

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI NOROVIRUS GIV ED ALTRI VIRUS ENTERICI IN MOLLUSCHI BIVALVI : UNO STUDIO PRELIMINARE



La Rosa G. (1); Fratini* M. (1); Spuri Vennarucci V. (1); Guercio , A. (2);
Purpari, G. (2) e Muscillo, M.(1)

(1) Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità,
Roma

(2) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

INTRODUZIONE

- I reflui urbani trasportano una grande quantità di patogeni responsabili di infezioni oro-fecali.
- Per alcuni patogeni (virus, protozoi ed elminti), i trattamenti di tipo convenzionale dei reflui urbani non sono spesso sufficientemente adeguati a ridurre in modo significativo le concentrazioni



gli effluenti trattati possono contaminare le acque superficiali, incluse quelle marine

INTRODUZIONE

Virus enterici nei reflui fognari e negli effluenti trattati

- ADENOVIRUS
- ENTEROVIRUS
- NOROVIRUS
- VIRUS DELL'EPATITE E

ANN IST SUPER SANITÀ 2010 | VOL. 46, No. 3: 266-273
DOI: 10.4415/ANN_10_03_07

Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy

Giuseppina La Rosa, Manoochehr Pourshaban, Marcello Iaconelli and Michele Muscillo
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,

Quantification of Norovirus Genogroups I and II in Environmental and Clinical Samples Using TaqMan Real-Time RT-PCR

Giuseppina La Rosa · Manoochehr Pourshaban ·
Marcello Iaconelli · Michele Muscillo

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 2010, p.
0099-2240/10/\$12.00 doi:10.1128/AEM.00336-10
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Molecular Detection of Hepatitis E Virus in Sewage Samples[▽]

Giuseppina La Rosa,* Manoochehr Pourshaban, Marcello Iaconelli,
Valentina Spuri Vennarucci, and Michele Muscillo

Istituto Superiore di Sanità, Department of Environment and Primary Prevention, Rome, Italy

Detection and molecular characterization of noroviruses from five sewage treatment plants in central Italy

G. La Rosa*, M. Iaconelli, M. Pourshaban, M. Muscillo

Istituto Superiore di Sanità, Department of Environment and Primary Prevention, Viale Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy

Food Environ Virol (2009) 1:15–22

INTRODUZIONE

Virus enterici nei corpi idrici superficiali (acque di fiume, acque di mare)

Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters

A. Peter Wyn-Jones^{a,*}, Annalaura Carducci^b, Nigel Cook^c, Martin D'Agostino^c, Maurizio Divizia^d, Jens Fleischer^e, Christophe Ganon^f, Rosina Girones^h, Christiane Höllerⁱ, Ana Maria de Iwona Kozyra^k, Juan López-Pila^l, Michele Muscillo^m, George Papageorgiou^o, Saskia Rutjes^j, Jane Sellwoodⁿ

Food Environ Virol (2009) 1:15–22
DOI 10.1007/s12560-008-9002-5

ORIGINAL PAPER

Quantification of Norovirus Genogroups I and II in Environmental and Clinical Samples Using TaqMan Real-Time RT-PCR

Giuseppina La Rosa · Manoochehr Pourshaban · Marcello Iaconelli · Michele Muscillo

Food Environ Virol (2010) 2:101–109
DOI 10.1007/s12560-010-9035-4

ORIGINAL PAPER

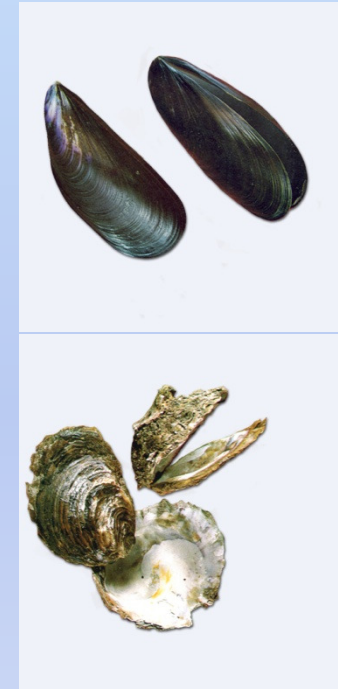
Quantification of Human Adenoviruses in European Recreational Waters

Sílvia Bofill-Mas · Byron Calgua · Pilar Clemente-Casares · Giuseppina La Rosa · Marcello Iaconelli · Michele Muscillo · Saskia Rutjes · Ana Maria de Roda Husman · Andreas Grunert · Ingeburg Gräber · Marco Verani · Annalaura Carducci · Miquel Calvo · Peter Wyn-Jones · Rosina Girones

INTRODUZIONE

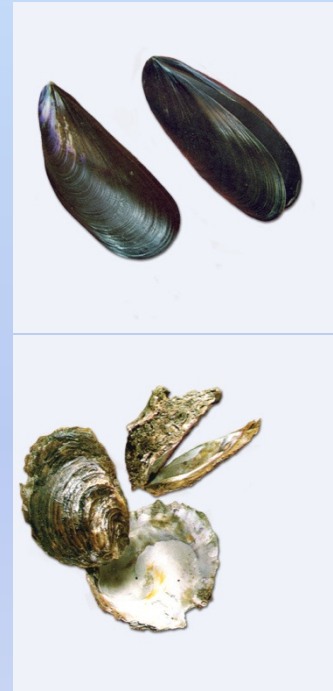
Le condizioni igienico-sanitarie delle acque si riflettono su quelle degli organismi acquatici che in esse vivono o vi sono allevati, come i **molluschi eduli lamellibranchi**

- si nutrono filtrando grandi quantità di acqua, a seconda delle dimensioni e della specie
- concentrano nel loro organismo batteri e virus eventualmente presenti nell'ambiente
- implicati da sempre nella trasmissione di malattie gastroenteriche di diversa gravità



INTRODUZIONE

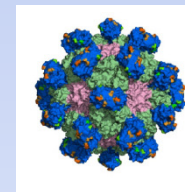
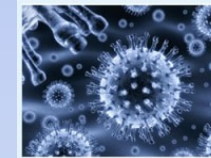
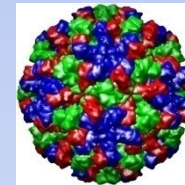
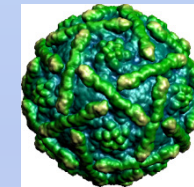
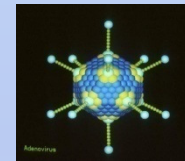
- al momento attuale non è prevista nessuna regolamentazione nei confronti delle contaminazioni virali in molluschi eduli lamellibranchi
- accertata l'assoluta **assenza di correlazione** tra contaminazione virale e batterica.



OBIETTIVI

Valutare la contaminazione virale di sei diversi gruppi di virus enterici in molluschi eduli lamellibranchi.

- adenovirus (specie A-F)
- norovirus (genogruppi I, II e GIV)
- virus dell'epatite E (genotipi 1 e 3)
- virus dell'epatite A
- enterovirus
- astrovirus

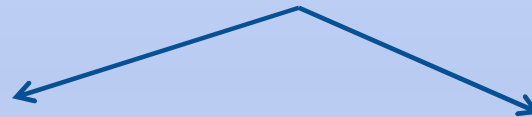


METODI

Campioni (mitili, vongole) raccolti nel corso di controlli ufficiali dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (mitilicoltura, mercato ittico, negozi surgelati, ristoranti)

Prelievo dell'epatopancreas da campioni di molluschi bivalvi

2 metodi di estrazione e concentrazione dei virus: utilizzo della proteinasi K e glicina/PEG



Estrazione genoma virale mediante silice magnetica (NucliSens MiniMAG, BioMerieux)


Colture cellulari su:
FRhk-4
A549
BGM

Panel di test molecolari (nested/PCR) per i 6 gruppi virali; sequenziamento genico



Controllo di processo: calicivirus
feino

METODI MOLECOLARI

- adenovirus (specie A-F)
 - norovirus (genogruppi I, II e GIV)
 - virus dell'epatite E (genotipi 1 e 3)
 - virus dell'epatite A
 - enterovirus
 - astrovirus
1. Per tutti i gruppi virali **un test “broad range”**
 2. Per adenovirus, norovirus e virus dell'epatite E, **test specifici** in diverse regioni genomiche
- 
- 14 diverse PCR per campione


RISULTATI: PCR

- 16/18 campioni positivi
- identificate 4 classi di virus enterici:
 - norovirus
 - adenovirus
 - enterovirus
 - virus dell'epatite A
- presenza di più gruppi virali nello stesso campione (fino a 4)
- tutti gli amplificati sequenziati; sequenze depositate in GeneBank

RISULTATI:PCR


Norovirus:

Genograppo II: GII.4 (N=9)  prevalenza del GII in
concordanza con studi similari

Genograppo IV: GIV.1 (N=1)  Identificato per la prima volta
in campioni di molluschi

- Identificato in zona di allevamento
- sequenza 100% omologia con campioni identificati in acque reflue in Italia
- presenza contemporanea di NoV GII.4, HAV, ed enterovirus

Adenovirus:

Specie C: sierotipi 1 (N=5) e 2 (N=1)  trasmissione
alimentare?

RISULTATI:PCR

Enterovirus:

echovirus 7 (N=3)  meno comuni rispetto agli altri virus enterici

Epatite A:



prevalenti insieme ai norovirus

Epatite A (N=8)

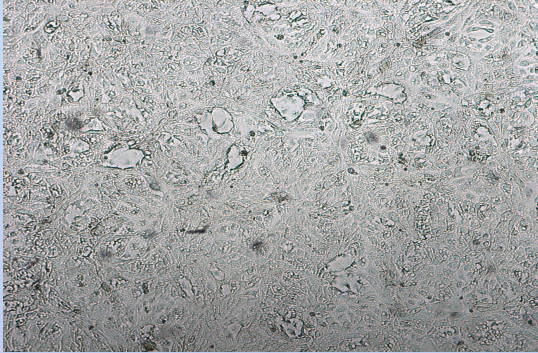
Nessuna positività per astrovirus e virus dell'epatite E

RISULTATI: COLTURE

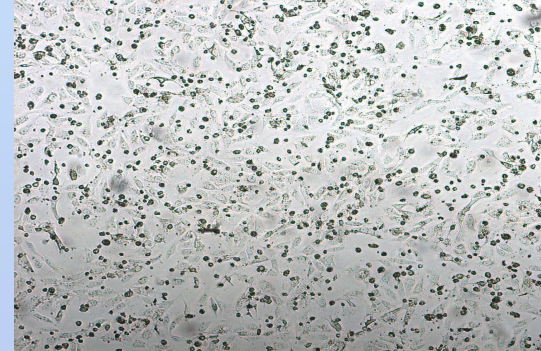
Colture cellulari: assenza di isolamento

- presenza di genomi virali ma NON particelle infettanti
- scarsa sensibilità del sistema cellulare
- ridotto N° di campioni
- caratteristiche dei campioni
 - campionamento
 - trasporto
 - conservazione

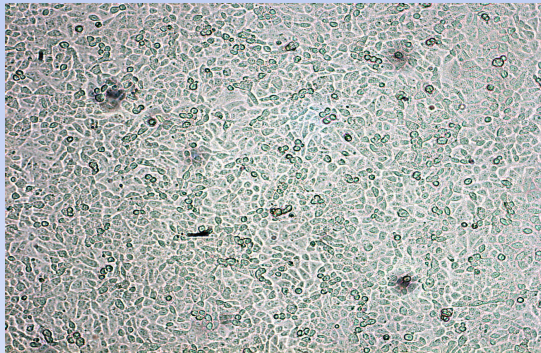
Monostrato confluyente di FRhK-4



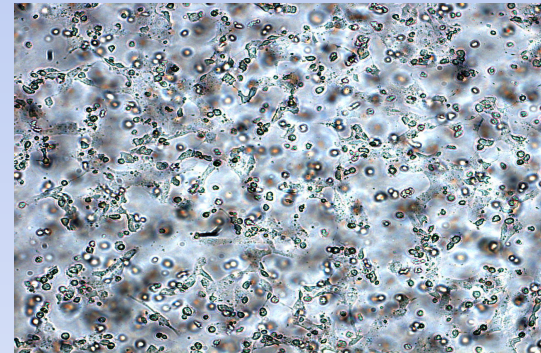
Effetto citopatico da HAV su FRhK-4



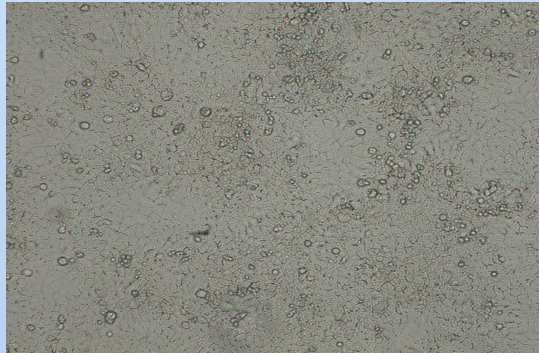
Monostrato confluyente di BGM



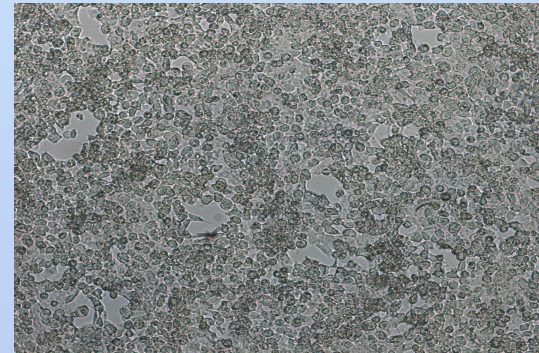
Effetto citopatico da Echovirus 30 su BGM



Monostrato confluyente di A549



Effetto citopatico da Adenovirus 2 su A549



CONCLUSIONI

- Approfondita analisi virologica su molluschi eduli lamellibranchi
- Considerevole contaminazione da virus enterici (fino a 4 gruppi nello stesso campione)
- Prima identificazione del genogruppo IV di norovirus
- Presenza di adenovirus (anche sierotipi non tipicamente enterici)
- Utilizzo di parametri virologici per un corretto giudizio di classificazione di aree e di rischi per il consumatore.