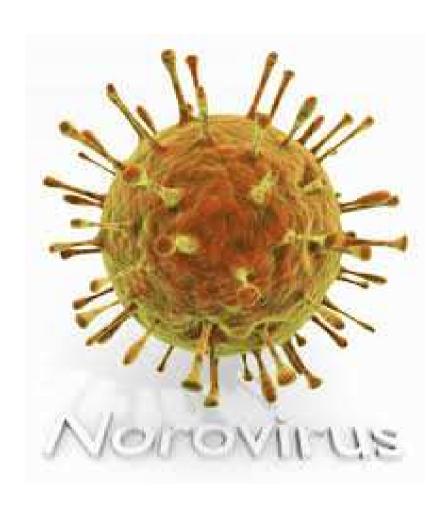


Malattie virali di origine alimentare: Norovirus e Coronavirus

I virus "enterici"

Viruses that m	ay be foodborn to smitt	ed.			
Primary tissue tropism	Common r	Particle/genome	Genus	Family	Associated disease(s)
Enterotropic	Human norovirus	Nonenveloped/ssRNA	Norovirus	Caliciviridae	Gastroenteritis
	Human sapovirus	Nonenveloped/ssRNA	Sapovirus	Caliciviridae	Gastroenteritis
	Aichi virus	Nonenveloped/ssRNA	Kobuvirus	Picornaviridae	Gastroenteritis
	Human astrovirus	Nonenveloped/ssRNA	Mamastrovirus	Astroviridae	Gastroenteritis
	Human rotavirus	Nonenveloped/segmented dsRNA	Rotavirus Reoviridae		Gastroenteritis
	Human reovirus	Nonenveloped/segmented dsRNA	Orthoreovirus Reoviridae		Unknown
	Human enteric adenovirus	Nonenveloped/dsDNA	Mastadenovirus	Adenoviridae	Gastroenteritis, fever, respiratory disease
	Human parvovirus	Nonenveloped/ssDNA	Parvovirus	Parvoviridae	Gastroenteritis
	Human picorbirnavirus	Nonenveloped/segmented dsRNA	Picobirnavirus	Picobirnaviridae	Gastroenteritis?
Hepatotropic Hepatitis A virus		Nonenveloped/ssRNA	Hepatovirus	Picornaviridae	Hepatitis
10.104.00-20-00-00-00-00-00-00-00-00-00-00-00-0	Hepatitis E virus	Nonenveloped/ssRNA	Orthohepevirus	Hepeviridae	Hepatitis
Neurotropic	Poliovirus	Nonenveloped/ssRNA	Enterovirus	Picornaviridae	Flaccid paralysis, meningitis, fever
	Non-polio enteroviruses (incl. Coxsackie A and B virus, Echovirus, and Enterovirus D68 and 71)	Nonenveloped/ssRNA	Enterovirus	Picornaviridae	Meningitis, herpangina, flaccid paralysis, cranial nerve dysfunction, hand-foot-and-mout disease, myocarditis, heart anomalies, respiratory illness, rush, pleurodynia
	Human parechovirus	Nonenveloped/ssRNA	Parechovirus	Picornaviridae	Meningitis, respiratory disease, gastroenteritis
	Nipah virus	Enveloped/ssRNA	Henipavirus	Paramyxoviridae	Encephalitis, respiratory disease
	Polyoma virus (JC, BK)	Nonenveloped/circular dsDNA	Polyomavirus	Polyomaviridae	Persistent infections, progressive multifocal leukoencephalopathy, urinary track diseases
	Tick-borne encephalitis virus	Nonenveloped/ssRNA	Flavivirus	Flaviviridae	Encephalitis, meningitis
Pneumotropic	Human coronavirus (incl. SARS and MERS CoV)	Enveloped/ssRNA	Betacoronavirus	Coronaviridae	Respiratory disease, SARS, MERS, gastroenteritis
	Avian influenza virus	Enveloped/segmented ssRNA	Influenzavirus A	Orthomyxoviridae	Influenza, respiratory disease
Multitropic	Ebola virus	Enveloped/ssRNA	Ebolavirus	Filoviridae	Gastroenteritis, hemorrhagic level

Norovirus



Le gastroenteriti da NoroVirus negli USA

- Principale causa di gastroenterite acuta negli USA tra le persone di ogni età (circa 21 milioni di casi/anno)
- Circa 2 milioni di visite ambulatoriali e 400.000 visite di pronto soccorso, soprattutto nei bambini piccoli
- 56.000 a 71.000 ricoveri e 570 a 800 decessi, soprattutto tra bambini piccoli e anziani
- Norovirus è responsabile di circa 1 milione di visite pediatriche all'anno.
- A 5 anni si stima che per le malattie da norovirus:
 - 1 su 278 bambini sarà ricoverato in ospedale,
 - 1 su 14 andrà al PS e
 - 1 su 6 riceverà cure ambulatoriali

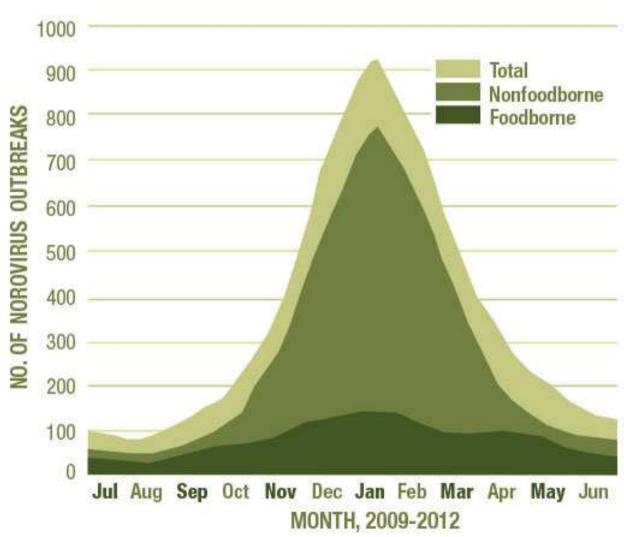
Provoca il 58% delle malattie alimentari negli USA. Ogni anno, la malattia da norovirus costa circa \$ 2 miliardi, principalmente a causa della perdita di produttività e delle spese sanitarie.

Because oyster contain not only pearls



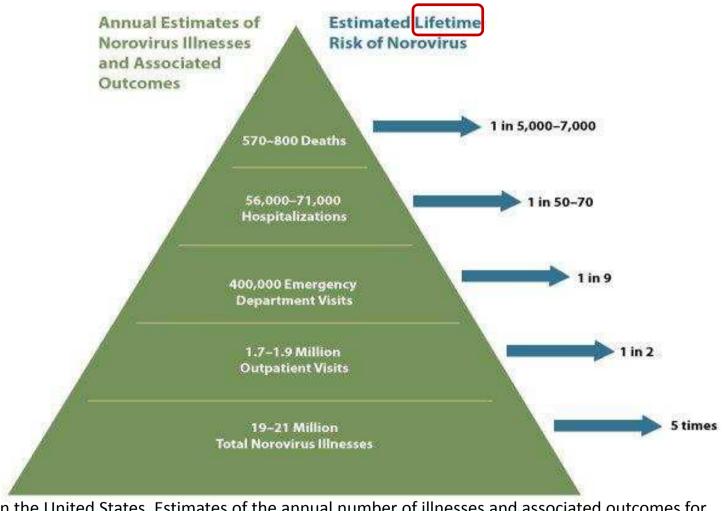
- Causano gastroenterite ad esordio improvviso con casi sporadici eo epidemie
- Colpiscono soggetti di tutte le età
- Diffusione in tutto il mondo
- Manifestazioni durante tutto l'anno, con picchi nei mesi invernali (winter vomiting disease)
- A livello internazionale è stato stimato che i Norovirus sono responsabili della maggior parte di gastroenteriti non batteriche sia infantili (a carattere sporadico e stagionale) sia nell'adulto, spesso in forma endemica.
- E' la più frequente malattia delle comunità quali ospedali, scuole, navi da crociera, ristoranti, mostra variazioni stagionali, con picchi epidemici che si verificano tra dicembre e febbraio (winter disease)
- Il virus è resistente al congelamento e al calore a 60°, alle soluzioni clorate, al pH acido fino a 2,7, ai trattamenti con etere, etanolo o detergenti.

NUMBER OF REPORTED NOROVIRUS OUTBREAKS, BY PRIMARY TRANSMISSION MODE AND MONTH OF ONSET—NATIONAL OUTBREAK REPORTING SYSTEM, UNITED STATES, 2009–2012



Page last reviewed: June 1, 2018 Content source: <u>National Center for</u> Immunization and Respiratory Diseases, Division of Viral Diseases

Burden of Norovirus Illness and Outbreaks



Burden of Norovirus in the United States. Estimates of the annual number of illnesses and associated outcomes for norovirus disease in the U.S., across all age groups. Lifetime risks of disease are based on a life expectancy of 79 years of age.

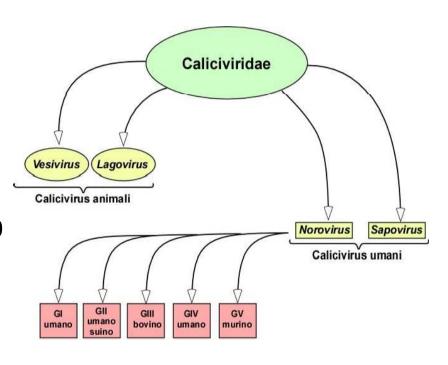
I Norovirus



- I Norovirus noti come "Small Round Structured Viruses" o SRSV, appartengono alla famiglia CALICIVIRIDAE
- Virus ad RNA a singola catena 25-38 nm di diametro,
- Simmetria icosaedrica
- Privi di envelope
- Ampia variabilità genetica: rende difficoltosa la loro individuazione e caratterizzazione
- Non coltivabili in vitro
- Molto resistenti alle condizioni avverse dell'ambiente

Classificazione dei Norovirus

- La famiglia Caliciviridae comprende 4 generi Vesivirus, Lagovirus, Sapovirus e Norovirus
- di cui i primi due sono di pertinenza veterinaria mentre gli altri sono agenti eziologici di gastroenterite umana.
- classificati in cinque diversi genogruppi (GI – GV) suddivisi in 30 cluster genetici (8 in GI, 17 in GII, 2 in GIII, 2 in GIV e 1 in GV) a loro volta comprendenti diversi genotipi.



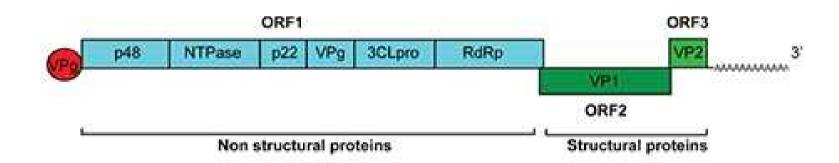
- Gl e GIV sono più frequentemente riscontrati nell'uomo mentre i virus
 GIII sono tipicamente bovini e il GV è infettivo per il topo
- GII.4 il genotipo umano più diffuso

Ampio grado di diversità antigenica

- Gli alti livelli di diversità genetica tra i differenti genogruppi e persino tra i genotipi dello stesso genogruppo, che derivano dall'alto tasso di mutazioni e da eventi di ricombinazione, contribuiscono all'ampio grado di diversità antigenica.
- La diversa risposta immunologica al patogeno sembra comunque trovare spiegazione in un'immunità di tipo locale più che con la produzione di anticorpi circolanti

Genoma

Il genoma del norovirus è costituito da un filamento positivo ssRNA di circa 7.500 nucleotidi. Contiene 3 frame di lettura aperti, ORF1, codifica per una polipoteina contenente ao la polimerasi, ORF2, codifica per la proteina capside (VP1) e ORF3, codifica per la proteina strutturale secondaria VP2.



I norovirus si **ricombinano frequentemente**, principalmente alla giunzione ORF1 / ORF2

La scoperta del Virus di Norwalk, 1972



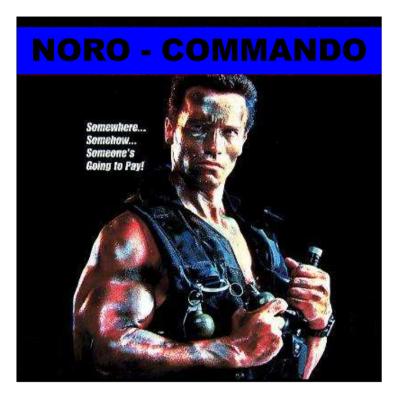
Bronson Elementary School, Norwalk, OH

Dr. Albert Z. Kapikian (1930-2014)

I Norovirus sono stati scoperti nel 1972 ed hanno acquisito il nomignolo "ufficioso" di virus "di Norwalk" o Norwalk-like-virus", in virtù di una grossa epidemia sviluppatasi nel 1968 all'interno di una scuola elementare della città di Norwalk, nello stato dell'Ohio.

Alto potenziale epidemico

- Carica infettante bassa (<100 particelle),
- Alta resistenza nell'ambiente (temperature >60°C, <0°C e concentrazioni di cloro fino a 10 ppm) e resiste ai comuni disinfettanti
- Assenza di immunità persistente
- Trasmissione diretta interumana (aerosol con vomito) e indiretta mediante cibi e bevande
- Rilascio prolungato del virus: eliminazione con le feci fino a 2 settimane dopo la guarigione
- Negli anziani e nei pazienti immunocompromessi i sintomi sistemici e la presenza del virus nelle feci possono persistere per più di un mese



- Altamente contagioso
- Varie vie di transmissione
- Stabile nell'ambiente
- Infezioni asintomatiche
- Immunità transitoria
- Resistente ai comuni disinfettanti

Epidemiology

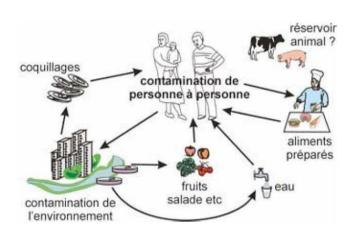
TABLE 1. Characteristics of "Norwalk-like viruses" that facilitate their spread during epidemics

Characteristic	Observation	Consequences		
Low infectious dose	<10 ² viral particles	Permits droplet or person-to-person spread, secondary spread, or spread by foodhandlers		
Prolonged asymptomatic shedding	≤2 weeks	Increased risk for secondary spread or problems with control regarding foodhandlers		
Environmental stability	Survives <10 ppm chlorine, freezing, and heating to 60 C	Difficult to eliminate from contami- nated water; virus maintained in ice and steamed oysters		
Substantial strain diversity	Multiple genetic and antigenic types	Requires composite diagnostics; repeat infections by multiple antigenic types; easy to underesti- mate prevalence		
Lack of lasting immunity	Disease can occur with reinfection	Childhood infection does not protect from disease in adulthood; difficult to develop vaccine with lifelong protection		

Vie di trasmissione

- Oro-fecale (possibile contaminazione anche con mani portate alla bocca, sigarette)
- Alimenti (Cibo e bevande) contaminati da personale infetto
- Consumatori (trasmissione crociata)
- Luoghi a rischio: navi da crociera, scuole, case di ricovero, ospedali,ecc

Norovirus cycle



Norovirus: trasmissione

- Alimenti (39%)
- Mani (12% "person to person")
- Acqua (3%)
- Ambiente (fomites)
- Aria (aerosol con vomito)
- 46% sconosciuta



Superfici esposte alla contaminazione

- Durante il picco di infezione sono presenti un miliardo di particelle virali per grammo di feci.
- La diarrea, soprattutto nei soggetti giovani può risultare incontrollata, così come improvvisi, incontrollati e violenti episodi di vomito

Grande diffusione sulle superfici

Mani, Scarpe, Oggetti, Pavimenti, Tavoli, Pareti, Attrezzature Tappeti, Tendaggi, Arredi (basta una piccolissima quantità di virus)

Contaminazione primaria + secondaria



6.000 passeggeri 2.500 equipaggio 30.000 pasti/giorno circa

NoV e crociere:

- Causa di >90% di epidemie diarroiche
- Rapidissima diffusione (ambienti affollati)
- Turnover passeggeri elevato
- NoV trasportato a bordo da passeggeri con acqua o cibo contaminati
- Epidemie in sequenza sulla stessa nave per varie crociere (ambiente o personale di bordo contaminati causa resistenza disinfettanti)



Ruolo dei Molluschi bivalvi

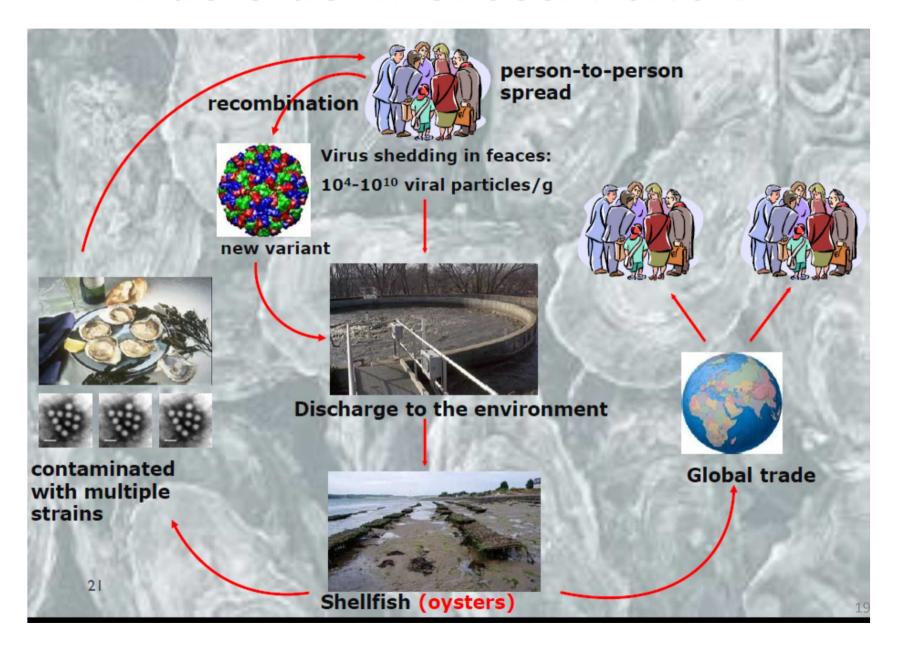
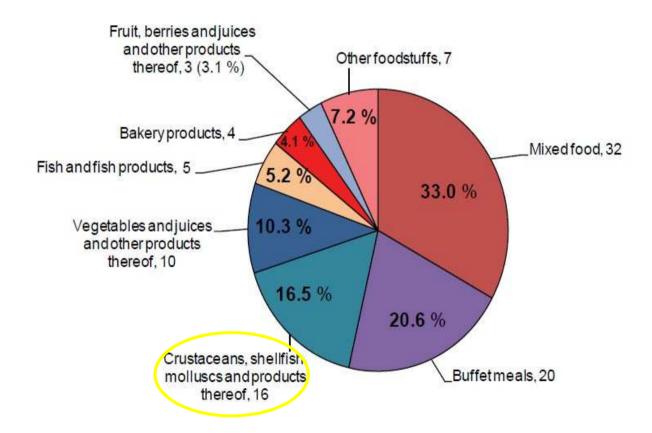


Figure OUT20. Distribution food vehicles in strong-evidence outbreaks caused by calicivirus, including norovirus (excluding strong-evidence waterborne outbreaks) in the EU, 2012

N = 97



Infezioni pediatriche

In Italia la definizione della reale incidenza delle gastroenteriti di natura virale nella popolazione pediatrica è ostacolata dall'assenza di un sistema di monitoraggio per le infezioni virali, le quali, oltre alla sottostima dei casi caratteristici delle infezioni gastroenteriche autolimitanti, risentono dell'ancor limitato utilizzo dell'analisi virologica negli episodi di gastroenterite che giungono all'attenzione del SSN



Norovirus - Aspetti clinici

- √ breve incubazione (12-48 ore)
- √ vomito, diarrea, dolori addominali
- √ cefalea, febbre, brividi
- ✓ dolori muscolari, spossatezza
- √ ricovero in ospedale raro
- ✓ risoluzione rapida (24 ore)
- √ decesso raro
- ✓ contagiosità da 15 h dopo l'infezione fino a due settimane dopo la guarigione clinica



Oltre il 30% dei casi senza sintomi

Resistenza a fattori ambientali

Possono resistere:

- A temperature $> 60^{\circ}$ C e $< 0^{\circ}$ C
- Cloro a concentrazioni fino a 100 ppm
- Altri disinfettanti
- Per cui è molto difficile l'eliminazione dall'ambiente (la presenza di RNA virale è stata evidenziata in più occasioni anche nell'acqua in bottiglia non gasata)

I **comportamenti dei consumatori** che possono modificare il rischio di infezione da **Norovirus**

- Va ricordato che esiste una grande differenza tra un contaminante e il rischio.
- Il contaminante (o il pericolo, hazard in inglese) è il Norovirus;
- mentre il rischio è la probabilità che la malattia abbia luogo.



Principali abitudini e comportamenti dei consumatori che possono modificare il rischio di infezione da norovirus

Consumer behaviors which may influence the risk of norovirus infection

Consumer options to mitigate norovirus risk

Purchase bivalve mollusks contaminated during primary production

 Avoid consumption of bivalves harvested near areas of human habitation and close to urban drainage

Eat raw or undercooked bivalves

 Cook to ensure that internal flesh reaches 90°C for 90 seconds

Steam for at least 14.4 minutes

Purchase fresh fruits/vegetables contaminated during primary or secondary production

 Wash vegetables with potable water supplemented with a sanitizer (eg. chlorine-based, PAA-based)

Consumers may contaminate RTE foods during handling and preparation, from contaminated hands to food

 Avoid handling RTE foods for others if a person has had gastroenteritis symptoms ≤ 2 days ago
 Follow strict hydianic measures during food handling

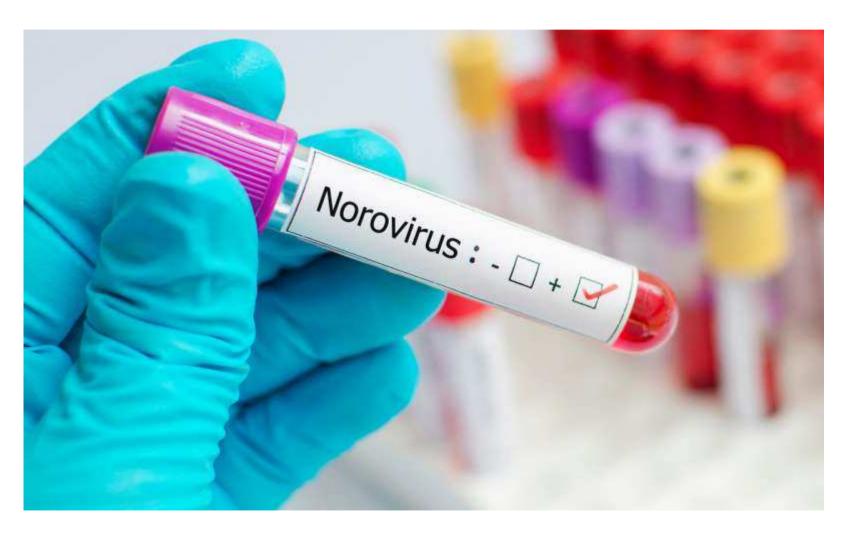
 Follow strict hygienic measures during food handling (especially hand washing)

Consumers may contaminate RTE foods during preparation, by cross-contamination (from fresh fruits/vegetables or contaminated hands to fomites; from contaminated fomites to RTE foods...)

- Keep food surfaces, sponge clothes and utensils clean
- Wash hands after handling unwashed fruits/vegetables

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 h
Malattia	Nausea,vomito,diarrea per circa 24-48 h
Escrezione	Il virus viene escreto durante la malattia con il vomito e le feci, e probabilmente ancora per 7 gg dopo la malattia
Diagnosi	Determinazione del virus nelle feci mediante test ELISA o PCR o microscopia elettronica. Secondo Kaplan si può sospettare che un'epidemia sia dovuta ai Norovrus quando presenta le seguenti caratteristiche:assenza di batteri patogeni nelle feci; durata media della malattia 12-60 h; periodo di incubazione 15-50 h; vomito presente in più del 50% dei casi
lmmunità	Di breve durata

Determinazione dei virus



Indagini sugli episodi tossinfettivi

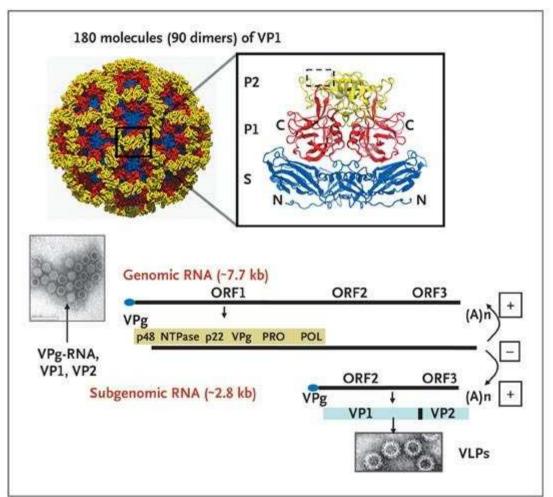
- Per una corretta valutazione degli episodi, la ricerca dovrebbe essere condotta sia sulle feci dei pazienti che sugli alimenti sospetti
- I campioni devono giungere al laboratorio:
- 1) feci: mantenute a 4°C per 7gg.(in alternativa congelate a 20°C)
- 2) molluschi: congelati a -20°C e analizzati nell'arco di un mese
- **3) vegetali e frutta**: trasportati a T° di refrigerazione(4-8°) non oltre 7gg dal prelievo; o mantenuti congelati a -20°C
- 4) acqua: mantenuta a temperatura ambiente o di refrigerazione(4-8°C)

Metodi tradizionalmente usati per la diagnosi di infezione da virus

- Isolamento in colture cellulari
- Microscopia elettronica
- ELISA
- Immunofluorescenza
- Criteri epidemiologici (Kaplan)
 - Comparsa dei sintomi dopo 24-36 ore
 - Vomito/diarrea per alcuni giorni
 - Elevata percentuale di attacchi
 - Elevato numero di casi secondari

Kaplan Criteria for Norovirus

- Feci negative per batteri patogeni
- ✓ Vomito nel 50% o più dei casi
- ✓ Durata media della malattia 12-60 h
- ✓ Durata media del periodo di incubazione 24-48 h
- ✓ Assenza di febbre



Virus: Legislazione

REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE del 15 novembre 2005

sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

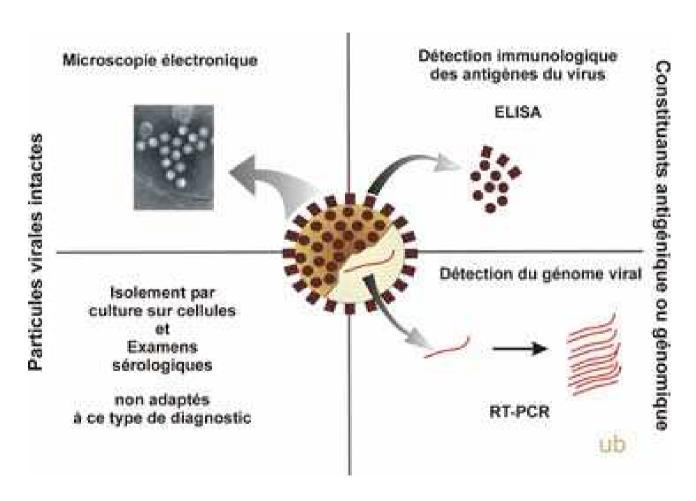
(27) In particolare, è opportuno che i criteri per i virus patogeni nei molluschi bivalvi vivi siano fissati quando i metodi d'analisi sono stati sufficientemente messi a punto. È necessario sviluppare metodi affidabili anche per altri rischi microbiologici, ad esempio Vibrio parahaemolyticus.

Per quanto riguarda i criteri microbiologici da applicare si può fare riferimento alla proposta di integrazione formulata dal laboratorio di riferimento comunitario (CEFAS, Weymouth, UK) del regolamento della commissione 2073/2005 e s.m.i., nella quale viene stabilito un criterio microbiologico per la categoria fragole provenienti dalla Cina e che si ritiene possa essere esteso ad altri frutti di bosco di provenienza sia nazionale che estera, come ipotizzato nella Tabella 3.

Tabella 3: Criterio microbiologico di sicurezza alimentare

Categoria	Micro- organismo	Piano di campionamento		Limiti		Metodo di riferimento	Fasi su cui si attua il critero
Alimentare		n	C	m	M	mermento	attua ii cirtero
Frutti di bosco	Virus dell'epatite A	5	0	Non determinato in 25 g.		ISO 15126-2 o altro metodo analitico validato	Prodotti che arrivano in frontiera

Metodi usati per la diagnosi di infezione da virus



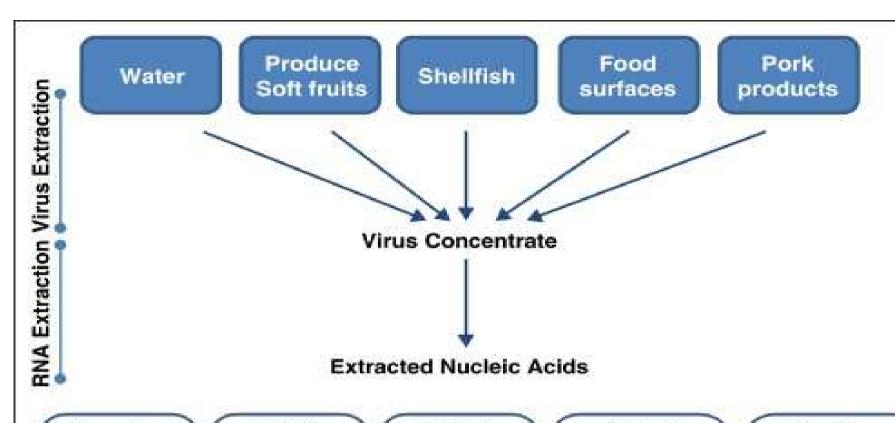
(Source: http://www.microbes-edu.org/professionel/prof.html

Problemi connessi con la rilevazione di virus dai molluschi

- Ridotte dimensioni del virus;
- Elevata diluizione che subiscono nell'ambiente;
- Capacità dei virus di aggregarsi tra di loro ed al particolato in sospensione;
- Grande variabilità delle specie virali, molte delle quali non sono coltivabili;
- La variabilità genetica di molte specie virali;
- Presenza di contaminazioni multiple con possibilità di interferenza;
- Mancanza di un indicatore affidabile;



Diagnosi RAPIDA e PRECOCE indispensabile per ridurre la diffusione in ambiente ospedaliero (soprattutto reparti pediatrici, lungo degenze, pazienti immunocompromessi, personale sanitario) attraverso il tempestivo rafforzamento delle misure di controllo



Monoplex RTqPCR

- Widely used
- ✓ Highly validated
- Already in use for European official controls

Viability PCR

- Applicable to some food matrices
- Promising for risk assessment studies

Multiplex RTqPCR

- High cost reduction
- Slight loss of sensitivity
- ✓ Costeffective for surveillance studies

Digital RTdPCR

- Quantitative data without standard curve
- Applicable to simultaneous quantification of several targets

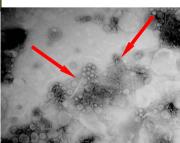
Next-Gen Sequencing (NGS)

- Technically challenging
- Promising for source biotracking
- Applicable for environmental viral diversity studies

34

Determinazione di virus

METODO	SENSIBILITA'	NOTE
EM/IEM	10 ⁶⁻⁷ Poco sensibile solo per campioni fecali)	 Individuazione di tutti i ceppi virali Scarsa praticità/economicità Scarsa sensibilità
ELISA	10 ⁴⁻⁶	Individuazione solo di alcuni ceppi viraliPraticitàScarsa sensibilità
RT-PCR	10 ²⁻⁴ Adatto per la ricerca in matrici alimentari	■Individuazione solo di alcuni ceppi virali ■sensibilità
Colture cellulari		■Non sono ancora disponibili linee cellulari per la coltura dei NV



Applicazione della PCR su matrici alimentari



- Le tecniche di biologia molecolare (RealTime PCR, Sequenziamento, Genotipizzazione, Next Generation Sequencing e Digital PCR) sono un supporto per l'operatore di sanità pubblica per:
 - Elevata sensibilità e specificità
 - Ricerca di virus difficilmente o non coltivabili (tutti virus "alimentari")
 - alla portata dei laboratori di sanità pubblica veterinaria
 - di rapida esecuzione

Metodi biomolecolari : un supporto per l'operatore di sanità pubblica

I metodi biomolecolari si possono usare per:

- ✓ per lo screening dei campioni *prima*dell'immissione nella rete commerciale nelle sedi naturali di allevamento attraverso l'esecuzione di prelievi ed esami svolti in maniera sistematica
- ✓ sorveglianza epidemiologica

Si tratta di virus ad RNA!

- In campo ambientale ed alimentare tutti i virus sono ad RNA,
- è necessaria la reazione di *retrotrascrizione dell'RNA* virale a cDNA che rappresenta il vero punto debole della PCR
- sono conosciuti anche virus a DNA (ad esempio Adenovirus) ma per nessuno di essi è stata provata la trasmissione attraverso alimenti o acqua.

Indagini virologiche sui molluschi bivalvi

Epatite A

- Replica lentamente su colture cellulari
- non dà effetto citopatico
- ricerca degli antigeni virali poco sensibile
- ricerca di acidi nucleici virali

Norovirus

- Non replica su colture cellulari
- ricerca degli antigeni virali poco sensibile
- ricerca di acidi nucleici virali:

Applicazione della PCR su matrici alimentari

Natura complessa e non omogenea del campione Basso numero di virus presenti

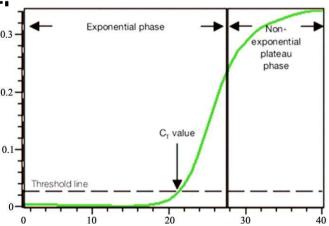
Fasi preliminari di estrazione e concentrazione del Virus matrice dipendente



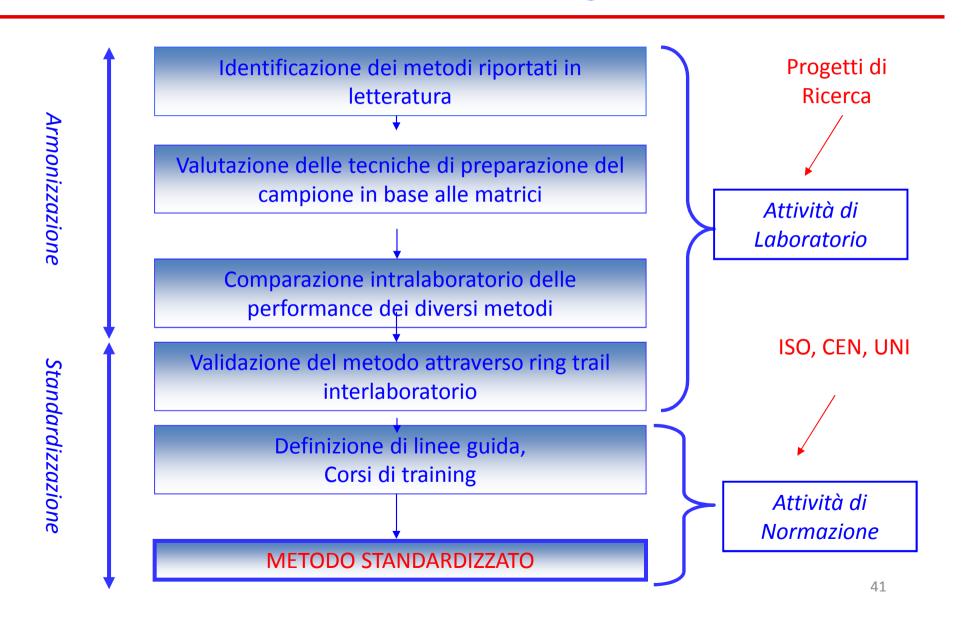
Estrazione e purificazione RNA rimozione inibenti

Retrotrascrizione in cDNA mediante enzima trascrittasi inversa

(One step) Real-Time PCR



Armonizzazione e standardizzazione di un nuovo metodo microbiologico



Official Standard Method

TECHNICAL SPECIFICATION

ISO/TS 15216-2

> First edition 2013-03-15

Corrected version 2013-05-01



Part 2: Method for qualitative detection

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel —

Partie 2: Méthode de détection qualitative



www.HelloCrazy.com

VIRUS EPATITE A (HAV), NOROVIRUS GENOGRUPPO I E II – RICERCA– REAL TIME PCR Norma ISO/TS 15216-2:2013

- L'RNA è estratto utilizzando un metodo che produce una preparazione di RNA tale da consentire di ridurre gli effetti degli inibitori della PCR. Il capside virale viene distrutto utilizzando guanidina tiocianato.
- L'RNA viene poi adsorbito alla silice per permetterne la purificazione mediante diversi passaggi di lavaggio.
- L'RNA virale purificato è poi rilasciato dalla silice in un tampone, prima della realtime RT-PCR.
- Nella One step real-time RT-PCR la retrotrascrizione dell'RNA in cDNA e la realtime PCR sono combinate consecutivamente in un'unica reazione.
- La Real-Time PCR utilizza sonde ad idrolisi, sonde corte a DNA marcate con molecole fluorescenti attaccate alle estremità opposte.
- La chimica della reazione assicura che la quantità dei prodotti amplificati aumenti, mentre la sonda viene spezzata con aumento proporzionale del segnale fluorescente.

VIRUS EPATITE A (HAV), NOROVIRUS GENOGRUPPO I E II – RICERCA– REAL TIME PCR Norma ISO/TS 15216-2:2013

Fasi della procedura operativa:

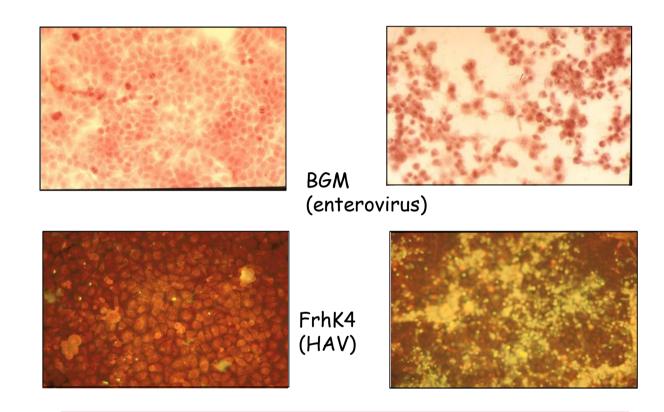
- 1) Preparazione del campione: apertura dei molluschi, prelievo dell'epatopancreas e omogeneizzazione con bisturi sterile
- 2) Estrazione dell'RNA virale dai molluschi bivalvi:
 Estrazione da ghiandola digestiva con proteinasi K e Kit di estrazione commerciale
 MiniMag Nuclisens Magnetic Extraction kit bioMerieux.
- 3) Realtime RT PCR one step: Retrotrascrizione dell'RNA virale in cDNA e Amplificazione in realtime in un'unica reazione.

La real-time PCR utilizza una sonda ad ibridazione sequenza-specifica di tipo TaqMan[®]. La sonda TaqMan[®] è marcata con molecole fluorescenti alle estremità 5' e 3', chiamate rispettivamente Reporter e Quencher. Nella sonda integra la vicinanza di Reporter e Quencher fa si che non ci sia emissione di fluorescenza. Nella sonda ibridata al DNA bersaglio, l'allontanamento del Reporter dal Quencher durante la fase di elongazione per attività esonucleasica dell'enzima *Taq* polimerasi determina emissione di fluorescenza, che è direttamente proporzionale all'accumulo del prodotto di PCR.

Prova di conferma su colture cellulari

- Il limite principale della 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
- i campioni risultati positivi alla PCR vengono seminati su colture cellulari in monostrato
- dopo due settimane di incubazione si esegue una RT-PCR dal lisato cellulare

Determinazione dell'infettività



HAV NON REPLICA FACILMENTE: GIORNI ANZICHE'
ORE e RICHIEDE UNA SERIE DI PASSAGGI
CIECHI

La questione dei germi indicatori

- La presenza di virus non è sempre correlata alla presenza di batteri.
- I virus vengono trattenuti dai molluschi per diversi giorni anche se posti in acque di stabulazione pulite ed essi permangono anche dopo che i batteri indice di contaminazione fecale sono scomparsi
- i virus sono più resistenti dei batteri ai trattamenti di bonifica compresa la clorazione
 - sopravvivono a lungo nell'acqua di mare
 - sopravvivono mesi a temperatura < 10°C
 - sedimento marino = reservoir di virus

Sopravvivenza dei virus nell'ambiente marino

- I virus possono sopravvivere a lungo in acqua perché agli effetti inattivanti del pH, dei raggi UV e dei trattamenti disinfettanti i virus enterici contrappongono due strategie di difesa organica che ne facilitano la persistenza e la diffusione nell'ambiente esterno: l'aggregazione e l'adsorbimento.
- L'aggregazione è data dalla formazione di aggregati formati da 2-10 unità virali chiamate "clumps" che garantiscono una maggiore resistenza delle singole particelle alle condizioni ambientali avverse.
- I virus hanno un grande potenziale di adsorbimento nei confronti di qualunque tipo di materiale particolato (organico ed inorganico), come particelle argillose, silicati, batteri, cellule algali e particolati organici, che aumenta la loro sopravvivenza nelle acque d'estuario e nei sedimenti, grazie alla creazione di una vera e propria barriera fisica.
- I virus, così protetti, riescono a sopravvivere per lunghi periodi nell'ambiente marino e possono essere trasportati dalle correnti anche a grande distanza dai punti di scarico.



- Elevata infettività
- Possibilità di induzione di episodi di vaste proporzioni
- Necessità di perfezionamento di metodiche (non solo ISO 15216: 2013)
- Necessità di piani di monitoraggio
- Attivazione di adeguati piani di sorveglianza epidemiologica

Non si può finire senza parlare di COVID



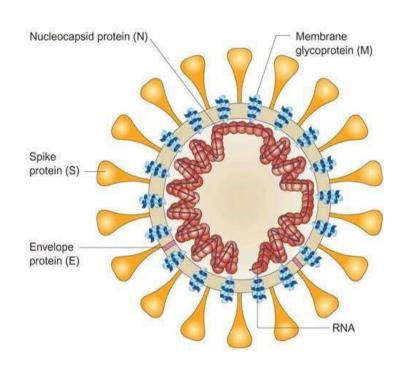
COSA SONO I CORONAVIRUS?

I Coronavirus (CoV) sono virus appartenenti alla famiglia *Coronaviridae* che possono causare malattie a diverso spettro sintomatico. Sono considerati la causa primaria del comune raffreddore (insieme ai Rinovirus) ma sono responsabili anche di sindromi respiratorie severe come la MERS (sindrome respiratoria mediorientale, *Middle East respiratory syndrome*) e la SARS (sindrome respiratoria acuta grave, *Severe acute respiratory syndrome*).

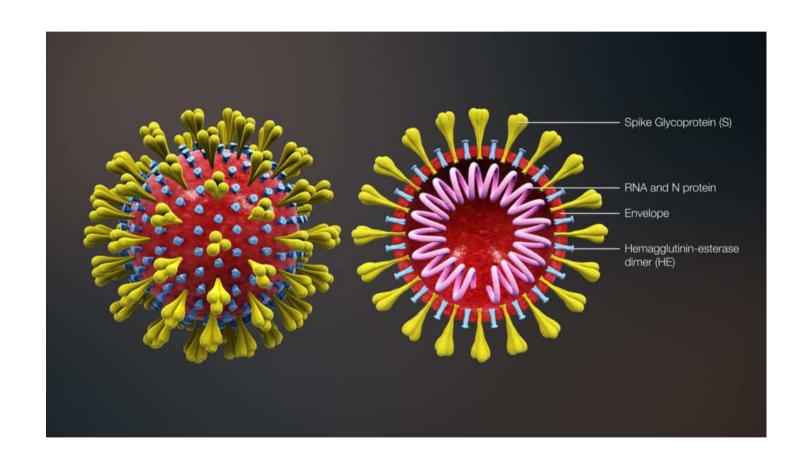
I virioni hanno un diametro medio di circa 100-160 nm, sono pleiomorfi e rivestiti da pericapside (envelope), con un grosso genoma ad ssRNA lineare (fino a 27-32 Kb). Sono così chiamati per la presenza sul pericapside di spicole molto evidenti che sembrano formare una «corona» intorno alla particella virale.

I coronavirus hanno come ospiti molte specie animali tra cui anche l'uomo.

Un nuovo coronavirus è un nuovo ceppo di coronavirus che non è stato precedentemente mai identificato nell'uomo.



Struttura del virione di un Coronavirus. Le spicole glicoproteiche della superficie virale sono inserite in un involucro lipidico (envelope) derivato dalla cellula ospite infetta. L'RNA virale a singolo filamento è associato alla fosfoproteina del nucleocapside. (*Periris et al., 2005*)



Classificazione dei coronavirus

- Ordine (suffisso -virales)
- oFamiglia (suffisso -viridae)
- oSottofamiglia (suffisso -virinae)
- oGenere (suffisso -virus)
- OSpecie
- OCeppo/sierotipo

Coronaviridae

Coronavirinae

- 1. Alphacoronavirus,
- 2. Betacoronavirus,
- 3. Gammacorona<mark>virus</mark>
- 4. Deltacoronavirus

The alphacoronaviruses and betacoronaviruses infect mammals.

The gammacoronaviruses and deltacoronaviruses infect birds, but some of them can also infect mammals.

Alphacoronaviruses and betacoronaviruses usually cause respiratory illness in humans and gastroenteritis in animals. (Woo et al., 2012)

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)

Coronavirus umani (HCoV)

I coronavirus umani conosciuti ad oggi, comuni in tutto il mondo, sono sette, alcuni identificati nella prima metà degli anni Sessanta, altri identificati nel nuovo millennio.

Coronavirus umani comuni

- 1) 229E (alphacoronavirus)
- 2) NL63 (alphacoronavirus)
- 3) OC43 (betacoronavirus)
- 4) HKU1 (betacoronavirus)



Causano lievi malattie del tratto respiratorio superiore, incluso il comune raffreddore

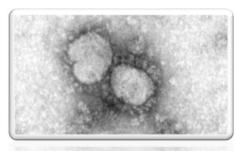


Immagine al microscopio elettronico dei virioni del virus SARS-CoV (Hazelton & Gelderblom, 2003)

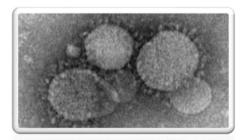


Immagine al microscopio elettronico dei virioni del virus MERS-CoV (Goldsmith et al. 2013)

Coronavirus umani emergenti

5) SARS-CoV (betacoronavirus causa della *Severe Acute Respiratory Syndrome*) 6)MERS-CoV (betacoronavirus causa della *Middle East Respiratory Syndrome*) 7)SARS-CoV-2 (betacoronavirus causa della COVID-19)

(www.epicentro.iss.it)



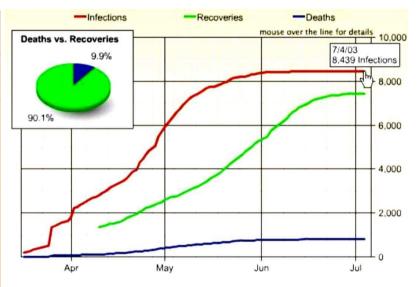
SARS-CoV

SARS-CoV

La sindrome respiratoria acuta grave (Severe acute respiratory syndrome) dovuta a coronavirus è stata registrata per la prima volta in Cina a novembre 2002. Ha causato un'epidemia mondiale che tra il 2002 e il 2003 ha registrato 8098 casi probabili di cui 774 decessi. Dal 2004 non si sono registrati casi di infezione da SARS-CoV in nessuna parte del modo.

Periodo epidemico	- inizio: Marzo 2002 - fine: Luglio 2003
Possibile serbatoio animale	Civetta mascherata delle palme (Zibetto o Musang) <i>Paguma larvata</i>
Periodo incubazione	- 2-7 giorni - massimo 10 giorni
Via di trasmissione	Aerea contatto diretto/indiretto con oggetti contaminati
Contagiosità	- molto bassa all'esordio -alta con il peggioramento dellasintomatologia (decimo giorno della malattia)
Mortalità	- 10 % - 774 decessi su 8096 casi

Caratteristiche dell'epidemia causata dal virus SARS-CoV



Il portale dell'epidemiologia per la sanità pubblica a cura dell'istituto superiore di sanità

Casi confermati di SARS registrati da Marzo 2002 a Luglio 2003 (WHO, World Health Organization 2004 SARS Report)

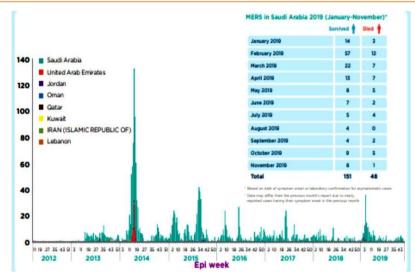
MERS-CoV

MERS-CoV



La sindrome respiratoria mediorientale (*Middle East respiratory syndrome*) dovuta a coronavirus è stata registrata per la prima volta in Arabia saudita nel 2012. Da allora, l'infezione ha colpito persone da oltre 25 Paesi anche se tutti i casi sono stati collegati a Paesi interni o nelle vicinanze della penisola arabica.

Periodo epidemico	- inizio: Luglio 2012 - fine: Maggio 2015
Possibile serbatoio animale	Camelidi (cammelli, dromedari)
Periodo incubazione	- dai 2 ai 15 giorni
Via di trasmissione	- aerea - contatto diretto/indiretto con oggetti contaminati
Contagiosità	- bassa all'esordio - alta con il peggioramento della sintomatologia
Mortalità	- 34,4 % - 860 decessi su 2200 casi



Caratteristiche dell'epidemia causata dal virus MERS-CoV

Casi confermati di MERS registrati da Luglio 2012 a Novembre 2019 (WHO, World Health Organization, MERS-Worldwide Situation 2020)

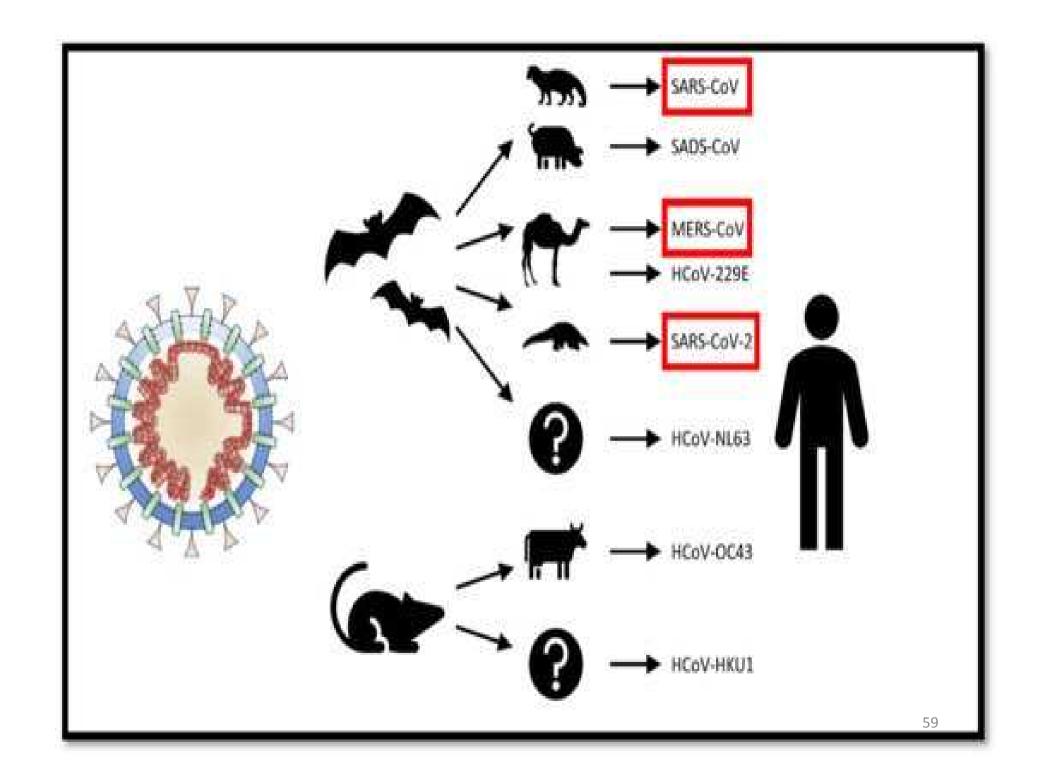


Origine Zoonotica

- Il virus che provoca la COVID-19 è un virus zoonotico
- Dalle analisi filogenetiche effettuate, i pipistrelli sembrano essere il serbatoio del virus 2019-nCoV, ma l'ospite intermedio non è stato ancora inequivocabilmente identificato
- Dai campionamenti condotti su diversi tipi di fauna selvatica viva delle specie vendute al mercato del pesce di Huanan, a Wuhan, focolaio dell'infezione, sembrerebbe essere molto accreditata l'ipotesi che si tratti di un serpente.







Analisi genetiche

Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV

Jia Liu^{1,3} | Xin Zheng^{1,3} | Qiaoxia Tong¹ | Wei Li¹ | Baoju Wang^{1,3} | Kathrin Sutter^{2,3} | Mirko Trilling^{2,3} | Mengji Lu^{2,3} | Ulf Dittmer^{2,3} | Dongliang Yang^{1,3}

¹Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuha Hubei, China

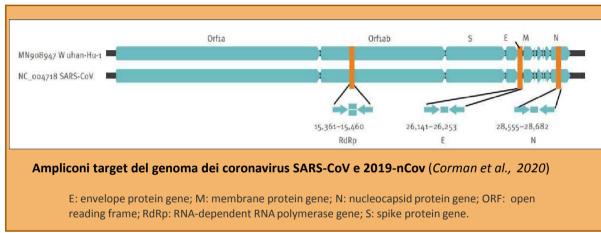
Institute for Virology, University Hospital of

Abstract

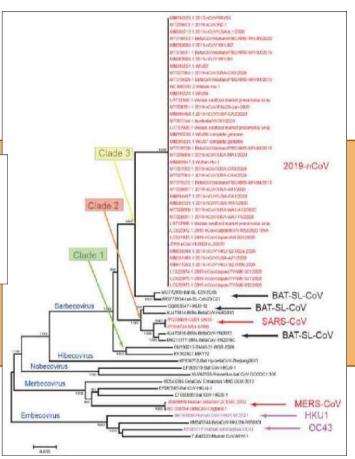
First reported from Wuhan, The People's Republic of China, on 31 December 2019, the ongoing outbreak of a novel coronavirus (2019-nCoV) causes great global The genome of 2019-nCov was sequenced very early during the outbreak. 5 This enabled rapid development of point-of-care real-time reverse transcription-polymerase chain reaction diagnostic tests specific for 2019-nCoV. 33 The genetic sequence analysis revealed that the 2019-nCoV belongs to the β -coronavirus genus, with a 79.0% nucleotide identity to SARS-CoV and 51.8% identity to MERS-CoV. 34 Furthermore, it has been reported that nCoV-2019 is 96% identical across the entire genome to a bat coronavirus. 35 Inoculation

Analisi genetiche

 Analisi bioinformatiche hanno indicato che il virus aveva caratteristiche tipiche della famiglia dei coronavirus ed apparteneva al genere Betacoronavirus.



 Analisi di sequenziamento dell'intero genoma di 104 isolati del virus causa di COVID-19 in pazienti di diverse località con insorgenza dei sintomi tra la fine di dicembre 2019 e metà febbraio 2020 hanno mostrato un'omologia del 99,9%, senza mutazioni significative, confermando un'omologia di quasi l'80% con il genoma di SARS-CoV e di oltre il 90% con il genoma del coronavirus dei pipistrelli.



Analisi filogenetica del virus della COVID-19 (WHO, COVID-19 Report, 16-24 Febbraio 2020)

01 MARZO 2020 18:47

Coronavirus, italiana la scoperta della mutazione genetica che lo ha reso pericoloso per l'uomo

sequenza genetica che ha permesso al microrganismo di passare dagli All'Università Campus Bio-medico di Roma è stata ricostruita la animali alla specie umana

gruppo di statistica medica ed epidemiologia molecclare dell'Università Campus Bio-medico di coronavirus degli animali in un virus in grado di colpire gli esseri umani. La scoperta si deve al Alcuni scienziati italiani sono riusciti a ricostruire la **mutazione genetica** che ha trasformato il Roma diretto da Massimo Ciccozzi e il primo autore è uno studente, Domenico Benvenuto



pubblicazione sul Journal of Clinical virology, mette sotto esame le sequenze genetiche del virus cioè il cambiamento che ha permesso a un virus típico degli animali, in particolare dei pipistrelli in circolazione scoprendo la mutazione che è stata decisiva per il cosiddetto "salto di specie", di diventare capace di aggredire gli uomini. "E' stato un cambiamento decisivo - ha spiegato Mutazione avvenuta tra il 20 e il 25 novembre - Lo studio, accessibile online e in via di Ciocozzi -, una mutazione molto particolare, avvenuta tra il 20 e il 25 novembre."

5/3/2020



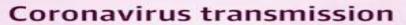
Roma. Chi sono le ricercatrici italiane che hanno isolato il Coronavirus

Redazione Internet lunedi 3 febbraio 2020

A isolare il Coronavirus un team tutto al femminile. La direttrice dell'Istituto: «Ora più semplice trovare un vaccino»



Lazzaro Spallanzani, riuscito a isolare il nuovo Coronavirus, passo fondamentale per sviluppare terapie e possibile vaccino, per la prima volta in Europa, la terdo volta Sono tre donne, tre ricercatrici italiane le protagoniste dell'impresa dell'istituto



SARS-CoV-2 is the novel coronavirus that causes COVID-19. The virus can spread when a person touches a surface or object that has active virus particles on it and then touches their mouth, nose, or eyes.



Virus particles can remain active for up to 72 hours on some surfaces, but they typically become inactive after 24 hours.



Virus particles can be eliminated by washing hands with soap and water and cleaning surfaces with disinfectant.

Food shopping safety

Transmission of SARS-CoV-2 has not been shown to occur through eating, but precautions when shopping for food may prevent viral spread.

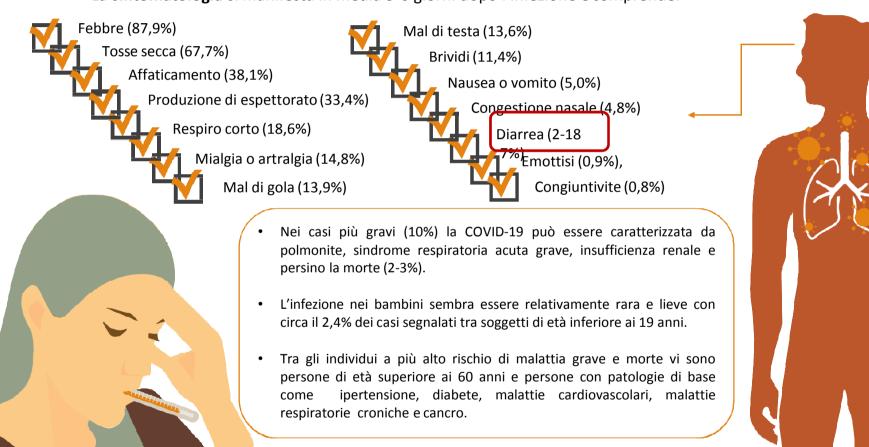
- Disinfect shopping carts and baskets.
- Keep 6 feet of distance between yourself and other shoppers.

6 feet

After putting groceries away, throw away disposable bags, wash hands, and disinfect countertops and other surfaces.

Sintomatologia

- Il **periodo di incubazione** della COVID-19 va da 1-14 giorni
- La sintomatologia si manifesta in media 5-6 giorni dopo l'infezione e comprende:



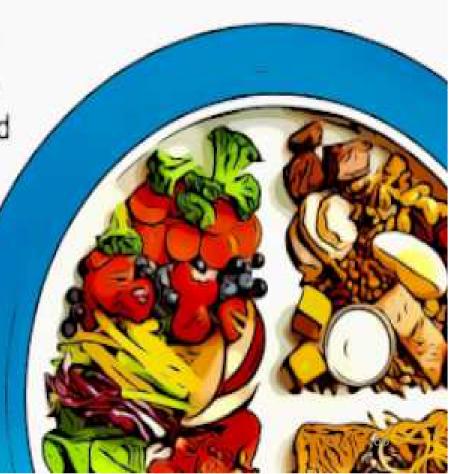
Can COVID_19 be passed on through food?

- Per quanto riguarda il coinvolgimento dell'apparato gastrointestinale, dati in letteratura evidenziano che circa il 2-18% dei pazienti con COVID-19 presentano diarrea e diversi studi hanno rilevato il genoma virale nelle feci di soggetti infetti, sia sintomatici che asintomatici.
- Ulteriori studi hanno inoltre mostrato la presenza di particelle virali infettive di SARS-CoV-2 in campioni fecali e hanno messo in evidenza che le proteine dei recettori ACE2 (*Angiotensin-Converting Enzyme* 2) utilizzati dal SARS-CoV-2 per l'ingresso cellulare sono abbondantemente espresse nell'epitelio gastrointestinale e che SARS-CoV-2 è in grado di penetrare nelle cellule intestinali.
- È indispensabile ricordare che, ad oggi (18/05/2020) non sono stati segnalati casi associati alla trasmissione oro-fecale di SARS-CoV-2
- Non vi sono evidenze di una sua trasmissione alimentare, associata agli operatori del settore alimentari o agli imballaggi per alimenti

Can COVID-19 be passed on through food?

There is no evidence to suggest that COVID-19 is passed on through food. People working in the food sector and consumers should maintain good hygiene practices which includes regular handwashing. Thorough cooking will also kill the virus.





Can COVID_19 be passed on through food?

"In base allo stato attuale delle conoscenze, è possibile escludere la trasmissione del virus SARS-CoV-2 direttamente attraverso il tratto digestivo. Infatti, mentre il virus è stato osservato nelle feci dei pazienti, probabilmente era dovuto alla circolazione del virus nel sangue a seguito di infezione respiratoria piuttosto che attraverso il tratto digestivo. Tuttavia, la possibilità che il tratto respiratorio venga infettato durante la masticazione non può essere completamente esclusa.
Come con altri coronavirus noti, questo virus è sensibile alle temperature di cottura. Il trattamento termico a 63 ° C per 4 minuti (temperatura utilizzata durante la preparazione di cibi caldi in catering collettivi, come le mense) può quindi ridurre la contaminazione di un prodotto alimentare di un fattore di 10.000.

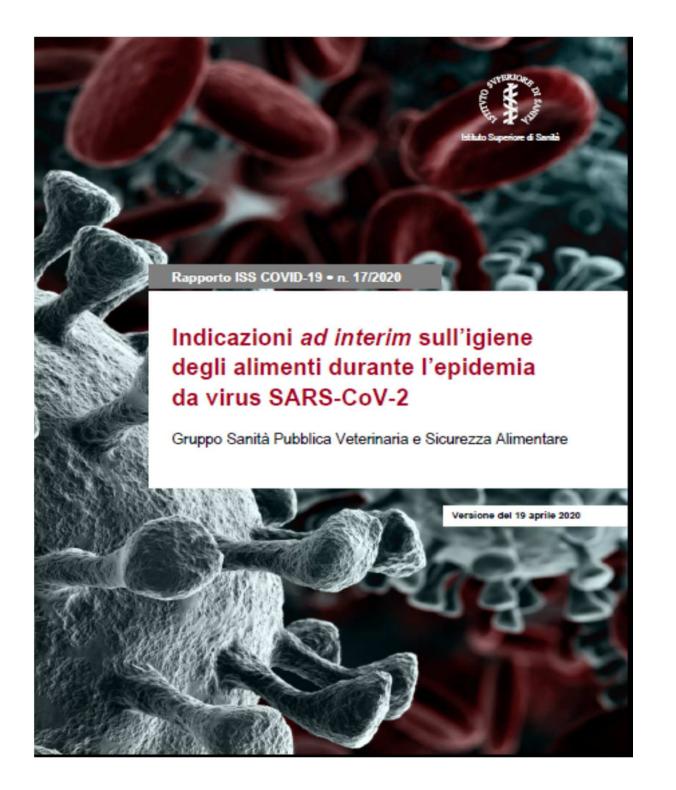
Una persona infetta può contaminare il cibo preparandolo o maneggiandolo con le mani sporche o attraverso goccioline infettive prodotte quando tossisce o starnutisce. Le buone pratiche igieniche, se applicate correttamente, sono un modo efficace per prevenire la contaminazione degli alimenti con il virus SARS-CoV-2".

Resistenza sulle superfici e in funzione della temperatura

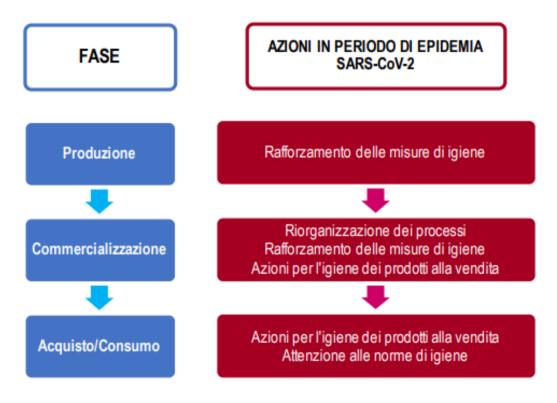
- SARS-CoV2 ha una diversa sopravvivenza in base alla tipologia di superfice.
- In condizioni controllate di laboratorio (es. umidità relativa del 65%), il virus infettante era rilevato per periodi inferiori alle 3 ore su carta (da stampa e per fazzoletti), fino a un giorno su legno e tessuti, due giorni su vetro, e per periodi più lunghi (4 giorni) su superfici lisce quali acciaio e plastica, persistendo fino a 7 giorni sul tessuto esterno delle mascherine chirurgiche.
- Sempre in condizioni di laboratorio, hanno evidenziato come il virus infettante fosse rilevabile fino a 4 ore su rame, 24 ore su cartone e 2-3 giorni su plastica e acciaio.



- Significativamente, SARS-CoV-2 risulta efficacemente disattivato dopo 5 minuti di esposizione a comuni disinfettanti quali soluzioni a base di cloro allo 0,1%, etanolo al 70% o ad altri disinfettanti quali clorexidina 0,05% e benzalconio cloruro 0,1% (24).
- SARS-CoV-2 mostra, nei confronti delle temperature rilevanti per i processi di preparazione dei cibi (cottura e mantenimento dalla temperatura nelle attività di ristorazione), un comportamento analogo a quello di altri Coronavirus come SARS e MERS, non essendo possibile rilevare virus infettante dopo 30 minuti a 56°C e dopo 5 minuti a 70°C.



Ferma restando l'assenza di evidenze rispetto alla trasmissione alimentare del virus e la valutazione da parte OMS che la possibilità di contrarre il COVID-19 tramite gli alimenti o tramite le confezioni alimentari sia altamente improbabile, nel corso dell'epidemia da SARS CoV-2, la tutela dell'igiene degli alimenti richiede di circoscrivere, nei limiti del possibile, il rischio introdotto dalla presenza di soggetti potenzialmente infetti in ambienti destinati alla produzione e commercializzazione degli alimenti



Azioni specifiche in periodo di epidemia da SARS-COV-2 nelle fasi dalla produzione al consumo di alimenti Water Research 179 (2020) 115899



Contents lists available at ScienceDirect

Water Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres



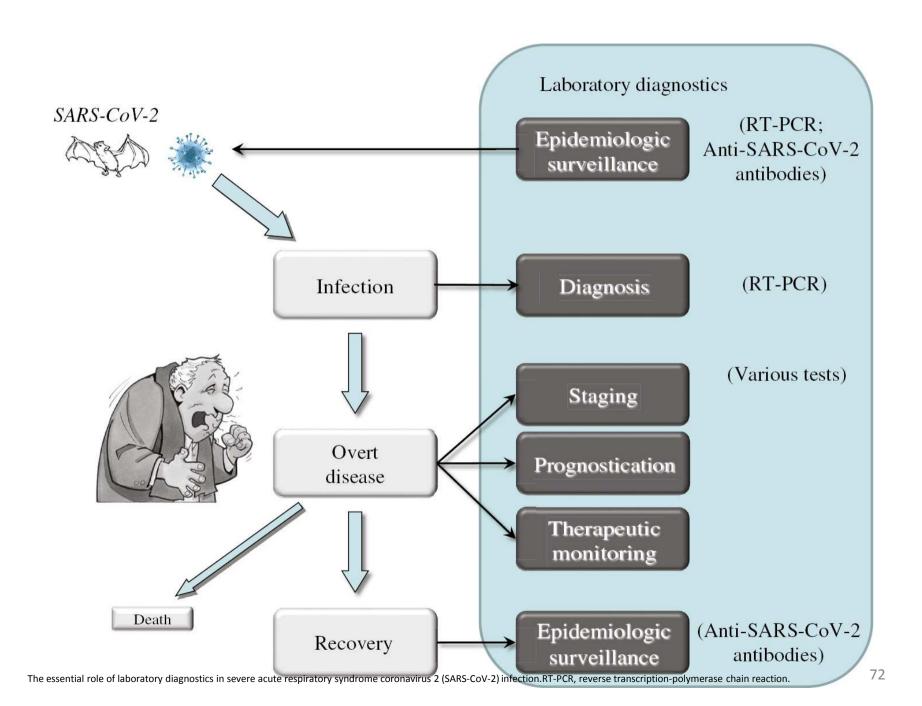
Review

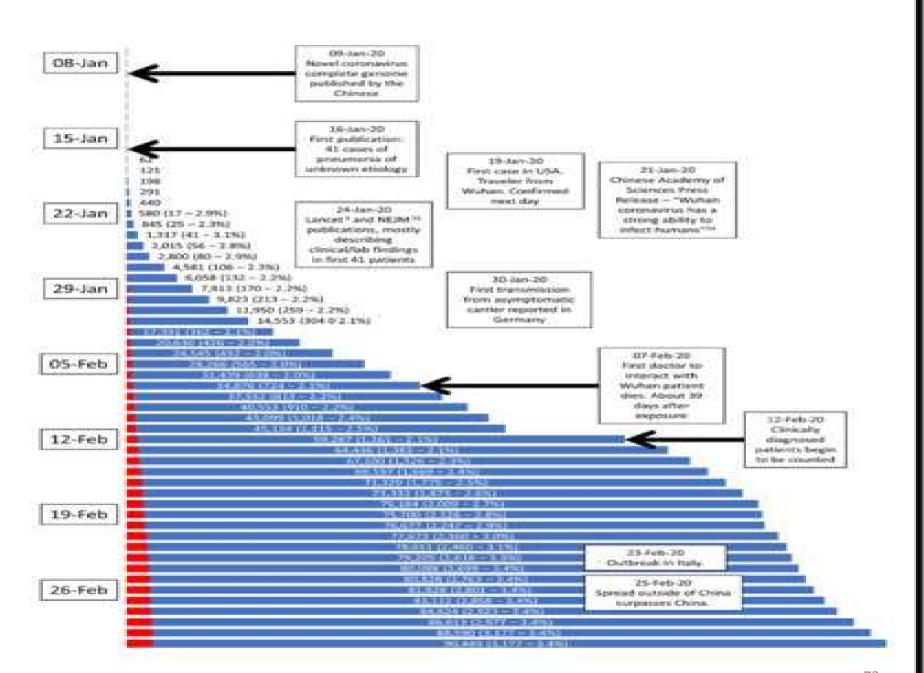
Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods - A scoping review

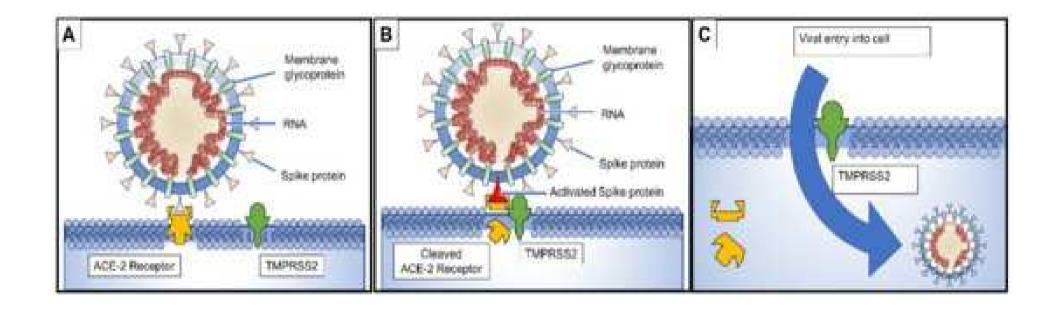


Giuseppina La Rosa ^{a,*}, Lucia Bonadonna ^a, Luca Lucentini ^a, Sebastien Kenmoe ^b, Elisabetta Suffredini ^c

- ^a Department of Environment and Health, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy
- Department of Virology, Centre Risteur of Cameroon, 451 Rue 2005, PO. Box 1274, Yaou nde, Cameroon Department of Rood Safety, Nutrition and Veterinary Public Health, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy
- Il coronavirus SARS è stato rilevato nelle acque reflue ma non come particelle infettive.
- La temperatura è un fattore importante che influenza la sopravvivenza virale (il titolo del virus infettivo diminuisce più rapidamente a 23 ° C-25 ° C rispetto a 4 ° C
- CoV mostra stabilità ambientale limitata e sensibilità agli ossidanti come cloro.
- Non ci sono prove della trasmissione di CoV attraverso acqua contaminata.
- I metodi per la concentrazione di CoV dalle acque dovrebbero essere ottimizzati.







(A) Le proteine spike sulla superficie del coronavirus si legano ai recettori dell'enzima 2 (ACE-2) che converte l'angiotensina sulla superficie della cellula bersaglio; (B) La proteasi della serina transmembrana di tipo II (TMPRSS2) si lega e scinde il recettore ACE-2. Nel processo, viene attivata la proteina spike; (C) Cleaved ACE-2 e proteina spike attivata facilitano l'ingresso virale. L'espressione di TMPRSS2 aumenta l'assorbimento cellulare del coronavirus

Water Research 179 (2000) 115899



Contents lists available at ScienceDirect

Water Research





Review

Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods - A scoping review



Giuseppina La Rosa a, Lucia Bonadonna a, Luca Lucentini a, Sebastien Kenmoe b, Elisabetta Suffredini ^c

- ^a Department of Environment and Health, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy
 ^b Department of Virology, Centre Rasteur of Camernon, 451 Rus 2005, PO. Box 1274, Yaquade, Camernon
- ^c Department of Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy





The Food Systems in the Era of the Coronavirus (COVID-19) Pandemic Crisis

Charis M. Galanakis 1,2,30

- Research & Innovation Department, Galanakis Laboratories, 73131 Chania, Greece; cgalanakis@chemlab.gr
- College of Science, King Saud University, Riyadh 11451, Saudi Arabia
- Food Waste Recovery Group, ISEKI Food Association, 1190 Vienna, Austria

Received: 1 April 2020; Accepted: 15 April 2020; Published: 22 April 2020



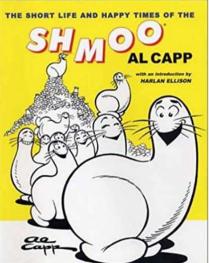
Agriculture and Human Values https://doi.org/10.1007/s10460-020-10107-8

RAPID RESPONSE OPINION

COVID, food, and the Parable of the Sh

M. Jahl Chappell^{1,2}

Accepted: 28 April 2020 © Springer Nature B.V. 2020



Indicazioni ad interim sull'igiene degli alimenti durante l'epidemia da virus SARS-CoV-2

Versions del 19 aprile 2020

Gruppo di lavoro ISS Sanità Pubblica Veterinaria e Siourezza Alimentare COVID-19

United Agins, Logi Bertrato, Artorio Mendito, Sinone Di Panpale Crario De Media, Parilo Standillia, Lorectura Classi, Elizabetta Suffredisi

on is orbiteratore if Lock Bonetome, Obseppine La Rose (Stoppe of Series (CC Avenue & - Arthur) Perio Fortage D'Annone Circums d'inversible de Control

Per David Makeri, Peole De Castro, Sandro Salinetti

Antonio Paparele Cinterally dept Stad-of Teramo