI DA CROCIERA



**Epidemia di norovirus sulla nave Aurora, dove oltre 800 persone (passeggeri e personale) sono state coinvolte in un'epidemia di vomito-diarrea durante una crociera nel Mediterraneo.**

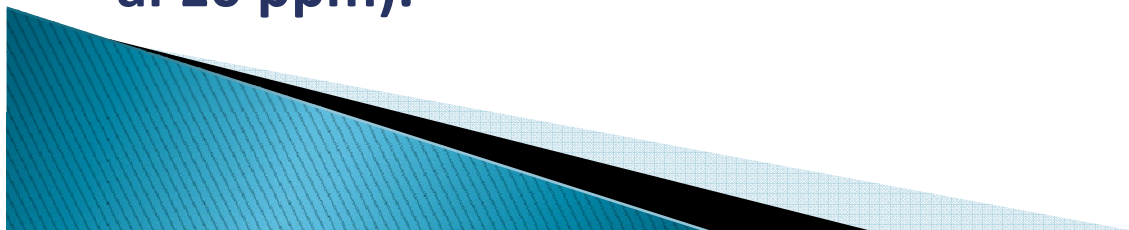
# **NOROVIRUS : CARATTERISTICHE**

## **Escrezione prolungata e talora asintomatica:**

- l'escrezione virale può manifestarsi sia prima della presenza dei sintomi clinici che dopo la guarigione clinica
- l'eliminazione virale può persistere fino a 3 settimane dall'infezione in circa il 30% dei pazienti
- pazienti immunocompromessi possono eliminare il virus anche per diversi mesi

## **Stabilità ambientale:**

presentano elevata resistenza nell'ambiente; riescono a sopravvivere a temperature superiori ai 60°C ed inferiori ai 0°C o a trattamenti di clorazione (con concentrazioni di cloro fino ai 10 ppm).



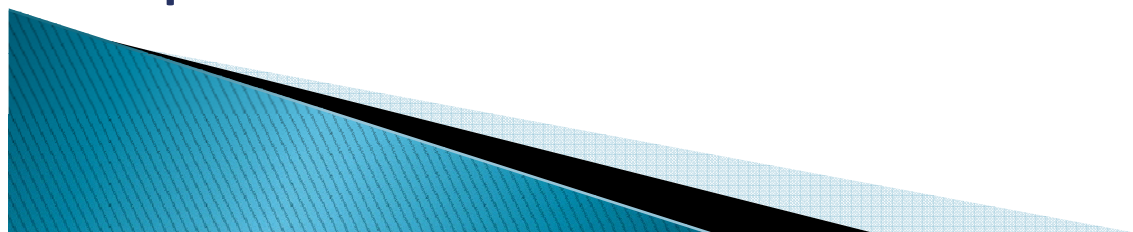
# NOROVIRUS : CARATTERISTICHE

➤ estrema diversità genetica: cinque diversi genogruppi suddivisi in 30 *cluster* genetici ciascuno comprendenti diversi tipi

- capacità di accumulare mutazioni genetiche
- fenomeni di ricombinazione genica tra virioni infettanti la stessa cellula

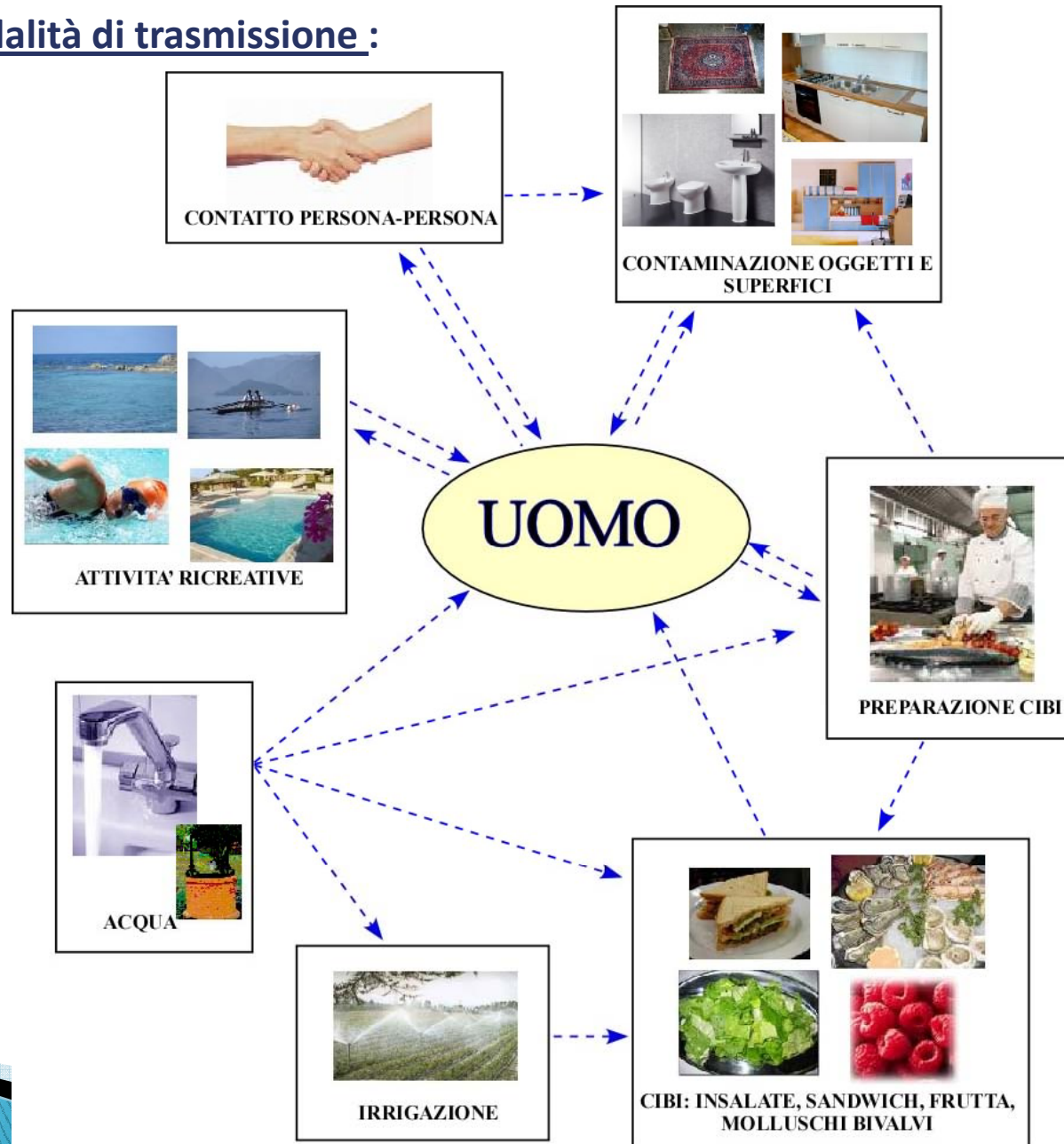


Tale variabilità genera continuamente nuove varianti che possono sostituire i ceppi predominanti circolanti in un dato momento nella popolazione in quanto meglio adattate ad infettare ospiti suscettibili o a sopravvivere nell'ambiente in presenza di fattori inattivanti.



# NOROVIRUS : CARATTERISTICHE

➤ molteplici modalità di trasmissione :



## Molteplici modalità di trasmissione :

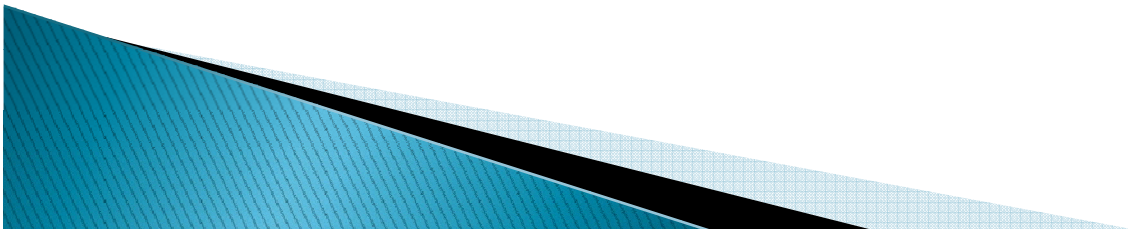
➤ ***consumo di alimenti o bevande contaminate***

(insalate, cibi freddi, frutta, carne, pesce, prodotti da forno, molluschi eduli lamellibranchi)

Acqua di rubinetto, acqua minerale, acqua di pozzo, acqua di fiume, ghiaccio, acqua di lago, acque destinate ad usi ricreativi (mare, piscine), possono tutte essere possibili sorgenti di infezione

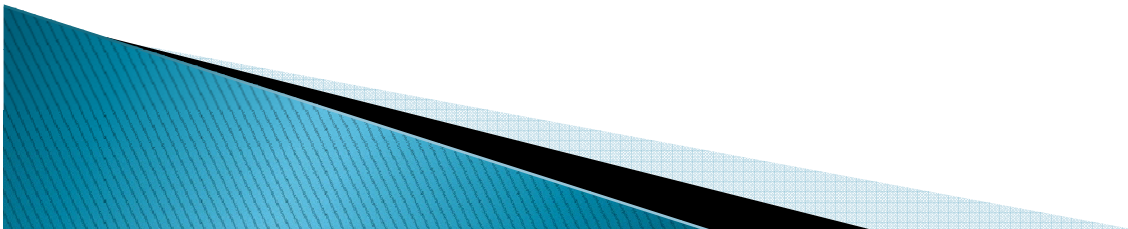
➤ ***contatto persona-persona o attraverso superfici contaminate***

➤ ***diffusione per via aerea*** (attraverso la formazione di aerosol contenenti il virus).



# **NOROVIRUS : DIFFUSIONE ED EPIDEMIOLOGIA**

- i norovirus presentano diffusione mondiale e nei paesi industrializzati sono i maggiori responsabili di gastroenterite epidemica
- i CDC americani stimano che ogni anno 23 milioni di casi di gastroenteriti acute siano dovuti ad infezioni da norovirus
- i sistemi di sorveglianza europei indicano i norovirus come responsabili di circa il 50% dei casi di gastroenteriti riportati in diversi paesi
- in Italia non esiste un sistema di sorveglianza per le gastroenteriti non batteriche ed è quindi molto difficile stimare l'impatto del norovirus sulla popolazione.





## NOROVIRUS : EPIDEMIE IDROTRASMESSE

➤ Sono riportati in letteratura oltre 40 descrizioni di *waterborne disease* da norovirus legate a consumo diretto di acqua di diversa origine, o ad attività ricreative

(La Rosa *et al.*, 2008, ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY 4(1).

STUDIO	ANNO	PROBABILE FONTE DI CONTAMINAZIONE	PAESE
(Almagro-Nieves <i>et al.</i> 2006)	2002	Consumo di acqua	Spagna
(Anderson <i>et al.</i> 2003)	2001	Consumo di acqua	USA
(Baron <i>et al.</i> 1982)	1979	Attività ricreative (Nuoto in lago)	USA
(Beller <i>et al.</i> 1997)	1995	Consumo di acqua (pozzo)	USA
(Boccia <i>et al.</i> 2002)	2000	Consumo di acqua	Italia
(Brieseman <i>et al.</i> 2000)	1996	Consumo di acqua	Nuova Zelanda
(Brown <i>et al.</i> 2001)	1998	Consumo di acqua	Bermuda
(Brugha <i>et al.</i> 1999)	1994	Consumo di acqua	Inghilterra
(Cannon <i>et al.</i> 1991)	1987	Consumo di ghiaccio	USA
(Carrique-Mas <i>et al.</i> 2003)	2002	Consumo di acqua	Svezia
(cdc 2004)	2004	Attività ricreative (nuoto piscina)	USA
(cdc 2007)	2006	Consumo di acqua	USA
(Gallay <i>et al.</i> 2006)	2000	Consumo di acqua	Francia
(Godoy <i>et al.</i> 2006)	2005	Consumo di acqua	Spagna
(Gray <i>et al.</i> 1997)	1994	Attività ricreative (canottaggio)	Gran Bretagna
(Hafliger <i>et al.</i> 2000)	1998	Consumo di acqua	Svizzera
(Hoebe <i>et al.</i> 2004)	2002	Attività ricreative (giochi in fontana)	Paesi Bassi
(Kaplan <i>et al.</i> 1982)	1980	Consumo di acqua	USA
(Kappus <i>et al.</i> 1982)	1977	Attività ricreative (nuoto in piscina)	USA
(Khan <i>et al.</i> 1994)	1993	Consumo di ghiaccio	Hawaii
(Kim <i>et al.</i> 2005)	2004	Consumo di acqua	Korea
(Kukkula <i>et al.</i> 1997)	1994	Consumo di acqua	Finlandia
(Kukkula <i>et al.</i> 1999)	1998	Consumo di acqua	Finlandia
(Kuusi <i>et al.</i> 2004)	2000	Consumo di acqua	Finlandia
(Lawson <i>et al.</i> 1991)	1989	Consumo di acqua	USA

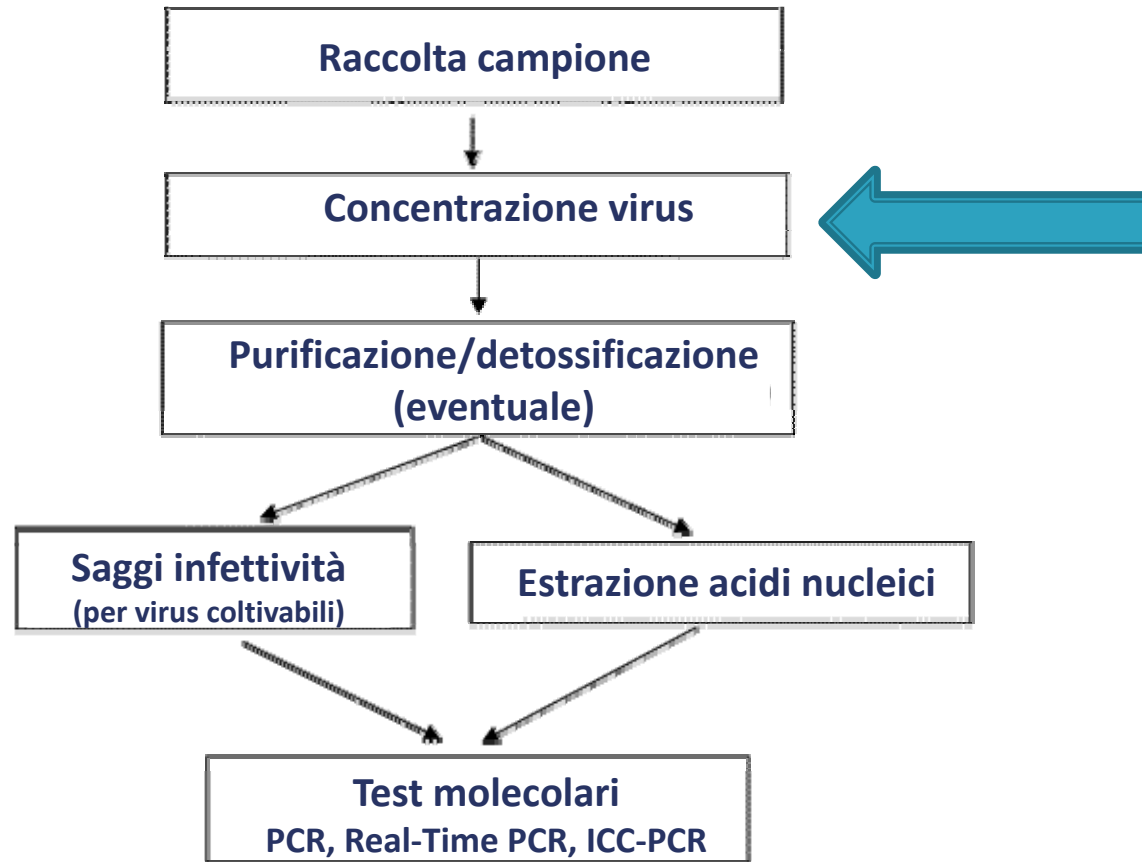
.. CONTINUA..

# NOROVIRUS : EPIDEMIE IDROTRASMESSE

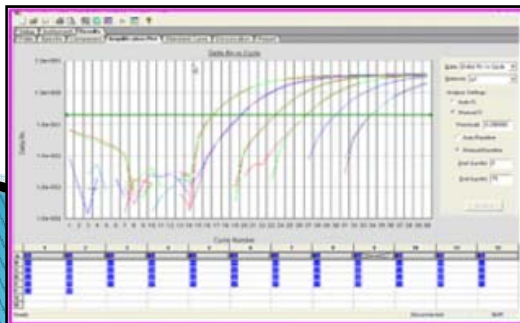
.. CONTINUA..

STUDIO	ANNO	PROBABILE FONTE DI CONTAMINAZIONE	PAESE
(Maunula <i>et al.</i> 2004)	2001	Attività ricreative (nuoto in piscina)	Finlandia
(Maunula <i>et al.</i> 2005)	1998-2003	Consumo di acqua	Finlandia
(Maurer and Sturchler 2000)	1998	Consumo di acqua	Svizzera
(McAnulty <i>et al.</i> 1993)	1989	Consumo di acqua (fiume)	Australia
(Nygard <i>et al.</i> 2003)	2001	Consumo di acqua	Svezia
(Nygard <i>et al.</i> 2004)	2002	Consumo di acqua, utilizzo di docce	Norvegia
(O'Reilly <i>et al.</i> 2007)	2004	Consumo di acqua	USA
(Papadopoulos <i>et al.</i> 2006)	2005	Consumo di acqua	Grecia
(Parshionikar <i>et al.</i> 2003)	2001	Consumo di acqua e/o ghiaccio	USA
(Podewils <i>et al.</i> 2007)	2004	Attività ricreative (nuoto in piscina)	USA
(Sartorius <i>et al.</i> 2007)	2004	Attività ricreative (nuoto in lago)	Svezia
(Schmid <i>et al.</i> 2005)	2005	Consumo di acqua	Austria
(Schvoerer <i>et al.</i> 1999)	1999	Consumo di acqua	Francia
(Taylor <i>et al.</i> 1981)	1978	Consumo di acqua	USA
(Tokutake <i>et al.</i> 2006)	2004	Consumo di acqua	Giappone
(Godoy <i>et al.</i> 2006)	2006	Consumo di acqua	Spagna
Papadopoulos <i>et al.</i> 2006)	2006	Consumo di acqua	Grecia
Rizzo <i>et al.</i> 2007)	2007	Consumo di ghiaccio	Italia
(Schmid <i>et al.</i> 2005)	2005	Consumo di acqua	Austria
(CDC 2007)	2006	Consumo di acqua	USA
(Hewitt <i>et al.</i> 2007)	2007	Consumo di acqua	Nuova Zelanda
(Martinelli <i>et al.</i> 2007)	2007	Consumo di acqua	Italia

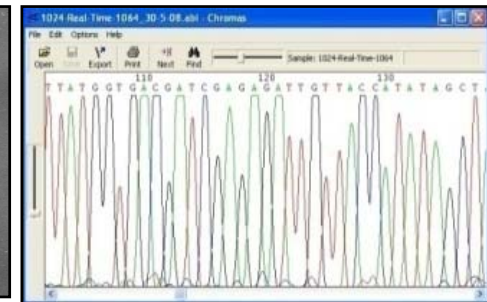
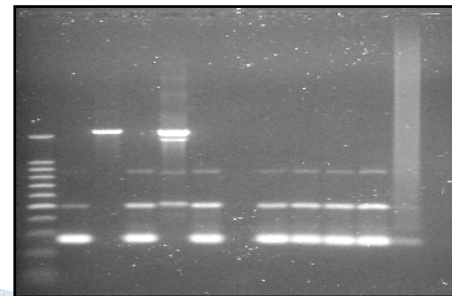
# IDENTIFICAZIONE VIRALE IN CAMPIONI DI ACQUA



**PCR quantitativa**



**PCR qualitativa**



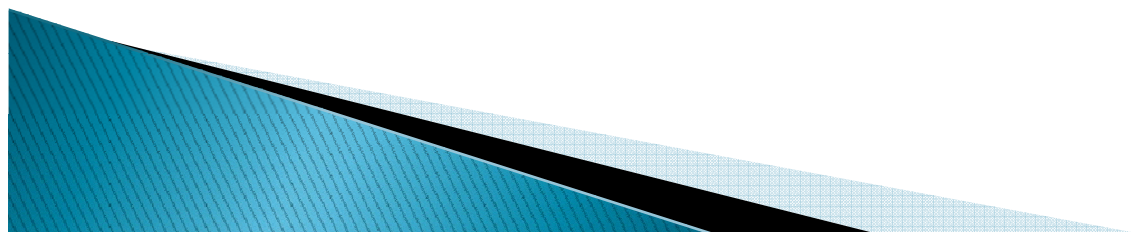
# **CONCENTRAZIONE DI VIRUS**

**Numerosi metodi sono stati messi a punto per la concentrazione di virus da matrici acquatiche.**

**Per essere ottimale un metodo di concentrazione deve seguire i seguenti criteri :**

- (i) tecnicamente facile da realizzare in breve tempo;**
- (ii) elevato tasso di recupero del virus;**
- (iii) adatto per una vasta gamma di virus;**
- (iv) piccolo volume di concentrato finale;**
- (v) non costoso;**
- (vi) in grado di processare anche grandi volumi di acqua;**
- (vii) ripetibile (all'interno di un laboratorio) e riproducibile (tra laboratori).**

**Non esiste un unico metodo che abbia tutti questi requisiti.....**



# CONCENTRAZIONE DI VIRUS

**Table 1** Summary of concentration techniques for viruses in water and water-related materials Journal of Applied Microbiology 2001, 91, 945±962

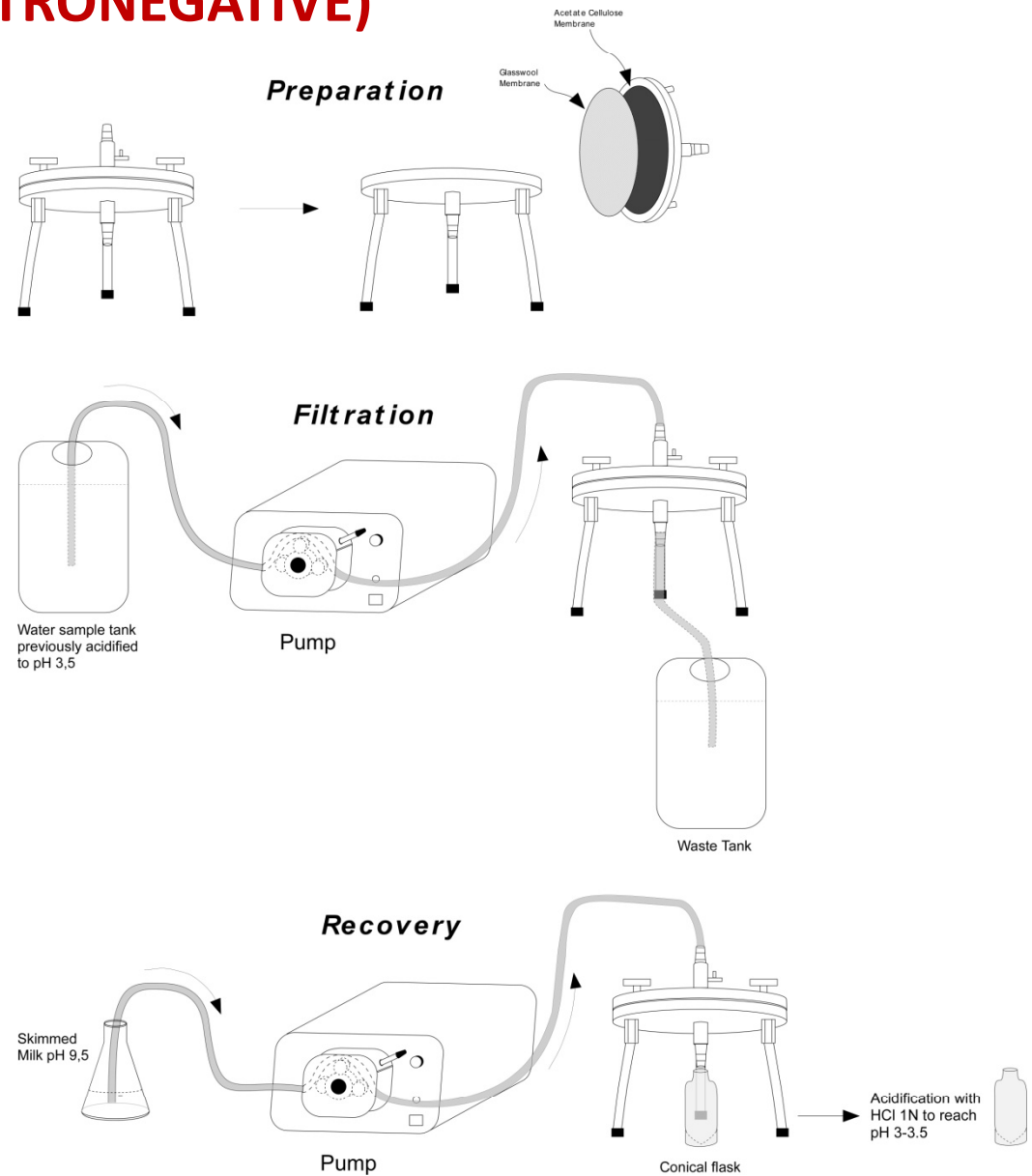
Technique	Method	Water quality	Initial volume (litres)	Relative virus content	Recovery	Capital cost	Revenue cost
Adsorption/elution	Gauze pads	Sewage or effluent	Large	High	Low to medium	Nil	Very low
	Electronegative membranes	All waters	1-1000	Low to medium	50-60% with practice	Medium	Medium
	Electropositive membranes	All waters	1-1000	Low to medium	50-60% with practice	Medium	High
	Electronegative cartridges	Any low turbidity	1-50	Low to medium	Variable: higher with clean waters	Low	Low
	Electropositive cartridges	All waters	1-1000	Low to medium	Variable	Medium	High
	Glass wool	All waters	1-1000	Low to medium	Variable	Low	Very low
	Glass powder	All waters	< 100	Any	20-60%	Medium	Low
Entrapment: ultrafiltration	Alginate membranes	Clean only	Low	High	Good	Low	Low
	Single membranes	Clean	Low	Any	Variable	Medium	Low
	Tangential (= cross) flow and hollow fibres	Treated effluents or better	High	Low	Variable	High	Medium
	Vortex flow	Treated effluents or better	High	Low	Unknown	High	Medium
Hydroextraction	PEG or sucrose	Any	Low	High	Variable (toxicity)	Negligible	Very low
Ultra-centrifugation		Clean	Low	High	Medium	High	Medium
Other techniques	Ferric oxide floc	All	Low	Any	Variable	Low	Low
	Biphasic partition	All	< 7	Any	Variable	Low	Low
	Immunoaffinity and	Unknown	Low	Low	High	High	Low

# ADSORBIMENTO DI VIRUS SU MEMBRANE FILTRANTI (ELETTRONEGATIVE)

**Filtri elettronegativi.** Questo modello di membrane filtranti presenta una superficie a carica elettrica negativa che ai valori di pH prossimi alla neutralità respinge le particelle virali. Riducendo i valori di pH del campione intorno a pH 3,5 si ottiene una inversione della carica elettrica superficiale dei virus che ne permette il loro adsorbimento.

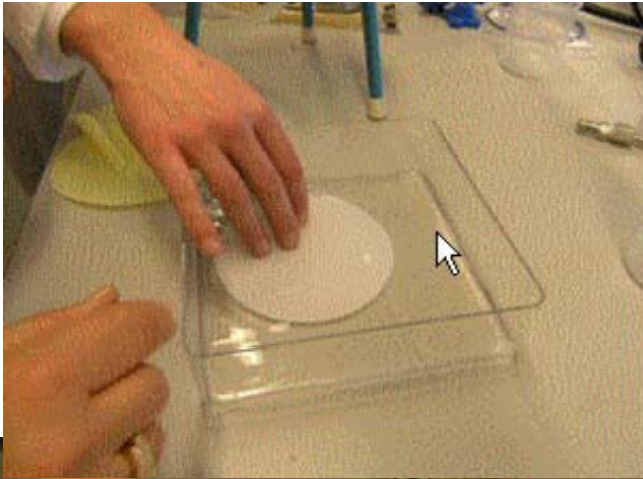
Le membrane filtranti vengono trattate con soluzioni eluenti per il rilascio dei virus concentrati.

Si può usare per grandi volumi di campione, anche migliaia di litri.

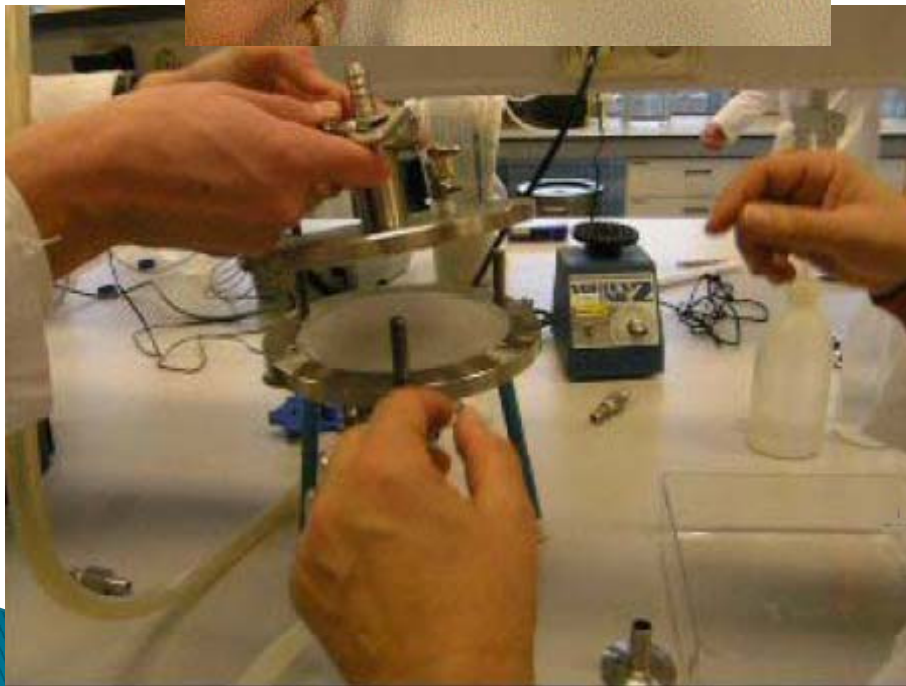




## ADSORBIMENTO DI VIRUS SU MEMBRANE FILTRANTI

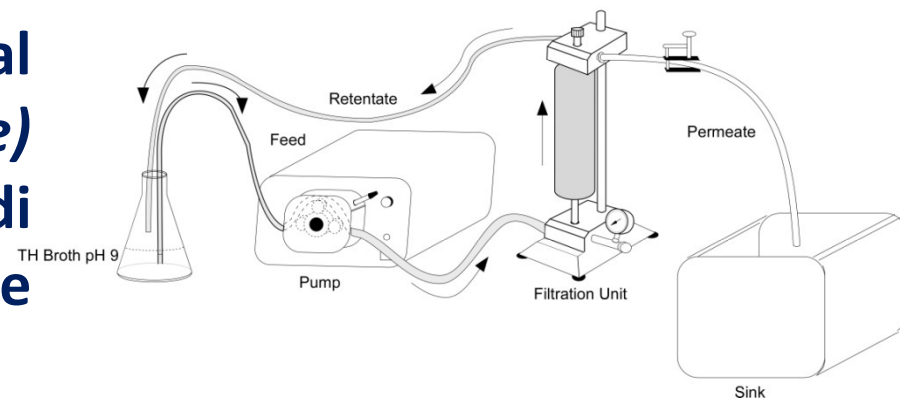
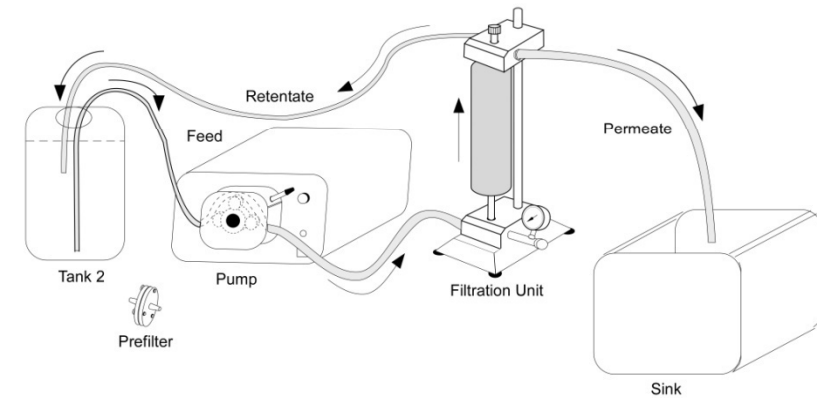
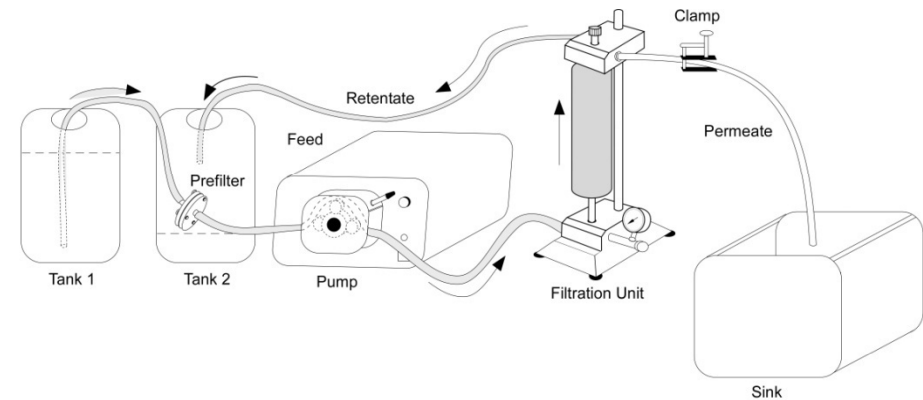


Doppio strato di membrane:  
Lana di vetro e nitrato di cellulosa

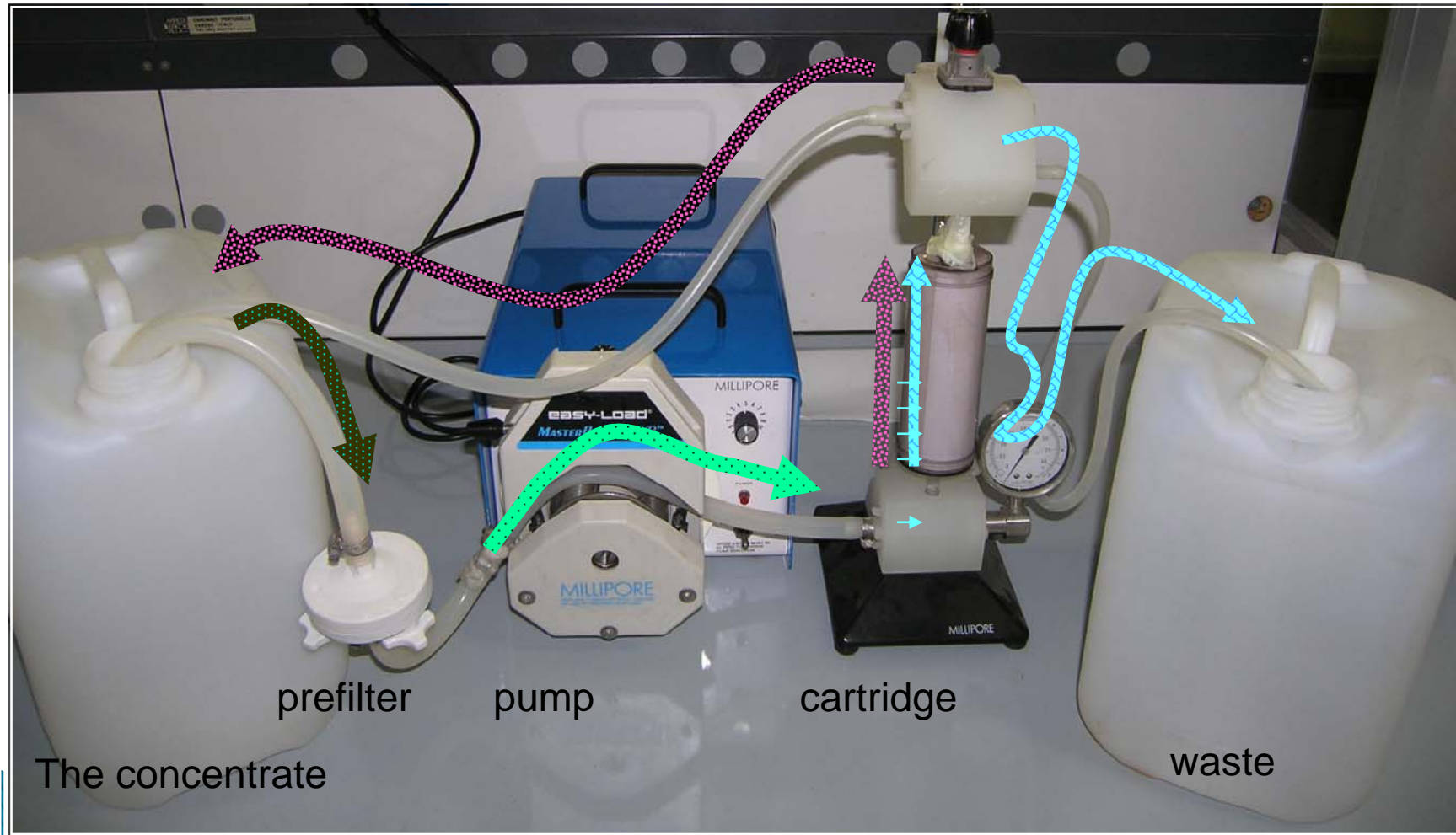


## ULTRAFILTRAZIONE A FLUSSO TANGENZIALE MEDIANTE CARTUCCE FILTRANTI

Il campione passa attraverso cartucce filtranti in polisulfone. L'ultrafiltrazione è un processo che è in grado di rimuovere dall'acqua particelle con diametro fino a  $5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{m}$  con un meccanismo a setaccio. I virus vengono concentrati non per adsorbimento su membrane ma per riduzione progressiva del volume del campione dovuto a perdita di acqua, sali e soluti in base al *cut-off* (taglio molecolare) scelto. Si può usare per grandi volumi di campione, anche migliaia di litri.

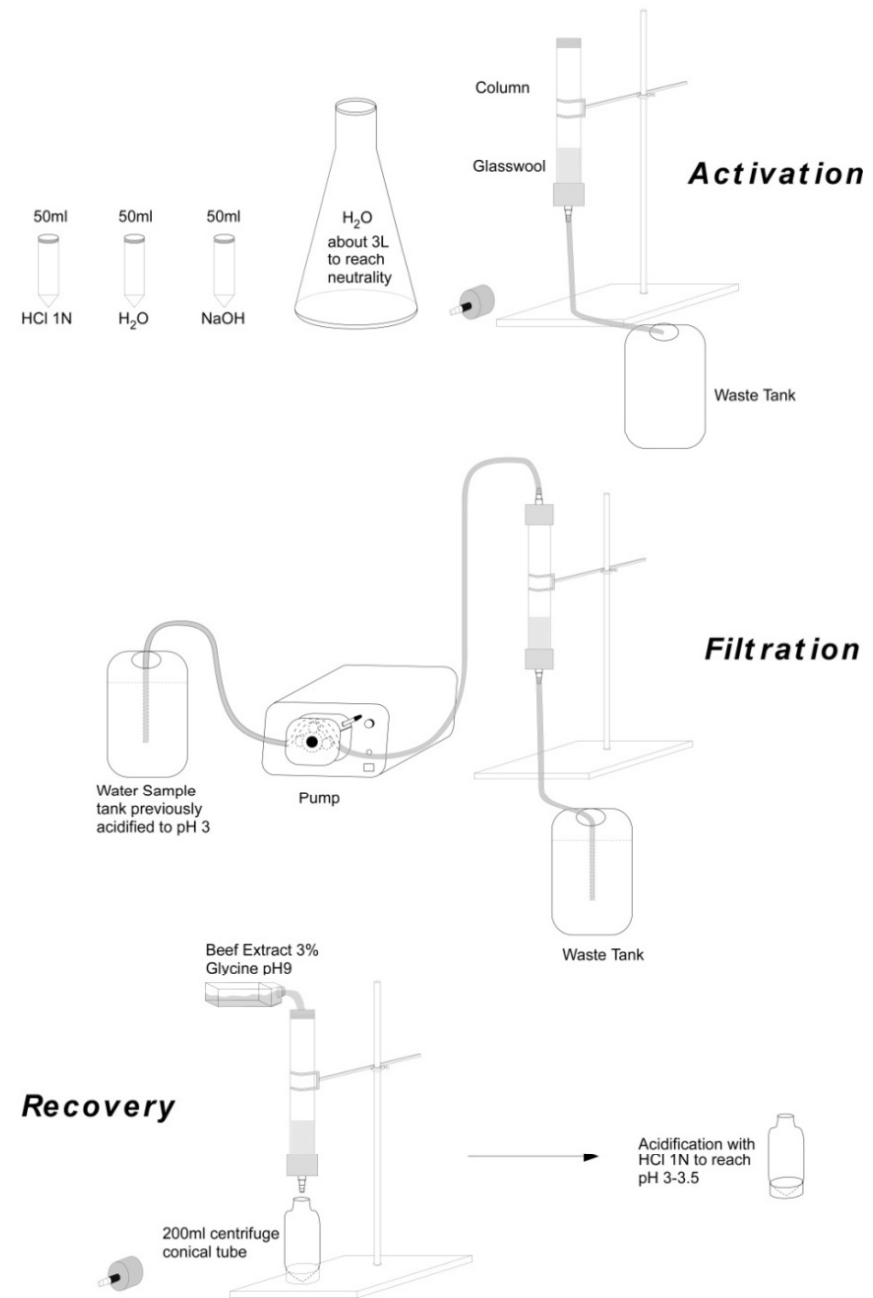


## CONCENTRAZIONE A FLUSSO TANGENZIALE MEDIANTE CARTUCCE A FILTRI ELETTROPOSITIVI O NEGATIVI



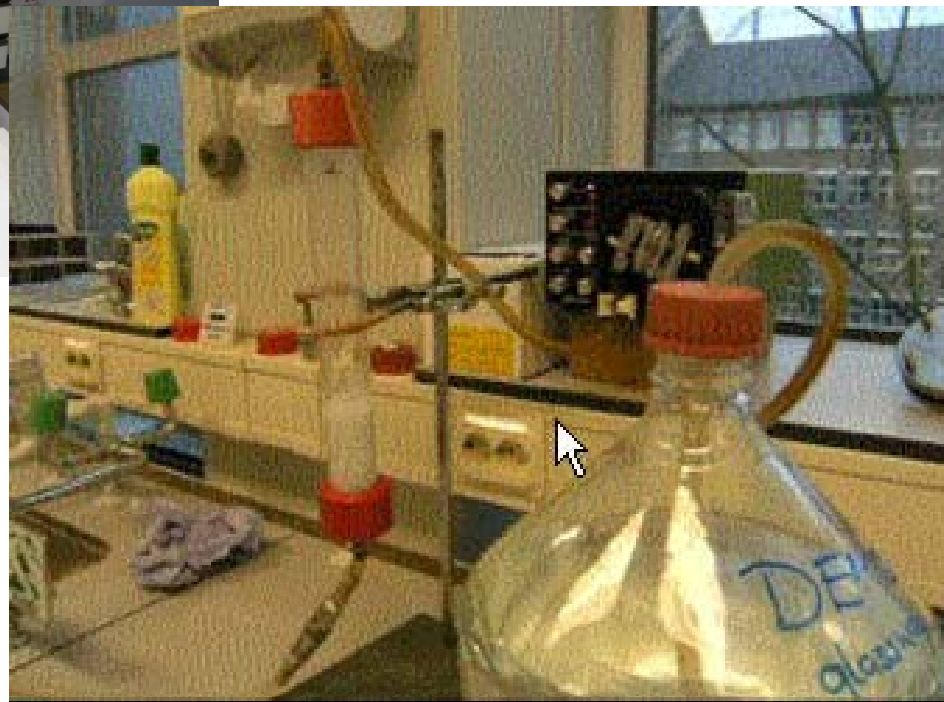
## COLONNA DI LANA DI VETRO

L'adsorbimento dei virus avviene su lana di vetro impacchettata in una colonna; la lana di vetro presenta sulla sua superficie fibre elettropositive che trattengono i virus. La colonna viene trattata con soluzioni eluenti per il rilascio dei virus concentrati.





## COLONNA DI LANA DI VETRO

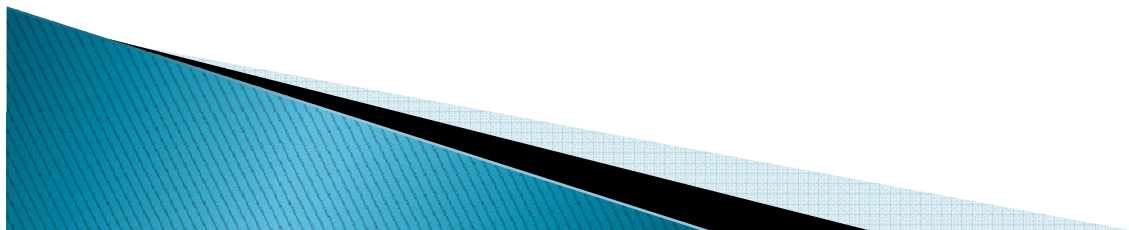


## Concentration of Enteroviruses, Adenoviruses, and Noroviruses from Drinking Water by Use of Glass Wool Filters<sup>▽</sup>

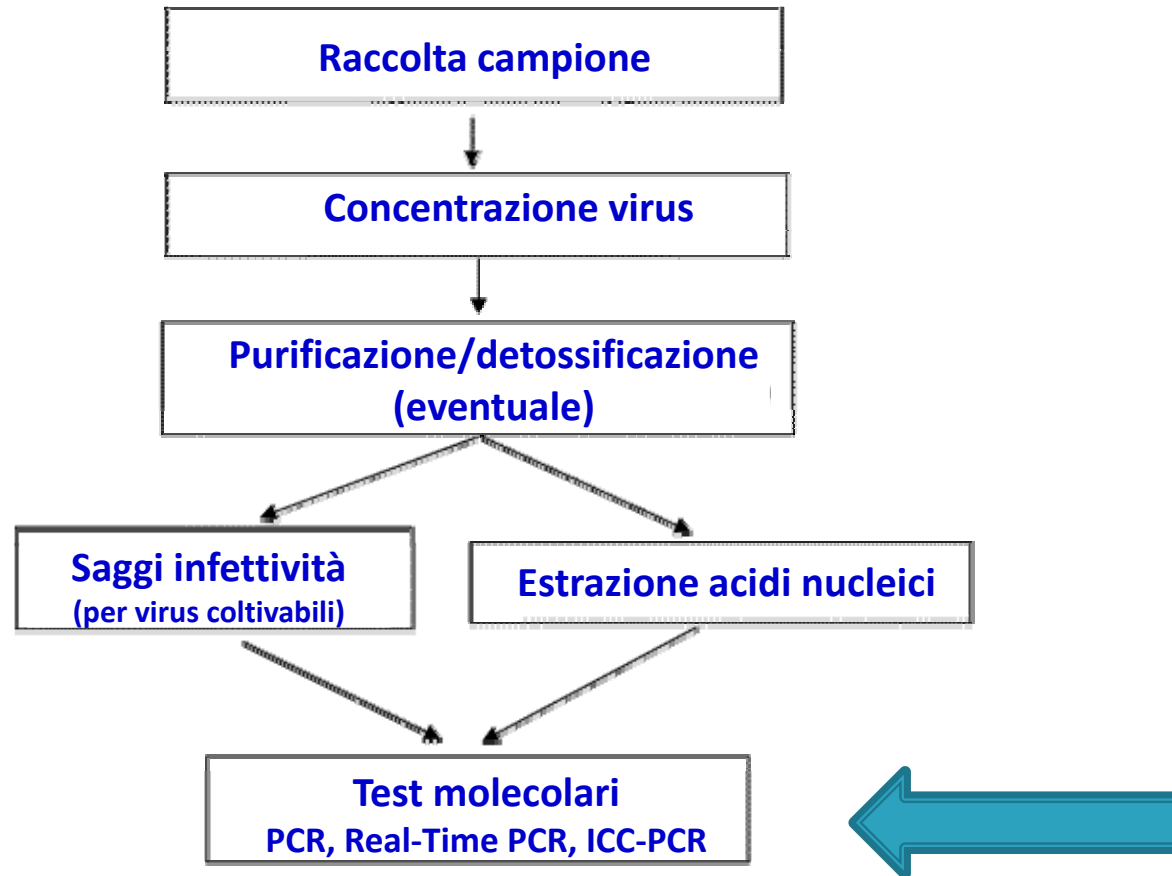
Elisabetta Lambertini,<sup>1</sup> Susan K. Spencer,<sup>2</sup> Phillip D. Bertz,<sup>2</sup> Frank J. Loge,<sup>1</sup>  
Burney A. Kieke,<sup>2</sup> and Mark A. Borchardt<sup>2\*</sup>

*Department of Civil and Environmental Engineering, University of California, Davis, California 95616,<sup>1</sup> and  
Marshfield Clinic Research Foundation, Marshfield, Wisconsin 54449<sup>2</sup>*

... Glass wool filtration is suitable for large-volume samples (1,000 liters) collected at high filtration rates (4 liters min<sup>-1</sup>), and its low cost makes it advantageous for studies requiring large numbers of samples.

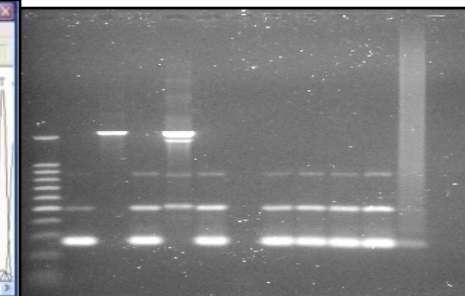
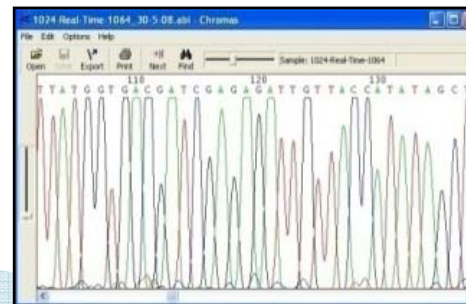
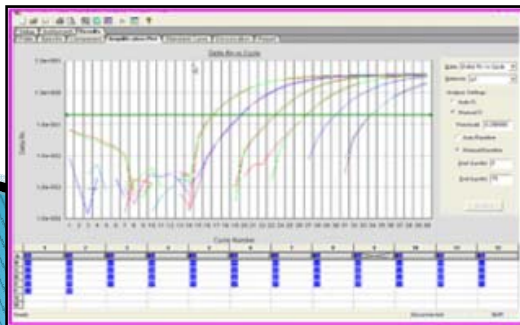


# IDENTIFICAZIONE VIRALE IN CAMPIONI DI ACQUA



PCR quantitativa

PCR qualitativa





# PCR: AMPLIFICAZIONE GENICA

Consente di amplificare esponenzialmente *in vitro una sequenza* specifica di DNA.

- ▶ Rapida
- ▶ Precisa
- ▶ Sensibile

Occorre conoscere almeno in parte la sequenza nucleotidica del frammento di DNA che vogliamo amplificare, e in particolare le sue estremità dove verranno disegnati i primers che agiscono da iniziatori per la Taq polimerasi



# PCR: Polymerase Chain Reaction

The image shows a screenshot of a Windows Internet Explorer browser window. The title bar reads "Molecular Diagnostics: Techniques - Windows Internet Explorer". The address bar contains the URL "http://pathology2.jhu.edu/molec/pcr.htm". The browser interface includes a menu bar with "File", "Modifica", "Visualizza", "Preferiti", and "Strumenti". Below the menu bar is a search bar with the Google logo and a "Cerca" button. To the right of the search bar are icons for "Segnalibri", "Popup OK", "Controllo", and "Invia a". The browser's address bar shows "Molecular Diagnostics: Techniques".

The main content area displays a diagram of a PCR reaction. At the top, two blue dots represent the DNA template. Below them, two horizontal lines represent the DNA strands, with the top strand labeled "3'" on the left and "5'" on the right, and the bottom strand labeled "5'" on the left and "3'" on the right. To the right of the template, two primers are shown: a red box labeled "F" with "5'" on the left and "3'" on the right, and a green box labeled "R" with "3'" on the left and "5'" on the right. Below the DNA strands, four yellow boxes labeled "A", "T", "C", and "G" represent the nucleotide bases. At the bottom right of the diagram, there are two buttons labeled "pause" and "play".

# FASI DELLA PCR

1: amplificazione



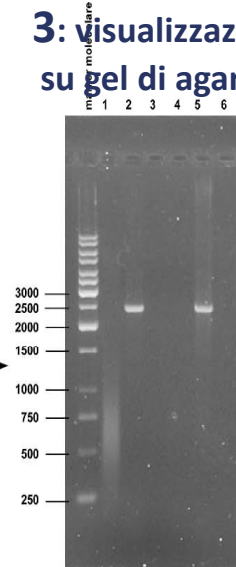
TERMOCICLIZZATORE

2: separazione elettroforetica del DNA amplificato



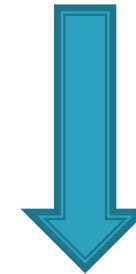
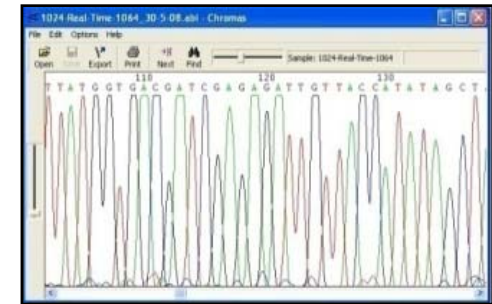
SUPPORTO ELETTROFORETICO

3: visualizzazione su gel di agarosio



VISUALIZZAZIONE BANDE DNA

4: sequenziamento



5: CONFRONTO SEQUENZE CON BANCHE DATI E TIPIZZAZIONE

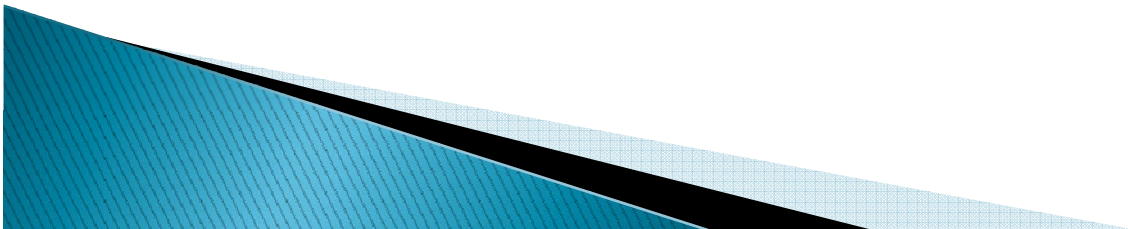
**4-5 ORE!**



## **REAL TIME PCR**

**La PCR real-time, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR), è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanea del DNA.**

**Questo è possibile grazie all'introduzione all'interno della reazione di una molecola fluorescente, che ci dà la possibilità di seguire la reazione grazie all'ausilio di appositi software di rilevazione.**



## REAL TIME PCR

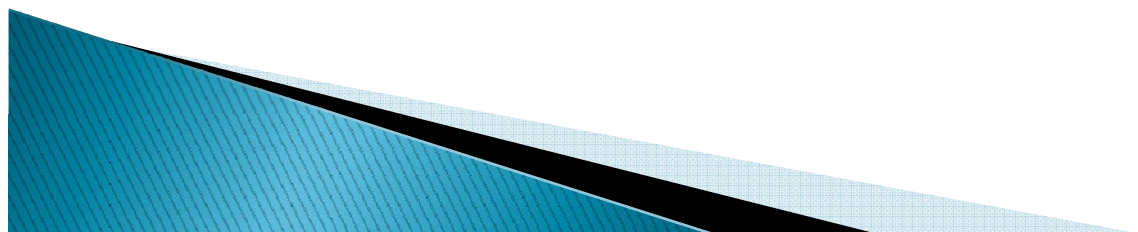
La Real-Time PCR effettua il rilevamento del DNA amplificato mediante l'impiego di:

➤ colorazioni fluorescenti che intercalano con il DNA doppio-filamento (in modo aspecifico)

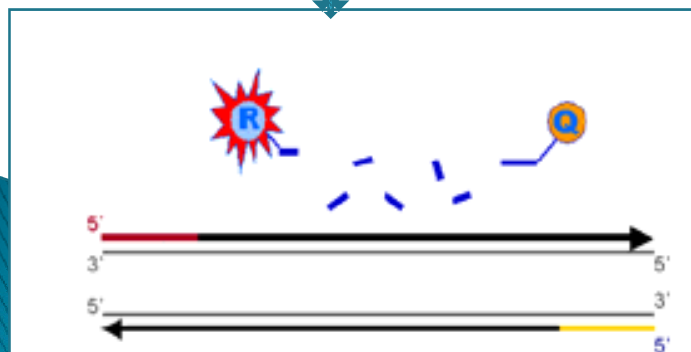
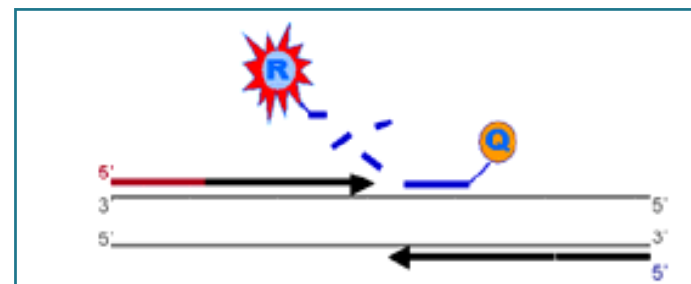
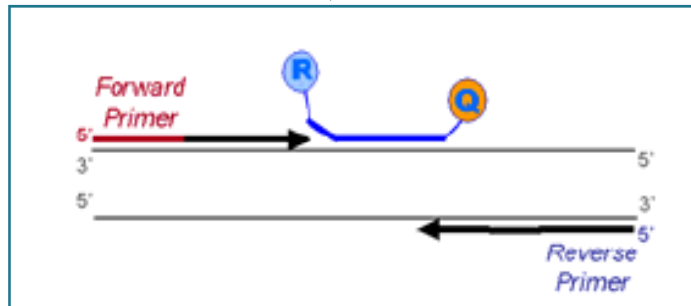
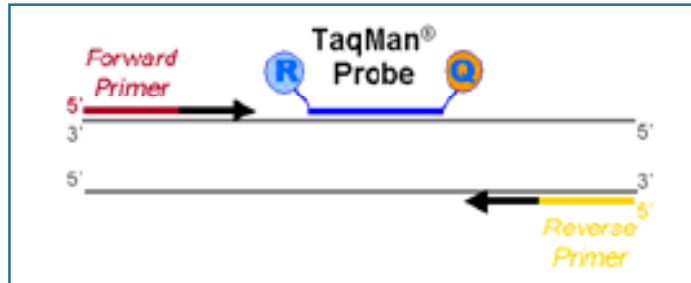
▪ **SYBR Green**



➤ sonde nucleotidiche (specifiche) ad ibridizzazione (oligonucleotidi marcati che sono fluorescenti una volta ibridati con un DNA).

▪ **chimica TaqMan**



## REAL TIME PCR (TECNOLOGIA TAQMAN)

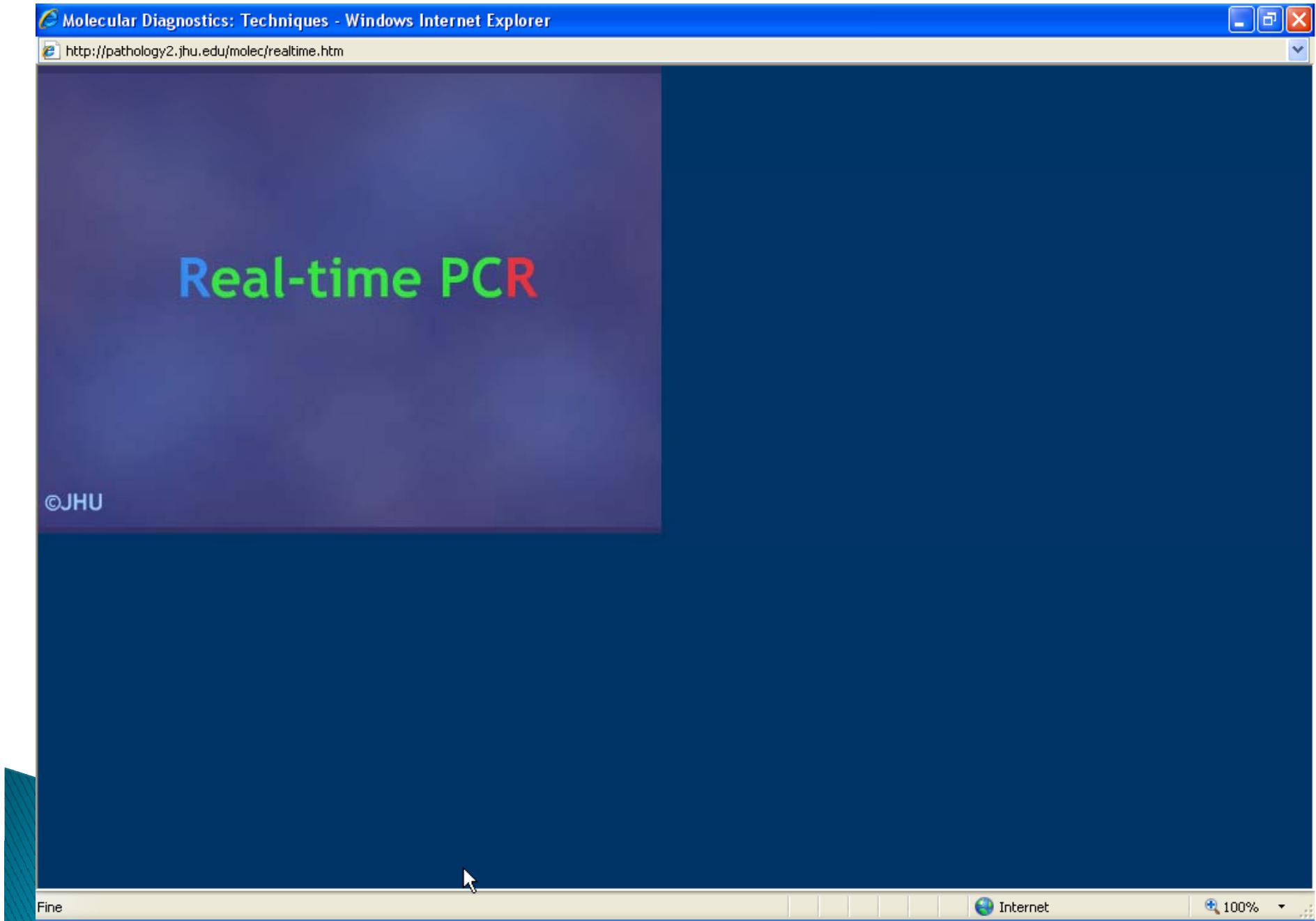


Le sonde Taqman sono oligonucleotidi marcat al 5' con un REPORTER (  ) e al 3' con un QUENCER (  ). Quando la sonda è integra la fluorescenza del reporter è “bloccata” dal QUENCER

Quando la sonda viene tagliata, il quencer ed il reporter si liberano in soluzione e si manifesta la fluorescenza. La liberazione del reporter avviene grazie all'azione della Taq polimerasi che è dotata di attività 5'-3' esonucleasica.

La fluorescenza si accumula ciclo dopo ciclo perché ad ogni ciclo aumenta la quantità di sonda tagliata.

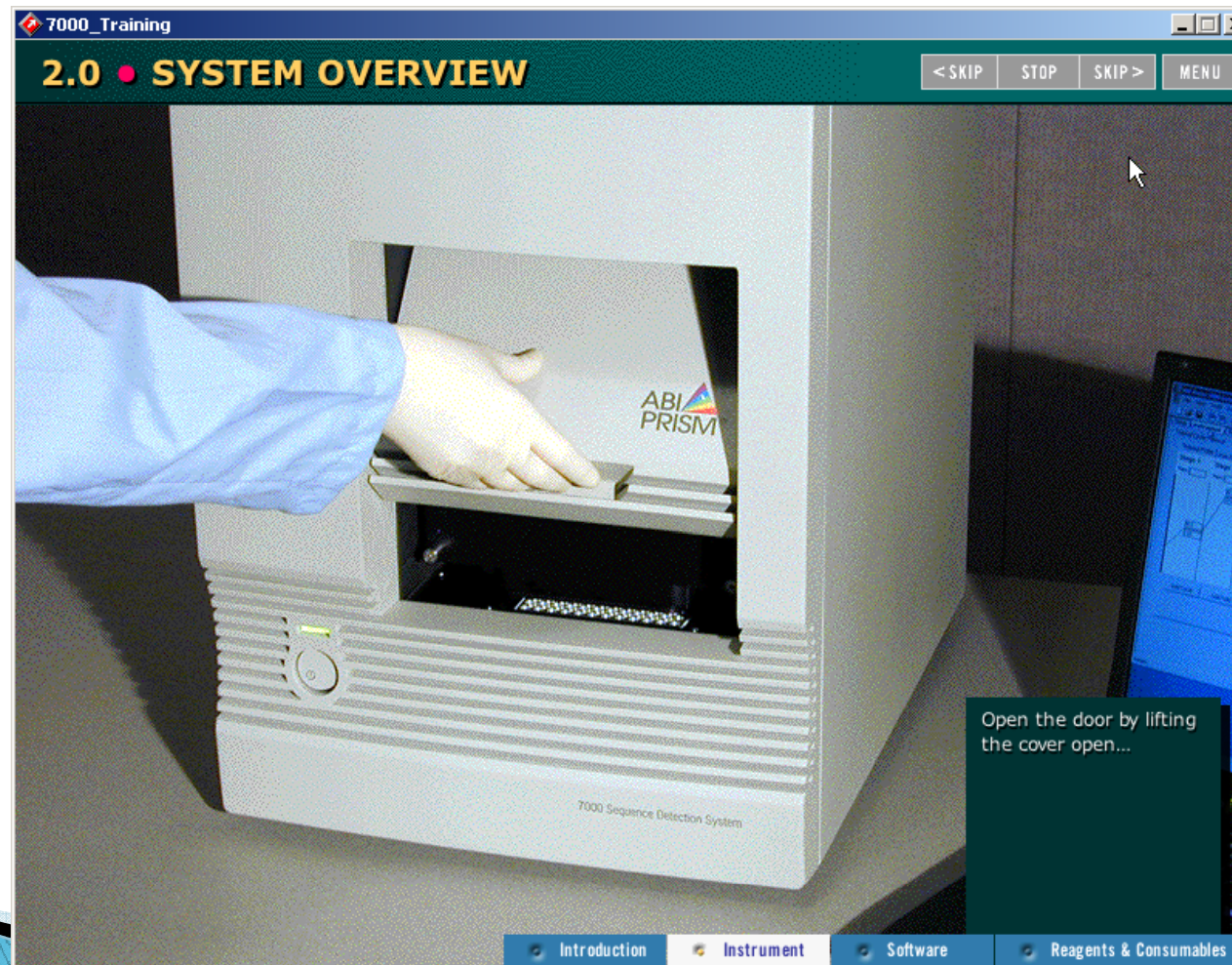
# Real-Time-PCR





# Real-Time-PCR

La reazione di Real Time PCR avviene in una camera completamente chiusa dove si inserisce la piastra a 96 pozzetti contenente i campioni





# Real-Time-PCR

La fluorescenza viene emessa da ogni pozzetto col procedere della reazione PCR durante l'estensione a 60°C del primer

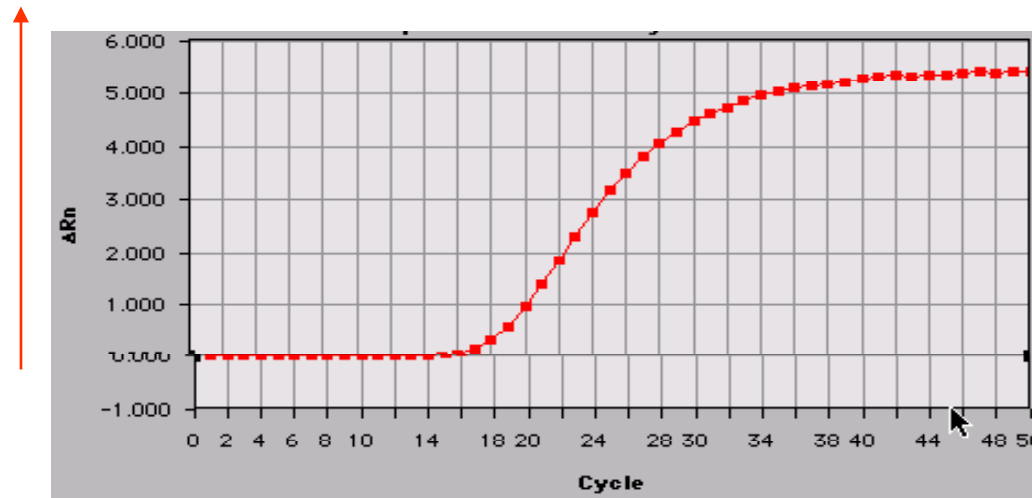


The screenshot displays a software interface for a 7000 Training module. The window title is '7000\_Training'. The main content area is titled '3.2 • ASSAYS' and features a 96-well plate with wells labeled A-H and 1-12. The text 'Each plate: 60° C' is displayed in yellow. A text box explains: 'For this endpoint assay, you read the data from each plate filled with a pure spectra dye at 60° C...'. The interface includes navigation buttons: '< SKIP', 'STOP', 'SKIP >', and 'MENU'. A bottom navigation bar contains tabs for 'Introduction', 'Background', 'Pure Spectra', 'Quantitation', 'Allelic Discrim.', 'Plus Minus', and 'Summary'.

# Real-Time-PCR

- Il prodotto di PCR non viene analizzato su gel di agarosio
- Il rilevamento della fluorescenza associata all'amplificazione avviene tramite computer.

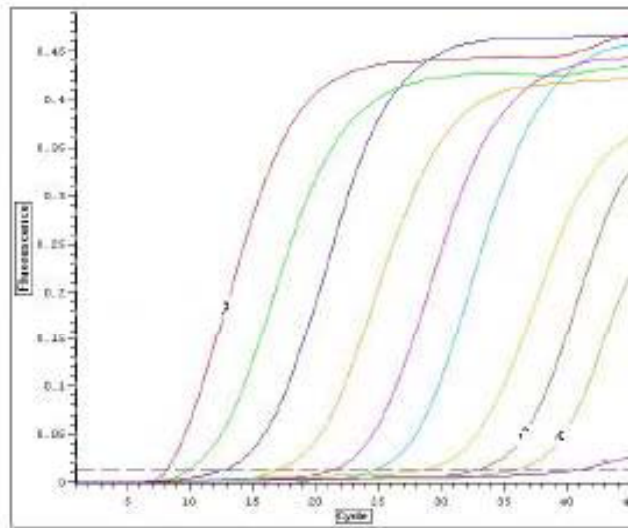
Incremento di  
fluorescenza



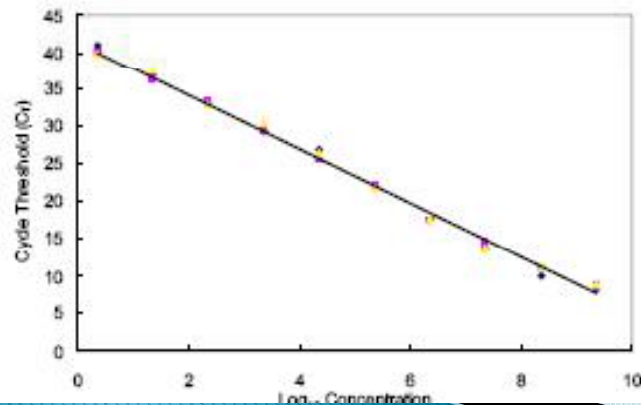
Cicli di PCR

## Real-Time-PCR: quantificazione

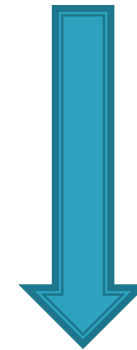
Per quantificare un campione incognito è necessaria l'amplificazione in parallelo di una curva standard (diluizione di un controllo positivo di concentrazione nota).



(a)



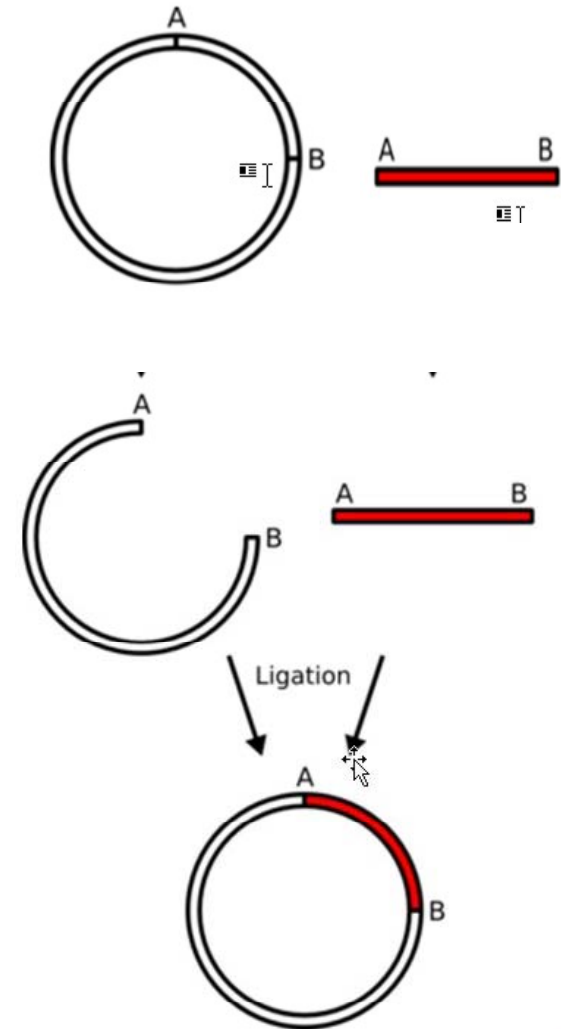
Diluizioni seriali



Curva standard

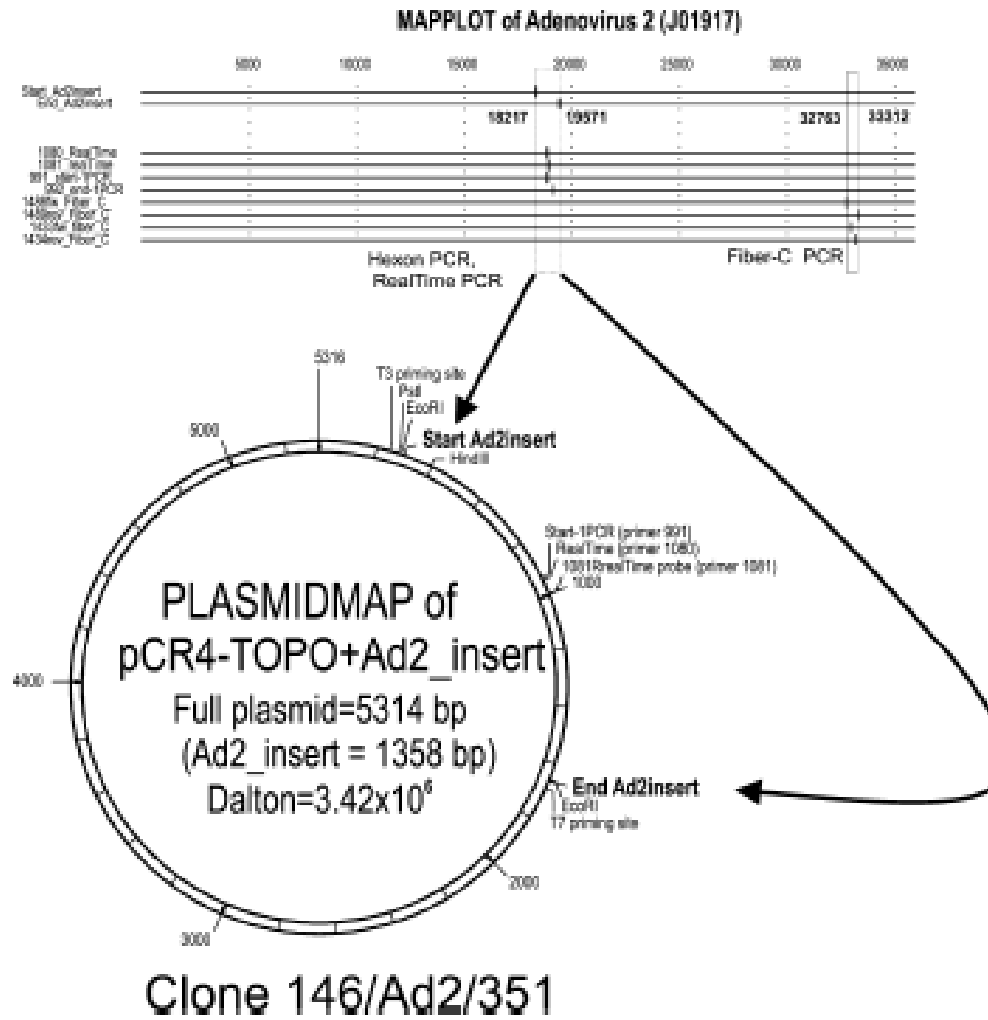
# Real-Time-PCR: preparazione dello standard di calibrazione

- La regione target per la Real-Time PCR viene amplificata mediante PCR e clonata in un opportuno vettore plasmidico;
- Il DNA del plasmide ricombinante viene misurato spettrofotometricamente;
- dalla concentrazione del plasmide si ricava il numero di copie genomiche utilizzando apposite formule matematiche.



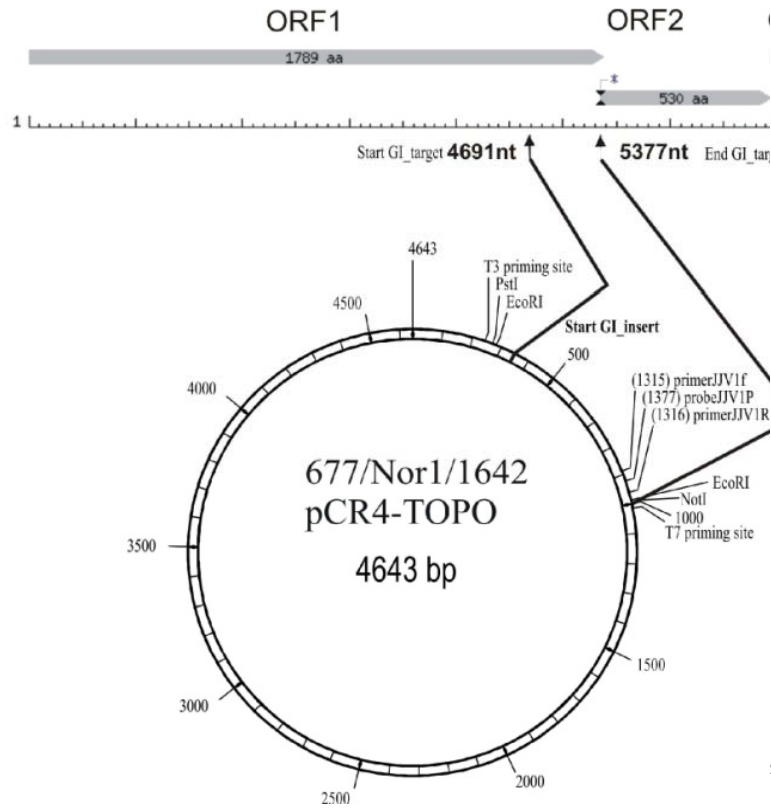
**Plasmide ricombinante**

# Standard di calibrazione per Adenovirus



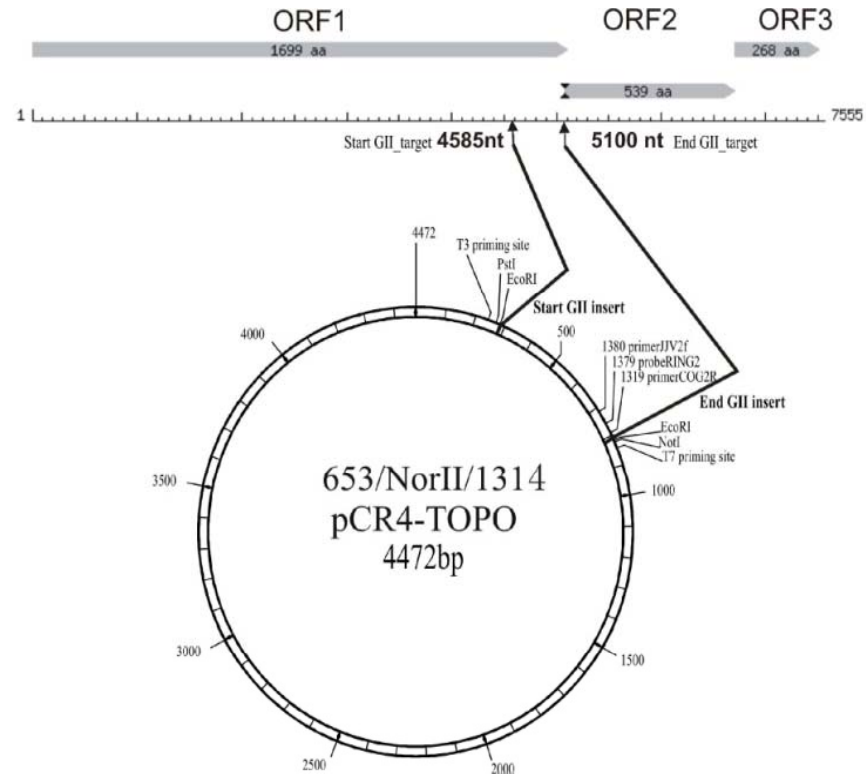


# Standard di calibrazione per Norovirus

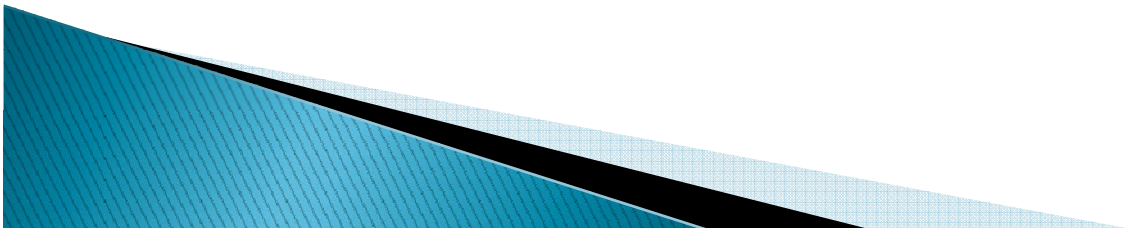


**Genograppo I**

5



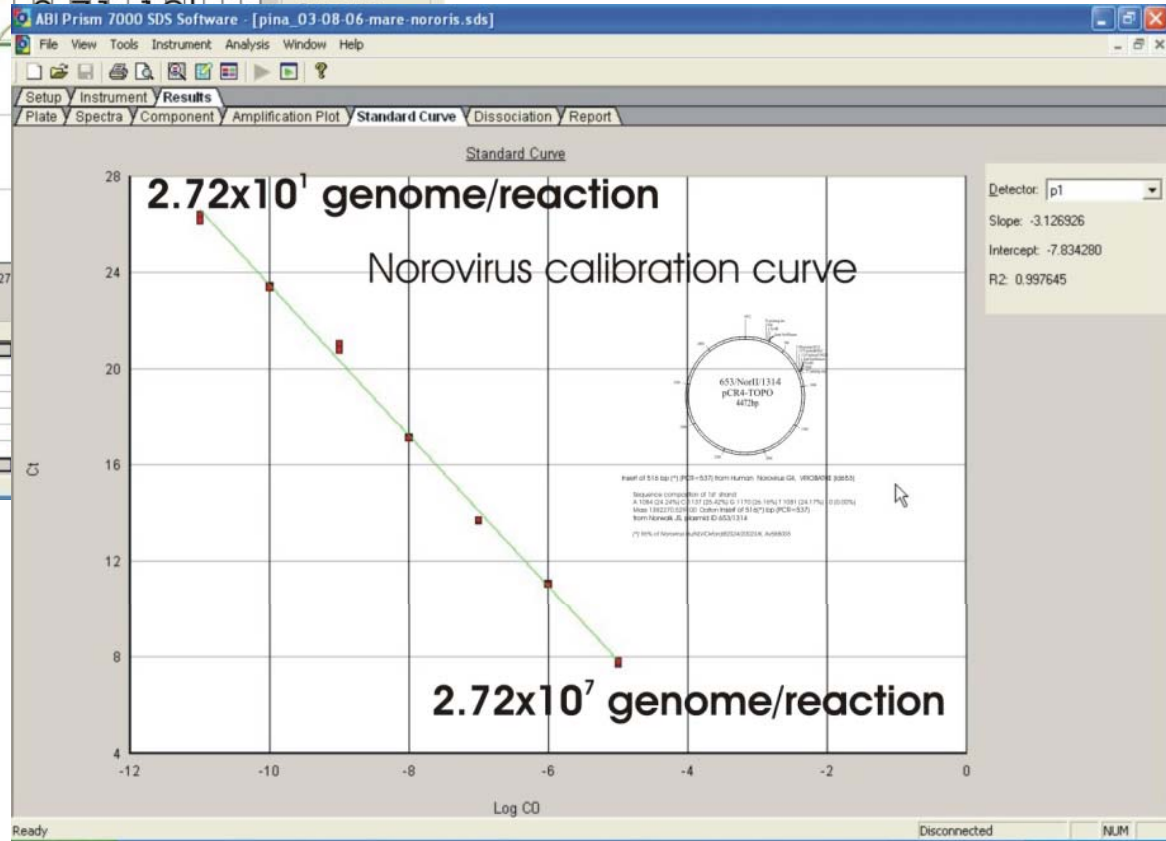
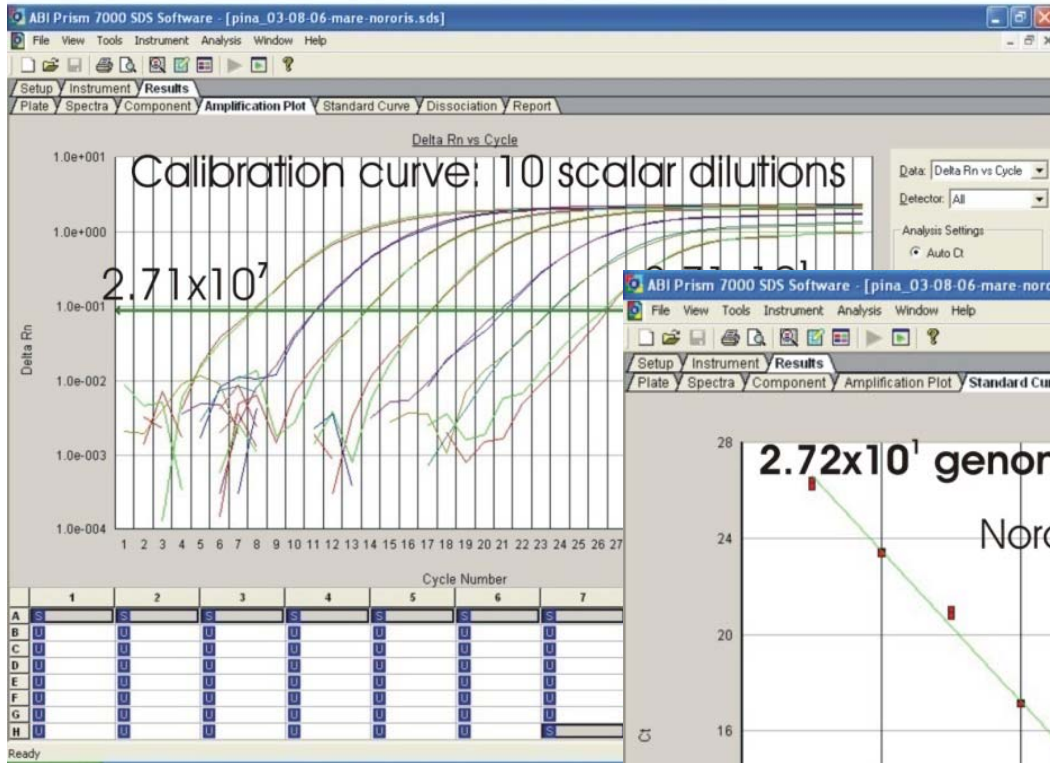
**Genograppo II**





# Curva di calibrazione effettuata usando RNA sintetico

Norovirus GII standard curve

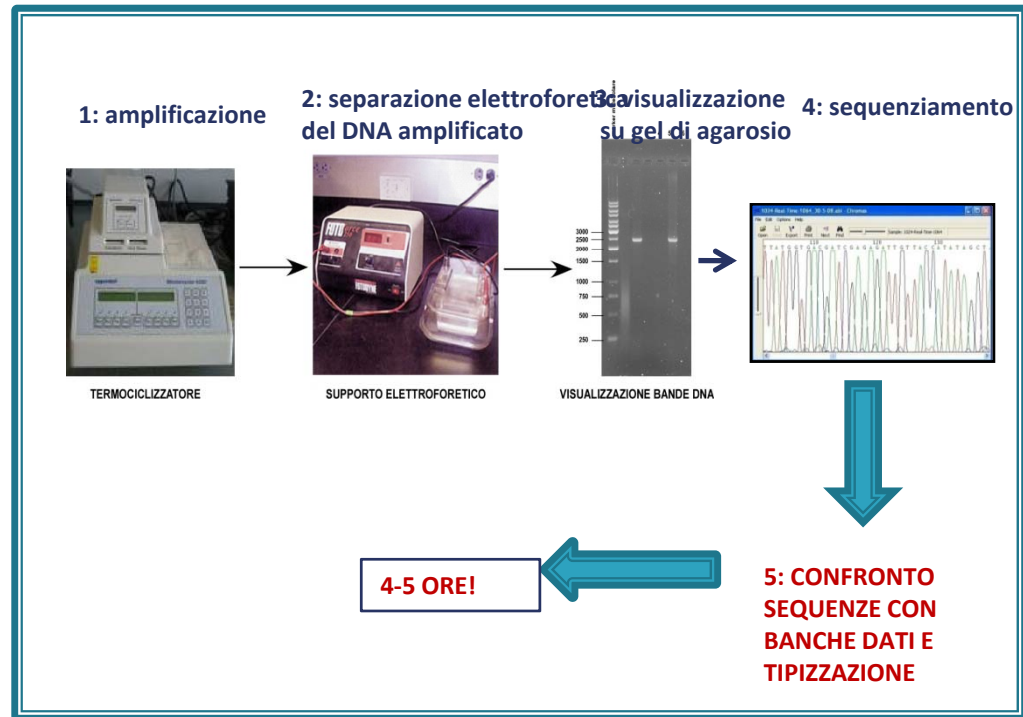
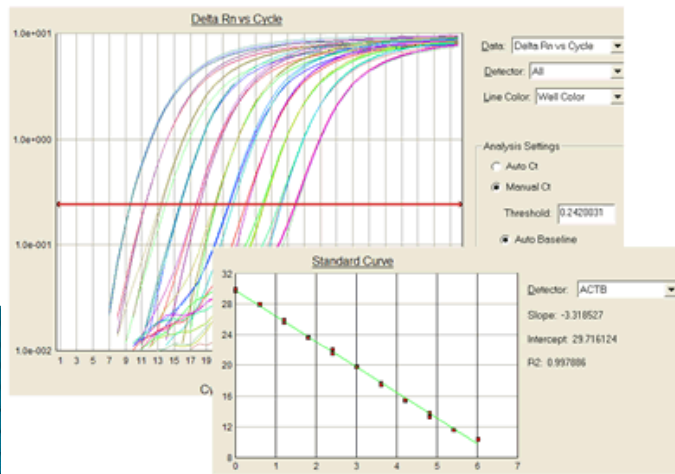


# FASI DELLA REAL-TIME PCR

## 1: amplificazione



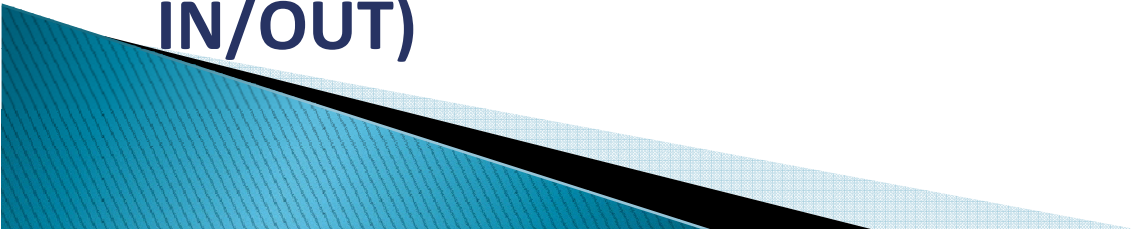
## 1: quantificazione



**2 ORE!**

# Conclusioni

## Vantaggi delle metodologie molecolari

- elevata sensibilità
  - elevata specificità
  - tempi diagnostici ridotti
  - informazioni sulla tipizzazione dei microrganismi (epidemiologia molecolare e studi epidemiologici)
  - quantificazione della carica virale (utile nei controlli di processi, es. valutazione efficienza dei trattamenti di depurazione acque, attraverso analisi IN/OUT)
- 

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI 2007-2008

1. FAUSTINI A., FANO V., MUSCILLO, M., ZANIRATTI, S, LA ROSA, G., TRIBUZI, L., AND PERUCCI C.A. *INDAGINE SU UN'EPIDEMIA DI MENINGITE ASETTICA DA ECHOVIRUS 30*. RAPPORTI ISTISAN 07[11], 91-100. 2007.
2. LA ROSA, G., S. FONTANA, A. DI GRAZIA, M. IACONELLI, M. POURSHABAN, AND M. MUSCILLO. 2007. *MOLECULAR IDENTIFICATION AND GENETIC ANALYSIS OF NOROVIRUS GENOGROUPS I AND II IN WATER ENVIRONMENTS: COMPARATIVE ANALYSIS OF DIFFERENT REVERSE TRANSCRIPTION-PCR ASSAYS*. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 73:4152-4161.
3. LA ROSA, G., MANOOCHEHR, P., IACONELLI, M., AND MUSCILLO, M. *INFEZIONI DA NOROVIRUS: ASPETTI BIOLOGICI, DIAGNOSI ED EPIDEMIE IDROTRASMESSE*. BOLL. BIOLOGI ITALIANI XXXVII[11], 37-45. 2007.
4. LA ROSA, G., M. POURSHABAN, M. IACONELLI, AND M. MUSCILLO. 2007. *ADENOVIRUS QUALI PATOGENI EMERGENTI RESPONSABILI DI INFEZIONI IDRODIFFUSE*. BOLL. BIOLOGI ITALIANI XXXVII:51-57.
5. LA ROSA, G., M. POURSHABAN, M. IACONELLI, AND M. MUSCILLO. 2007. *EPIDEMIE ASSOCIATE AGLI ADENOVIRUS NELLE ACQUE DI PISCINA*, Rapporti ISTISAN. 2007;07(11):82-90.
6. LA ROSA, G., M. POURSHABAN, M. IACONELLI, AND M. MUSCILLO. 2008. *RECREATIONAL AND DRINKING WATERS AS A SOURCE OF NOROVIRUS GASTROENTERITIS OUTBREAKS: A REVIEW AND UPDATE*. ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY 4(1).
7. MUSCILLO, M., M. POURSHABAN, M. IACONELLI, S. FONTANA, A. DI GRAZIA, S. MANZARA, G. FADDA, R. SANTANGELO, AND G. LA ROSA. 2008. *DETECTION AND QUANTIFICATION OF HUMAN ADENOVIRUSES IN SURFACE WATERS BY NESTED PCR, TAQMAN REAL-TIME PCR AND CELL CULTURE ASSAYS*. WAT AIR SOIL POLLUT 191:1-4.
8. LA ROSA G; POURSHABAN M; IACONELLI M; MUSCILLO M. 2008. *'DETECTION OF GENOGROUP IV NOROVIRUSES IN ENVIRONMENTAL AND CLINICAL SAMPLES AND PARTIAL SEQUENCING THROUGH RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS*. ARCHIVES OF VIROLOGY, IN PRESS.

