

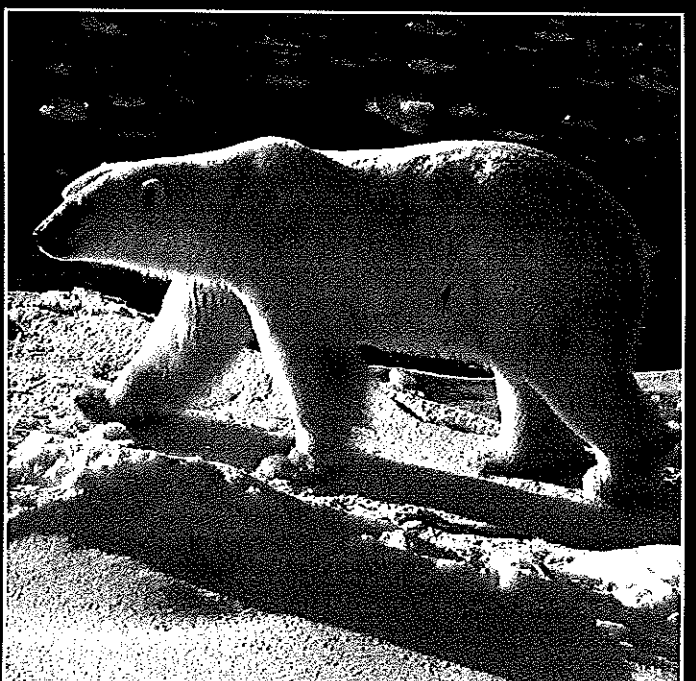
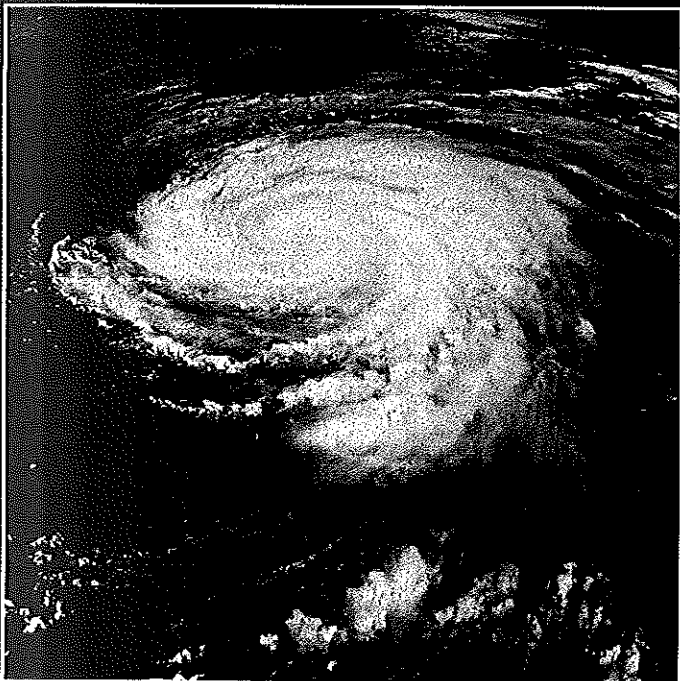
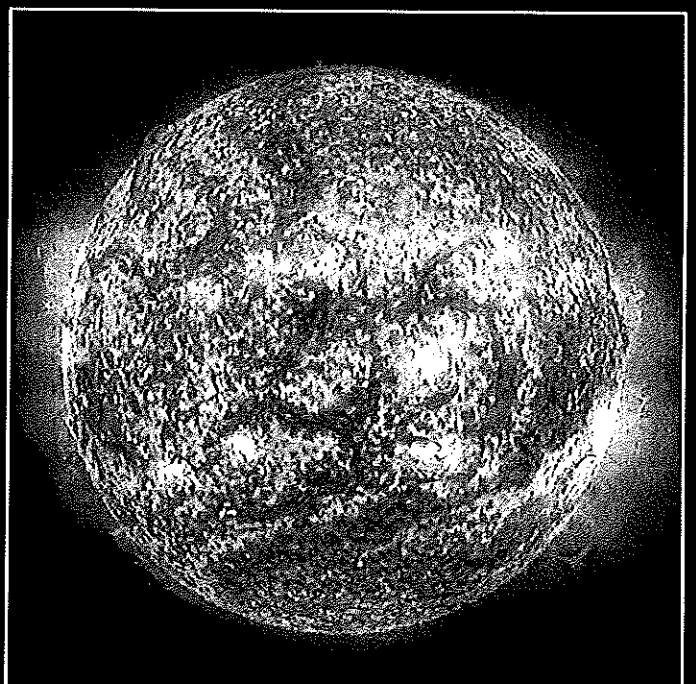
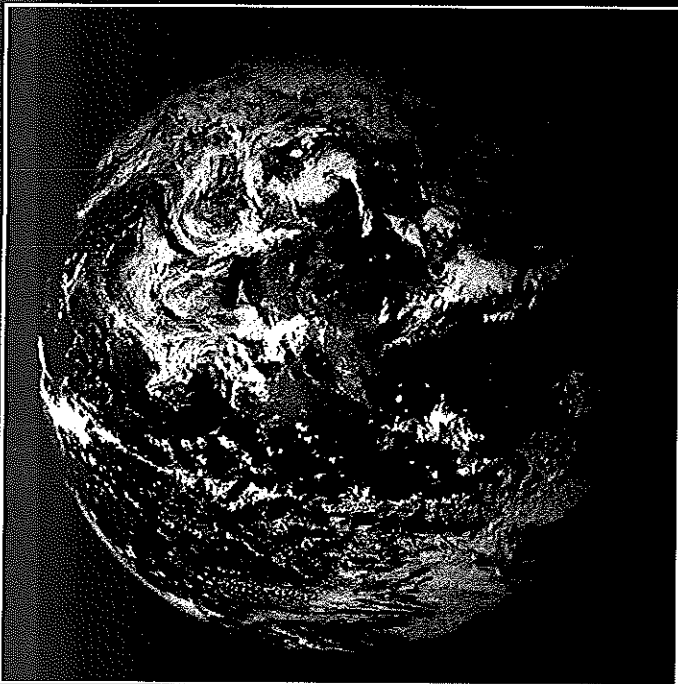
ANNO XXXIX - N. 1

GENNAIO 2009

# BIOLOGI ITALIANI



ORGANO UFFICIALE DELL'ORDINE NAZIONALE DEI BIOLOGI



"IN CASO DI MANCATO RECAPITO, RINVIARE A UFFICIO POSTE ROMA ROMANINA PER LA RESTITUZIONE AL MITTENTE PREVIO ADEBITO"

# Messa a punto di un protocollo sperimentale per la ricerca di *Enterovirus* in sedimenti marini

V. Cannella, G. Purpari, P. Di Marco, A. Guercio

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo

## Riassunto

In riferimento al Decreto Ministeriale del 24/01/1996, il controllo dei fondali marini utilizzati per il ripascimento dei litorali, costituisce un passo importante per la valutazione della salubrità dell'ambiente marino e dei prodotti ittici da allevamento, con particolare riferimento alla coltivazione di molluschi eduli lamellibranchi. Diversi studi, infatti, hanno dimostrato come i sedimenti, per le loro caratteristiche chimico-fisiche, rappresentano dei "serbatoi" di agenti microbici di varia natura che, da qui possono essere risospesi nelle acque, compromettendo la salubrità dell'ambiente. Poiché i molluschi eduli lamellibranchi sono organismi filtratori e trattengono agenti patogeni causa di malattie nell'uomo, è importante conoscere il livello di contaminazione microbiologica dell'ambiente in cui essi sono allevati. In quest'ottica, l'analisi virologica di campioni ambientali, assume una particolare importanza, in considerazione di alcune caratteristiche peculiari dei virus, tra cui l'elevata resistenza nell'ambiente, la bassa carica infettante, nonché l'elevata variabilità genetica che pone il rischio di impreviste emergenze sanitarie. I controlli delle acque di mare e dei molluschi sono regolamentati rispettivamente dal D.P.R. 470/86 e dal D. Leg 530/92, i quali prevedono la ricerca di batteri indicatori di contaminazione fecale

(Coliformi, Streptococchi e Salmonella) definendone i limiti quantitativi e i protocolli operativi e lasciando, invece, facoltativa la ricerca di Enterovirus. Pertanto, in mancanza di protocolli standardizzati per la ricerca di virus, un utile approccio al problema è rappresentato dalla ottimizzazione di metodi diagnostici sensibili, in grado di rilevare tali patogeni nei campioni di origine ambientale. Gli A.A., nel presente lavoro, hanno messo a punto una metodica di estrazione e concentrazione di agenti virali dai sedimenti marini, attraverso una prova di contaminazione sperimentale di tale matrice con il virus dell'Epatite A (HAV). La ricerca del virus nei campioni pretrattati è stata eseguita attraverso l'uso di una specifica "seminest" RT-PCR seguita dall'isolamento in colture cellulari permissive FRhK-4 (*foetal rhesus monkey kidney*). Il protocollo ottimizzato, è stato adottato successivamente, per analizzare 162 campioni di sedimenti marini, prelevati in aree costiere della Sicilia occidentale ed orientale in cui sono presenti allevamenti di molluschi. In particolare, i sedimenti sono stati analizzati per la ricerca di Enterovirus ed HAV attraverso due specifiche RT-PCR ed attraverso tecniche di isolamento virale, rispettivamente in BGM (*buffalo green monkey*) e FRhK4.

## Introduzione

La ricerca dei virus nell'ambiente ebbe inizio negli anni '40, quando fu dimostrata la possibilità di trasmissione dei *Poliovirus* attraverso il contatto con le acque contaminate dell'East River a New York, evidenziando una relazione tra agenti virali nell'ambiente e comparsa di infezione nella popolazione (Carducci A., 2005).

L'immissione di reflui organici in mare correlata all'urbanizzazione delle coste, lo sversamento di corsi d'acqua contaminati, le operazioni di dragaggio effettuate nei porti e il ripascimento dei litorali, sono tutti fattori che inducono cambiamenti nella flora microbica ambientale, rappresentando così un rischio per la sanità pubblica. In particolare, nell'ambito dei controlli sanitari delle acque costiere, l'analisi microbiologica dei sedimenti marini

assume una certa significatività, poichè gli agenti patogeni in essi depositati ed adsorbiti sulle particelle solide, rimangono protetti dall'inattivazione operata da vari fattori biologici, chimici e fisici.

I sedimenti contaminati risospesi sia dal moto ondoso che dalle attività di dragaggio dei fondali, costituiscono un rischio di contaminazione per l'ambiente (Donati G. *et al.* 2003; Smith E.M. *et al.* 1977; Pianetti A. *et al.* 2007). In considerazione della notevole importanza del mare per l'economia della regione siciliana, non possono non rientrare tra gli interessi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia i problemi di sanità collegati alla salubrità dell'ambiente marino e all'allevamento delle specie ittiche (Qualità totale).

La normativa vigente, in aggiunta alla ricerca di batteri indicatori di contaminazione fecale (Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi e Salmonelle), prevede anche la ricerca obbligatoria di Enterovirus nei sedimenti usati per il ripascimento degli arenili (D.M. del 24/01/1996), invece nei molluschi (D. Lgs 530/92), nelle acque potabili (D.P.R. 2367/1988) e di balneazione (D.P.R. 470/82, con le successive modifiche) essa è facoltativa.

Tuttavia, il rischio ambientale di natura virale dovrebbe essere considerato con maggiore attenzione considerando che i virus presentano caratteristiche peculiari che li differenziano dagli altri microrganismi.

Essi, infatti, possiedono una elevata resistenza ambientale e ai trattamenti di decontaminazione, bassa carica infettante ed elevata variabilità genetica; quest'ultima comporta il rischio di comparsa di varianti nuove, causa di imprevisti problemi sanitari. (Gilgen M. *et al.* 1997; Gantzer C. *et al.* 2002;). Inoltre, l'assenza di correlazione tra gli indicatori di contaminazione batterica e la presenza di agenti virali rende necessaria la ricerca specifica di questi ultimi non solo nei sedimenti utilizzati per il ripascimento delle spiagge, come imposto dal D.M. del 24/01/1996, ma ogni qual volta si debbano valutare le condizioni di salubrità dell'ambiente, con riferimento alle acque ed ai molluschi eduli in essi allevati. (Beller *et al.* 1997; Hafliger D. *et al.*, 2000; Wyn-Jones A.P. *et al.* 2001).

E' noto tuttavia che l'analisi virologica dei campioni di origine ambientale, pone una serie di problemi tecnici, diversi rispetto a quelli che si incontrano per le analisi batteriologiche e che si identificano in: determinazione dei volumi da analizzare, acquisizione e validazione di procedure per la concentrazione dei campioni, messa a punto di tecniche diagnostiche innovative capaci di superare i limiti e le difficoltà dei sistemi tradizionali. Infatti, l'isolamento dei virus su sistemi cellulari e la loro successiva identificazione, risulta spesso indagginosa, richiede tempi protratti e non è sempre applicabile.

Pertanto, in mancanza di protocolli standardizzati, è necessaria la messa a punto di metodiche diagnostiche affidabili e facilmente applicabili. Un problema di sanità pubblica è rappresentato dalle frequenti infezioni virali correlate al consumo di molluschi eduli lamellibranchi stabulati in acque aventi parametri batteriologici nella norma ma contaminate da agenti virali.(Croci L. *et al.*,1999; Leclerc H. *et al.* 2002). Le principali patologie virali veicolate dai molluschi sono rappresentate da infezioni a trasmissione oro-fecale attribuibili ad agenti quali *Enterovirus*, (*Virus Epatite A*, *Echovirus*, *Coxsackievirus*, *Enterovirus 68-71*), *Calicivirus* (*Norovirus*, *Virus Epatite E*), *Rotavirus*, *Reovirus*, *Coronavirus*, *Astrovirus*, *Adenovirus*, causa di forme cliniche complesse e diversificate come gastroenteriti, miocarditi, infezioni respiratorie e sindromi nervose (meningite, poliomelite, encefalite). L'epatite A riveste un ruolo primario tra le malattie di origine virale veicolate dai mitili. In Italia più del 60% dei casi di Epatite A segnalati negli ultimi anni sono stati correlati al consumo di molluschi. (Croci L. *et al.* 2003). Nel presente lavoro, gli A.A., hanno messo a punto un protocollo di estrazione e concentrazione di agenti virali, da sedimenti marini, attraverso una contaminazione sperimentale di tale matrice con un ceppo non citopatogeno del virus dell'Epatite A (HAV). Sui campioni pretrattati è stata eseguita infine la ricerca del virus attraverso una specifica "seminested" RT-PCR ed un test di isolamento virale in monostrati di cellule permissive FRhK-4. Il protocollo adottato è stato successivamente utilizzato per analizzare, n°162 campioni di sedimenti marini, prelevati in aree costiere della Sicilia occidentale ed orientale, in cui sono presenti allevamenti di molluschi eduli lamellibranchi (Foto 1). Nei campioni pretrattati infine è stata effettuata la ricerca di *Enterovirus* e di HAV, attraverso due specifiche "seminested" RT-PCR ed isolamento in vitro, rispettivamente su linee cellulari BGM e FRhK-4.



Foto 1 - Zone costiere della Sicilia dalle quali è stato effettuato il prelievo dei sedimenti

**Materiali e metodi**

Allo scopo di ottimizzare il protocollo per l'estrazione e la concentrazione di virus, n° 10 aliquote di sedimenti marini, di 20 ml ciascuna, precedentemente sterilizzati in autoclave a +121°C per 15 min, sono stati infettati sperimentalmente. L'infezione è avvenuta mediante contatto a +4°C e in lenta agitazione per 2 h, con diluizioni scalari, dal tal quale a 10<sup>-9</sup>, di un ceppo non citopatico del virus dell'Epatite A (ATCC-VR-2089, gentilmente fornito da M. Muscillo - Istituto Superiore di Sanità), con "End Point" in RT-PCR pari a 10<sup>-5</sup>. Successivamente, i campioni contaminati sono stati centrifugati a 5000 rpm per 10 min a +4°C, al fine di allontanare il virus in eccesso. Quindi, ai sedimenti precipitati sono stati aggiunti 60 ml di estratto di carne al 3% a pH 9,5 e sono stati lasciati in agitazione lenta per 15 min a +4°C. I campioni così pretrattati, sono stati ulteriormente centrifugati per il recupero dei surnatanti, il cui pH è stato portato a 7 ed ai quali è stata aggiunta una soluzione di PEG (Polietilenglicole) 8000 al 50%, rispettivamente in rapporto vol./vol. pari a 4:1 (Carducci A. *et al.* 1997; Rao V.C. *et al.* 1984; Wait D.A. *et al.* 1983). Dopo una notte in lenta agitazione a +4°C, si è proceduto ad effettuare una ulteriore centrifugazione a 8000 rpm per 45 min a +4°C. I pellets recuperati sono stati risospesi in 3 ml di PBS antibiotato 10X (1000U/ml penicillina, 1 mg/ml Streptomycina, 2,5 µg/ml anfotericina B) a pH 7,2 e posti a decontaminare per 1 h a +37°C (IRSA, Rapporti ISTISAN). L'RNA virale da ciascun campione è stato successivamente estratto, attraverso l'uso di un kit commerciale, seguendo le specifiche istruzioni (High Pure isolation RNA kit - ROCHE). La ricerca dell' HAV è stata effettuata tramite due reazioni consecutive di PCR ("seminested" RT-PCR). La prima reazione di amplificazione utilizza i primers H1 (*Reverse 1*) e H2 (*Foward*), specifici per la regione conservata VP1, codificante per il capsido virale e che danno un amplicone di 247 bp. La seconda PCR, utilizza i primers H2 e H3 (*Reverse 2*) ed amplifica un segmento di 210 bp interno al segmento precedente (Le Guyader *et al.* 1994). In particolare, la reazione preliminare di retro-trascrizione è stata realizzata seguendo le istruzioni fornite dal kit utilizzato (Transcriptor first strand cDNA sythesis - Roche), in un volume finale di 25

µl. La miscela di reazione per la prima PCR, è stata realizzata in un volume totale di 25 µl, contenenti 0,5 µM di ciascun primer H1 e H2 (tabella 1), PCR Buffer 1X, una miscela contenente 0,4 mM di ciascun di dNTP, 1,25 U di Taq Polymerase (Go Taq Polymerase - Promega) e 5 µl di cDNA. Il profilo termico di amplificazione è stato eseguito con l'uso del termociclatore 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) ed impostato con i seguenti parametri: +94°C per 5 min; 40 cicli di denaturazione a +94°C per 30 sec, ibridazione a +55°C per 1 min ed estensione a +72°C per 75 sec; infine è stato effettuato un ulteriore ciclo di estensione a +72°C per 5 min. La miscela di reazione per la seconda PCR, è stata realizzata rispettando le stesse condizioni adottate per la prima PCR, ma usando i primers H2 e H3 e 1 µl del primo amplificato, in un volume totale di 25 µl. I prodotti di amplificazione sono stati infine analizzati per elettroforesi in un gel di agarosio al 2%, contenente Etidio Bromuro (0.5 mg/ml).

Per dimostrare la presenza nei sedimenti dell'agente virale e dare evidenza della sua capacità replicativa sono stati infettati con 500 µl di inoculo, monostrati cellulari confluenti di cellule FrhK-4, permissive per il virus HAV ed allestiti in fiasche di 12,5 cm<sup>2</sup>. Dopo assorbimento a +37°C per 2 h, la coltura cellulare è stata addizionata del terreno colturale in rapporto di 1:7 (vol. inoculo/vol. terreno). Le colture infettate, sono state controllate al microscopio invertito per 10 giorni e sono stati eseguiti, complessivamente 3 passaggi ciechi (Ferrari M. *et al.* 2003). La crescita virale è stata verificata analizzando, attraverso la "seminested" RT-PCR, i criolisati ottenuti da ciascun passaggio. Le metodiche descritte sono state adottate per esaminare n°162 campioni di sedimenti marini, prelevati mediante tecnica di carotaggio a differenti strati (superficiale, media e profonda), in zone costiere in cui sono presenti allevamenti di molluschi eduli. Nei campioni suddetti, oltre ai test per il virus HAV ("seminested" RT-PCR ed isolamento su cellule FrhK-4), è stata effettuata la ricerca degli *Enterovirus* attraverso una "seminested" RT-PCR con primers che amplificano un segmento di 399 bp, localizzato nella regione altamente conservata 5' UTR, del genoma degli *Enterovirus* e denominati EV03 (*Reverse 1*), EV05 (*Reverse 2*), EV06 (*Foward*) (Gilgen *et al.* 1997) (Tabella 1).

Tab. 1 - Sequenze primers usati

Nome Primer	Sequenza	Localizzazione	Lunghezza frammento (bp)
H1 Reverse 1	5'-GGAAATGCTCTCAGGTACTTCTTIG-3'	2389-2413	247
H2 Foward	5'-GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG-3'	2167-2192	210
H3 Reverse 2	5'-TCCTCAATTGTTGTGATAGC-3'	2358-2377	
EV03 Reverse 1	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'	601-582	437
EV05 Reverse 2	5'-CACGGACACCCAAAGTA-3	563-547	339
EV06 Forward	5'-CAAGCACTTCTGTTCCCGG-3'	164-184	

Inoltre è stata eseguita una infezione su monostrati di cellule BGM permissive alla replicazione degli *Enterovirus*. Anche in questo caso, la reazione di retro-trascrizione è stata realizzata come descritto sopra. La prima PCR è stata ottimizzata in un volume totale di 50 µl, contenente 0.15 µM di ciascun primer EV03, EV06, 3,5 mM di MgCl<sub>2</sub>, PCR Buffer 1X, una miscela contenente 0,2 mM di ciascun dNTPs e 5 µl di cDNA. La miscela di reazione per la seconda PCR è stata ottimizzata con 0,25 µM di ciascun primer EV05, EV06, 3 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 µl del primo amplificato, in un volume totale di 50 µl. Il profilo termico per entrambe le amplificazioni ha previsto: una denaturazione iniziale a +94°C per 1 min; 30 cicli di denaturazione a 94°C per 30 sec, ibridazione a 55°C per 1 min ed estensione a +72°C per 1 min. L'estensione finale è avvenuta per 10 min a 72°C. I prodotti di amplificazione sono stati osservati per elettroforesi in un gel di agarosio al 2%, colorato con Etidio Bromuro. Ciascun campione inoltre è stato inoculato su monostrati di cellule confluenti BGM, per evidenziare l'eventuale presenza di virus. Le cellule infettate sono state osservate al microscopio per 7 giorni; i criolisati dei tre passaggi eseguiti sono stati analizzati attraverso la "seminested" RT-PCR descritta.

**Risultati e conclusioni**

Il protocollo sperimentale adottato, per eluire e concentrare il virus dell'epatite A attraverso l'uso dell'estratto di carne al 3% a pH 9, seguito dal trattamento con PEG 8000, ha dato esito favorevole. Infatti, la "seminested" RT-PCR condotta con i primers specifici, ha rilevato la presenza dell'RNA virale nei sedimenti infettati, fino alla diluizione di 10<sup>-5</sup> (Foto 2).

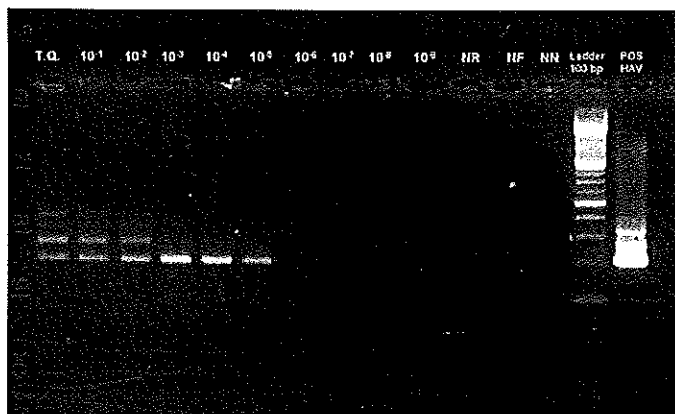


Foto 2 - RT- PCR sui 9 campioni di sedimenti infettati

Inoltre, le prove di isolamento virale eseguite su monostrati confluenti di cellule FRhK-4 hanno fornito anch'esse esito positivo. La presenza del virus è stata dimostrata nei tre passaggi tramite la stessa "seminested" RT-PCR, fino alla diluizione di 10<sup>-5</sup> (Foto 3 e 4). Quindi, si può affermare che il protocollo ha permesso di concentrare al massimo le particelle virali dando risultati positivi sino alla 10<sup>-5</sup>, diluizione corrispondente all'End Point del virus. Inoltre, la metodica utilizzata non ha interferito sulla capacità replicativa del virus dell'Epatite A.

L'indagine condotta sui 162 campioni di sedimenti marini, per la ricerca sia del virus dell'Epatite A che degli Enterovirus, ha dato esito negativo sia con i test biomolecolari che con le prove di isolamento virale.

Nell'ottica di una valutazione complessiva, si può affermare che sono molti i fattori, correlati alle caratteristiche dei virus e dell'ambiente, che possono condizionare l'adsorbimento di questi alle particelle solide di sedimento, rendendo tale interazione più o meno stabile.

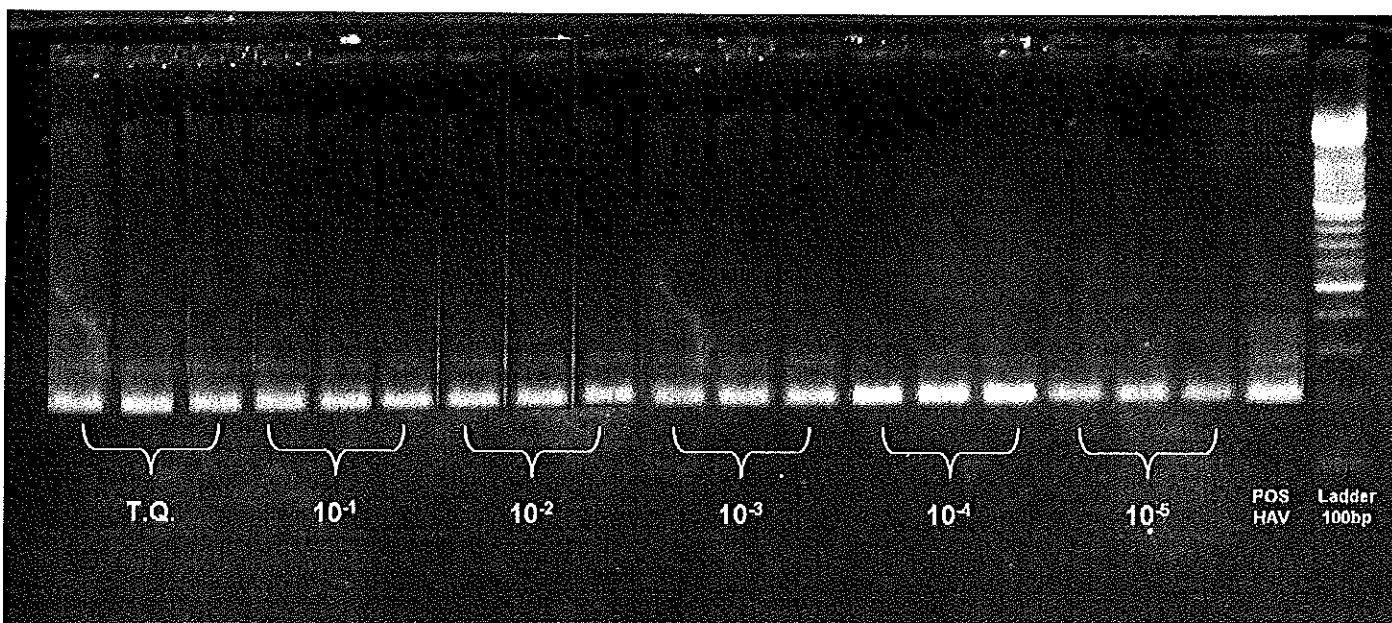


Foto 3 - RT- PCR sui 3 passaggi cellulari infettati con diluizioni del virus dal T.Q alla 10<sup>-5</sup>

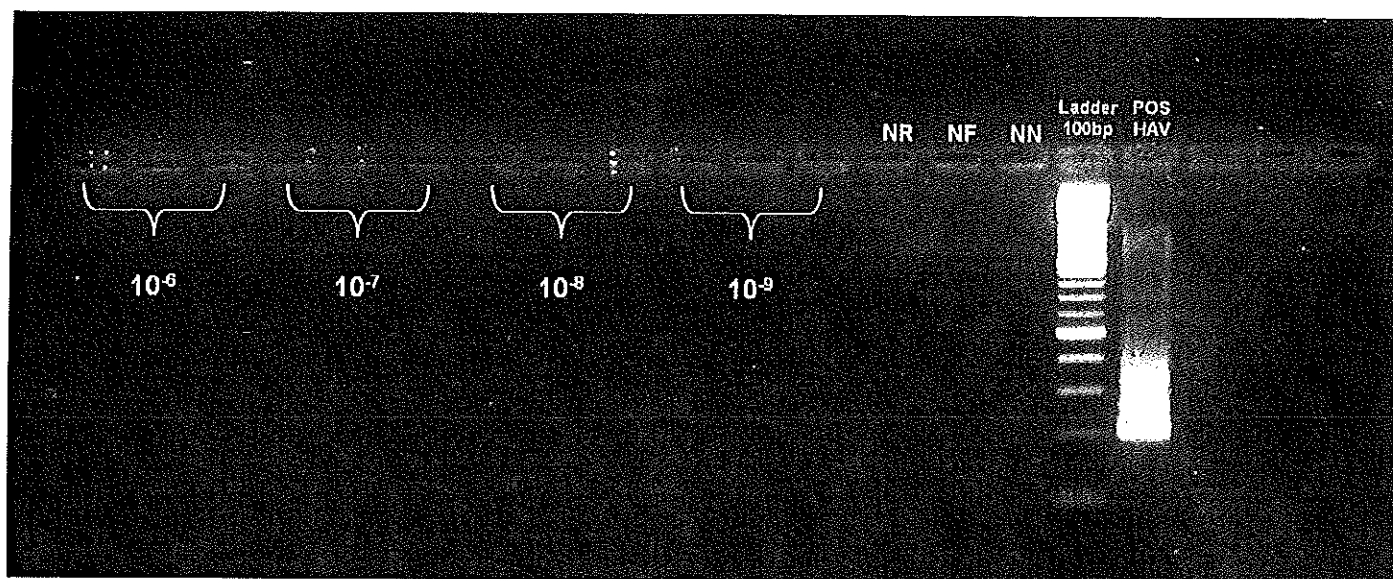


Foto 4 - RT-PCR sui 3 passaggi cellulari infettati con diluizioni del virus dalla  $10^{-6}$  alla  $10^{-9}$

In particolare, nell'interazione tra virus e sedimenti, giocano un ruolo fondamentale le cariche elettriche di superficie che possono cambiare in funzione dei valori di pH e della salinità dell'acqua. Infatti, in diversi studi è stato osservato che valori di pH acidi favoriscono l'adsorbimento dei virus alle particelle solide. Un altro importante parametro da tenere in considerazione è la natura bromatologica del sedimento in esame come pure le caratteristiche strutturali (capside, envelope) dei virus stessi. (Tsai S.C. *et al.* 1983; Douglas A.W. *et al.* 1983, Shioh-Chua T. *et al.* 1983, Berg G. *et al.* 1980).

La sicurezza dell'ambiente e la Qualità Totale delle produzioni rappresenta l'obiettivo principale da raggiungere nei prossimi anni. Il controllo dei sedimenti marini e delle acque, costituisce un passo importante nel percorso della qualità, intesa non soltanto come sorveglianza ambientale ma anche come controllo dei prodotti della pesca. In questa ottica, la ricerca dei virus enterici riveste un notevole interesse poiché tali agenti virali sono frequentemente rinvenuti in acque destinate al consumo umano ed in alimenti di origine ittica. (Boccia D. *et al.* 2002; Le Guyader F.S. *et al.* 2006; Prato R. *et al.* 2004; Rizzo C. *et al.* 2007; Lopman B.A. *et al.* 2003). Diversi studi condotti sul grado di contaminazione microbica dei sedimenti marini, riferiscono che le particelle virali in essi adsorbiti, sopravvivono più a lungo rispetto ai virus che si trovano sospesi in acqua di mare (Douglas A.W. *et al.* 1983; Pianetti A. *et al.* 2007; Bitton G. *et al.* 1982). Pertanto, la tutela dello stato di salute dell'ambiente marino passa non solo per un'attenta analisi delle acque, ma anche attraverso lo studio del sedimento in quanto "serbatoio" di sostanze inquinanti che possono venire risospese da fenomeni naturali e dall'uomo stesso. (La Belle R.L. *et al.* 1980)

#### Bibliografia

- 1) Beller M., Ellis A., Lee S.H., Debrot M.A., Jenkerson S.A., Funk E., Sobsey M.D., Simmons O.D., Monroe S.S., Ando T., Noel J., Petric M., Middaugh J.P., Spika J.S. "Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well" (1997). *JAMA*; 278: 563-568.
- 2) Berg G., Dahling D.R. "Method for recovering viruses from river water solids" (1980). *Appl. Environ. Microbiol.*: 850-853.
- 3) Bitton G., Chou Y.J., Farrah S.R. "Techniques for virus detection in aquatic sediments" (1983). *J Virol Methods*; 4(1): 1-8.
- 4) Boccia D., Tozzi A.E., Colter B., Rizzo C., Russo T., Buttinelli G., Caprioli A., Marziano M.L., Ruggeri F.M. "Waterborne outbreak of Norwalklike virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy" (2002). *Emerg Infect Dis*; 8: 563-568.
- 5) Carducci A., Zucchini A., Casini B., Cantiani L. "Efficienza di metodi per l'analisi virologica di sedimenti marini: confronti" (1997). *Rivista Italiana d'Igiene*, 57: 191-196.
- 6) Carducci A. "Rischio biologico da agenti virali: diffusione ambientale dei virus, sopravvivenza e modalità di trasmissione" (2005). Il corso di perfezionamento in virologia ambientale. Pisa 20-25 Giugno-12-17 Settembre.
- 7) Croci L., De Medici D., Morace G., Fiore A., Scalfaro C., Benedice F., Toti L. "Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested reverse transcription-PCR" (1999). *International Journal of Food Microbiology*. 48: 67-71.
- 8) Croci L., Suffredini E. "Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici" (2003). *Ann. Ist. Super. Sanità*; 39(1): 35-45.
- 9) Douglas A.W., Sobsey M.D. "Method for recovery of enteric viruses from estuarine sediments with chaotropic agents". (1983). *Appl. Environ. Microbiol.*: 379-385.
- 10) Donati G., De Angelis S. "Operazioni di movimentazione dei fondali marini. Possibili implicazioni sanitarie". (2003). *Ann. Ist. Super. Sanità*; 39(1): 11-14.
- 11) Ferrari M., Losio M.N., Bertasi B., Pinoni C., Cosciali E., Boni P., Pavoni E., Rubini S. "Il ruolo degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali nel controllo del rischio microbiologico e tossicologico associato ai prodotti della pesca" (2003). *Ann. Ist. Super. Sanità*, 39: 97-104.
- 12) Gantzer C., Schwartzbrod L. "Enteroviruses: occurrence and persistence in the environment" (2002). *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, 2338-2348. Wiley and Sons Publ., New York

- 13) Gilgen M., Germann D., Lüthy J., Hübner Ph "Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples" (1997). *Int. J. Food Microbiol.*, 37: 189-189.
- 14) Hafliger D., Hubner P., Luthy J. "Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water" (2000). *International Journal of Food Microbiology*; 54: 123-126.
- 15) IRSA: "Metodi analitici per i fanghi" (1983). Vol.1 Quad. 64, 4: 1-3.
- 16) La Belle R.L., Gerba C.P., Goyal S.M., Melnick J.L., Cech I., Bogden G.F. "Relationship between environmental factor, bacterial indicators and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments" (1980). *J. Mol. Biol.* 55:588-596.
- 17) Leclerc H., Schwartzbrod L., Dei-Cas E. "Microbial agents associated with waterborne diseases" (2002). *Crit. Rev. Microbiol.* 28(4): 371-409.
- 18) Le Guyader F., Dubois E., Menard D., Pommepuy M. "Detection of hepatitis A virus, Rotavirus and Enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR" (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3665-71.
- 19) Le Guyader F.S., Bon F., De Medici D., Parnaudeau S., Bertone A., Crudeli S., Doyle A., Zidane M., Suffredini E., Kohli E., Maddalo F., Monini M., Gallay A., Pommepuy M., Pothier P., Ruggeri F.M. "Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption" (2006). *J. Clin. Microbiol.*; 44:3878-3882.
- 20) Lopman B.A. Reacher M.H., Van Duynhoven Y., Hanon F.X., Brown D., Koopmans M. "Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000" (2003). *Emerg Infect Dis.* 9:90-96.
- 21) Pianetti A., Citterio B., Sabatini L., Pierfelici L., Colantoni P., Bruscolini F. "Techniques for recovery of enteric viruses from artificially contaminated marine sediments" (2007). *Ig Sanità Pubbl.*; 63(4): 419-31.
- 22) Prato R., Lopalco P.L., Chironna M., Barbuti G., Germinario C., Quarto M. "Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in south Italy" (2004). *BMC Infect Dis*; 4:37.
- 23) Rapporti ISTISAN. Ottaviani M., Bonadonna L. "Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano". 00/14 Pt.2: 309-327.
- 24) Rao V.C., Seidel K.M., Goyal S.M., Metcalf T.G., Melnick J.L. "Isolation of enteroviruses from water, suspended solids and sediments from Galveston Bay: survival of Poliovirus and Rotavirus adsorbed to sediments". (1984) *Appl. Environ. Microbiol.*; 48: 404-409.
- 25) Rizzo C., Di Bartolo I., Santantonio M., Coscia M.F., Monno R., De Vito D., Ruggeri F.M., Rizzo G. "Epidemiological and virological investigation of a Norovirus outbreak in a resort in Puglia, Italy" (2007). *BMC Infect Dis.* 19; 7:135.
- 26) Shioh-Chuan T., Ellender R.D., Johnson R.A., Howell F.G. "Elution of viruses from coastal sediments" (1983). *Appl. Environ. Microbiol.*: 797-804.
- 27) Smith E.M., Gerba C.P., Melnick J.L. "Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment" (1978). *Appl. Environ. Microbiol.* 35(4): 685-689.
- 28) Tsai S.C., Ellender R.D., Johnson R.A., Howell F.G. "Elution of viruses from coastal sediments" (1983). *Appl. Environ. Microbiol.*; 46(4): 797-804.
- 29) Wait D.A., Sobsey M.D. "Method for recovery of enteric viruses from estuarine sediments with chaotropic agents" (1983). *Appl. Environ. Microbiol.*; 46: 379-385.
- 30) Wyn-Jones A.P., Sellwood J. "Enteric viruses in the aquatic environment" (2001). *J. Appl. Microbiol.* 91:945-962.



UNIVERSITÀ DI MILANO

CORSO DI PERFEZIONAMENTO in:  
PROFESSIONE BIOLOGO (I Edizione)

Coordinatore:

Prof.ssa Daniela Candia (daniela.candia@unimi.it)

Referente:

Dott.ssa Mariaelvina Sala (mariaelvina.sala@unimi.it)

**Obiettivi:** Per il primo anno viene istituito nell'ambito della Facoltà di SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI un Corso di perfezionamento POST-Lauream denominato PROFESSIONE BIOLOGO JUNIOR (rivolto ai laureati in lauree triennali) e un Corso di perfezionamento PROFESSIONE BIOLOGO (rivolto ai laureati in lauree magistrali) allo scopo di fornire una corretta e completa informazione ai laureati delle Classi interessate sia per quanto riguarda la preparazione richiesta per affrontare l'Esame di Stato sia per l'effettivo esercizio della professione di Biologo. Un ulteriore obiettivo del Corso è quello di rendere la figura professionale del Biologo in misura sempre maggiore funzionale alle richieste del mondo del lavoro anche sulla base dell'entrata in vigore di specifiche normative europee.

**Requisiti di Ammissione:** Il Corso di perfezionamento Professione Biologo Junior è riservato a studenti laureati in Scienze Biologiche (Classe 13), Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e la Natura (Classe 27), Biotecnologie (Classe 1); il Corso di perfezionamento Professione Biologo è riservato a studenti laureati in Biologia (CLASSE 6/S o Classe LM-6), Biotecnologie Agrarie (classe 7/S), Biotecnologie Industriali (classe 8/S) Biotecnologie mediche, veterinarie e farmaceutiche (classe 9/S), Scienze della Nutrizione Umana (classe 69/S), Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il Territorio (classe 82/S).

**Sede e organizzazione:** La sede del Corso è presso i DIPARTIMENTI BIOLOGICI, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO, VIA CELORIA 26, 20133 MILANO. Le attività didattiche inizieranno il 21 aprile 2009 per concludersi entro il 28 maggio 2009. Il percorso formativo prevede un totale di 32 ore e 50 ore rispettivamente. Ogni settimana si terranno 2 lezioni di 3 ore ciascuna dalla 14:30 alle 17.30, il martedì e il giovedì. Per ulteriori informazioni consultare i siti dell'Università; (<http://www.unimi.it/studenti/corsiperf/>), del Consiglio di Coordinamento Didattico di S. Biologiche (<http://www.cdbiol.unimi.it/it/index.html>), del Collegio Biologi Università Italiana (<http://www.cbui.unimi.it/>) o contattare la segreteria del Consiglio di Coordinamento Didattico di Scienze Biologiche (cl.biol@unimi.it). Gli interessati dovranno far pervenire domanda di iscrizione corredata di curriculum entro la data stabilita (si veda all'indirizzo: <http://www.unimi.it/studenti/corsiperf/>).