

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Giornata di studio **Epatite A trasmessa con gli alimenti**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 18 maggio 1999

A cura di
Luciana Croci e Dario De Medici
Laboratorio Alimenti

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

00/2

Istituto Superiore di Sanità

Giornata di studio. Epatite A trasmessa con gli alimenti. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 18 maggio 1999.

A cura di Luciana Croce e Dario De Medici

2000, iii, 53 p. Rapporti ISTISAN 00/2

Vengono affrontati i diversi aspetti relativi alle problematiche legate alla presenza del virus dell'epatite A negli alimenti. Nelle diverse monografie vengono illustrati: le modalità di contaminazione degli alimenti da parte dell'HAV, la sua resistenza ai trattamenti di bonifica e la sua sopravvivenza nell'ambiente, la diffusione della malattia in Italia, nonché gli aspetti clinici e molecolari. Con una breve disamina sulle varie metodologie, classiche e innovative, per la rilevazione della contaminazione virale nei prodotti alimentari, se ne evidenziano i vantaggi e i limiti. Viene quindi proposto un nuovo metodo di RT-nested-PCR da utilizzare come screening per la valutazione dell'incidenza dell'HAV negli alimenti. In appendice viene riportato il protocollo sperimentale per la ricerca dell'HAV nei molluschi eduli lamellibranchi e nei prodotti vegetali.

Parole chiave: Alimenti, HAV

Istituto Superiore di Sanità

Workshop. Hepatitis A transmitted by food. Istituto Superiore di Sanità. Rome, May 18, 1999.

Edited by Luciana Croce and Dario De Medici

2000, iii, 53 p. Rapporti ISTISAN 00/2 (in Italian)

Different aspects relating to the HAV presence in food are evaluated. The monographs deal with: way of HAV contamination of food, HAV survival to different treatments and its diffusion in the environment, the incidence of the hepatitis A in Italy and clinical and molecular aspects of the virus. Classical and innovative methods for determining viral contamination of food with their advantages and their limits are reported. A new screening method RT-nested-PCR to evaluate the incidence of HAV in food is proposed. In appendix the experimental protocol for determining HAV in mussels and in vegetables is reported.

Key words: Food, HAV

INDICE

Introduzione		
L. Toti.....	p	iii
Alimenti come veicoli di trasmissione di virus enterici		
L. Croci.....	«	1
Epidemiologia dell'epatite A in Italia		
A. Mele, M. Ciccozzi.....	«	11
Virus dell'epatite A: aspetti clinici e molecolari		
G. Morace.....	«	13
Valutazione sulla presenza del virus dell'epatite A nell'ambiente.		
M. Divizia.....	«	24
Tecniche classiche ed innovative per la determinazione dei virus enterici negli alimenti, con particolare riferimento al virus dell'epatite A.		
D. De Medici.....	«	31
Uso della RT-nested-PCR per la determinazione dell'HAV negli alimenti		
A. Fiore, S. Di Pasquale, C. Scalfaro.....	«	41
Appendice		
Protocollo sperimentale per la determinazione dell'epatite A negli alimenti.....	«	47

Introduzione

L'epatite A è una delle malattie a trasmissione oro-fecale ancora relativamente diffusa nel nostro Paese. Infatti anche se l'endemia è progressivamente diminuita nel corso degli ultimi anni, permangono alcune aree, specialmente nelle regioni meridionali (Campania, Puglia e Sicilia) dove le modificazioni epidemiologiche sono meno evidenti e permane una situazione endemica con recrudescenze epidemiche periodiche ad intervalli di due-quattro anni.

In Puglia, ad esempio, negli anni 96-97, si è avuta una importante manifestazione epidemica con circa 11.000 casi notificati che si sono verificati per la maggior parte in adolescenti e giovani adulti. I casi pugliesi rappresentano una quota compresa fra il 12 ed il 60% dei casi nazionali.

Come è noto, tale malattia è associata ad abitudini alimentari particolari ed a problemi ambientali di inquinamento delle acque: attraverso le acque infatti, i virus enterici passano negli alimenti.

I molluschi ed i vegetali sono sicuramente i più soggetti a tale tipo di contaminazione: i primi perché filtrano l'acqua in cui vivono ed insieme alle sostanze nutrienti concentrano batteri e virus, gli altri perché spesso vengono innaffiati e concimati con acque di scarico.

Quanto sopra mette in evidenza una realtà epidemiologica ed igienica presente nel nostro Paese che non ha comunque riscontro nella normativa sanitaria (D. L.vo 530/92).

Finora infatti non è stato possibile introdurre limiti o dare indicazioni sulla presenza degli enterovirus negli alimenti soprattutto a causa della non disponibilità di metodi di analisi. In questi ultimi anni presso i nostri laboratori è stata intrapresa una serie di indagini per lo studio della virologia alimentare. In particolare sono stati condotti studi sui tempi di sopravvivenza dei virus in varie condizioni, sulle possibilità di depurazione dei molluschi e di reale bonifica degli alimenti.

E' chiaro che alla base di questa ricerca è posta la messa a punto di un metodo di analisi. Siamo partiti da metodi che utilizzano colture cellulari che, sebbene riescano a rilevare l'infettività delle particelle virali, sono spesso molto costosi e soprattutto piuttosto lunghi dato che il virus dell'epatite A non si replica facilmente in coltura. Siamo quindi passati alla utilizzazione della PCR che offre sicuramente il vantaggio di minori costi e maggiore rapidità ma è stato necessario un lungo periodo per mettere a punto le tappe preliminari ed eliminare le possibili interferenze.

Laura Toti

ALIMENTI COME VEICOLI DI TRASMISSIONE DI VIRUS ENTERICI

Luciana Croci

Laboratorio di Alimenti - Istituto Superiore di Sanità - Roma

Introduzione

Gli alimenti possono essere causa della trasmissione all'uomo di vari agenti patogeni di natura batterica o virale, provocando l'insorgenza di manifestazioni patologiche diverse, che, nonostante i progressi fatti nel settore della prevenzione, rappresentano ancora un serio problema di sanità pubblica. Dati epidemiologici e clinici dimostrano che i virus stanno assumendo una crescente importanza come causa di malattie trasmesse con gli alimenti, nonostante ci sia ragione di credere che il numero delle gastroenteriti virali è ancora sottostimato, non solo in Italia, ma anche nel resto del mondo. Soltanto nel 1982 il Centro per il Controllo delle Infezioni di Atlanta ha iniziato a censire le gastroenteriti virali (MacDonald & Griffin, 1986) tra queste un ruolo emergente è stato assunto negli ultimi anni dai virus Norwalk, a carico dei quali sono stati segnalati diversi episodi, coinvolgenti un elevato numero di persone. Il primo si era verificato in Minnesota, dove alcuni operatori alimentari, infettatisi con il virus, avevano contaminato delle insalate, che distribuite in comunità, avevano provocato la malattia in circa 3000 persone (White *et al.*, 1986). Altri episodi furono segnalati in Australia e a New York coinvolsero migliaia di persone in seguito al consumo di frutti di mare (Kuritsky *et al.*, 1985; Morse *et al.*, 1986). Numerosi episodi di gastroenterite da Norwalk sono stati anche segnalati in seguito al consumo di pasticcini e piatti pronti contenenti insalate, ma soprattutto in seguito al consumo di molluschi contaminati dalla presenza di liquami di scarico nelle acque di allevamento (Cliver 1988). Più recentemente sono stati documentati in diversi Paesi altri episodi gastroenterici dovuti ad astrovirus, Snow Mountain virus e Calicivirus, questi ultimi sono stati causa a giugno del 1998 di un episodio di gastroenterite che ha coinvolto 15 persone dopo il consumo di lamponi congelati provenienti dalla Serbia.

Ampiamente documentato inoltre è il ruolo degli alimenti nella trasmissione di epatite A. Tra gli episodi più imponenti possono essere ricordati due avvenuti in America, il primo nel 1971, in cui furono coinvolte numerose persone che avevano consumato verdure crude e il secondo verificatosi nell'estate del 1983, quando 203 persone si ammalarono dopo aver consumato cibi contaminati da un dipendente di un ristorante. Nel 1988 furono segnalati più di 300.000 casi dovuti al consumo di molluschi nella regione di Shanghai in Cina. Anche nel nostro Paese l'epatite A rappresenta un importante problema di sanità pubblica, dai dati del SEIEVA (Sistema Epidemiologico dell'Epatite Virale Acuta dell'ISS) risulta un'incidenza di migliaia di casi all'anno, di cui il 62% associato al consumo di molluschi, inoltre nel 1996 veniva registrata nella regione Puglia un'epidemia piuttosto estesa (circa 6000 persone coinvolte), provocando notevoli problemi sia sotto l'aspetto clinico che economico.

Principali virus trasmessi con gli alimenti

Sono conosciuti oltre 120 differenti tipi di virus enterici e vengono suddivisi in diversi gruppi a seconda delle loro caratteristiche morfologiche, fisiche, chimiche ed antigeniche (Rao *et al.*, 1986; Durkop, 1992) (Tab.1).

Tabella 1 - Principali virus enterici umani

VIRUS ENTERICI UMANI			
	VIRUS	N° di sierotipi conosciuti	SINTOMATOLOGIA CAUSATA
ENTERO VIRUS	Poliovirus	3	Meningite, paralisi, febbre
	Echovirus	32	Meningite, diarrea, rash, febbre, malattie respiratorie
	Coxsackievirus A	23	Meningite, erpagina, febbre malattie respiratorie
	Coxsackievirus B	6	Miocarditi, anomalie cardiache congenite, pleurodinia, malattie respiratorie, febbre, rash, meningite
	Nuovi enterovirus (tipi 68-71)	>4	Meningiti, encefaliti, congiuntivite acuta emorragica, febbre, malattie respiratorie
	Epatite A (enterovirus 72?)	1	Epatite infettiva
	Rotavirus	6	Diarrea, sintomi respiratori
CALICI VIRUS	Adenovirus	47	Febbre, sintomi respiratori, congiuntiviti, diarrea
	Reovirus	3	Non chiaramente stabilito
	Norwalk-like ¹	2	Diarrea, vomito, febbre
	Sapporo-like ²	?	Diarrea, vomito, in età pediatrica
	Epatite E	1	Epatite
	Astrovirus e altri piccoli virus a struttura rotondeggiante (SRSVs)	5+7	Gastroenteriti
	Coronavirus e altri possibili virus (torovirus, picobirnavirus, parvovirus, ecc)	?	?

1- Anche conosciuti come "Small-Round-Structured-Viruses" o SRSV

2- definiti anche come "tipici Calicivirus"

Soltanto per alcuni, comunque è stata epidemiologicamente provata la trasmissione in seguito al consumo di alimenti, anche se potenzialmente qualsiasi virus enterico, la cui ingestione è causa di malattia, può essere trasmesso mediante i cibi.

Oltre ai ben noti enterovirus, Calicivirus e virus dell'epatite A, dei quali vengono riportate alcune caratteristiche generali nelle Tabelle 2, 3 e 4, altri virus possono essere occasionalmente trasmessi con gli alimenti e sono:

Astrovirus un gruppo di piccoli virus rotondi dalla caratteristica forma a stella. Presentano una singola catena di RNA non protetta da rivestimento proteico. Provocano una sintomatologia morbosa che differisce leggermente da quella dei Norwalk-like virus, il periodo di incubazione è a volte più lungo, il vomito è meno comune, vengono colpiti maggiormente bambini molto piccoli (< 1 anno). Evidenze epidemiologiche di trasmissione con gli alimenti sono limitate.

Rotavirus sono a doppia catena di RNA con un doppio rivestimento proteico. Infettano principalmente i bambini piccoli e sono occasionalmente associati al cibo e all'acqua.

Tick-borne encephalitis virus è l'unico virus che non è trasmesso per via oro-fecale. Il virus infetta gli animali da latte nel centro Europa (principalmente in Slovacchia) attraverso il morso di parassiti vettori (*Ixodes persulcatus* e *I. ricinus*) e può ritrovarsi nel latte, che, se consumato non pastorizzato, infetta l'uomo. Prodotti derivati dal latte non pastorizzato possono veicolare il virus. Questo appartiene al genere *Flavivirus* contiene una singola catena di RNA, come la maggior parte dei virus trasmessi con gli alimenti, ma ha un rivestimento lipidico intorno a quello proteico. E' altamente specifico verso il suo vettore e ha un range molto limitato, quindi la malattia è abbastanza rara. Durante un recente incidente sono state infettate sette persone in Slovacchia.

Hepatitis E virus appartiene al gruppo dei calicivirus, ha una singola catena di RNA, ricoperto da un rivestimento proteico con caratteristiche depressioni a coppa. E' diffuso principalmente in Asia, Africa ed America Latina. Nel nostro Paese non si trova, ad eccezione di qualche caso importato. E' un non-A, non-B hepatitis virus che viene trasmesso per via oro-fecale.

Parvovirus sono proposti come causa di gastroenteriti umane, ma quelle associate agli alimenti sono molto rare, comunque viene descritto un episodio avvenuto in Inghilterra che ha coinvolto circa 800 persone.

Tabella 2. - Enterovirus: il virus e la malattia

Gruppo	Picornavirus
Struttura	Virione sferico di circa 27-32 nm di diametro, ad RNA a singola catena, privo di rivestimento lipidico e circondato da un capsidico costituito da 60 copie multiple di quattro proteine, denominate VP ₁ VP ₂ VP ₃ e VP ₄
Infezione	A seconda di vari fattori possono diffondersi nell'organismo attraverso i linfonodi mesenterici ed il circolo ematico, localizzandosi di volta in volta in organi e tessuti suscettibili
Malattia	Patologia molto varia e multiforme, di norma l'infezione intestinale si esaurisce in a livello subclinico
Escrezione	I virus si ritrovano nell'intestino umano e vengono escreti con le feci in gran quantità
Diagnosi	Isolamento del virus contemporaneamente dall'oro faringe e dal materiale fecale e conseguente identificazione antigenica; la diagnosi non può essere condotta sulla base della sola ricerca degli anticorpi, in quanto dovrebbe essere effettuata nei confronti dei numerosi tipi antigenici di enterovirus

Tabella 3 - Epatite A: il virus e la malattia

Gruppo	Picornavirus
Struttura	Virione sferico di circa 27-32 nm di diametro, ad RNA a singola catena, privo di rivestimento lipidico e circondato da un capsido icosaedrico costituito da 60 copie multiple di quattro proteine, denominate VP ₁ , VP ₂ , VP ₃ e VP ₄ .
Infezione	Dall'intestino al fegato, periodo di incubazione 15-50 giorni (media 28 giorni)
Malattia	La malattia è dovuta alla distruzione, mediante meccanismi immunologici, delle cellule epatiche infettate: febbre, malessere generale, anoressia nausea, disturbi addominali, spesso seguiti da ittero; la severità che tende ad aumentare con l'età, può variare da una forma inapparente fino ad una forma conclamata con conseguente debilitazione per alcune settimane e a volte con danni permanenti
Escrezione	L'escrezione del virus con le feci raggiunge il massimo livello durante la seconda metà del periodo di incubazione (10-14 giorni), generalmente termina nei 7 giorni seguenti la comparsa dell'ittero
Diagnosi	La diagnosi è basata sulla determinazione di anticorpi di classe IgM diretti contro il virus dell'epatite A nel siero del malato (kits diagnostici)
Immunità	L'immunità è duratura, probabilmente persiste per tutta la vita

Tabella 4 - Norwalk like e Sapporo like

Gruppo	Calicivirus
Struttura	Virione sferico di 25-30 nm di diametro, ad RNA a singola catena con un rivestimento proteico caratterizzato da depressioni sulla superficie a forma di cupola
Infezione	L'infezione interessa la mucosa intestinale ed ha un'incubazione di 24-48 ore
Malattia	Nausea, vomito, diarrea per circa 24-48 ore (Sapporo-like provocano la malattia soprattutto nell'età infantile)
Escrezione	Il virus viene escreto durante la malattia con il vomito e le feci, e probabilmente ancora per 7 giorni dopo la malattia
Diagnosi	Determinazione del virus nelle feci mediante test ELISA o PCR o microscopia elettronica. Secondo Kaplan (1982) si può sospettare che una epidemia sia dovuta ai Norwalk-like quando presenta le seguenti caratteristiche: assenza di batteri patogeni nelle feci; durata media della malattia 12-60 ore; periodo di incubazione 15-50 ore; vomito presente in più del 50% dei casi.
Immunità	Di breve durata

Modalità di infezione

I virus passano da ospite a ospite sotto forma di particelle inerti, che si presentano irregolarmente sferiche con un diametro che varia da 25 - 35 nm (Picornavirus, per es. epatite A e Calicivirus, per es. Norwalk-like, rispettivamente), a 75 nm (Rotavirus).

I virus più piccoli trasmessi con gli alimenti contengono una singola catena di RNA, mentre i Rotavirus sono a doppia catena. Sono conosciuti anche virus enterici a DNA ma per nessuno di essi è stata provata la trasmissione attraverso alimenti o acqua.

La superficie esterna dei virus è costituita da un rivestimento proteico altamente specifico che protegge l'RNA e funge da antigene contro cui si attiva la risposta immunitaria dell'ospite. Essendo particelle inerti non si riproducono al di fuori dell'ospite e quindi a differenza dei batteri, non si moltiplicano né producono tossine negli alimenti, ma possono essere semplicemente veicolati da questi nel momento dell'ingestione. In base all'interazione tra il rivestimento proteico e i recettori della cellula ospite i virus presentano specificità relativamente alla specie di ospite e ai tessuti che possono infettare, perciò virus di origine non umana, eventualmente presenti negli alimenti, sono raramente un pericolo per la salute dell'uomo (Cliver, 1988).

L'efficienza con cui i virus ingeriti infettano non è ben nota. È stato riferito che dosi minime, fino ad una singola unità infettante le culture cellulari, hanno prodotto infezione per via orale, ma dosi considerevolmente maggiori sono state necessarie in alcuni studi, ad esempio il vaccino di Sabin è somministrato a livelli di almeno 100.000 dosi infettanti per assicurare una risposta di almeno il 90%. Evidenze epidemiologiche comunque indicano che per molti virus enterici una dose infettante molto bassa, dell'ordine di 10-100 unità virali (Iverson *et al.*, 1987). È noto però che la sola presenza dell'agente patogeno non è condizione sufficiente a determinare la malattia, che dipende da una serie di fattori quali la virulenza dell'agente etiologico, l'ospite, le condizioni ambientali, biologiche, sociali e fisiche.

Dopo essere stati ingeriti con gli alimenti i virus iniziano l'infezione a livello dei tessuti dell'intestino tenue. Nella maggior parte dei casi essi si replicano a livello della mucosa intestinale, vengono liberati probabilmente insieme alle cellule infettate nel lume intestinale e passano attraverso il colon con il chimo. Alcuni virus prodotti durante la fase intestinale possono essere trasportati tramite la linfa e il sangue ad altri organi, provocando infezioni secondarie (poliomielite, miocarditi ecc.). Durante la malattia i virus vengono eliminati con le feci in gran quantità ($10^8 - 10^{10}$ virus/g), è evidente quindi che una piccola frazione di grammo di feci può contenere abbastanza virus da produrre la malattia, per tale motivo è estremamente importante osservare tutte le norme igieniche necessarie ad evitare la contaminazione dei cibi.

Alimenti associati alle infezioni virali e fonti di contaminazione

Gli alimenti coinvolti sono molteplici e vanno dall'acqua, che rappresenta una delle principali fonti di infezione, al latte (Cliver *et al.*, 1984), alla carne, alla frutta, ma un ruolo particolarmente importante è rivestito dai prodotti vegetali (insalata) e dai prodotti della pesca (soprattutto molluschi). Le potenziali fonti di contaminazione possono essere varie: animali infetti, insetti, roditori, ma quella più importante è rappresentata

dalle secrezioni ed escrezioni umane (Kramer & Cantoni, 1990). La contaminazione può avvenire durante la fase di preparazione e distribuzione degli alimenti (contaminazione secondaria) mediante il contatto di superfici contaminate, di altri alimenti o ad opera dell'operatore (portatore sano), che non rispetta rigorose norme igieniche, oppure all'origine (contaminazione primaria). Tra gli alimenti che possono essere contaminati all'origine vi sono i prodotti ortofrutticoli a causa dell'abitudine abbastanza diffusa, anche in alcune regioni del nostro Paese, di impiegare acque inquinate o reflue per l'irrigazione dei campi in cui si coltivano frutta e verdura (Ward & Irving, 1987). I virus possono essere trasferiti per contatto superficiale diretto durante l'irrigazione e la fertilizzazione, ed in base a risultati condotti con virus di mammiferi è stato anche ipotizzato che i virus potrebbero essere captati mediante le radici delle piante. Nostre prove sperimentali condotte con Poliovirus ed HAV hanno evidenziato che l'insalata irrigata con acqua contaminata è in grado di adsorbire sulla propria superficie una rilevante quantità di virus, che si mantiene a livelli elevati per diversi giorni a 4°C e non viene significativamente abbattuta in seguito al lavaggio domestico.

Altri alimenti che possono essere contaminati all'origine e che sicuramente rivestono un ruolo preminente nella trasmissione all'uomo di virus enterici sono i prodotti della pesca, in particolare i molluschi che possono essere contaminati durante il loro accrescimento quando vengono allevati in acque inquinate.

I virus enterici eliminati con le feci degli individui infetti attraverso gli scarichi arrivano alle acque superficiali, essi 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 dei batteri coliformi che, come è noto vengono utilizzati come indicatori di contaminazione fecale sia dell'acqua che dei molluschi. Inoltre molti fattori possono influenzare la sopravvivenza di tali virus, come la temperatura, la salinità, l'antagonismo microbico, le radiazioni solari e l'associazione tra gli stessi virus e particelle solide del plancton, che svolgono un'azione protettiva (Sobsey *et al.*, 1980). Di tutti questi la temperatura è il fattore più importante; ad esempio è noto che molti virus enterici possono sopravvivere anche per parecchi mesi a temperature inferiori a 10°C. I sedimenti marini, infine, costituiscono il reale *reservoir* dei virus e li proteggono dall'azione inattivante di temperatura, pH e UV, dall'antagonismo microbico ed anche dall'azione dei disinfettanti.

I molluschi sono organismi filtratori la cui attività è pressochè ininterrotta e riescono a filtrare diversi litri di acqua, a seconda delle dimensioni e della specie, un mitilo filtra a 14°C circa 1,5 l di acqua all'ora, l'ostrica europea ne filtra 12 a 15°C, mentre quella americana supera i 18 litri se tenuta a 20°C. Durante questa intensa attività di filtrazione i molluschi trattengono nel loro organismo non solo il plancton necessario al loro metabolismo, ma anche batteri e virus eventualmente presenti nell'ambiente.

I virus in particolare vengono trattenuti dai molluschi per diversi giorni, anche se posti in acque di stabulazione pulite ed è stato dimostrato che essi permangono anche dopo che questi hanno rilasciato i batteri indici di contaminazione fecale.

La legge che regola la commercializzazione dei molluschi (D.L.vo 530/92), basa il giudizio di idoneità microbiologica al consumo di tali prodotti solo sulla determinazione di parametri batteriologici (salmonelle ed *E.coli*) data la mancanza di

metodi per la ricerca dei virus da utilizzare routinariamente. Però è ormai ampiamente documentato il fatto che la presenza di virus non è sempre correlata alla presenza di batteri (Douglas *et al.*, 1983). Anzi alcuni Autori hanno dimostrato che in acque fortemente contaminate da germi, in particolare Gram-negativi, il reperimento di virus è molto scarso, forse a causa dell'azione inattivante di metaboliti batterici. Quindi dal punto di vista di una contaminazione virale potrebbero essere più pericolosi mitili stabulati in acque batteriologicamente pulite. La stessa normativa definisce inoltre che tutti i molluschi provenienti da acque non classificate idonee al consumo diretto siano sottoposti a depurazione. I dati disponibili in letteratura e i risultati di alcune nostre indagini hanno però dimostrato che i metodi attualmente in uso per il trattamento delle acque destinate alla depurazione dei molluschi, non sempre sono efficaci verso i virus enterici (Fanco *et al.* 1990; Croci *et al.* 1992).

Effetto dei sistemi di depurazione sulla contaminazione virale dei molluschi

Attualmente i metodi di disinfezione delle acque destinate alla depurazione dei molluschi si basano sulla utilizzazione di particolari agenti chimici, quali cloro, iodofori ed ozono o agenti fisici quali UV e filtrazione.

La depurazione con il cloro è stato il primo procedimento usato e sebbene 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 il cloro residuo nell'acqua deve essere abbattuto mediante tiosolfato e aereazione prima che l'acqua venga immessa nelle vasche di depurazione.

Gli iodofori vengono utilizzati in molti Paesi europei ed in particolare in Italia a concentrazioni che vanno da 0.1 a 0.4 mg/l; essi non hanno alcun apparente effetto sulla attività dei molluschi e sulle loro caratteristiche di edibilità, riducono in breve tempo la quantità di batteri presenti, ma non sono efficaci nei confronti degli enterovirus se non a concentrazioni che danneggiano i molluschi stessi (l'HAV viene inattivato a concentrazioni di iodio attivo superiori a 100 ppm).

Un altro processo di disinfezione si basa sull'impiego dei raggi UV: questo sistema è capace di distruggere i microrganismi solo quando questi vengono a stretto contatto con la luce e si è dimostrato efficace nei confronti sia di batteri che di virus. Inoltre non lascia residui, come gli altri metodi e non influenza i processi fisiologici dei molluschi. E' un metodo molto utilizzato negli USA ma necessita di un'acqua poco torbida, un flusso a strato sottile e lampade sempre efficienti. Il sistema deve essere regolarmente pulito per permettere una buona penetrazione della luce UV. Se queste condizioni non vengono rispettate, la disinfezione potrebbe risultare inefficace, questo metodo comporta costi di esercizio molto elevati.

L' utilizzo della disinfezione mediante ozonizzazione ha avuto un incremento negli ultimi anni anche nel nostro Paese.

L'ozono agisce sui batteri con azione combinata di ossidazione delle proteine, alterazione delle strutture molecolari (aggredisce in particolare i gruppi HS) e di blocco enzimatico. I virus sono soggetti allo stesso processo di eliminazione dei batteri, con la

differenza che l'ossidazione delle loro proteine avviene più facilmente in quanto privi di membrana cellulare.

Una volta depurata, l'acqua viene immessa in apposite vasche dove vengono posti a stabulare i mitili che, mediante un meccanismo di rilascio riescono a purificarsi dei microrganismi accumulati.

I tempi di depurazione (48 h) attualmente in uso si basano comunque su parametri batteriologici, ma è stato ormai più volte provato che i tempi di rilascio dei virus sono più lunghi di quelli necessari per i batteri coliformi o altri batteri patogeni; è stato inoltre dimostrato che il virus dell'epatite A viene eliminato più difficilmente rispetto agli altri enterovirus (Sobsey *et al.*, 1987).

Già da alcuni anni nel nostro laboratorio è stata affrontata la problematica, conducendo prove su molluschi sperimentalmente contaminati con Poliovirus, HAV. Campioni di molluschi venivano posti contemporaneamente sia in acqua non trattata che in acqua trattata con ozono, effettuando dei prelievi a tempi stabiliti fino alle 72 h. I molluschi posti in acqua ozonizzata presentavano un più rapido decremento del virus nelle prime ore di trattamento, che però rallentava notevolmente nelle ore successive e dopo 72 h di trattamento era ancora possibile evidenziare una significativa quantità di virus (Poliovirus $10^{1.5}$ TCID₅₀/ml; HAV 10 TCID₅₀/ml) (Croci *et al.*, 1992). Mentre prove effettuate contaminando i campioni con l'*E.coli*, germe utilizzato come indice di contaminazione fecale, hanno dimostrato che poche ore di trattamento erano sufficienti ad eliminare la contaminazione (Franco *et al.*, 1990), confermando che tale germe non è un parametro sufficiente a garantire l'assenza di virus nei molluschi e quindi la mancanza di rischio per il consumatore.

Attualmente sono in corso studi sulla depurazione dei molluschi, basati sull'utilizzo di vasche di nuova concezione con le quali è possibile regolare e mantenere costanti parametri come salinità e temperatura. Tali parametri infatti sono particolarmente importanti per il metabolismo dei molluschi e per ogni specie esistono delle condizioni ottimali, quindi si può ipotizzare, che, variando appositamente tali parametri si possa rendere più veloce ed efficace il meccanismo di rilascio dei virus da parte del mollusco. Le nostre prove, ancora non completate, indicano, entro le prime 48 h di trattamento, un rapido decremento della concentrazione di HAV da 10^4 TCID₅₀ /ml fino ad una quantità inferiore al limite di rilevabilità del metodo quantitativo su cellule (< 10 TCID₅₀ /ml). Il virus, però, evidenziato mediante RT-nested-PCR, rimane ancora presente anche in campioni mantenuti in depurazione per 120 h.

Sopravvivenza dei virus negli alimenti sottoposti a trattamenti di conservazione o inattivazione

I virus enterici, una volta arrivati nell'alimento, possono sopravvivere per periodi più o meno lunghi anche se questi vengono sottoposti a trattamenti di conservazione. Ad esempio il congelamento di frutti di mare consente la sopravvivenza dei virus enterici e dell'HAV per settimane o addirittura mesi, infatti nel 1980 in USA si è verificato un episodio di gastroenterite da Norwalk virus, causato da mitili che erano stati congelati per 15 settimane prima del consumo. Alcuni Autori hanno dimostrato che i poliovirus

sopravvivono per 30-90 giorni in ostriche congelate e oltre 300 giorni in gamberetti sgusciati mantenuti a -20°C (Di Girolamo *et al.*, 1970).

Alcuni trattamenti di bonifica sono in grado di inattivare i virus presenti, come il riscaldamento (al di sopra di 70°C) e l'irraggiamento, che provocano una denaturazione delle proteine del capsido e/o una frammentazione dell'acido nucleico.

Il più vantaggioso è comunque il calore ma spesso i componenti stessi degli alimenti possono proteggere i virus dall'effetto della temperatura, infatti è noto che un ambiente proteico protegge i virus. Da alcuni studi risulta che i molluschi forniscono una buona protezione verso il trattamento termico, viene riportato che il 7-13% di poliovirus aggiunto sopravvive in ostriche sottoposte a vari metodi di cottura (cottura a vapore, friggitura, cottura al forno ed in umido). Prove sperimentali da noi condotte hanno confermato il ruolo protettivo svolto dai tessuti dei molluschi su HAV. È stato evidenziato infatti che, a 80°C occorre prolungare i tempi di trattamento di diversi minuti per inattivare la stessa quantità di virus contenuto in un omogenato di mollusco (oltre 15 min), rispetto a quello contenuto nella sospensione virale (soltanto 3 min). Inoltre, altri autori hanno dimostrato che temperatura di $85-90^{\circ}\text{C}$ all'interno di un mollusco per 1 min è sufficiente ad inattivare completamente il virus presente (Millard *et al.*, 1987), i dati da noi ottenuti dimostrano che dopo immersione in b.m. a 100°C per 1 min. il virus presente in un omogenato di mollusco si riduce, ma è ancora quantitativamente determinabile (da 10^5 TCID₅₀ /ml a 10^2 TCID₅₀ /ml), solo mantenendo per un altro minuto il campione alle stesse condizioni (la temperatura interna raggiunge gli 85°C dopo 30 sec ed i 90°C dopo un minuto di immersione), il virus risulta completamente inattivato (Crocì *et al.*, 1999). Considerando che per alcune preparazioni domestiche i molluschi si ritengono cotti all'apertura delle valve e questa può avvenire nella cottura a vapore ad una temperatura inferiore a 70°C dopo 47 ± 5 secondi (Koff & Sear, 1967), risulta evidente come tale trattamento non sia assolutamente sufficiente a rendere salubri molluschi contaminati. Durante i procedimenti di cottura, quindi, pur preservando la gustosità del prodotto, è consigliabile porre particolare attenzione ai tempi e alle temperature, le quali devono essere raggiunte anche al cuore del prodotto dove nei primi minuti di trattamento si registra una temperatura mediamente di $7-8^{\circ}\text{C}$ inferiore a quella esterna.

Bibliografia

- CLIVER D.O. Virus Transmission via Foods. *Food Technology* 1988; 241-248.
- CLIVER D.O., ELLENDER R.D., SOBSEY M.D.. Foodborne viruses. In *Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods*, 2nd ed. (Speck M.L. ed.) American Public Health Association, Washington D.C, 1984.
- CROCI L., DE MEDICI D., GABRIELI R., FRANCO E., DI PASQUALE S., TOTI L. Effectiveness of water disinfection treatment on depuration of shellfish. *Microb. Alim. Nutr.* 1992; 10, 229-232.
- CROCI L., CICOZZI M., DE MEDICI D., DI PASQUALE S., FIORE A., MELE A. AND TOTI L. Inactivation of Hepatitis A virus in heat-treated mussels. *J. Appl. Microb.* 1999. (in press).

- DI GIROLAMO R., LISTON J. AND MATCHES J.R. Survival of virus in chilled, frozen and processed oyster. *Appl. Microb.* 1970, 20: 58-63.
- DOUGLAS A.W, HACKENEY C.R, CARRICK RJ, LOVELACE G, SOBSEY M.D. Enteric bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in hard shell clams. *J. Food Prot.* 1983; 46: 493-496.
- DÜRKOP J. Virus contamination of Surface Water *Trends in Microbial Ecology Proceeding of the Sixth International Symposium on Microbial Ecology* Barcelona, 6-11 September 1992
- FRANCO E., TOTI L., GABRIELI R., CROCI L., DE MEDICI D. AND PANÀ A. Depuration of *Mytilus galloprovincialis* experimentally contaminated with hepatitis A virus. *Int. J. Food Microb.* 1990, 11, 321-328.
- GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA D.L. vo 530 del 30 Dicembre 1992, attuazione della direttiva 91/492/CEE
- IVERSON WD, GILL M, BARTLETT CLR, CUBITT WD, MC SWIGGA D.A., Two outbreaks of foodborne gastroenteritis caused by a small round structured virus; evidence of prolonged infectivity in a food handler. *Lancet* Sept. 5th, 1987; 8558:556-558.
- KOFF R.S. & SEAR H.S. Internal temperature of steamed clams. *New Eng. J. Med.* 1967; 276 : 737-739.
- KRAMER J., CANTONI C. *Alimenti: Microbiologia e Igiene*. Ed. OEMF, S.P.A. 1990.
- KURITSKY J.N., OSTERHOLM M.T., KORLATH J.A., WHITE K.E., KAPLAN J.E. A statewide assessment of the role of Norwalk virus in outbreaks of foodborne gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 1985, 151, 568-572.
- MACDONALD K.L. & GRIFFIN P.M. Foodborne disease outbreaks. Annual Summary 1982. CDC surveillance summaries. *Morbid, Mortal. Wkly. Rept.* 1986, 35, 7SS.
- MILLARD J., APPLETON H., PARRY J.V.: Studies on heat inactivation of hepatitis A virus with special reference to shellfish. *Epid. Inf.* 1987, 98: 397-414
- MORSE D.L., GUZEWICH J.J., HANRANHAN J.P., STRIGOF R., SHAVEGANI M., DEIBEL R., GRABAU J.C., NOWAK N.A., HERMAN J.E., CUKOR G., BLACKLOW N.R. Widespread outbreaks of clam and oyster associated gastroenteritis. Role of Norwalk virus. *New Eng. J. Med.* 1986 314: 678-672.
- RAO V.C, METCALF T.G., MELNICK J.L *Human viruses in sediments, sludges, and soils* Bulletin of the W.H.O. 1986; 64: 1-14
- SOBSEY M.D, DEAN C.H, KUNCKLES M.E., WAGNER R.A. Interaction on survival of enteric viruses in soil material. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980, 40:92.
- SOBSEY MD, DAVIS AL, RULLMAN VA. Persistence of Hepatitis A virus and other viruses in depurated Easter oysters. *Proc Oceans 87*, Halifax, Nova Scotia 1987; 5: 1740-1745
- WARD K.E., IRVING L.G. Virus survival on vegetables spray washed with waste water. *Water Res.* 1987.21 : 57-61.
- WHITE K.E., OSTERHOLM M.T., MARIOTTI J.A., KORLATH J.A., LAWRENCE D.H., RISTINEN T.L., GREENBERG H.B. A foodborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis. *Ann.J.Epidemiol.* 1986. 124, 120-124.

EPIDEMIOLOGIA DELL'EPATITE A IN ITALIA

Alfonso Mele, Massimo Ciccozzi

Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica – Istituto Superiore di Sanità - Roma

L'epatite virale A è ancora oggi in Italia un importante problema di sanità pubblica, in quanto spesso causa di epidemie che talvolta raggiungono ampie dimensioni.

In Italia esiste un sistema informativo specifico per l'Epatite Virale Acuta (SEIEVA) creato nel 1984 presso l'Istituto Superiore di Sanità; con questo sistema è possibile una valutazione dell'incidenza delle epatiti acute ed è possibile impostare delle strategie di prevenzione.

Il SEIEVA utilizza le notifiche giunte al centro di riferimento mediante il modulo di trasmissione settimanale per calcolare i tassi di incidenza utilizzando come denominatore i dati dei censimenti, mentre utilizza un questionario ad "hoc" per quanto riguarda i dati clinici ed i fattori di rischio.

Le ASL aderenti al SEIEVA sono circa 129 con una copertura della popolazione di circa il 60% (Mele *et al.*, 1997).

Utilizzando i dati provenienti dal sistema di sorveglianza, è stato possibile osservare che l'epatite A costituisce attualmente il 75% delle epatiti virali acute.

I tassi di incidenza indicano una diminuzione dei casi notificati passando da un valore di 10 per 100.000 nel 1985 ad un valore di incidenza del 6 per 100.000 nel 1998 (Notiziario ISS, 1999).

Nel corso del 1997 a causa di un'epidemia accaduta nella regione Puglia i casi di epatite A notificati hanno raggiunto un tasso di incidenza di 17 per 100.000. (Tabella 1).

Tabella 1: Tassi annuali /100.000 per età, sesso per l'epatite virale A. SEIEVA 1a-52a settimana 1998.

Età	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
0-14	29	4	6	4	2	3	8	11	9	11	5	10	28	8
15-24	16	7	6	5	4	5	7	15	11	14	6	18	50	15
25 e +	2	3	1	1	2	2	2	2	3	2	1	3	6	4
Totale	10	4	2	2	2	2	4	6	5	6	3	7	17	6

La classe di età più colpita risulta quella dei giovani adulti, 15-24 anni, questo è dovuto al fatto che diminuendo l'infezione in età infantile, a causa di un miglioramento delle condizioni igienico sanitarie, si è creata una quota di soggetti suscettibili nella età in cui è più probabile l'esposizione a fattori di rischio per l'epatite A, come il consumo di frutti di mare (61% nel Nord e Centro Italia, e 72% nel Sud) e i viaggi in aree endemiche (60% riportano questo fattore di rischio).

La diffusione del virus avviene principalmente attraverso una fonte comune o attraverso contatti persona-persona. La somministrazione di immunoglobuline con un elevato titolo anticorpale è la raccomandazione che viene data nel caso di infezioni secondarie. Questa procedura deve essere avviata prima dell'esposizione, perché se somministrata successivamente non esclude comunque l'infezione. L'immunità di tipo passivo che comunque conferiscono le immunoglobuline è limitata a pochi mesi.

Uno studio recentemente condotto sulla vaccinazione dei contatti familiari di casi di epatite A, ha dimostrato una efficacia vaccinale nella prevenzione delle infezioni secondarie di circa l'80%, inoltre la vaccinazione ha l'ulteriore vantaggio di conferire una immunità permanente (Sagliocca *et al.*, 1999).

Le raccomandazioni principali sono quindi quelle di evitare il consumo dei frutti di mare crudi o poco cotti e la vaccinazione sia per chi deve affrontare viaggi in aree endemiche, sia per i familiari dei casi di epatite A al posto delle immunoglobuline.

Bibliografia

MELE A., MARZOLINI A., TOSTI M.E., CICCOZZI M., STROFFOLINI T. SEIEVA Sistema epidemiologico integrato dell'epatite virale acuta. Rapporto 1995-1996. *Rapporto ISTISAN 97/36*.

SAGLIOCCA L., AMOROSO P., STROFFOLINI T., ADAMO B., TOSTI M.E., et al. Efficacy of hepatitis A vaccine in prevention of secondary hepatitis A infection: a randomised trial. *The Lancet*, 1999, 353, 1136-39.

VIRUS DELL'EPATITE A: ASPETTI CLINICI E MOLECOLARI

Graziella Morace

Laboratorio di Virologia- Istituto Superiore di Sanità

Aspetti clinici

L'infezione da virus dell'epatite A (HAV) avviene usualmente attraverso il contatto diretto con feci infette o mediante l'ingestione di cibi contaminati con il virus. La sequenza di eventi, che porta dalla penetrazione del virus per via orale alla replicazione nel fegato, non è ancora stata completamente chiarita. Sebbene il sito bersaglio della replicazione dell'HAV sia l'epatocita, da molti anni si cerca di determinare se il virus abbia anche siti di replicazione differenti dalle cellule epatiche. In effetti, studi recenti condotti in scimmie hanno suggerito che il virus possa inizialmente riprodursi nelle cellule intestinali, dove è stato messo in evidenza alcuni giorni prima che negli epatociti (Shavrina Asher *et al*, 1995).

Dopo l'infezione con il virus si verifica un periodo di incubazione di circa 2-7 settimane, che può essere seguito dalla comparsa dei sintomi clinici (epatite itterica) o dare luogo ad una epatite inapparente (principalmente nella prima infanzia). La Tab. 1 presenta un sommario dei possibili esiti di una infezione da HAV. Come si può notare, la malattia è molto più leggera nei bambini che negli adulti, e la ospedalizzazione e l'eventuale morte sono correlate con l'aumento dell'età del paziente. Inoltre, diversamente da ciò che avviene nel caso di altri virus epatitici, l'infezione acuta da HAV non tende mai alla cronicizzazione (Hollinger & Ticehurst, 1996).

Tabella 1 - Possibili esiti di una infezione da virus dell'epatite A

Parametro	Esito	
	Bambini (<10 anni)	Adulti
Infezione inapparente	80-95%	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%

L'epatite virale acuta itterica (Tab.2) è caratterizzata da una fase prodromica di 2-10 giorni, in cui possono essere presenti malessere generale, anoressia, nausea con vomito, mialgie, ed spesso febbre. In questa fase si inizia ad osservare l'aumento delle transaminasi sieriche, le quali si incrementano gradualmente e possono raggiungere anche valori elevatissimi durante la fase itterica (500-2000 UI). Tale fenomeno è conseguente alla necrosi delle cellule epatiche infette ed è dovuto al passaggio di enzimi epatici nel torrente ematico. Successivamente compare l'ittero, prima sclerale e poi diffuso a tutta la superficie cutanea. Le urine diventano color marsala (a causa della iperbilirubinemia) e le feci ipocoliche. Il fegato è ingrandito, e nel 20% dei casi compare splenomegalia. In questa fase la bilirubinemia e le transaminasi raggiungono i valori massimi. Dopo circa 3-4 settimane i sintomi si attenuano fino a scomparire, le transaminasi e la bilirubina calano ai valori normali.

Tabella 2 - Eventi clinici nel corso di una epatite itterica acuta

Incubazione	Fase prodromica	Fase sintomatica	Guarigione
<i>Durata</i> 10 - 50 giorni	<i>Durata</i> 2 - 10 giorni	<i>Durata</i> 3-4 settimane	
<i>Dati clinici e di laboratorio</i> Assenti	<i>Dati clinici e di laboratorio</i> Malessere generale Anoressia Febbre (< 39°C) Nausea Vomito Mialgie Aumento dei valori delle transaminasi Aumento del valore della bilirubina	<i>Dati clinici e di laboratorio</i> Ittero sclerale, poi ittero diffuso Urine scure Feci ipocoliche Epato-splenomegalia Transaminasi elevate (500-2000 UI/L) Bilirubina aumentata (10-15 mg/dl)	<i>Dati clinici e di laboratorio</i> Calo transaminasi (ai valori normali) Calo bilirubina (ai valori normali) Scomparsa ittero Normalizzazione delle dimensioni del fegato Feci normali Urine normali

La Fig. 1 presenta uno schema degli eventi immunologici e clinici più rilevanti che si verificano nel corso di una epatite acuta. Come si può notare, l'HAV appare nelle feci e nel sangue dei pazienti prima della comparsa dei sintomi clinici, circa 2 settimane dopo l'infezione. La viremia è in genere breve e la quantità di virus presente nel sangue è bassa, se confrontata con quella presente nelle feci. Il sangue non è generalmente un veicolo di trasmissione dell'infezione, sebbene, alcuni anni fa, siano stati riportati dei casi di infezione in emofiliaci che avevano ricevuto Fattore VIII preparato da sangue contaminato con il virus (Mannucci *et al*, 1994). Le feci, invece, a causa dell'alta

concentrazione di virus presente (fino a 10^9 virioni/g), sono altamente infettive e possono trasmettere il virus fino a circa 2 settimane dopo la comparsa dei sintomi clinici, sia direttamente, sia per ingestione di cibi da esse contaminati.

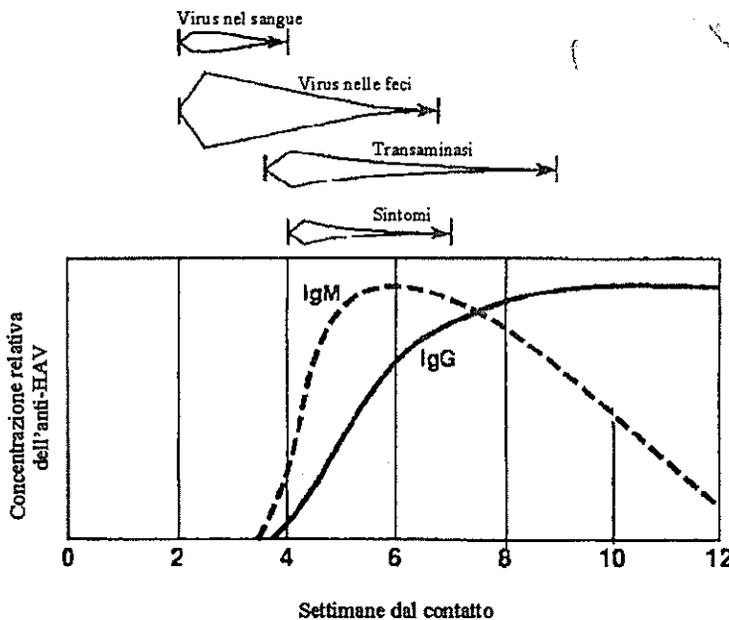


Figura 1 - Eventi immunologici e clinici nel corso della malattia

Nonostante l'elevata quantità di virus nelle feci, per la diagnosi di epatite virale di tipo A non è conveniente tentare l'isolamento del virus, poiché l'HAV si adatta difficilmente alla crescita in coltura cellulare e sono necessari vari passaggi per mettere in evidenza gli antigeni virali. Invece, la diagnosi viene fatta basandosi sulla presenza degli anticorpi anti-HAV, e principalmente delle IgM, le quali compaiono circa 4 settimane dopo il contatto con il virus e persistono per circa un anno. Poco dopo le IgM, compaiono nel sangue le IgG, che persistono per tutta la vita e sono protettive contro tutti i ceppi di HAV, poiché esiste un solo sierotipo del virus.

I sintomi clinici dell'epatite (tra cui l'ittero, l'aumento delle transaminasi, e gli squilibri più o meno marcati della funzionalità epatica) sono la diretta conseguenza della distruzione delle cellule infette, in seguito alla moltiplicazione virale.

Il meccanismo alla base del danno epatico che segue l'epatite A non è ancora stato definitivamente chiarito. Il virus dell'epatite A appartiene alla famiglia dei Picornavirus, le cui particelle mature escono dalla cellula disintegrandola. Ciò aveva fatto inizialmente presupporre una correlazione diretta tra la crescita virale e il danno epatico. Tuttavia numerosi studi hanno successivamente dimostrato che l'HAV differisce, sotto questo punto di vista, dagli altri membri della famiglia poiché non induce in genere

danni evidenziabili in coltura cellulare. Inoltre, l'osservazione dell'assenza di danni epatici durante la fase iniziale dell'infezione, quando la produzione di virus è maggiore, suggerisce che la replicazione virale in se stessa non sia probabilmente responsabile dei cambiamenti patologici. Appare invece probabile che il sistema immunitario dell'ospite contribuisca in maniera rilevante alla patogenesi dell'epatite A. In effetti, studi in vitro hanno mostrato che le cellule infettate dall'HAV, e che esprimono i suoi antigeni sulla membrana cellulare, sono riconosciute e distrutte dai linfociti killer e dai linfociti T citotossici (Siegl & Weiz, 1993).

Occasionalmente, durante l'epatite acuta può verificarsi una necrosi massiva del fegato, con severa compromissione delle funzioni epatiche, seguita spesso da morte del paziente. Tale forma di epatite, definita epatite fulminante, è fortunatamente rara e si verifica in meno dell'1,5% dei casi di epatite acuta. Come già riassunto nella tabella 1, il rischio di morte aumenta con l'aumentare dell'età del paziente, ed è maggiore dopo i 40 anni. La necrosi massiva caratteristica dell'epatite fulminante potrebbe essere la conseguenza di una eccessiva risposta immunitaria cellulare da parte dell'individuo o dell'infezione con varianti virali più patogene.

Nel 3-20% dei casi di epatite acuta si può osservare un prolungamento dei sintomi clinici o una recrudescenza dei sintomi dopo una apparente guarigione (epatite recidivante). Gli episodi di epatite A ricorrente possono essere più d'uno, e i titoli degli enzimi epatici possono rimanere elevati fino ad un anno, tuttavia non si osserva mai cronicizzazione. La causa delle infezioni ricorrenti non è stata ancora determinata, ma vi sono numerose ipotesi. Le più verosimili ipotizzano la possibilità che l'infezione con HAV possa scatenare, in alcuni individui, l'insorgenza di fenomeni autoimmuni che proseguirebbero il danneggiamento del fegato, iniziato dalla infezione virale, oppure la possibile esistenza di ceppi o varianti di HAV più virulenti. In effetti, l'isolamento di ceppi o varianti che, diversamente dalla maggior parte dei ceppi conosciuti, inducono danni nelle cellule in coltura (effetto citopatico) (Venuti *et al*, 1985; Shen *et al*, 1986; Lemon *et al*, 1991), potrebbe fornire sostegno a questa seconda ipotesi.

Aspetti molecolari

Il virus dell'epatite A appartiene alla famiglia dei Picornavirus, che comprende diversi virus causa di infezioni enteriche, ed è classificato nel genere Hepatovirus (Francki *et al*, 1991). Come per tutti i Picornavirus, il virione è una particella nuda con un diametro di 27nm e contiene un genoma ad RNA a singola elica a polarità positiva. Tuttavia, diverse caratteristiche biologiche distinguono l'HAV dagli altri membri della famiglia (Tab. 3):

- 1) le sequenze nucleotidica ed aminoacidica dell'HAV sono molto differenti da quelle degli altri e così pure i pesi molecolari e le funzioni di alcune proteine;
- 2) l'HAV si adatta difficilmente a crescere in coltura cellulare e cresce comunque molto lentamente, senza indurre, in genere, danni cellulari visibili (effetto citopatico);

- 3) presenta un solo sierotipo, sebbene siano stati isolati molti ceppi differenti in diverse parti del mondo;
- 4) è molto più resistente all'inattivazione degli altri picornavirus. L'infettività è mantenuta anche dopo permanenza di oltre due mesi nei cibi, nell'acqua e su molti tipi di superfici, sia in ambiente umido sia essiccato, e per alcuni anni a -20°C (Abad *et al.*, 1994; Hollinger & Ticehurst, 1996). Il virus viene completamente inattivato solo dopo alcuni minuti a $98-100^{\circ}\text{C}$, od in autoclave a 121°C per 20 minuti; inoltre, sono efficaci il trattamento con formalina, con composti contenenti cloro e con radiazioni ultraviolette.

Tabella 3 - Caratteristiche biologiche dei picornavirus

	Hepatovirus	Enterovirus (Polio, Coxsachie, Echo)	Rhinovirus	Aphthovirus
<i>Sierotipi</i>	1	71	100	7
<i>Ospite bersaglio</i>	Uomo (ed altri mammiferi)	Uomo (ed altri mammiferi)	Uomo (ed altri mammiferi)	Bovini (ed altri mammiferi)
<i>Spettro d'ospite</i>	Stretto	Da stretto ad ampio	Stretto	Ampio
<i>Bersaglio primario</i>	Fegato	Tratto gastro-intestinale	Vie respiratorie superiori	Generalizzato
<i>Sensibilità</i>				
<i>PH 1</i>	Stabili	Labili	Labili	Labili
<i>PH 3</i>	Stabili	Stabili	Labili	Labili
<i>Calore (60°C x 60 min)</i>	Stabili	Labili	Labili	Labili
<i>Guanidina</i>	Relativamente resistenti	Sensibili	Sensibili	Resistenti
<i>Proteine virali mature (kD)</i>				
<i>VP1</i>	<33,2	33,5	32,4	23,3
<i>VP2</i>	24,8	30,0	28,5	24,7
<i>VP3</i>	27,8	26,4	26,2	24,3
<i>VP4</i>	<2,5 (?)	7,4	7,2	8,5
<i>VPg</i>	2,4	2,3	2,4	2,6
<i>Genoma (RNA)</i>				
<i>Lunghezza</i>	7,5 kb	7,4 kb	7,2 kb	8,4 kb
<i>Cross-ibridazione</i>	HAV	Enterovirus, rhinovirus	Rhinovirus, enterovirus	Aphthovirus

Il genoma dell'HAV è costituito da circa 7500 basi (Fig. 2) e può essere suddiviso in tre parti: una regione non codificante all'estremità 5' (5'NTR) che costituisce circa 10% del genoma, a cui è legata covalentemente una proteina virale (VPg) che interviene

nella replicazione; un lungo open reading frame, che codifica tutte le proteine virali; e una corta regione non codificante all'estremità 3' (3'NTR), seguita da una coda poli-A, di 40-80 nucleotidi (Hollinger & Ticehurst, 1996).

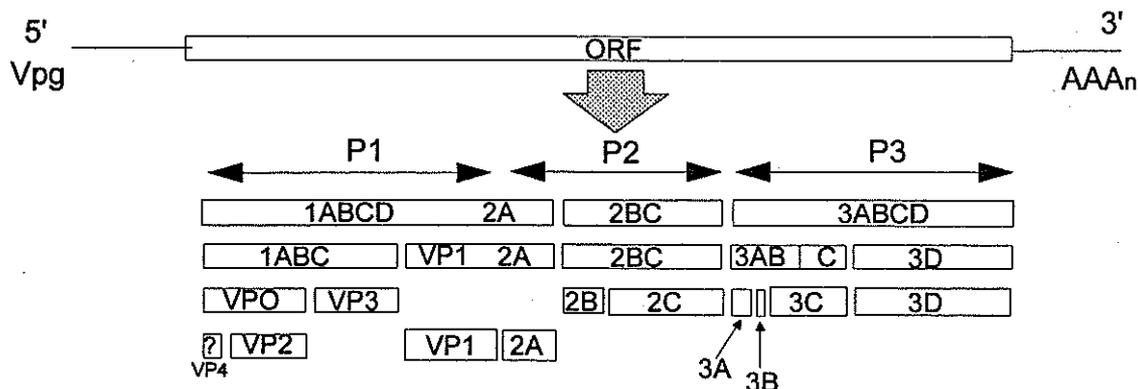


Figura 2 - Genoma del virus dell'Epatite A

La regione genomica 5'NTR presenta numerose strutture secondarie (Fig. 3), che contengono segnali per il riconoscimento e legame da parte dei ribosomi dell'ospite al genoma virale (IRES). Inoltre, i nucleotidi compresi tra 1 e 150 sembrano essere necessari per l'inizio della sintesi di nuovo RNA virale (formazione del complesso replicativo). Anche la regione 3'NTR presenta strutture secondarie importanti nella replicazione virale (Brown *et al.*, 1993; Kusov *et al.*, 1997).

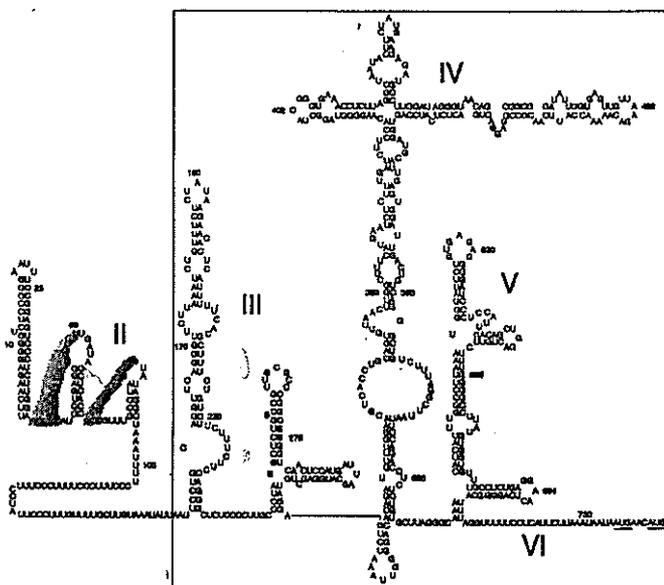


Figura 3 - Regione 5' NTR dell'HAV. I domini strutturali maggiori sono indicati con i numeri romani. La regione di attacco dei ribosomi (IRES) è delimitata dal riquadro.

L'open reading frame codifica per una lunga poliproteina che viene tagliata dopo la trascrizione dalla polimerasi virale, per dare origine alle proteine mature e a vari intermedi utilizzati durante la replicazione virale (Fig. 2). Può essere suddivisa in 3 regioni: P1-2A, che codifica per le proteine del capsido, e P2' e P3, che codificano per le proteine non strutturali.

La tabella 4 descrive le funzioni, finora identificate, svolte dalle varie proteine dell'HAV.

Tabella 4 - 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 Picornavirus. Interviene nell'assemblaggio del capsido 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 per la 3B alle membrane cellulari. Interagisce con l'RNA virale durante la replicazione.
3D	RNA Polimerasi virale RNA-dipendente.

Alcuni anni fa un gruppo di ricercatori francesi ha condotto una analisi di sequenza e di ibridazione con sonde molecolari, per determinare le regioni genomiche maggiormente conservate nel genere degli enterovirus della famiglia dei picornavirus. Tale studio comprendeva anche il virus dell'epatite A, poiché in quel periodo esso era ancora classificato come enterovirus n.72; solo successivamente esso è stato classificato in un nuovo genere in base alle differenze genomiche e biologiche osservate (Tabella 3). Lo studio ha mostrato che alcune regioni del genoma degli enterovirus sono altamente

conservate, e che sonde molecolari che riconoscono alcune di queste regioni cross-reagiscono tra i diversi membri del genere, ad esclusione dell'HAV. L'ordine generale di conservazione individuato è: 5'NCR > 3'NCR > 2C > VP3 > VP1 (Tabella 5) (Kopecka *et al*, 1988).

Tabella 5- Omologia di sequenza di alcuni picornavirus con le regioni genomiche del poliovirus (PV-1).

Virus	Ribosonda				
	5'NTR	VP3	VP1	2C	3'NTR
PV-1 M	+++	+++	+++	+++	+++
PV-1 S	+++	+++	+++	+++	+++
PV-2 W.T.	+++	+++	+++	+++	+++
PV 3-W.T.	+++	+++	+++	+++	+++
Cox A21	++	+	+	+	+
Cox A9	+++	++	-	++	+
Cox A7	+	+	-	+	+
ECHO 9	+++	+	-	+	+
Cox B4	+	+	-	+	+
ECHO 11	+	-	-	+	+
ECHO 33	++	-	-	+	+
Cox B1	++	-	-	+	+
Cox B3	++	-	-	+	+
ECHO 22	-	-	-	-	-
HAV	-	-	-	-	-
TMEV	-	-	-	+	+
HRV-2	+++	-	-	+++	-

Ibridazione negativa (-) o ibridazione positiva, in funzione dell'intensità del segnale (+, ++, +++) visibile dopo autoradiografia per 40 ore.

W.T.: wild-type; TMEV: virus dell'encefalite murina di Theiler; HRV: rhinovirus umano.

Questo ordine generale non si applica totalmente all'HAV. Infatti, il paragone tra le sequenze nucleotidiche di quattro ceppi di HAV isolati in differenti parti del mondo, inclusa l'Italia (Najarian *et al*, 1985; Cohen *et al*, 1987; Paul *et al*, 1987; Beneduce *et al*, 1995), ci ha mostrato che la regione genomica VP4-VP2 (Fig. 2) presenta maggiore omologia tra i vari ceppi rispetto alla 5'NTR. Pertanto i primers utilizzati per mettere a punto la PCR per la ricerca dell'HAV da campioni ambientali sono stati scelti in questa zona. Tali primers sono stati selezionati in base all'omologia del 100% rispetto alle regioni genomiche corrispondenti dei ceppi usati come riferimento e sono quindi in grado di riconoscere qualsiasi altro ceppo di HAV. Inoltre, l'analisi al computer, effettuata paragonando tutti i genomi virali e non virali riportati nelle banche dati, ha mostrato l'assenza di cross-reattività con qualsiasi microrganismo noto.

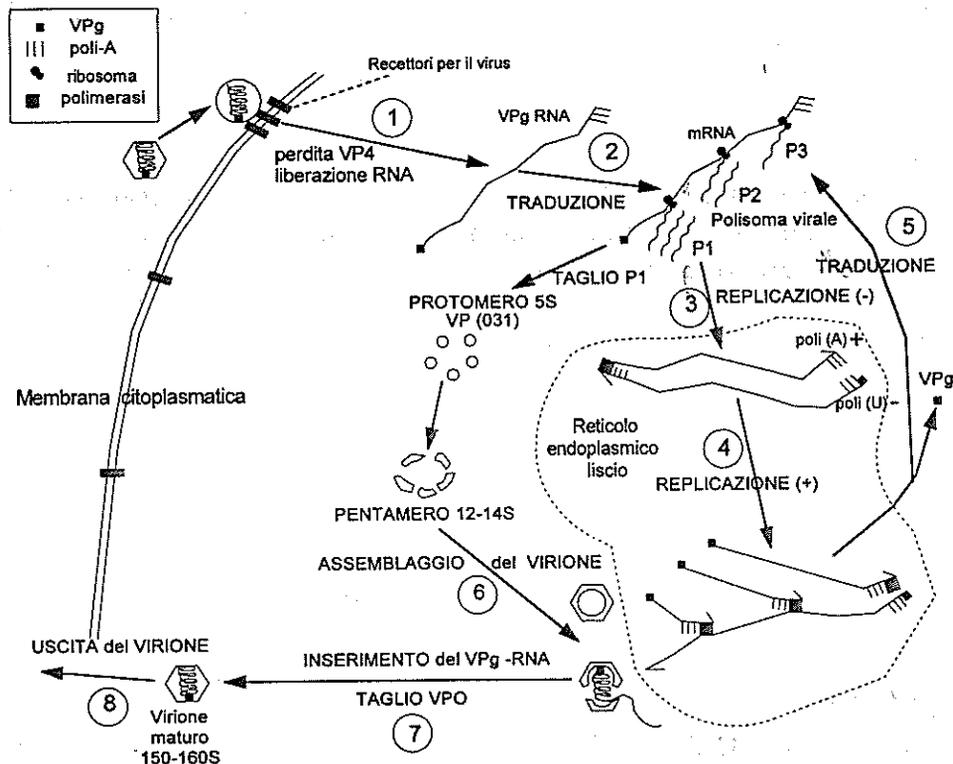


Figura 4 - Ciclo vitale dell'HAV nell'epatocita.

Nella cellula ospite, in cui il virus penetra per endocitosi dopo essersi legato al recettore specifico sulla membrana cellulare (Fig. 4), l'RNA viene tradotto nella lunga poliproteina che viene successivamente 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 è 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). 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 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 (Gauss-Müller & Deinhardt, 1984).

Le basi molecolari della citopatogenicità di alcuni ceppi di epatite A non sono ancora state chiarite. Un ceppo citopatico isolato in Italia e sequenziato nel laboratorio di Virologia dell'Istituto, ha mostrato una variazione genomica, rispetto ai ceppi non citopatici, che è presumibilmente correlata con la sua capacità di indurre danni cellulari (Beneduce *et al.*, 1995). Tale variazione consiste nella delezione di tre aminoacidi nella

porzione aminoterminale della proteina 3A, che le conferisce la capacità di creare pori nella membrana cellulare e quindi di indurre la lisi delle cellule infette in coltura (Pisani *et al*, 1995; Beneduce *et al*, 1997; e dati non pubblicati). Tale ceppo con capacità patogenetica diretta per le cellule in coltura potrebbe essere correlato con i casi di epatite protratta descritti in Italia, o comunque con forme di epatite più severa.

Uno dei progetti congiunti tra il laboratorio di Alimenti e quello di Virologia prevede di amplificare tramite PCR, e sequenziare, porzioni di genoma del virus dell'epatite A identificati in campioni ambientali e da alimenti mediante i primers descritti, per verificare la diffusione di tale ceppo in Italia e, successivamente, di verificare se esso sia associato a forme di epatite più severa o protratta. I primers che verranno utilizzati per questa ricerca sono stati sintetizzati in maniera da identificare la porzione della 3A contenente la delezione caratteristica del ceppo italiano.

Bibliografia

- ABAD F.X., PINTÒ R.M., BOSCH A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60: 3704-3710.
- BENEDUCE F., PISANI G., DIVIZIA M., PANÀ A., MORACE G. Complete nucleotide sequence of a cytopathic hepatitis A virus strain isolated in Italy. *Virus Res.* 1995, 36: 299- 309.
- BENEDUCE F., CIERVO A., MORACE G. Site-directed mutagenesis of hepatitis A virus protein 3A: effects on membrane interaction. *Bioch. Biophys. Acta* 1997, 1326: 157-165.
- BROWN E.A., ZAJAC A.J., LEMON S.M. In vitro characterization of an internal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *J. Virol.* 1993, 68: 1066-1074.
- COHEN J.I., TICEHURST J.R., PURCELL R.H., BUCKLER-WHITE A., BAROUDY B.M. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J. Virol.* 1987, 61: 50-59.
- FRANCKI R.I.B., FAUQUET C.M., KNUDSON D.L., BROWN F. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 1991, 2:320-326.
- GAUSS- MÜLLER V., DEINHARDT F. Effect of hepatitis A virus infection on cell metabolism in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 175: 10-15.
- HOLLINGER F.B., TICEHURST J.R. Hepatitis A virus. In "*Fields Virology*", 3rd Edition. (B.N. Fields et al. ed). Lippincott-Raven, Philadelphia. Pagg.735-782, 1996.
- KOPECKA H., PREVOT J., GIRARD M., FUCHS F., AYMARD M. Interet des sondes ARNc (ribosondes) synthetises in vitro dans la detection des enterovirus par hybridation moleculaire. *Ann. Inst. Pasteur/Virol.* 1988, 139: 217-225.
- KUSOV Y.Y., MORACE G., PROBST C., GAUSS-MÜLLER V. Interaction of hepatitis A virus (HAV) precursor proteins 3AB and 3ABC with 5' and 3' termini of the HAV RNA. *Virus Res.* 1997, 51: 151-157.

LEMON S.M., MURPHY P.C., SHIELDS P.A., PING L., FEINSTONE S.M., CROMEANS T., JANSEN R.W. Antigenic and genetic variations in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J. Virol.* 1991, 65: 2056-2065.

MANNUCCI P.M., GDOVIN S., GRINGERI A., and The Italian Collaborative Group. Transmission of hepatitis A to patients with hemophilia by factor VIII concentrates treated with organic solvent-detergent to inactivate viruses. *Ann. Int. Med.* 1994, 120:1-7.

NAJARIAN R., CAPUT D., GEE W., POTTER S.J., RENARD A., MERRYWEATHER J., VAN NEST G., DINA D. Primary structure and gene organization of human hepatitis A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82:2627-2631.

PAUL A.V., TADA H., VON DER HELM K., WISSEL T., KIEHN R., WIMMER E., DEINHARDT F. The entire nucleotide sequence of the genome of the human hepatitis A virus (isolate MBB). *Virus Res.* 1987, 8: 153-161.

PISANI G., BENEDEUCE F., GAUSS-MÜLLER V., MORACE G. Recombinant expression of hepatitis A virus protein 3A: interaction with membranes. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 1995, 211: 627-638.

SHAVRINA ASHER L.V., BINN L.N., MENSING T.L., MARCHWICHI R.H., VASSELL R.A., YOUNG G.D. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J. Med. Virol.* 1995, 47: 260-268.

SHEN W., LIAN-CAI J., HUI-XUN S., XI-TAN Z., QUING-HAI M., XUE-GUANG L. Strain of hepatitis A virus causing cytopathic effect isolated in A549 cell line. *Chin med. J.* 1986, 99:387-392.

SIEGL G., WEITZ M. Pathogenesis of hepatitis A: persistent viral infection as basis of an acute disease? *Microb. Pathog.* 1993, 14: 1-8.

VENUTI A., DI RUSSO C., DEL GROSSO N., PATTI A.M., RUGGERI F., DE STASIO P.R., MARTINELLO M.G., PAGNOTTI P., DEGENER A.M., MIDULLA M., PANÀ A., PEREZ-BERCOFF R. Isolation and molecular cloning of a fast-growing strain of human hepatitis A virus from its double-stranded replicative form. *J. Virol.* 1985, 56: 579-588.

VALUTAZIONE SULLA PRESENZA DEL VIRUS DELL'EPATITE A NELL'AMBIENTE

Maurizio Divizia

Università di Roma "Tor Vergata", Dipartimento di Sanità Pubblica, Cattedra di Igiene, Facoltà di Medicina.

Il virus dell'epatite A è stato inizialmente classificato come enterovirus 72 appartenente al gruppo Enterovirus, che comprende Poliovirus, Echovirus e Coxsackievirus. Solo successivamente, in base alle caratteristiche biologico-molecolari del virus, è stato separato come gruppo a se stante.

In effetti, il virus dell'epatite A, a differenza degli altri enterovirus, presenta alcune caratteristiche peculiari, quali: lenta replicazione cellulare e una bassa progenie virale, limitato numero di cellule suscettibili al virus e, soprattutto, assenza di effetto citopatico.

Il virus presenta una classica trasmissione oro-fecale e l'incorretto trattamento delle acque reflue urbane rappresenta sicuramente una delle principali vie di disseminazione del virus (Divizia *et al.*, 1989). Sebbene la presenza del virus a livello ambientale sia certa il suo isolamento è piuttosto complesso legato a diverse problematiche quali: la bassa concentrazione virale, la necessità di concentrare grandi volumi d'acqua, la perdita di virus durante le fasi di concentrazione e la copresenza di altri virus enterici.

Per lunghi anni i ricercatori hanno focalizzato l'attenzione su altri virus ambientali quali ad esempio il poliovirus sia per la maggiore facilità di isolamento su sistemi cellulari che per la sua assenza di pericolosità, legata alla vaccinazione di massa. Solo recentemente ci si è resi conto come il poliovirus sia più sensibile all'inattivazione con disinfettanti naturali e artificiali, e che la sua assenza non assicura l'assenza anche del virus dell'epatite A. In questi ultimi anni i ricercatori hanno tentato, a causa della mancanza di correlazione tra i virus enterici e gli indicatori batteriologici di contaminazione fecale, di individuare altri indicatori della presenza di virus nell'ambiente (Grabow *et al.*, 1988). L'attenzione è stata rivolta verso i virus dei batteri, i fagi, ed in particolar modo i colifagi somatici, i fagi F-plus ed il fago B40/8 del *Bacteroides Fragilis*. Sfortunatamente nessuno ha dato risultati soddisfacenti e lo stesso Autore (Donia *et al.*, 1999) ha evidenziato una correlazione positiva tra i seguenti gruppi: colifagi somatici-streptococchi fecali-enterovirus e B40/8-streptococchi fecali-enterovirus ma solo in acque reflue grezze di un impianto di trattamento di reflui urbani dove la presenza di enterovirus è in pratica certa. Diversamente non si è evidenziata alcuna correlazione nei reflui finali.

Una citazione a parte meritano le tecniche di concentrazione dei virus enterici da campioni ambientali. Tali tecniche vanno accuratamente standardizzate per ogni virus e spesso una tecnica valida per un determinato virus enterico non è applicabile ad altri così come tecniche diverse possono dare risultati differenti. Ad esempio, in una recente

indagine (Divizia *et al.*, 1998), su campioni di acque prelevati a diversi stadi di un impianto di depurazione, l'Autore ha dimostrato una maggiore sensibilità delle membrane a carica superficiale elettropositiva rispetto a quelle a carica superficiale elettronegativa (Tabella 1).

Tabella 1. - Ricerca del virus dell'epatite A in campioni di acque reflue.

Campioni	Acque reflue	Acque parzialmente trattate		Acque trattate	
		Viros.	HAWP	Viros.	HAWP
Metodo	Ultrafiltrazione	Viros.	HAWP	Viros.	HAWP
Positivi su totale	8/10	3/10	2/10	3/10	1/10

Ultrafiltrazione: sistema Prep-scale Millipore; Viros.: Virosorb, membrane a carica superficiale elettropositiva; HAWP: membrane a carica superficiale elettronegativa

La positività verso il virus dell'epatite A era determinata con test PCR seguito da ibridazione molecolare con sonda specifica e scanner del film di ibridazione.

Un altro problema che si incontra nell'isolamento del virus dell'epatite A è l'utilizzo di tecniche di identificazione. Queste si sono ampiamente modificate nel corso degli anni e possono essere suddivisi in tre gruppi: sistemi biologici che comprendono l'inoculazione in scimmie e su sistemi cellulari; i sistemi immunologici che comprendono i test di immunofluorescenza, Elisa, radioimmunologici ed il test radioimmunofocus (RIFA); i sistemi molecolari che comprendono le sonde molecolari e il test PCR (test di reazione a catena della polimerasi).

Per quanto riguarda i sistemi biologici l'inoculazione su scimmia è, per evidenti motivi, non più utilizzata mentre l'inoculazione su cellule è ancora largamente utilizzata. E' bene comunque ricordare che il virus dell'epatite A si moltiplica solo su pochissime linee cellulari, ma senza indurre alcun effetto citopatico, ed inoltre l'isolamento richiede tempi estremamente lunghi, non adatti per un'analisi di acque potabili o di alimenti.

I metodi cellulari, sebbene siano i soli in grado di dimostrare la presenza di virus infettivo, sono processi il cui risultato finale è fortemente influenzato dalla tossicità del campione, dalle linee cellulari utilizzate e da loro stato fisiologico, dalla copresenza di altri virus enterici a più rapida replicazione. E' solo nel 1979 che si è riusciti a adattare ad una specifica linea cellulare, FrHK, il virus dell'epatite A. Nel corso degli anni, e dopo ripetuti e numerosi passaggi cellulari, il virus è stato adattato ad altre linee cellulari ma sempre dimostrando una lenta replicazione virale e una bassa produzione di progenie virale. Tale produzione, spesso cellulo-associata, in genere non supera il titolo di 10^5 - 10^6 TCID₅₀/ml contro 10^8 - 10^9 TCID₅₀/ml del poliovirus.

La tossicità del campione è un altro fattore veramente limitante nella ricerca del virus dell'epatite A come di ogni altro virus enterico. E' sufficiente pensare alle diverse matrici ambientali per comprendere come esse siano molto differenti. Nel caso di omogenati di mitili (Kader *et al.*, 1994) così come da campioni di fanghi di risulta di impianti di depurazione di acque reflue, la tossicità su sistemi cellulari è talmente elevata da necessitare una prediluizione elevata del campione aumentando la quantità di materiale da inoculare su monostrati cellulari ed indirettamente i costi di analisi.

I sistemi immunologici comprendono i test Elisa, immunofluorescenza, radioimmunologici e radioimmunofocus (RIFA). Il primo test può essere applicato anche a campioni ambientali concentrati mentre gli altri solo a sistemi cellulari infettati. Sfortunatamente la sensibilità di tali test non è molto elevata e da campioni ambientali, sia di acque sia di alimenti, difficilmente si può arrivare ad una risposta positiva anche in presenza di virus (Tabella 2).

Tabella 2 - Limiti di sensibilità delle diverse metodiche

Metodo	Sensibilità
Colture cellulari	+/- 1 particella infettiva
Elisa	1×10^5 particelle virali
Radioimmunologico	$1 \times 10^4 / 10^5$ particelle virali
Radioimmunofocus	1×10^3 particelle virali
Ibridazione molecolare	$1 \times 10^2 / 10^3$ particelle virali
P.C.R.	3-30 particelle virali

Negli anni più recenti accanto ai test tradizionali si sono sviluppati test più innovati quali i test biologico-molecolari che comprendono il test di ibridazione molecolare con sonde marcate e il test di reazione a catena della polimerasi o PCR. Questi test sono stati utilizzati inizialmente nel campo strettamente medico ma, successivamente, sono stati applicati anche a diversi altri aspetti della ricerca biologica, quale quello ambientale. Il primo test sviluppato è stato l'ibridazione molecolare utilizzando sonde (frammenti genomici complementari a porzioni del genoma virale) marcate con sistemi radioattivi. Tali sonde hanno aperto la strada alla biologia-molecolare in campo ambientale ma presentavano alcuni problemi quali: la necessità di utilizzare materiale radioattivo, la scarsa sensibilità di poco superiore a quella dei test immunologici e la necessità di utilizzare in largo eccesso il probe marcato; ciò era possibile solo dopo clonaggio in plasmidi batterici del frammento di genoma virale scelto "ad hoc". Lo stesso batterio si incaricava poi di ampliare, moltiplicandosi, la quantità di genoma virale inserito. Premesso ciò, risulta evidente come il test di ibridazione non sia notevolmente diffuso, ma già nel 1988 Cova, dopo attenta analisi genetica, dimostrò come fosse possibile produrre una sonda dalla regione 5'-

genomica in grado di "riconoscere" tutti i virus enterici con l'eccezione del virus dell'epatite A, e viceversa un probe scelto nella regione codificante per la proteina strutturale VP1 del poliovirus poteva discriminare questi virus dagli altri enterovirus. Cova riuscì a dimostrare che: il test di ibridazione è altamente specifico, il virus dell'epatite A non appartiene al gruppo degli altri enterovirus e, infine, con un solo test di ibridazione, utilizzando una sonda nella regione 5'- genomica, era possibile identificare più virus contemporaneamente. Lo stesso Autore, in uno studio condotto sul fiume Tevere (Divizia *et al.*, 1991) ed utilizzando sonde specifiche per enterovirus e per il virus dell'epatite A, dimostrò, in più campioni, la contemporanea copresenza dei due virus, così come la presenza di virus enterici in campioni che batteriologicamente rispondevano ai parametri di legge.

Successivamente, accanto alle sonde "calde" furono utilizzate sonde non radioattive (fredde) marcate con enzimi (fosfatasi alcalina, perossidasi), fluorocromi (fluoresceina), apteni, biotina, basi azotate modificate, ecc. Tra tutti i sistemi non "caldi" utilizzati, solo la digossigenina ha dimostrato una sensibilità paragonabile a quella dei sistemi radioattivi e comunque superiore di 10-1000 volte rispetto ai sistemi di marcatura enzimatica (Tabella 3).

Tabella 3 - Sensibilità dei sistemi di rivelazione del test di ibridazione.

Perossidasi	10 - 100
Fosfatasi	10 - 100
Biotina-complesso avidina-perossidasi	5 - 10
Biotina-complesso avidina-fosfatasi	5 - 10
Digossigenina	0,1 - 1
Sonde calde	0,1

La sensibilità è espressa in picogrammi.

Più recentemente, la reazione a catena della polimerasi (PCR) ha permesso una più ampia diffusione della ricerca ed ha avuto un notevole impulso anche in campo ambientale. La PCR consiste nell'amplificazione del frammento genomico bersaglio mediante una reazione 2^n con n uguale al numero dei cicli di amplificazione. Rispetto a test di ibridazione, la PCR ribalta completamente il concetto, nel primo test era presente una forte eccedenza di sonda rispetto al bersaglio, nel secondo si amplifica il bersaglio riducendo la sonda. La PCR determina quindi un aumento tale delle sequenze bersaglio che queste possono essere visualizzate semplicemente su gel di agarosio in bromuro d'etidio. In verità, nei primi lavori, alla PCR doveva seguire un'ibridazione con una sonda interna alla zona amplificata, marcata calda o fredda, per confermare l'amplificazione specifica. In un altro studio, condotto nel corso di un'epidemia di epatite A in due scuole dell'area di Roma

(Divizia *et al.*, 1993), il virus non fu isolato su colture cellulari ma la sua presenza fu evidenziata inequivocabilmente da concentrati di acqua di pozzo sospetta utilizzando un test PCR ed ibridazione.

Nel 1990 Jansen dimostrò chiaramente come il limite di sensibilità della PCR, applicata a lisati cellulari per la ricerca dell'HAV, fosse di sole 3-30 particelle virali. Tale elevata sensibilità fu confermata in uno studio condotto su campioni del fiume Tevere dove i test tradizionali dimostrarono una sensibilità inferiore (Elisa: 15,3%; colture cellulari: 23%) rispetto ai metodi biologico molecolari (ibridazione: 38,4%; PCR: 67%) (Morace *et al.*, 1993). Lo studio permise di dimostrare la notevole circolazione dell'HAV in campo ambientale.

Due sono i fondamentali problemi legati all'uso del test PCR: la PCR è applicabile solo a bersagli a DNA e la presenza di inibitori specifici e aspecifici presenti nei campioni ambientali. In campo ambientale tutti i virus sono, con l'eccezione degli Adenovirus, ad RNA obbligando, quindi, ad una reazione di retrotrascrizione dell'RNA virale a cDNA (DNA complementare all'RNA genomico, reazione RT-PCR), che rappresenta il vero punto debole del test PCR. L'altro problema è legato alla presenza di inibitori della reazione ed ogni ricercatore ha standardizzato un suo metodo particolare e sicuramente valido, anche se tutti comportano una serie di passaggi che possono causare perdita di materiale. Dalla nostra personale esperienza i kit commerciali a base di guanidina isotiocianato sono validi per i campioni ambientali previa purificazione dei virus mediante doppia precipitazione con PEG6000. Jansen (1990) ha standardizzato un metodo di estrazione dell'HAV da campioni, rivestendo le provette di PCR con monoclonali (antigen-antibody capture method). Il test permette, con un semplice lavaggio delle provette, l'eliminazione di tutti gli inibitori presenti. Tale metodica è oramai universalmente accettata per la ricerca dell'HAV nei campioni ambientali ed adottata anche per altri virus enterici.

L'utilità della tecnica di PCR si riferisce anche alla possibilità di identificare i diversi genotipi di un virus e meglio evidenziare i rapporti causa-effetto in caso di episodi epidemici. Robertson (1992), analizzando le sequenze nucleotidiche della giunzione VP1/2A dell'HAV notò una notevole eterogeneità di sequenza, tanto da classificare l'HAV in sette distinti genotipi diversamente distribuiti nel mondo sebbene tutti appartengano ad un unico sierotipo. Pebody (1998) fu in grado di identificare due diversi genotipi di HAV in un'epidemia di epatite a trasmissione alimentare. In una recente epidemia di HAV in Canada (De Serres *et al.*, 1999) l'analisi genomica del virus dimostrò chiaramente l'origine comune del ceppo di HAV responsabile dell'evento, mentre gli Autori riuscirono anche a "seguire" il virus nella sua diffusione nella falda freatica fino ai pozzi acquiferi distanti anche 60 metri dal pozzo nero del caso indice. Tale studio sarebbe stato improponibile utilizzando solamente i metodi classici di identificazione.

Progressivamente allo sviluppo delle analisi genetiche e alla messa a punto di primers sempre più specifici e selettivi, si è andato diffondendo l'uso delle PCR multiple (multiplex RT-PCR), non solo nell'indagine clinica ma anche ambientale. Il test consiste

nell'utilizzare, in un'unica reazione di PCR e per un unico campione, più coppie di primers per lo screening di più virus enterici, anche non appartenenti alla stessa famiglia. La metodica è stata da noi applicata con successo su diverse matrici ambientali sperimentalmente contaminate con Poliovirus, virus dell'epatite A e virus dell'epatite E.

Sebbene il test PCR sia estremamente sensibile, partendo da campioni ambientali ove la presenza di inibitori della reazione enzimatica è certa, e considerando sia la perdita di materiale e la degradazione spontanea dell'RNA virale, sia per aumentare la sensibilità e specificità del metodo, ad una prima reazione di PCR è fatta seguire una seconda reazione di amplificazione utilizzando primers interni alla regione amplificata: nested RT-PCR. La nested RT-PCR si è andata largamente diffondendo specie per campioni, come omogenati di mitili e fanghi di disidratati, ove il rendimento della prima PCR non è molto elevato.

Un ultimo accenno riguarda la presenza di reti telematiche che mettono a disposizione software di analisi genomica estremamente sofisticata e complessi, ma che hanno determinato un aumento esponenziale dell'uso di test RT-PCR e dell'analisi e confronto delle sequenze amplificate (Divizia *et al.*, 1999).

Bibliografia

- COVA L., KOPECKA H., AYMARD M. et al. Use of cRNA probes for the detection of enteroviruses by molecular hybridization. *J Med Virol* 1998; 24: 11-18
- DE SERRES G., CROMEANS T.L., LEVESQUE B. et al. Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water: epidemiology and public health implication. *J Infect Dis* 1999; 179: 37-43.
- DIVIZIA M., DE FILIPPIS P., DI NAPOLI A., VENUTI A., PEREZ-BERCOFF R., PANÀ A. Isolation of wild-type hepatitis A virus from the environment. *Water Research* 1989; 23 (9): 1155-1159.
- DIVIZIA M., DEGENER A.M., RIPANTI L. et al. Indagini sullo stato di salute del fiume Tevere. *Igiene Moderna* 1991; 95:715-729.
- DIVIZIA M., GNESIVO C., AMORE BONAPASTA R. et al. Hepatitis A virus identification in an outbreak by enzymatic amplification. *Eur. J. Epidemiol.* 1993; 9:203-208.
- DIVIZIA M., RUSCIO V., DEGENER A.M. et al. Hepatitis A virus detection in wastewater by PCR and hybridization. *Microbiologica* 1998; 21:161-167.
- DIVIZIA M., PALOMBI L., BUONOMO E, et al. Genomic characterization of human and environmental poliovirus isolated in Albania. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999; 65 (8): 3534-3539.
- DONIA D, DIVIZIA M, PANÀ A. Presence of bacteriophages in different stages of wastewater treatment. *Igiene Moderna* 1999; 111: 1-13.
- GRABOW W.O.K., IDEMA G.K., COUBROUGH P et al. Selection of indicator system for human viruses in polluted seawater and shellfish. *IAWPRC Newsletter* 1988; 13: 24-27.

JANSEN R.W., SIEGEL G., LEMON S.N. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen capture/polymerase chain reaction method. *Proc. Nat. Acad. Science* 1990; 87: 2867-2871.

KADER O.A., DIVIZIA M., EL GHAZZAWI E. et al. Detection of hepatitis A virus in artificially contaminated mussels by polymerase chain reaction. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*. 1994; 12: 179-183.

MORACE G., PISANI G., DIVIZIA M. et al. Detection of hepatitis A virus in concentrated river water by polymerase chain reaction. *Zentralblatt fur Hygiene*. 1993; 193: 521-527.

PEBODY R.G., LEINO T., RUTU P. et al. Foodborne outbreaks of hepatitis A in a low endemic country: an emergent problem. *Epidemiol Infect* 1998; 120: 5-59.

ROBERTSON B.H., JANSEN R.W., KHANNA B. et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 1365-1377.

TECNICHE CLASSICHE ED INNOVATIVE PER LA DETERMINAZIONE DEI VIRUS ENTERICI NEGLI ALIMENTI, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO AL VIRUS DELL'EPATITE A

Dario De Medici

Laboratorio di Alimenti - Istituto Superiore di Sanità - Roma

Introduzione

Gli alimenti sono stati identificati come veicoli di malattie enteriche di origine virale fin dagli anni '50, i rischi epidemiologici però relativi a questo tipo di contaminazione sono ancora poco conosciuti, anche a causa della scarsa diffusione dei metodi per la determinazione di tali agenti patogeni, che al momento attuale risultano ancora di non semplice esecuzione.

Sono conosciuti oltre 120 differenti tipi di virus enterici, suddivisi in diversi gruppi in relazione delle loro caratteristiche morfologiche, fisiche, chimiche ed antigeniche (Rao V.C. *et al.*, 1986; Dürkop J., 1992). Essi includono gli Enterovirus, gli Adenovirus, i Reovirus, i Rotavirus, i Calicivirus, e vari agenti virali che sono identificati ogni anno

L'efficacia con cui i virus enterici ingeriti provocano una malattia non è ben nota, ma è stato dimostrato per alcuni di loro che l'ingestione di 10-100 particelle è sufficiente a causare episodi gastroenterici.

Gli studi condotti per individuare i parametri capaci di garantire l'idoneità degli alimenti, rispetto ai pericoli d'origine virale, hanno seguito due diverse direzioni: la prima cerca di evidenziare organismi indici della contaminazione virale umana, la seconda tende alla definizione di metodi d'analisi idonei alla determinazione diretta dei virus enterici in matrici complesse come gli alimenti.

Organismi indicatori

Le difficoltà derivate dalla messa a punto di metodi d'analisi di facile applicazione al controllo routinario delle contaminazioni virali negli alimenti hanno suggerito a diversi ricercatori di cercare di identificare un organismo indice, di facile determinazione, che risultasse strettamente correlato alla presenza di contaminati virale di origine umana.

A tale scopo è stato proposto l'utilizzo di vari organismi indice sia di origine batterica (coliformi e streptococchi fecali, *E. coli*), che di origine virale (colifagi, fagi F+, il fago del *Bacteroides Fragilis* (Havelaar A.H. *et al.*, 1993; Lucena *et al.*, 1994, Contato E. *et al.* 1995)

I virus enterici mostrano, però, una più elevata resistenza nell'ambiente rispetto ai batteri, ed inoltre in acque molto contaminate da germi, il reperimento di virus è spesso molto scarso, forse a causa dell'azione inattivante dei metaboliti batterici.

E' stata inoltre recentemente dimostrata, in una indagine compiuta su campioni di molluschi eduli lamellibranchi prelevati in diverse aree del Mar Adriatico, la mancanza di correlazione tra presenza di fagi e di virus enterici. (Croci *et al.*, 1999).

Metodi di determinazione diretta dei virus enterici

La mancata definizione di microrganismi indice ha quindi indirizzato la ricerca alla messa a punto di metodi per la determinazione diretta dei virus enterici negli alimenti.

Tali tecniche hanno trovato però, molte difficoltà per la loro elaborazione dovute principalmente alla complessità e diversità del gruppo dei virus enterici, alla loro bassa dose infettante e alla presenza negli alimenti di varie molecole che interferiscono con i diversi metodi utilizzabili.

Infatti nella definizione di un metodo d'analisi da applicare per la determinazione dei virus enterici negli alimenti si devono soddisfare alcune esigenze, quali:

- poter determinare anche un piccolo numero di virus
- avere tempi di determinazione contenuti
- essere di costo non troppo elevato
- essere di facile esecuzione
- poter determinare, quando possibile, virus infettanti

Le tecniche fin qui proposte possono essere divise in *metodiche tradizionali* che si basano sull'utilizzo delle colture cellulari, e *metodiche innovative* che impiegano tecniche immunologiche (immunofluorescenza, RIA, ELISA), tecniche di biologia molecolare (sonde, PCR) ed infine sistemi integrati (la combinazione di due metodi).

Metodi tradizionali

Sistemi biologici – Le colture cellulari sono state estesamente applicate in vari studi effettuati per la determinazione di virus enterici nell'ambiente (Patti A.M. & Santi A.L., 1992) e sugli alimenti.

La presenza del virus e la sua crescita in tale substrato viene evidenziata o dalla morte cellulare (effetto citopatico CPE) o dall'insorgenza di aree di degenerazione in una cultura monostrato posta sotto terreno semisolido (placche).

L'evidenziazione del CPE può essere meglio evidenziata con la colorazione delle cellule o con l'identificazione delle cellule infette per mezzo di anticorpi fluorescenti.

L'isolamento dei virus enterici su colture cellulari sebbene rappresenti una prova inconfutabile della presenza di virus infettivo è un processo piuttosto lungo e indaginoso, e non tutti i virus enterici possono essere determinati utilizzando questo sistema.

Infatti, solo il 60-70% degli enterovirus è coltivabile su cellule (Tab.1); il virus dell'epatite A, gli Adenovirus, gli Astrovirus e i Rotavirus sono coltivabili solo in misura limitata e con particolari accorgimenti, mentre tutti i Calicivirus, non sono coltivabili.

Tabella 1 – Colture cellulari utilizzate per l'isolamento degli enterovirus da diverse matrici

Virus	Primo espianto	Linee continue					Cellule diploidi
	Rene di scimmia	VERO	BGM	Hela	Hep2	RD	MRC5
Poliovirus	+	+	+	+	+	+	+
Coxsackie A	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*
Coxsackie B	+	+	+	+/-	+/-	-	-
Echovirus	+	+	+	+/-	+/-	+	+

* Con l'eccezione di alcuni stipiti.

L'isolamento degli enterovirus richiede 2-8 giorni mentre sono necessari tempi più lunghi per gli altri virus enterici. Per il virus dell'epatite A, ad esempio, sono necessarie almeno 4-6 settimane, e solo su un numero limitato di linee cellulari alcuni genotipi del virus crescono dando un evidente effetto citopatico.

Per evidenziare l'effetto citopatico spesso è, necessario adattare il virus a crescere su quella linea cellulare, con conseguente aumento del tempo richiesto per l'analisi.

Un altro fattore che limita l'uso delle colture cellulari è rappresentato dalla tossicità del campione. Tale tossicità, spesso elevata, comporta una diluizione inevitabile del campione stesso ed un aumento altrettanto rilevante dei costi.

Inoltre la crescita di alcuni virus su alcune linee cellulari può essere inibita competitivamente da altri virus che crescono su quelle linee cellulari più rapidamente.

Per quanto riguarda la determinazione del virus dell'epatite A, si è rivelata estremamente utile aggiungere la guanidina idrocloruro nel terreno di crescita cellulare alla concentrazione finale 1 mM (Siegl & Eggers, 1982), che inibendo lo sviluppo degli eventuali enterovirus presenti nel campione, facilita l'evidenziazione dell'HAV, che cresce più lentamente. La crescita del virus su questi substrati, nonostante i limiti prima descritti, rappresenta l'unica via per dimostrare in maniera inconfutabile la presenza del virus infettivo, e quindi il reale rischio per la salute. Anche la definizione di metodi alternativi, quindi, non deve fermare gli sforzi per cercare di rendere più efficiente questo sistema, allo scopo di individuare linee cellulari e condizioni tali da permettere la crescita dei virus enterici oggi incoltivabili o difficilmente coltivabili.

Metodiche innovative

Negli ultimi anni accanto ai metodi tradizionali di isolamento su colture cellulari, si sono sviluppati altri metodi che non evidenziano il virus mediante la sua crescita, ma attraverso la determinazione di una parte caratteristica della sua struttura. Le tecniche più utilizzate sono quelle radioimmunologiche, immunoenzimatiche e di biologia molecolare (Tab. 2).

Tabella 2 – Limiti di sensibilità dei metodi proposti per la ricerca dei virus enterici negli alimenti

Metodo	Limite di sensibilità
Colture cellulari	≈1 particella virale infettiva
Radioimmunologico	10 ⁴ 10 ⁵ particelle virali
Elisa	10 ⁵ particelle virali
Radioimmuno focus	10 ³ particelle virali
Ibridazione molecolare	10 ² 10 ³ particelle virale
Nested – PCR	1 particella virale
Colture Cellulari – PCR (sistema integrato)	≈1 particella virale infettiva

I metodi radioimmunologici e immunoenzimatici, che si sono dimostrati molto utili in campo clinico, si sono dimostrati difficilmente applicabili nell'analisi degli alimenti poiché il loro limite di sensibilità è troppo alto.

Sistemi molecolari - I metodi di biologia molecolare quale l'utilizzo delle sonde molecolari (probe) e della tecnica di reazione a catena della polimerasi (PCR) hanno suscitato un notevole interesse principalmente per la rapidità delle risposte. Le sonde molecolari (probes) sono costituite da sequenze note di DNA, RNA od oligonucleotidi di sintesi che opportunamente marcati possono riconoscere specificamente le sequenze bersaglio complementari. L'uso delle sonde molecolari per la ricerca dei virus enterici, che ha avuto l'indubbio merito di aver introdotto le tecniche di biologia molecolare nel campo della virologia alimentare, si è rivelato di scarso interesse, in quanto il limite di sensibilità di tale tecnica si è rivelato troppo alto per garantire la sicurezza d'uso degli alimenti rispetto al rischio virale.

La reazione a catena della polimerasi è stata elaborata e perfezionata da un gruppo di ricercatori della Cetus Corporation. (Mullis K.B. & Fallopa F.A., 1987; Saiki *et al.*, 1985).

Tale tecnica consente l'amplificazione di sequenze specifiche e selettive del genoma virale secondo la relazione teorica 2^n , con n uguale al numero di cicli di amplificazione.

La reazione avviene nel modo seguente: un segmento di DNA, che si trova tra due regioni con sequenza nota, è amplificato mediante l'utilizzazione di due oligonucleotidi (primers) che danno luogo ad una serie di reazioni sintetiche catalizzate da una DNA polimerasi.

Questi oligonucleotidi tipicamente hanno differenti sequenze che si trovano sugli opposti filamenti del DNA stampo e che delimitano il segmento che deve essere amplificato. Le due catene del DNA stampo sono prima divise per riscaldamento in presenza di un eccesso molare dei due oligonucleotidi e dei quattro deossinucleotiditri-fosfato, che legandosi formeranno il filamento copia. La miscela è quindi raffreddata ad una temperatura, che permetta agli oligonucleotidi-primers di

legarsi con le loro specifiche sequenze complementari, e di dar inizio alla reazione di polimerizzazione.

Il protocollo originale della tecnica utilizzava la DNA polimerasi I dell'*E.coli* per catalizzare la reazione. Questo enzima presentava però dei problemi di inattivazione alle temperature richieste per la separazione dei due filamenti. Questi problemi sono stati risolti con l'introduzione di una DNA polimerasi termostabile estratta dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*, che non è inattivato anche a temperature di 95°C e quindi non dovendo essere aggiunto al termine di ogni ciclo di polimerizzazione ha permesso di mettere commercio strumentazioni che ripete i cicli più volte in automatico, semplificando di molto l'utilizzo di questa metodica. Inoltre la più alta temperatura di polimerizzazione (72°C) riduce gli errori durante le fasi di anelling e di copiatura (Saiki *et al.*, 1988).

Sono state proposte diverse coppie di primer in grado di riconoscere non solo le singole famiglie virali, ma anche nell'ambito di queste i diversi sierotipi.

Le limitazioni principali che rallentano la applicazione di questa metodica per il controllo delle contaminazioni virali degli alimenti sono rappresentate dall'impossibilità di discriminare tra virus infettante e non infettante, la difficoltà di quantificare l'amplificato e la presenza di molte sostanze inibenti della reazione di PCR. Per quanto attiene al primo punto, in effetti né le sonde molecolari né il test PCR sono in grado di attuare tale discriminazione, mentre solo le particelle infettanti rappresentano un rischio per la salute pubblica. La presenza di genomi virali, sono comunque un indice d'avvenuta contaminazione che in ogni modo deve essere attentamente valutata. Inoltre la stessa integrità del virus non può essere testimonianza della virulenza, in quanto è stato notato che i virus animali a singolo filamento di RNA possono essere associati con endoribonucleasi che sono responsabili della parziale degradazione dell'RNA virale senza provocare danni nel capsido.

Sobsey suggerisce che si dovrebbe mettere a punto una strategia di concentrazione e di clen-up del campione, che mantenga il più a lungo possibile l'integrità del virus, prima dell'amplificazione enzimatica. L'obiettivo dovrebbe essere quello di ridurre quanto possibile il volume dell'estratto del campione, rimuovendo qualunque sostanza interferente. Il campione in seguito dovrebbe essere posto in una soluzione acquosa compatibile sia con la PCR sia con altri metodi di quantificazione, come la determinazione dell'infettività espressa come TCID50 o conta per placche.

Un'ulteriore limitazione all'uso della PCR è legata agli stessi virus che s'intende ricercare, sfortunatamente tutti ad RNA fatta ad eccezione che per gli Adenovirus. La reazione della PCR deve essere inevitabilmente associata ad una reazione di reverse-trascriptase (RT-PCR) allo scopo di polimerizzare DNA dall'RNA virale.

L'RNA è una molecola molto più instabile del DNA ed è facilmente degradato dalle RNAsi, enzimi molto diffusi ed estremamente resistenti, diviene quindi necessario fare particolare attenzione durante le operazioni analitiche, precedenti la fase di retrotrascrizione, a non contaminare il campione con RNAsi naturalmente presenti sulla cute ed ad utilizzare preferibilmente materiale monouso o, in alternativa, vetreria trattata al calore a secco (alcune RNAsi sono stabili al trattamento di sterilizzazione in autoclave). L'uso d'enzimi o sostanze inibenti le RNAsi aiutano a prevenire la degradazione del RNA.

Diversi Autori hanno proposto l'utilizzo della PCR per la determinazione dei virus enterici, utilizzando diversi metodi d'estrazione e di purificazione.

Tutti questi metodi hanno però dimostrato una sensibilità ($\sim 10^3$ TCID₅₀) molto inferiore di quella attesa dovuta alla inefficacia dei trattamenti di purificazione a eliminare dal campione totalmente le sostanze inibenti la reazione di PCR. Tale sensibilità non risulta essere idonea a garantire la salubrità degli alimenti, anche in considerazione che 1 TCID₅₀ corrisponde approssimativamente a 100 particelle virali nel caso degli enterovirus e di 60 particelle virali nel caso del HAV.

Recentemente alcuni Autori (Hafliger *et al.*, 1997; De Medici *et al.*, 1998, Croci *et al.*, 1999, Green *et al.*, 1998) hanno proposto l'utilizzo di una seconda fase di amplificazione utilizzando uno (semi-nested) o due primer (nested) interni alla regione precedentemente amplificata, allo scopo di rendere la reazione più specifica e sensibile. La nested-PCR inoltre permette di eliminare la fase di ibridizzazione che alcuni Autori (Lees *et al.*, 1995) avevano individuato come indispensabile per la determinazione di una concentrazione accettabile di virus enterici nei molluschi.

Sistemi integrati - L'utilizzo di un sistema integrato colture-PCR può eliminare i limiti prima descritti che sono propri dell'utilizzo diretto delle tecniche di biologia molecolare. La tecnica integrata colture cellulari-PCR consiste nell'inoculazione di un estratto concentrato del campione su monostrato cellulare che permette la crescita dei virus eventualmente presenti (Reynolds *et al.*, 1996). Il monostrato infettato è quindi incubato per un tempo minimo da permettere una crescita virale tale che successivamente nel lisato cellulare, ottenuto attraverso successivi trattamenti di congelamento e scongelamento, ci sia una concentrazione del virus tale da poter essere determinata mediante PCR (24 h per gli enterovirus, circa 15 gg per l'HAV).

Questo sistema si è rivelato molto più sensibile e rapido del solo utilizzo delle colture infatti, la determinazione della presenza del virus non è effettuata evidenziando cambiamenti morfologici delle cellule, e quindi permette la determinazione facilmente anche di virus che solo raramente danno effetti citopatici sulle cellule quali l'HAV e i rotavirus. Inoltre questa fase di "prearricchimento quasi selettivo", permettendo la moltiplicazione delle cellule virali infettive, consente la loro determinazione applicando la sola PCR diretta, che in questo caso non deve essere seguita da una fase di nested.

L'utilizzo quindi della RT-nested-PCR diretta dovrebbe essere allo stato attuale delle conoscenze utilizzata solo come metodo di screening per la determinazione dell'RNA virale, che deve essere seguita, quando possibile, da una prova di conferma per stabilire la reale infettività del virus utilizzando un sistema integrato colture cellulari-PCR.

PCR quantitativa

Un interessante sviluppo futuro delle tecniche d'amplificazione sarà sicuramente costituito dall'applicazione dei metodi di PCR-quantitativa. Tra i sistemi proposti a questo scopo quelle che sembrano più interessanti sono: la PCR competitiva e la PCR "real time".

PCR competitiva - Sono state proposte varie tecniche di PCR quantitativa, una delle più vantaggiose è rappresentata dalla PCR competitiva che si basa sul principio che se nella miscela di reazione sono presenti due substrati, in quantità equimolecolare, che competono per i reagenti, questi si ritroveranno nello stesso rapporto anche alla fine delle successive fasi d'amplificazione (Marin, 1996).

Il substrato competitore dovrà avere, quindi, una sequenza il più possibile simile alla sequenza bersaglio, essere delimitata dagli stessi siti di riconoscimento dei primer utilizzati. Il competitore deve però differire dalla sequenza bersaglio in un qualsiasi modo che permetta di distinguere facilmente i prodotti d'amplificazione che derivano dal competitore da quelli che provengono dall'acido nucleico oggetto della ricerca.

La costruzione di competitori, che diano prodotti di reazione con un peso molecolare diverso da quello della sequenza "bersaglio" e distinguibile utilizzando semplici tecniche, quali l'elettroforesi su gel d'agarosio, costituisce uno dei sistemi più semplici di differenziazione.

La PCR competitiva è effettuata mediante aggiunta di quantità scalari note del competitore a reazioni di PCR contenenti il campione da testare.

Le due sequenze saranno amplificate contemporaneamente utilizzando gli stessi primers e quando le quantità della sequenza "bersaglio" del campione e del competitore saranno equivalenti, si accumuleranno quantità uguali dei rispettivi prodotti.

Il competitore può anche essere utilizzato come standard interno per la verifica della efficienza di tutto il processo analitico dall'estrazione del RNA virale dal campione alla reazione di amplificazione. La reazione di RT-PCR, infatti, quando è utilizzata in campioni di alimenti può essere inibita da una molte molecole nel campione stesso e dar luogo ad una serie di reazioni falsamente negative.

PCR "Real-Time" - Una delle prime esigenze che un ricercatore vorrebbe avere soddisfatta, quando si avvicina alla PCR e alle tecniche di biologia molecolare, è quello di poter "vedere" quello che succede all'interno della provetta in tempo reale per potersi rendere conto di cosa sta succedendo.

Già nel 1992 Higuchi *et. al.* avevano costruito un sistema che poteva determinare i prodotti della PCR così come questi si accumulavano.

Questo sistema utilizzava la capacità del bromuro di etidio d'intercalarsi tra i due filamenti del DNA e di emettere fluorescenza quando irradiato con luce U.V.. La fluorescenza risultante era registrata in "tempo reale" da una telecamera collegata ad un computer ed incrementava in funzione dell'aumento dei doppi filamenti di DNA nella miscela di reazione.

Da quel primo sistema sono derivati altri strumenti, di ancora alto costo, che stanno però entrando in molti laboratori di ricerca.

I sistemi di PCR quantitativa in "Real-Time" utilizzano principalmente due procedimenti di rilevazione dell'accumulo dei prodotti di PCR:

- coloranti che si legano specificamente con i doppi filamenti di DNA
- sonde legate a molecole fluorescenti

Il primo sistema che si ricollega a quello proposto inizialmente da Higuchi utilizza coloranti fluorescenti che devono avere la caratteristica di legarsi specificamente alle doppie catene di DNA incrementando il segnale emesso e non devono interferire con la reazione di PCR. Oltre al classico bromuro di etidio altri coloranti sono stati proposti anche se quello che sembra dare i migliori risultati è il SYBR®Green I, anche se non si conosce il meccanismo di interazione di questo colorante con il DNA.

Lo svantaggio e contemporaneamente il vantaggio di questo sistema è che questi coloranti si legano indiscriminatamente a qualunque doppio filamento di DNA perdendo quindi di specificità. D'altra parte quest'aspecificità del legame colorante-DNA permette al sistema di essere utilizzato per qualunque tipo di reazione di amplificazione. Più di una molecola di colorante potrà legarsi ad un singolo filamento di DNA, così che, amplificati lunghi genereranno un segnale più intenso di quelli corti.

L'utilizzo delle sonde fluorescenti ha aumentato la specificità del sistema prima descritto. Queste sonde, infatti, si legano contemporaneamente alla coppia di primer durante l'amplificazione forniscono alla reazione un sistema di rilevamento dell'accumulo dei prodotti estremamente specifico.

Queste sonde sono legate a due sostanze fluorescenti: il reporter e il quencher.

Nella sonda integra il quencher blocca l'emissione da parte del reporter, così che l'emissione è molto bassa.

La sonda, dopo essersi specificamente attaccata alla sequenza specifica del DNA bersaglio, è degradata dall'attività DNAsica della Taq-polimerasi, quindi il reporter separato dal quencher potrà emettere fluorescenza alla sua lunghezza specifica, cambiando di intensità.

Il vantaggio di questa tecnica è che la reazione è molto specifica, inoltre l'utilizzo di sonde legate a molecole che emettono fluorescenza a diverse lunghezze d'onda permette di poter distinguere contemporaneamente amplificati generati da diverse reazioni.

A differenza dei coloranti che si legano con il DNA, in questo caso un singolo fluorocromo è rilasciato per ogni molecola di DNA sintetizzata.

Lo svantaggio dell'utilizzo di sonde fluorescenti è rappresentato dal fatto che devono essere sintetizzate differenti sonde per rilevare sequenze diverse.

Bibliografia

- CONTATO E., MIROLO G., SARTEA A., TAMPIERI M.L., TUFFANELLI A., CHIOCCIOLI M., BUCCI G. Batteriofagi nei mitili e in acque di molluschicoltura. *Ig. Moderna* 1995: 103, 361-371
- CROCI L, DE MEDICI D, MORACE G, FIORE A, SCALFARO C, BENEDEUCE F, TOTI L. Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested reverse transcription-PCR. *Int J Food Microbiol* 1999 Apr 1; 48(1):67-71

- CROCI L., DE MEDICI D., SCALFARO C., FIORE A., DIVIZIA M., DONIA D., COSENTINO A.M., MORETTI P., COSTANTINI G. Determination of enteroviruses, Hepatitis A virus, bacteriophages and *E.coli* in Adriatic sea mussels. *J. Appl. Microb.* 1999 (in press)
- DE MEDICI D, BENEDEUCE F, FIORE A, SCALFARO C, CROCI L. Application of reverse transcriptase-nested-PCR for detection of poliovirus in mussels. *Int J Food Microbiol* 1998 Mar 3; 40: 51-6
- DÜRKOP J. Virus contamination of Surface Water *Trends in Microbial Ecology Proceeding of the Sixth International Symposium on Microbial Ecology* Barcelona, 6-11 September 1992
- GREEN J., HENSHILWOOD K., GALLIMORE C.I., BROWN D.W., LEES D.N. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Appl. Environ Microbiol.* 1998 Mar;64(3): 858-63
- HAFLIGER D., GILGEN M., LUTHY J., HUBNER P. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 1997, 37: 27-36.
- HAVELAAR A.H., VAN OLPHEN M., DROST Y.C. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993 59: 2956-62
- HIGUCHI R., DOLLINGER G., WALSH P.S., GRIFFITH R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992; 10: 413-7
- LEES D.N., HENSHILWOOD K., GREEN J., GALLIMORE C.I., BROWN D.W. Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 4418-24
- LUCENA F., LASOBRAS J., MCINTOSH D., FORCA M., JOFRE J. Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of *Bacteroides fragilis* phages and coliphages in mussels. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60 :2272-7
- MARIN M.G. *Tecniche di amplificazione genica: dal laboratorio alla pratica.* (a cura di L. Spandrio) 1996 Edizioni Sorbona Milano
- MULLIS K.B. & FALLONA F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155: 335-350.
- PATTI A.M. & SANTI A.L. General principles of laboratory methods for virus detection in environmental samples *Ann. Ig.* 1992; 5: 317-322
- RAO V.C, METCALF T.G., MELNICK J.L. Human viruses in sediments, sludges, and soils *Bullettin of the W.H.O.* 1986; 64: 1-14
- REYNOLDS K.A., GERBA C.P., PEPPER I.L. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 1424-7
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEN S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A. Primer directed Enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239; 487-491.

SAIKI R.K., SHARF S., FALOONA F., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N. Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.

SIEGL G. & EGGERS H.J. Failure of Guanidine and 2-(α -Hydroxybenzyl)-benzimidazole ti inhibit replication of hepatitis A virus *in vitro*. *J. Gen Virol.* 1982, 61, 111- 114.

USO DELLA RT-NESTED-PCR PER LA DETERMINAZIONE DELL'HAV NEGLI ALIMENTI

Alfonsina Fiore, Simona Di Pasquale, Concetta Scalfaro
Laboratorio di Alimenti - Istituto Superiore di Sanità - Roma

Introduzione

Gli alimenti coinvolti nella trasmissione all'uomo di virus enterici sono molteplici e vanno dall'acqua, che rappresenta una delle principali fonti di infezione, al latte, alla carne, alla frutta, ma un ruolo particolarmente importante è rivestito dai prodotti vegetali (insalata) (Badawy *et al.* 1984; Ward and Irving 1987) e dai prodotti della pesca (soprattutto molluschi) in ragione del fatto che possono essere consumati crudi (Cliver 1988; Mele *et al.* 1996).

La mancanza di normative che prevedano la ricerca dei virus enterici, e in particolare del virus dell'epatite A, per il controllo degli alimenti, nasce dalla indisponibilità fino ad oggi di un metodo di analisi sufficientemente sensibile e semplice da poter essere usato a livello routinario. Tale carenza ha portato all'impossibilità anche di effettuare monitoraggi che indichino l'incidenza delle contaminazioni di origine virale negli alimenti.

Nella messa a punto di una metodica per la determinazione di virus enterici, bisogna tener conto dei seguenti fattori:

tempi di determinazione contenuti, determinazione anche di un piccolo numero di particelle virali, costo non troppo elevato, facilità di esecuzione.

Molte delle metodiche proposte nel corso degli anni, per la ricerca dei virus negli alimenti, si sono dimostrate complesse e scarsamente riproducibili (Le Guyader *et al.* 1994; Severini *et al.* 1993).

Il metodo proposto, basato sull'applicazione di principi di biologia molecolare si presenta rapido e di facile esecuzione e consiste nelle seguenti fasi:

- estrazione e concentrazione del virus ;
- estrazione e purificazione dell'RNA virale;
- retrotrascrizione;
- prima amplificazione (PCR);
- seconda amplificazione (Nested-PCR);

Estrazione e concentrazione del virus dagli alimenti

Molluschi - La fase di estrazione prevede il recupero del virus dalla complessa matrice alimentare e rappresenta perciò un passaggio essenziale per la successiva fase di amplificazione.

La fase di concentrazione è altrettanto importante in quanto permette di superare una delle difficoltà del recupero dei virus dagli alimenti, rappresentata dal basso numero di particelle virali presenti.

A tale scopo è stato scelto il sistema glicina-PEG che prevede l'uso combinato del tampone glicina per la fase di estrazione, e del PEG (polyethylene glycol) per la fase di concentrazione (Croci *et al.* 1993). La glicina permette di eluire il virus eventualmente adsorbito al mollusco ed inoltre rispetto ad altri eluenti usati, ha mostrato minori interferenze durante la fase di PCR riducendo il carico organico. Il PEG intrappola il virus nelle sue maglie e ne permette una migliore separazione durante le successive fasi di centrifugazione previste dal protocollo sperimentale. Esso, inoltre rispetto ad altri sistemi di concentrazione, è di basso costo, non prevede l'utilizzo di particolari apparecchiature e permette di poter trattare contemporaneamente più campioni.

Prodotti vegetali - Per l'estrazione del virus dell'epatite A dai prodotti vegetali è stato scelto come eluente il Beef Extract al 3% che, come risulta dalla letteratura, offre miglior recupero delle particelle virali. La fase di concentrazione del virus viene effettuata tramite ultracentrifugazione per le sue caratteristiche di semplicità ed affidabilità (Croci *et al.* 1991).

Tale tecnica non viene utilizzata per i molluschi, a causa di un precipitato di difficile recupero con piccoli volumi di soluzione.

L'utilizzo di guanidina isotiocianato nella fase di estrazione consente di eliminare l'azione inibente di molecole comunemente presenti nel terreno, quali gli acidi umici, che possono interferire con i risultati.

Estrazione e purificazione dell' RNA virale

La fase di estrazione, si avvale dell'uso della Soluzione D (Afzal and Minor 1994) che permette di estrarre l'RNA virale dal capsido proteico, mediante agenti detergenti e deproteinizzanti.

Usando questa soluzione infatti, la lisi cellulare, la denaturazione delle proteine e la neutralizzazione delle RNasi, avvengono tutte allo stesso tempo e rapidamente.

Tale soluzione è composta infatti, da:

- guanidina isotiocianato: un potente denaturante che permette la separazione delle proteine dagli acidi nucleici; agisce anche come inibitore delle RNasi;
- sodio N-laurilsarcosil: un agente deproteinizzante che inibisce le RNasi;
- 2 mercaptoetanolo: una sostanza riducente che aumenta la capacità della guanidina isotiocianato nel separare le proteine dagli acidi nucleici;
- sodio citrato: un agente chelante;
- soluzione antischiuma.

La successiva fase, è quella della purificazione, che prevede l'uso di un cuscino di cloruro di cesio per separare definitivamente l'RNA dal DNA. Alla fine delle operazioni, le proteine si trovano nel sovrantante, il DNA forma una banda nel cloruro di cesio, mentre l'RNA forma una pellicola (pellet) appena visibile sul fondo della provetta.

L'RNA è una molecola estremamente degradabile, inoltre le RNAsi sono molto diffuse e di difficile eliminazione (alcune RNAsi hanno una termoresistenza molto elevata); per questo motivo è importante proteggere l'RNA con enzimi inibenti le RNAsi quali l'RNasin.

Retrotrascrizione

Ha lo scopo di trascrivere la molecola di RNA virale in cDNA mediante l'azione dell'enzima trascrittasi inversa.

A tale scopo il campione viene trattato con l'enzima AMV a 42°C per 1 ora che successivamente deve essere eliminato dalla soluzione trattando il campione a 95°C per 3 minuti (Croci *et al.* 1999)

Prima amplificazione (PCR)

La reazione di polimerizzazione consiste di tre fasi che vengono ripetute ciclicamente (30 cicli) e automaticamente dal Thermal Cycler. La prima fase di denaturazione, viene condotta a 95°C per 25 secondi, segue la fase di ibridazione dei primers (annealing), condotta a 49°C per 10 secondi (l'uso delle alte temperature rende più specifica la reazione eliminando la possibilità di ibridazioni aspecifiche che porterebbero alla formazione di frammenti amplificati aspecifici) e infine la fase di estensione o polimerizzazione dei primers, catalizzata dalla Taq polimerasi è condotta a 70°C per 1 minuto (la temperatura ottimale dell'enzima è tra 70 e 80°C).

La reazione di PCR, viene completata con un tempo di estensione finale di 70°C per 5 minuti, allo scopo di ottenere prodotti il più possibile completi e consentire quindi, una completa polimerizzazione di tutte le molecole iniziate.

Elettroforesi su gel di agarosio

L'ultima fase del saggio di PCR riguarda la valutazione del prodotto della reazione che ha lo scopo di valutare l'amplificato e consentire l'accertamento che il frammento amplificato corrisponda effettivamente alla sequenza bersaglio attesa.

A tal fine viene utilizzata l'elettroforesi su gel di agarosio all'1%, dopo colorazione con bromuro di etidio (0.5%), in questo modo è possibile osservare l'amplificato mediante lettura con un transilluminatore U.V. e valutarne la lunghezza in base al confronto con bande di migrazione a lunghezza nota (marcatore di peso molecolare).

La semplice valutazione della lunghezza del frammento amplificato non è però sufficiente, in quanto esiste la possibilità che bande di amplificazione non specifiche abbiano casualmente lunghezza simile a quella attesa. Da qui la necessità di utilizzare

un metodo di conferma specifico, di facile esecuzione e che nello stesso tempo aumenti il limite di sensibilità della prima PCR.

Seconda amplificazione (Nested-PCR)

Un metodo di questo tipo che nello stesso tempo è in grado di migliorare sia la sensibilità che la specificità dell'amplificazione è rappresentato dalla PCR nested, che consiste nell'esecuzione di una seconda amplificazione successiva alla prima, utilizzando una coppia di primers che fiancheggiano una sequenza interna al segmento bersaglio della prima reazione.

Rispetto ad una PCR singola, nella nested PCR il numero di sequenze bersaglio è maggiore e la resa della reazione aumenta notevolmente. I prodotti possono essere direttamente visualizzati su gel di agarosio dopo colorazione con bromuro di etidio. Anche la specificità aumenta in quanto vengono amplificati selettivamente solo i prodotti della prima PCR realmente corrispondenti alla sequenza desiderata.

Il frammento amplificato viene, infatti, riconosciuto da quattro primers complementari alla sua sequenza.

L'utilizzo di questa tecnica permette di evitare l'uso di tecniche di ibridazione con sonde specifiche (a volte marcate con radioattivo), ma per una corretta esecuzione occorre rispettare una serie di accorgimenti per evitare rischi di contaminazioni.

Precauzioni generali

L'RNA è per sua natura soggetto alla digestione e quindi alla distruzione da parte delle RNasi presenti in ogni cellula nonché sui polpastrelli delle dita, per cui in tutte le varie fasi del processo, è necessario che l'operatore prenda alcune precauzioni generali:

- lavorare sempre con un paio di guanti da laboratorio
- usare materiale monouso o qualora venga usato materiale in vetro, questo deve essere sempre sterile
- utilizzare enzimi che abbiano la capacità di degradare le eventuali RNasi che comunque possono venire a contatto con l'RNA anche quando si osservino le precedenti precauzioni

Controllo delle contaminazioni - Per evitare il rischio di ottenere risultati falsamente positivi dovuti alla presenza di DNA contaminante nel campione, è necessario prendere una serie di precauzioni al fine di lavorare in condizioni ottimali e di garantire l'attendibilità dei risultati:

- uso di set di pipette distinti nelle diverse fasi del lavoro;
- uso di puntali con filtro (il filtro funziona da barriera protettiva tra il campione e la pipetta);
- suddivisione dei reagenti in piccole aliquote per evitare l'apertura ripetuta delle provette in cui sono contenuti, ciò permette di eliminare l'aliquota qualora venga contaminata;
- cambio frequente dei guanti soprattutto quando si manipolano campioni diversi e sempre dopo aver maneggiato materiale potenzialmente contaminato;

- apertura attenta delle provette per evitare la formazione di aerosol;
- chiusura di ogni provetta dopo l'aggiunta del campione, prima di passare al campione successivo;
- separazione degli ambienti di lavoro: è necessario tenere fisicamente separate l'area di preparazione della reazione dall'area in cui vengono analizzati i prodotti della PCR; in particolare la miscela di reazione per la PCR nested deve essere sempre preparata in un ambiente diverso rispetto al locale dove si manipolano i campioni contaminati.

Prova di conferma su colture cellulari

Il limite principale della reazione di PCR è quello di non permettere la discriminazione tra virus infettante e non infettante (in realtà solo le particelle infettanti rappresentano un rischio per la salute, anche se il ritrovamento di RNA virale nel campione suggerisce un probabile contatto con il patogeno e quindi una qualità igienica scadente). Da qui nasce l'esigenza di un metodo che stabilisca l'infettività o meno del virus.

A tale scopo i campioni risultati positivi dopo PCR o PCR nested vengono seminati su colture cellulari in monostrato, per evidenziare l'infettività del virus.

Tale infettività può essere evidenziata o attraverso un tipico effetto citopatico (CPE) oppure, nel caso di virus che non evidenziano CPE, dal ritrovamento di RNA virale nel lisato cellulare di monostrati in cui è stato fatto crescere il virus per alcuni giorni.

Bibliografia

- AFZAL M.A., MINOR P.D. Instant RNA isolation from virus-infected tissue culture fluid for the polymerase chain reaction. *Vaccine*. 1994. 10: 976-977.
- BADAWY A.S., GERBA C.P., KELLEY L.M. Survival of rotavirus SA-11 on vegetables. *Food Microbiol.*, 1984; 2: 199-205.
- CLIVER D.O. Virus Transmission via foods *Food Technol.* 1988. 241-248.
- CROCI L., DE MEDICI D., DIVIZIA M., GABRIELI R., TOTI L. and PANA' A. Recovery of poliovirus type 1 from experimentally contaminated shellfish: evaluation of different methods. *Wat.Sci.Tech.*, 1993. 27: 45-48.
- CROCI L., DE MEDICI D., MORACE G., FIORE A., SCALFARO C., BENEDEUCE F., TOTI L. Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested reverse transcription-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 1999. 48: 67-71.
- CROCI L., FIORE A., DE MEDICI D., TOTI L. Persistence of *Escherichia coli* and Poliovirus 1 in contaminated vegetables. *Microb. Alim. Nutr.* 1991. 9: 257-262.
- LE GUYADER F., DUBOIS E., MENARD D. AND POMMEPUY M. Detection of hepatitis A virus, rotavirus and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by Reverse Transcription-Seminested PCR. *Appl. Environ. Microb.* 1994. 28: 3665-3671.
- MELE A., STROFFOLINI T., PASQUINI P. SEIEVA Integrated Epidemiological System for Acute Viral Hepatitis. Report 1985-1994. *Rapporti Istisan* 96/3.

- SEVERINI G.M., MESTRONI L., FALASCHI A., CAMERINI F. AND GRACE M. Nested Polymerase Chain Reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. *J. Clin. Microb.* 1993. **31**: 1345-1349.
- WARD K.E., IRVING L.G. Virus survival on vegetables spray washed with waste water. *Water Res.* 1987. **21**: 57-61.

Appendice

PROTOCOLLO SPERIMENTALE PER LA DETERMINAZIONE DELL'EPATITE A NEGLI ALIMENTI

Estrazione e concentrazione del virus.

Molluschi

- Privare i mitili delle valve e sottoporli ad omogeneizzazione in mixer.
- Prelevare 75g dell'omogenato di mollusco e diluirlo in tampone glicina (1) 0.05M pH 9,2 in rapporto 1:1.
- Agitare per 30 minuti, e centrifugare a 10000xg per 15 minuti a 4°C.
- Recuperare il sovrantante e aggiungere il PEG (3) in rapporto 1:4 (concentrazione finale 12.5%)
- Precipitare over night a 4°C sotto una leggera agitazione.
- Centrifugare a 10000xg per un'ora a 4°C.
- Sospendere il pellet in 10 ml di PBS (10X Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) avendo cura di sciogliere gli eventuali agglomerati.
- Centrifugare a 10000xg per 15 minuti a 4°C.
- Recuperare il sovrantante e aggiungere il PEG in rapporto 1:4.
- Mettere a precipitare over night a 4°C sotto una leggera agitazione.
- Centrifugare a 10000xg per 45 minuti a 4°C.
- Sospendere il pellet in 3 ml di PBS fino a completa dissoluzione.
- Centrifugare a 10000xg per 10 minuti a 4°C.
- Raccogliere il sovrantante e sottoporlo a RT-Nested-PCR

Prodotti vegetali

- Tagliare i vegetali in piccoli pezzi (in media non superiori ai 9 cm² di superficie complessiva ciascuno).
- Aggiungere a 25g del campione così preparato 50ml di Estratto di carne (Beef Extract) (2) al 3% e pH 9,5 ed agitare per 30 minuti.
- Riprendere il Beef Extract e centrifugarlo a 3.000 xg per 10 minuti a 4 °C

- Recuperare il sovrantante e sottoporlo ad ultracentrifugazione a 200.000 xg per 2 ore a 4° C.
- Risospendere accuratamente il pellet con 334 µl di acqua tridistillata sterile e procedere con la RT-Nested-PCR¹.

Estrazione e purificazione dell'RNA virale

- Trasferire 334µl del campione ottenuto precedentemente in una provetta eppendorf da 1.5 ml contenente 666µl di Soluzione D (4).
- Agitare con vortex per 30 secondi.
- Aggiungere 100µl di cloruro di cesio (5) sul fondo attraversando attentamente il liquido contenuto nella provetta.
- Centrifugare a 13000 rpm per 20minuti a 4°C.
- Con molta cautela allontanare il sovrantante e lavare l'eventuale RNA pellet con 1 ml di etanolo al 70%.
- Allontanare l'etanolo, essiccare e procedere alla fase di retrotrascrizione che ha lo scopo di trascrivere la molecola di RNA virale in cDNA.

Retrotrascrizione

Mantenere in ghiaccio il campione e tutti i reagenti della reazione.

- Sospendere il pellet essiccato in una miscela così composta:

MgCl ₂ 25mM	8	µl
Buffer 10X	10	µl
dNTPs 10 mM	8	µl
Primer antisenso 100 pmoli/µl (tab.1)	1	µl
Rnasin 20U/µl	0.5	µl

¹ Nell'allestimento di un saggio di PCR è necessario, insieme ai campioni da testare, allestire sempre un controllo positivo (campione contenente la sequenza bersaglio da amplificare) e un controllo negativo (campione non contenente la sequenza bersaglio da amplificare).

AMV 5U/ μ l	0.25 μ l
Acqua tridistillata sterile	62.25 μ l.
(Volume finale 90 μ l)	

- Incubare a 42°C (*temperatura ottimale per l'enzima trascrittasi inversa*) per 50 minuti.
- Bloccare la reazione a 95 °C per 3 minuti (*per comodità condurre questa fase in bagnomaria*).

PCR (prima amplificazione)

Mantenere in ghiaccio il campione e tutti i reagenti della reazione.

- Trasferire la suddetta sospensione (90 μ l) in una provetta da PCR da 0.5 ml contenente 8.5 μ l di acqua tridistillata sterile, 1 μ l di primer senso (100 pmoli/ μ l) (tab1) e 0.5 μ l di Taq polimerasi (5U/ μ l). (Volume finale 100 μ l)
- Procedere alla reazione di polimerizzazione, che consiste in 30 cicli di amplificazione, eseguiti dal Thermal Cycler, i cui tempi e temperature ottimali di ogni ciclo sono:
 - 95°C per 25'' (denaturazione),
 - 49°C per 10'' (annealing)
 - 70°C per 1' (estensione)
- La reazione di PCR viene completata con un tempo di estensione finale a 70°C per 5 minuti con lo scopo di ottenere prodotti il più possibile completi e consentire quindi una completa polimerizzazione di tutte le molecole iniziate.

Nested-PCR (seconda amplificazione)

Mantenere in ghiaccio il campione e tutti i reagenti della reazione.

- Una frazione (5 μ l) del prodotto amplificato nella prima PCR viene trasferito in una seconda provetta contenente una nuova miscela di reazione così composta:

MgCl ₂ 25mM	8	μ l
Buffer 10X	10	μ l
dNTPs 10 mM	8	μ l
Primer antisenso 100 pmoli/ μ l (tab.1)	1	μ l
Primer senso 100 pmoli/ μ l (tab.1)	1	μ l
Taq polimerasi 5U/ μ l	0.5	μ l
Acqua tridistillata sterile	66.5	μ l.
(Volume finale 95 μ l)		

- Procedere alla reazione di polimerizzazione come descritto per la prima amplificazione.
- Se il campione non viene utilizzato subito per la nested-PCR, può essere conservato a 4°C per alcuni giorni.

Rilevamento dei risultati

Elettroforesi su gel di agarosio.

- Agarosio all'1%.
- Bromuro di etidio (0.5%) (6).
- Tampone per elettroforesi (TBE 1x o altri equivalenti) (7).
- Soluzione colorante per elettroforesi (6x) (8).

- Marker (9).
- Voltaggio: 80-120V
- Lettura transilluminatore U.V.

Tabella 1 – Sequenze dei primers dell'HAV

Oligonucleotidi ^a	Sequence	Localizzazione ceppo HM175
Primer 1	Anti 5'-CAT ATG TAT GGT ATC TCA ACA A-3'	1092 - 1113
Primer 2	Senso 5'-CAG GGG CAT TTA GGT TT-3'	698 - 714
Primer 3	Anti 5'-CCA ATT TTG CAA CTT CAT G-3'	1029 - 1047
Primer 4	Senso 5'-TGA TAG GAC TGC AGT GAC T-3'	836 - 854

^a Primer 1 e 2 vengono usati per la PCR; 3 e 4 vengono usati per la nested - PCR

MATERIALI

(1) Tampone glicina 0.05M pH 9.2

Glicina	3,75 g
Acqua distillata q.b.	1000 ml
Portare a pH 9,2 con idrossido di sodio	

(2) Estratto di carne (Beef Extract)

Estratto di carne in polvere	30 g
H ₂ O tridistillata	1000 ml
Sterilizzare a 121°C per 15 minuti	

(3) Polyethylene Glycol 8,000 (PEG)

Polyethylene Glycol	1000 g
NaCl	150 g
H ₂ O distillata	2000 ml

In una beuta miscelare 1,5l di H₂O distillata, 150g di NaCl e 1000g di PEG e portare ad ebollizione. Aggiungere il resto dell'acqua distillata e sterilizzare in autoclave a 121°C per 20 minuti. Raffreddare sotto agitazione.

(4) Soluzione D (composizione per 25 ml di H₂O tridistillata sterile)

Guanidina Isotiocianato	18,75 g
Sodio N-Laurilsarcosil	0,1875 g
Sodio citrato	0,94 g
2 Mercaptoetanololo	0,262 ml
Soluzione antischiuma	0,125 ml

(5) Cuscino di cloruro di cesio

Cloruro di cesio	5.7 M
Acetato di sodio	25 mM pH 5,0

Aggiustare l'indice di rifrazione a 1.4000, sterilizzare a 121°C per 20 minuti e riaggiustare l'indice di rifrazione. Conservare la soluzione a temperatura ambiente.

(6) Bromuro di etidio (0.5%).(7) TBE 1xTBE 5x

Tris	54 g
Acido Borico	27,5 g
EDTA 0.5 M pH 8	10 ml
Acqua tridistillata q.b.	1000 ml

Diluire il TBE 5x in acqua tridistillata in rapporto 1:4 per ottenere il TBE 1x

(8) Soluzione colorante per elettroforesi (6x)

Glicerolo 30%
 Bromofenolo blu 0,25%
 Xylene cyanolo 0,25%

Aggiungere il colorante all'amplificato in rapporto 1:5 in modo da avere un volume finale idoneo per la deposizione sul gel di agarosio.

(9) Marker

Ladder 100bp

*Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità
e Responsabile scientifico: Giuseppe Benagiano*

Direttore responsabile: Vilma Alberani

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, marzo 2000 (n. 1) 2° Suppl.

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori