



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO
DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE
DIPARTIMENTO DI BIOPATOLOGIA E BIOTECNOLOGIE MEDICHE

INDIRIZZO “ALIMENTAZIONE E NUTRIZIONE UMANA”
Settore Scientifico Disciplinare MED/07

**VALUTAZIONE DELLA PREVALENZA DI *NOROVIRUS*
E VIRUS DELL'EPATITE A (HAV) NEI MOLLUSCHI
EDULI LAMELLIBRANCHI IN SICILIA, STRATEGIE
DI CONTROLLO E COMUNICAZIONE DEL RISCHIO**

IL DOTTORE
DR.SSA GIUSEPPA PURPARI

IL REFERENTE DELL'INDIRIZZO
PROF.SSA CATERINA MAMMINA

IL TUTOR
PROF. GIOVANNI MAURIZIO GIAMMANCO

CICLO XXVI
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2016

A mio padre

Se non puoi essere una via maestra, sii un sentiero.

Se non puoi essere il sole, sii una stella.

Sii sempre il meglio di ciò che sei

Martin Luther King

RINGRAZIAMENTI

Avrei voluto cogliere l'occasione per ringraziare coloro che ho sempre sentito importanti nel mio percorso di studi e di vita, ma purtroppo non ci sono più. Sono comunque certa che hanno compreso la mia riconoscenza ed il mio affetto, così mi basta volgere in alto un sorriso. A volte però i figli raccolgono l'eredità dei padri.

Ringrazio quindi Francesco per la preziosa amicizia ed affettuosità fraterna, che hanno dato conferma e certezza ai miei pensieri. Grazie a Caterina per essere stata disponibile a dirimere i miei dubbi e a sminuire le mie paure, comprendendo i momenti difficili che mi hanno accompagnato nell'ultimo anno. La ringrazio ancor più per aver mantenuto la professionalità ed il senso del dovere che la contraddistinguono anche quando poteva aver ben altro a cui pensare.

Un grazie a Giovanni per i suoi consigli ed il suo sostegno e per avermi supportato/sopportato negli ultimi tempi.

Ringrazio infinitamente Pina, che più che una collega è stata un'amica, alla quale mi sento estremamente affine sin da quando ci siamo conosciute.

Ringrazio mia madre per avermi dato delle nozioni che hanno guidato inconsciamente le mie decisioni con consapevolezza e caparbietà. Ringrazio mio padre per esserci sempre stato. Ringrazio la mia famiglia: Stefano, Davide ed Andrea per esserci. Va a loro tutta la mia riconoscenza.

Grazie anche a coloro con cui condivido gran parte della mia giornata, la mia seconda famiglia, che come tutte le famiglie è estremamente eterogenea e caotica, ma a volte può anche essere complicità e sostegno.

Infine, un semplice ma sentito grazie a tutti coloro che non ho menzionato ma che mi hanno accompagnato e mi accompagnano in questo cammino chiamato esistenza regalandomi la loro presenza.

INDICE

1. Capitolo 1 - INTRODUZIONE	5
1.1 <i>I Molluschi Bivalvi</i>	6
1.2 <i>I virus enterici nell'ambiente</i>	11
1.3 <i>Aspetti normativi</i>	18
1.4 <i>Il Virus dell'Epatite A (HAV)</i>	24
1.5 <i>I Norovirus</i>	38
1.6 <i>Gli Enterovirus</i>	49
1.7 <i>Il Virus dell'Epatite E (HEV)</i>	55
1.8 <i>Gli Adenovirus</i>	66
2. Capitolo 2 - OBIETTIVI DELLA TESI	81
3. Capitolo 3 - MATERIALI E METODI	85
3.1 <i>Reperimento e Preparazione di Linee Cellulari permissive</i>	86
3.2 <i>Reperimento e Preparazione degli stock di Virus di Riferimento</i>	89
3.3 <i>Preparazione di Controlli Positivi</i>	91
APPENDICE A	93
APPENDICE B	94
APPENDICE C	95
APPENDICE D	96
3.4 <i>Individuazione dei CDM e CSM della Regione Sicilia</i>	97
3.5 <i>Protocolli di Estrazione/Concentrazione dei Virus dal Campione</i>	101
3.5.1 <i>Campioni di MEL: Metodo Glicina-PEG₈₀₀₀ (Metodo A)</i>	103
3.5.2 <i>Campioni di MEL: Metodo Proteinasi K (Metodo B)</i>	106
3.5.3 <i>Campioni di Acque</i>	107
APPENDICE E	112
3.6 <i>Metodologie di Estrazione Genomica</i>	117
3.6.1 <i>Colonnine di affinità: QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)</i>	118
3.6.2 <i>Colonnine di affinità: DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (QIAGEN)</i>	125
3.6.3 <i>Estrazione magnetica: NucliSENS Magnetic Extraction Kit</i> <i>(BioMérieux)</i>	128
3.7 <i>Metodi Biomolecolari</i>	135

3.7.1	<i>Semi-Nested RT-PCR per la ricerca dell'HAV (Metodo A)</i>	136
	APPENDICE F	145
	APPENDICE G	151
	APPENDICE H	153
	APPENDICE I	154
3.7.2	<i>Real Time RT-PCR per la ricerca dell'HAV</i>	155
	APPENDICE J	165
	APPENDICE K	166
	APPENDICE L	170
	APPENDICE M	172
3.7.3	<i>RT-PCR Booster per la ricerca dei NoVs</i>	173
	APPENDICE N	182
	APPENDICE O	188
	APPENDICE P	190
3.7.4	<i>Real Time RT-PCR per la ricerca del NoV GI e del NoV GII</i>	191
	APPENDICE Q	203
	APPENDICE R	209
	APPENDICE S	212
3.7.5	<i>Nested PCR per la ricerca degli Adenovirus (Metodo A)</i>	213
	APPENDICE T	220
	APPENDICE U	223
	APPENDICE V	225
3.7.6	<i>Nested RT-PCR per la ricerca dell'HAV (Metodo B)</i>	226
	APPENDICE W	234
	APPENDICE X	237
	APPENDICE Y	239
3.7.7	<i>Semi-Nested RT-PCR per la ricerca del NoV GI e del NoV GII</i> ...	240
	APPENDICE Z	251
	APPENDICE A1	256
	APPENDICE B1	258
3.7.8	<i>Nested RT-PCR per la ricerca del NoV GIV</i>	259
	APPENDICE C1	266
	APPENDICE D1	269
	APPENDICE E1	271

3.7.9	<i>Nested RT-PCR per la ricerca degli Enterovirus</i>	272
	<i>APPENDICE F1</i>	279
	<i>APPENDICE G1</i>	282
	<i>APPENDICE H1</i>	284
3.7.10	<i>Nested RT-PCR per la ricerca dell'HEV</i>	285
	<i>APPENDICE I1</i>	292
	<i>APPENDICE J1</i>	295
	<i>APPENDICE K1</i>	297
3.7.11	<i>Nested PCR per la ricerca degli Adenovirus (Metodo B)</i>	298
	<i>APPENDICE L1</i>	305
	<i>APPENDICE M1</i>	308
	<i>APPENDICE N1</i>	310
3.7.12	<i>Analisi di Sequenza</i>	311
3.8	<i>Circuiti Interlaboratorio</i>	312
3.8.1	<i>RING TEST Real Time RT-PCR per la determinazione di Norovirus (NoVs) e Virus Epatite A (HAV) nei molluschi bivalvi RT02 – 2013</i>	313
3.8.2	<i>RING TEST Real Time RT-PCR per la determinazione di Norovirus (NoVs) e Virus Epatite A (HAV) nei molluschi bivalvi RT03 – 2014</i>	316
3.8.3	<i>RING TEST Real Time RT-PCR per la determinazione di Norovirus (NoVs) e Virus Epatite A (HAV) nei molluschi bivalvi RT04 – 2015</i>	318
3.9	<i>Isolamento Virale in Colture Cellulari</i>	320
3.9.1	<i>Isolamento dell'HAV</i>	320
3.9.2	<i>Isolamento degli Enterovirus</i>	324
3.9.3	<i>Isolamento degli Adenovirus</i>	327
3.10	<i>Collezione e Analisi dei Campioni</i>	330
4.	Capitolo 4 – RISULTATI	333
4.1	<i>CDM e CSM della Regione Sicilia</i>	334
4.2	<i>Metodologie di Estrazione Genomica a Confronto</i>	337
4.3	<i>Esiti dei Circuiti Interlaboratorio</i>	342

4.3.1	<i>Esiti RING TEST Real Time RT-PCR per la determinazione di NoVs e HAV nei molluschi bivalvi RT02 – 2013</i>	342
4.3.2	<i>Esiti RING TEST Real Time RT-PCR per la determinazione di NoVs e HAV nei molluschi bivalvi RT03 – 2014</i>	349
4.3.3	<i>Esiti RING TEST Real Time RT-PCR per la determinazione di NoVs e HAV nei molluschi bivalvi RT04 – 2015</i>	354
4.4	<i>Risultati delle Analisi</i>	357
4.4.1	<i>Anno 2013</i>	357
4.4.2	<i>Anno 2014</i>	363
4.4.3	<i>Anno 2015</i>	369
4.4.4	<i>Esiti Globali (2012-2015)</i>	373
5.	Capitolo 5 - CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI	383
6.	Capitolo 6 – BIBLIOGRAFIA	399

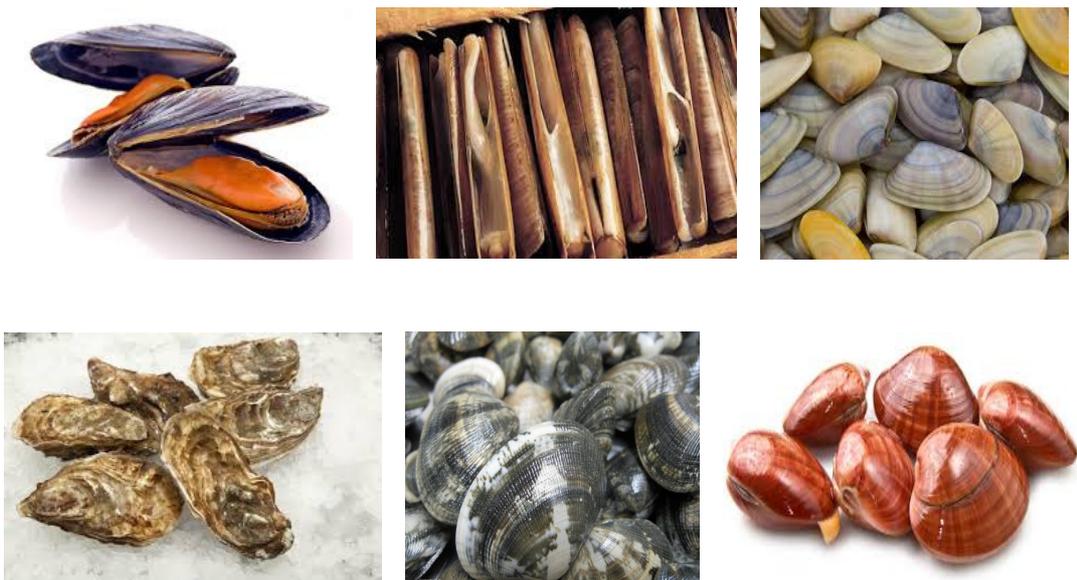
Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 I MOLLUSCHI BIVALVI

La classe zoologica dei Molluschi Bivalvi (MB) o Molluschi Eduli Lamellibranchi (MEL), assieme alle due classi di cefalopodi (calamari, seppie e polpi) e gasteropodi (murici e lumachine di mare) fa parte del Phylum dei molluschi, un gruppo vasto ed eterogeneo, costituito da migliaia di specie molto diverse le une dalle altre (*Figura 1.1*), presenti in abbondanza in diversi habitat. I Bivalvi possono popolare ambienti di acqua dolce, salmastra o acqua salata; sono commestibili solamente quelli provenienti da lagune e mare. La maggior parte delle specie vive in prossimità delle coste marine, anche se non mancano le specie abissali che si spingono fino ai 5.000 m di profondità. Molte specie sono adattate ad infossarsi più o meno profondamente in un substrato soffice (sabbioso o fangoso) o a scavare in substrati duri, nascondendosi così dai predatori ed utilizzando come alimento i detriti del fondo o particelle sospese nell'acqua; altre specie, invece, vivono sulla superficie del substrato, ancorandosi ad esso. I Molluschi hanno un forte impatto sull'ambiente in cui vivono, rappresentano infatti un importante anello della catena alimentare rivestendo, a seconda della specie, diversi ruoli dagli erbivori ai predatori.

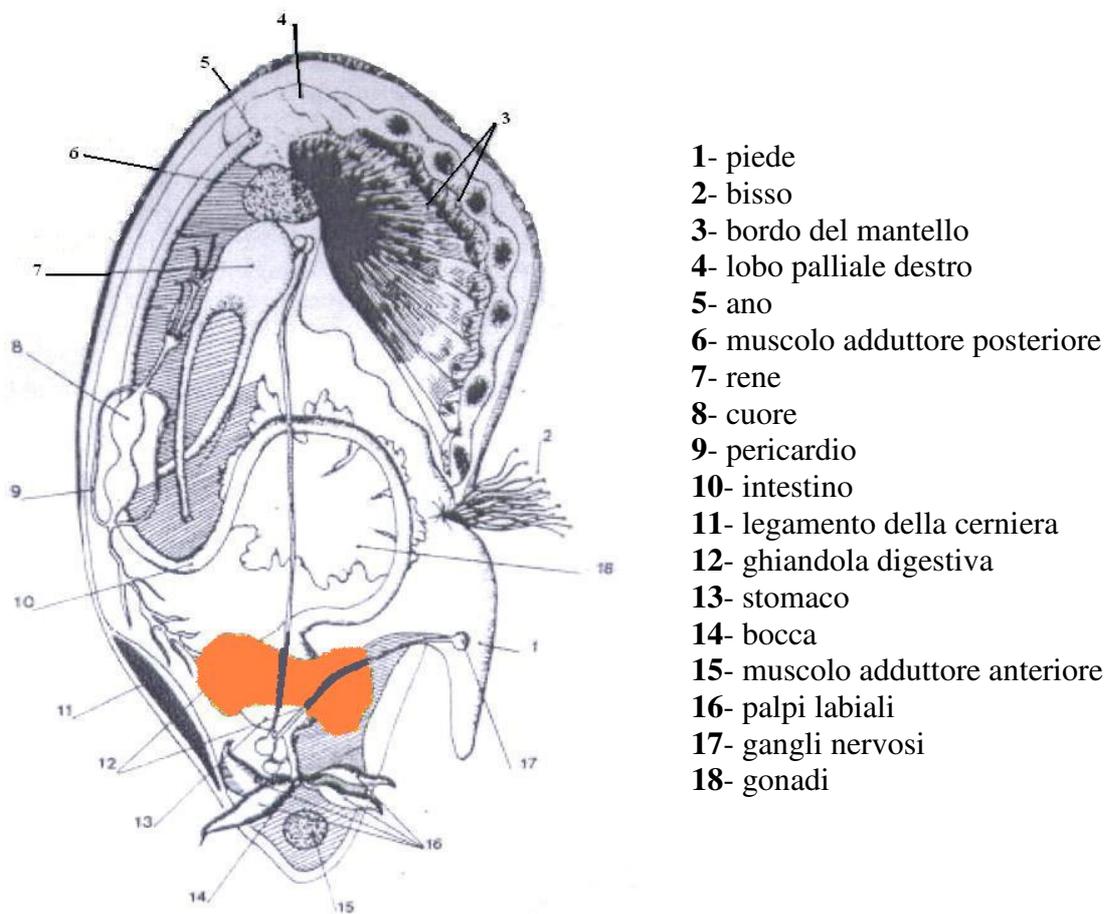
Figura 1.1. Molluschi Bivalvi



I bivalvi (*Figura 1.2*) sono caratterizzati dalla costante presenza di una conchiglia di materiale calcareo composta da due valve, da cui il nome, incernierate fra loro da denti e fossette che costituiscono la *cerniera o cardine*, posta sul *margine dorsale* ed avente funzione di articolazione. Contrapposto al margine dorsale è il *margine ventrale*. Il *margine anteriore* della conchiglia si trova in corrispondenza della bocca e il *margine posteriore* in corrispondenza dell'ano del mollusco. Le valve sono tenute aperte dal *legamento elastico*, inserito sul margine dorsale, al quale si oppongono uno o due *muscoli adduttori*, che contraendosi causano lo schiacciamento e lo stiramento del legamento determinando la chiusura delle valve. Mentre la chiusura delle valve è attiva, dovuta alla contrazione dei muscoli adduttori, l'apertura della conchiglia è determinata passivamente dal legamento elastico, per cui dopo la morte gli animali rimangono generalmente con le valve aperte. Le valve si sviluppano dall' *umbone*, area rilevata che costituisce la parte più vecchia di ciascuna valva, e racchiudono il corpo dell'animale, compreso lateralmente, privo di capo e ricoperto ai lati dai due lembi del *mantello*, una duplicatura cutanea, estesa fra il sacco dei visceri ed il piede, che aderisce alle valve ed è deputata al loro accrescimento. Il mantello lascia sulle valve l'impronta palleale, posta in posizione posteriore, che in alcune specie costituisce una vera e propria cavità (*seno o cavità palleale*). I due lembi del mantello possono essere liberi o saldati tra loro in più punti lasciando tre aperture, una mediana dalla quale sporge il piede, e due posteriori per l'entrata e l'uscita dell'acqua. Attorno alle due aperture posteriori il mantello può estendersi in due tubi detti *sifone inalante* ed *esalante*, che permettono il passaggio dell'acqua anche quando i lobi del mantello sono saldati per gran parte della loro estensione. Il *piede* è un organo muscoloso che raggiunge il suo massimo sviluppo nei bivalvi escavatori; in altre specie è invece ridotto fino a mancare del tutto. In svariati generi (ad esempio *Mytilus*), sulla linea medio-ventrale del piede si apre la ghiandola del bisso, la quale produce i filamenti del bisso, utilizzati dall'animale per ancorarsi a substrati solidi. Nello spazio delimitato dal mantello è contenuto il *liquido intravalvare*, che permette gli scambi gassosi e metabolici con l'ambiente circostante. La presenza di questo liquido permette la sopravvivenza dei molluschi al di fuori dell'ambiente marino per periodi prolungati. Immerse nel liquido intravalvare vi sono le *branchie*. di forma lamellare, che oltre alla funzione respiratoria hanno anche quella di raccolta dell'alimento. I molluschi bivalvi si nutrono, infatti, di particelle in sospensione

(sospensivori) o presenti sul fondale (detritivori), costituite da fitoplancton e da microrganismi animali vivi o morti (zooplancton). Per utilizzare questo tipo di cibo i bivalvi filtrano grandi volumi d'acqua, quantità che variano a seconda della specie, delle dimensioni e della temperatura di stabulazione del mollusco (i MEL sono in grado di filtrare da 36 litri a 436 litri d'acqua al giorno). L'acqua penetra all'interno della cavità palleale tramite il sifone inalante, passa attraverso le branchie, raggiunge lo stomaco, che è circondato dalla ghiandola digestiva, e viene espulsa all'esterno tramite il sifone esalante. Il 90% delle particelle filtrate viene trattenuto, si tratta di particelle che vanno da 1-5 μm a 400-500 μm . In tale maniera i MEL sono in grado di concentrare i contaminanti (batteri, biotossine algali, sostanze chimiche, virus) eventualmente disciolti nelle acque. L'acqua marina fornisce anche il carbonato di calcio (CaCO_3) di cui è prevalentemente composta la conchiglia.

Figura 1.2. Anatomia interna di un Bivalve



Le specie di gran lunga più allevate in Italia sono le cozze, dette anche mitili (*Mytilus galloprovincialis*), le vongole veraci (*Ruditapes philippinarum*) e i lupini (*Chamelea gallina*), seguite da specie minori come i cannolicchi, i fasolari, le ostriche concave, le telline, i canestrelli, i cuori, le cappesante e i tartufi di mare. In realtà l'originale vongola verace è la *Tapes decussatus*, presente da sempre nelle lagune venete ma in quantità modesta, fino quasi a scomparire in anni recenti, quando l'ambiente lagunare è invece risultato favorevole alla crescita della vongola importata dal Sud Est asiatico, la *Ruditapes philippinarum* (*Tapes philippinarum* o *Tapes semidecussatus*). Questa vongola, allevata in Italia da ormai trent'anni si è talmente ben acclimatata e diffusa che la nomenclatura ufficiale del prodotto commercializzato non distingue più tra verace e filippina, ma chiama entrambe vongole veraci. L'unica differenza rilevante tra le due specie è di tipo morfologico ed è facilmente valutabile guardando i due sifoni, che appaiono ben distinti nella *T. decussatus*, mentre sono parzialmente fusi tra loro nella *R. philippinarum*. Oltre al *Mytilus galloprovincialis*, la cozza comune dei nostri mari, è commercializzato in Italia anche il *Mytilus edulis*, proveniente dalle coste atlantiche.

A seconda del tipo di bivalve, si parla di pesca oppure di molluschicoltura. Mitili e vongole veraci sono allevate e si parla rispettivamente di **mitilicoltura** e di **venericoltura**, invece per quanto riguarda i lupini (*Chamelea gallina*), questi sono solamente pescati al largo con particolari pescherecci detti turbosoffianti. L'allevamento di ostriche o **ostricoltura** è prevalentemente di *Crassostrea gigas*, molto meno rappresentata è la coltivazione di *Ostrea edulis*.

La Molluschicoltura rappresenta la principale voce produttiva per quanto riguarda l'acquacoltura nazionale. Il mitilo (*Mytilus galloprovincialis*) e la vongola verace filippina (*Tapes philippinarum*) insieme costituiscono circa il 99% della produzione nazionale dichiarata di molluschi con circa 147.000 tonnellate di mitili e vongole rispetto alle 68.500 tonnellate di specie ittiche. In particolare, la mitilicoltura è caratterizzata da una produzione annua di circa 80.000-100.000 tonnellate, la venericoltura da una produzione annua di 45.000-50.000 tonnellate e l'ostricoltura da una produzione di 500 tonnellate/anno. A livello nazionale la produzione di mitili risulta essere il doppio di quella delle vongole, mentre a livello di Regioni Obiettivo 1 (Basilicata, Calabria, Campania, Molise, Puglia, Sardegna, Sicilia) costituisce la quasi totalità.

La produzione nazionale copre la richiesta interna con la sola eccezione delle ostriche concave e delle cappellette, che sono di importazione. Solo nei mesi invernali si consumano cozze di origine atlantica in quanto la produzione nazionale è attiva nei mesi da aprile a ottobre.

1.2 I VIRUS ENTERICI NELL'AMBIENTE

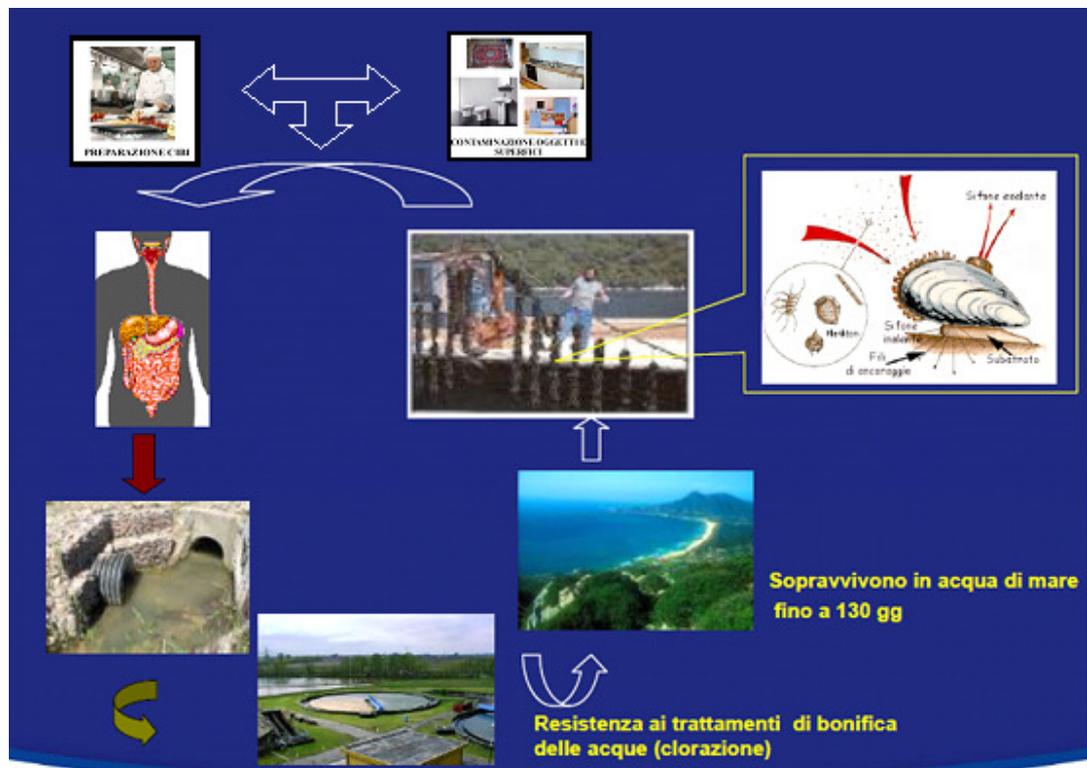
Le infezioni di origine alimentare, frequente causa di affezioni nei Paesi industrializzati, sono causate dal consumo di alimenti o bevande contaminati da diversi microrganismi. Gli agenti eziologici principalmente coinvolti nelle epidemie che si verificano a seguito di consumo di alimenti contaminati sono batteri, in particolare *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., ceppi patogeni di *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Vibrio* e virus enterici ⁽²⁹³⁾. La diffusione di “foodborne diseases” e “waterborne diseases” potrebbe essere spiegata da diversi fattori quali la globalizzazione del commercio (le nuove modalità di approvvigionamento degli alimenti fanno sì che si abbiano filiere alimentari più lunghe che in passato), le mutate abitudini alimentari, la tendenza a consumare pasti fuori casa (ristorazione collettiva), i cambiamenti ambientali (modifiche nelle nicchie ecologiche), l'aumento della popolazione a rischio (anziani e soggetti immunocompromessi). Lo studio dei dati epidemiologici sulle infezioni alimentari ha evidenziato un coinvolgimento crescente dei virus enterici, anche a seguito del miglioramento delle tecniche di analisi che permettono di attribuire a questi agenti patogeni molti episodi epidemici prima classificati ad eziologia sconosciuta. Nei primi anni '70, infatti, le gastroenteriti virali nell'uomo erano diagnosticate solo sulla base di criteri epidemiologici ⁽¹⁹⁸⁾ a causa della scarsa sensibilità e disponibilità di metodi per l'identificazione dei virus enterici che non permettevano la loro determinazione negli alimenti e talvolta neanche nei campioni fecali ⁽⁸⁾.

Il ruolo svolto dai MB nella diffusione di alcune patologie umane è ormai noto da tempo ^(73, 74). L'ambiente in cui essi vivono e crescono, la modalità di nutrizione per filtrazione ed alcune consuetudini nel consumo di tali prodotti, contribuiscono a far di loro un veicolo privilegiato di malattie batteriche e virali. Essi sono ampiamente rappresentati nella dieta del nostro paese, in particolar modo nelle zone costiere dell'Italia meridionale (Campania, Puglia), dove vengono abitualmente consumati crudi. Il consumo di MEL allevati in acque microbiologicamente non idonee costituisce il fattore di rischio più importante per la trasmissione all'uomo di patologie causate da virus enterici. I virus enterici sono microrganismi a trasmissione fecale-orale responsabili di un vasto spettro di patologie, tra cui gastroenteriti, meningiti asettiche, encefaliti, miocarditi, pericarditi e paralisi flaccide. Una delle cause primarie nella diffusione di tali virus

è rappresentata dalla contaminazione delle falde acquifere e di conseguenza delle acque potabili, irrigue nonché delle acque marine, con deiezioni di origine animale e umana (contaminazione primaria).

Inoltre, la contaminazione del cibo può avvenire in qualunque fase della filiera alimentare "dal campo alla tavola" e molte epidemie virali di origine alimentare possono essere ricondotte a cibo che si è contaminato in seguito a manipolazioni ad opera di soggetti infetti o contatto con utensili e/o superfici contaminate (contaminazione secondaria) ⁽¹²⁰⁾. La **Figura 1.3** mostra le molteplici modalità di contaminazione dei MEL ad opera dei virus enterici.

Figura 1.3. Contaminazione dei MEL con virus a trasmissione fecale-orale



Riconoscere la trasmissione alimentare dei virus enterici attraverso i dati di sorveglianza può risultare difficile per diversi motivi:

- i pazienti possono avere difficoltà a risalire ai cibi consumati prima del manifestarsi dei sintomi;
- i casi possono essere notificati gradualmente o non essere registrati;
- alcune delle persone esposte possono non riconoscere l'infezione;
- alcune delle persone esposte possono avere una preesistente immunità.

Ciò rende necessario andare a valutare l'eventuale contaminazione virale implementando il controllo degli alimenti e dell'ambiente.

Si conoscono oltre 120 virus enterici classificati in diverse specie in base alle loro caratteristiche morfologiche, chimiche, fisiche, antigeniche e genetiche ^(98, 197), ma solo pochi sono comunemente riconosciuti come importanti patogeni di origine alimentare. I virus veicolati da acqua ed alimenti che più frequentemente causano malattia sono il Virus dell'Epatite A (Famiglia: *Picornaviridae*, Genere: *Hepatovirus*) ^(48, 76, 77), i *Norovirus* (Famiglia: *Caliciviridae*), i *Sapovirus* (Famiglia: *Caliciviridae*), gli *Enterovirus* (Poliovirus, Echovirus e Coxsackievirus; Famiglia: *Picornaviridae*), i *Rotavirus* di gruppo A (Famiglia: *Reoviridae*), il Virus dell'Epatite E (Famiglia: *Hepeviridae*, Genere: *Hepevirus*), gli *Astrovirus* (Famiglia: *Astroviridae*, Genere: *Mammoastrovirus*) e gli *Adenovirus* (Famiglia: *Adenoviridae*, Genere *Mastadenovirus*), questi ultimi proposti da diversi ricercatori quale possibile indicatore di contaminazione virale di origine umana ^(159, 411).

La Direttiva 2003/99/CE, sulle misure di sorveglianza delle zoonosi, colloca i calicivirus ed il virus dell'Epatite A fra gli agenti zoonotici da porre sotto attenzione durante i controlli nelle varie fasi della filiera alimentare, in funzione della situazione epidemiologica esistente. Non è ancora prevista per legge la ricerca dei virus enterici nei bivalvi, anche se l'art.11 comma 5 lett. B del REG 853/2004 CE lascia aperta la possibilità di stabilire requisiti igienico sanitari supplementari per i MEL.

La contaminazione delle acque di superficie con liquami ha ormai assunto proporzioni allarmanti ed ha attirato l'attenzione delle autorità sanitarie competenti poiché, a causa del depauperamento delle risorse idriche, sempre più frequentemente le acque di fiumi, laghi ed addirittura del mare vengono adibite, previo trattamento, ad uso potabile. I liquami trasportano una grandissima quantità di microrganismi, molti dei quali responsabili di malattie a trasmissione fecale-orale. Oltre a batteri, quali *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* ed altri patogeni emergenti, essi veicolano anche particelle virali escrete con le feci dall'uomo e dagli animali.

La maggior parte dei virus presenta una specificità d'ospite per cui, dal punto di vista della tutela della salute pubblica, l'interesse si focalizza sui virus enterici di origine umana. Questi sono normalmente trasmessi attraverso il contagio interumano (da persona a persona) o per contatto diretto con superfici

contaminate, tuttavia vi è la possibilità che anche gli alimenti e le acque trasmettano una grande varietà di virus patogeni. Diversamente dai batteri, i virus non si moltiplicano nell'alimento né producono tossine; sono parassiti intracellulari obbligati e quindi inerti ed incapaci di replicarsi al di fuori della cellula ospite.

Le epidemie di origine alimentare possono essere associate al consumo di diversi cibi contaminati, quali insalate, cibi freddi, frutta (uva, fragole, lamponi ed altri "berries"), carne, prodotti ittici (consumati crudi o poco cotti), prodotti da forno. Particolare importanza rivestono i molluschi (in particolare ostriche e cozze) che, a causa della loro attitudine a filtrare l'acqua di mare, riescono a concentrare le particelle virali in essa presenti ^(346, 382). Ampiamente documentato è il ruolo degli alimenti nella trasmissione dell'Epatite A. Tra quelli di maggior rilievo possono essere ricordati due episodi avvenuti in America: il primo nel 1971, in cui furono coinvolte numerose persone che avevano consumato verdure crude; 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 nel territorio di Shanghai in Cina. La percentuale di episodi epidemici associata ai frutti di mare è di circa 10-20% in Paesi come gli Stati Uniti e l'Australia, ma questa percentuale aumenta al 70% nei Paesi in cui il consumo di pesce è maggiore, come il Giappone. Dal 1° gennaio 2013 al 28 febbraio 2014 sono stati notificati in Italia 1.463 casi di Epatite A (notifiche pervenute al Ministero della Salute, integrate con i dati del Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta, SEIEVA, Istituto Superiore di Sanità) fortemente correlati al consumo di frutti di bosco surgelati provenienti da Italia, Francia e Germania (è stata rilevata analogia tra le sequenze virali dei casi clinici e i virus riscontrati nei frutti di bosco). È del 4 marzo 2015 l'allerta lanciato dal Ministero della Salute per aver riscontrato, a fine febbraio dello stesso anno, il virus dell'Epatite A ed i Norovirus in mitili, sia già confezionati che nel sito di allevamento, in provincia di Napoli. Acqua di rubinetto, acqua minerale, acqua di pozzo, ghiaccio, acqua di fiume, acqua di lago, acque destinate ad usi ricreativi (mare, piscine) sono tutte possibili sorgenti di infezione ^(27, 149, 205, 206, 212, 257). Gli studi sul veicolo idrico mettono in evidenza la necessità di intensificare il sistema di sorveglianza e identificazione dei virus tramite metodiche molecolari, associate a studi di tipo epidemiologico, al fine di

ottenere una corretta valutazione del rischio sanitario legato alle acque. Inoltre, le acque infette possono contaminare all'origine frutti di mare, verdure fresche o frutti di bosco.

Nel 2011 in Sicilia, a Santo Stefano di Quisquinia (Agrigento) si è verificata una epidemia di gastroenterite da Norovirus che ha coinvolto almeno 156 soggetti, probabilmente determinata dalla contaminazione dell'acqua proveniente dall'acquedotto comunale ⁽¹³⁴⁾.

Il rischio infettivo legato alla presenza nelle acque di microrganismi patogeni è ancora molto elevato nei Paesi meno sviluppati. Nei Paesi industrializzati, invece, negli ultimi decenni è stato registrato un parziale declino delle patologie legate alla diffusione dei più tradizionali patogeni enterici, presumibilmente legato alla messa in opera di processi di trattamento e di disinfezione delle acque, alle attività di controllo della loro qualità igienico-sanitaria, così come definite dalle normative, ed alle campagne di vaccinazione. Tuttavia, nonostante i processi di potabilizzazione, nelle acque è possibile rilevare una presenza costante di flora microbica, in cui si ritrovano microrganismi caratterizzati da una maggiore capacità di sopravvivenza. È noto, infatti, che i virus non possono essere completamente eliminati dal trattamento dei reflui con i comuni metodi di potabilizzazione ^(48, 219, 238, 306, 351).

Le malattie idrotrasmesse costituiscono attualmente un problema rilevante per la salute umana, come sottolineato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), che ha pubblicato una serie di documenti quali le “*Guidelines for drinking-water quality*” ⁽⁴⁰⁶⁾, le “*Guidelines for safe recreational water environments*” ⁽⁴⁰⁴⁾, e le “*Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater*” ⁽⁴⁰⁵⁾, al fine di mettere in evidenza i rischi associati all'utilizzo delle acque a scopo potabile o ricreativo. L'elevata incidenza delle infezioni virali diffuse attraverso l'acqua è dovuta alle caratteristiche intrinseche dei virus come agenti di rischio biologico ambientale, ossia:

- escrezione di grandi quantità di patogeni da parte dei soggetti infetti (fino a 10^6 - 10^8 virioni per gr di feci);
- bassa carica infettante (dell'ordine di 1-100 unità virali, mentre per *Salmonella* occorrono dosi minime infettanti di 10^5 - 10^7 organismi) ⁽³¹⁵⁾;
- elevata resistenza ambientale e ai metodi di disinfezione;

- numerose vie di trasmissione (fecale-orale, contatto diretto, aerosol);
- elevata variabilità genetica;
- sviluppo di un'immunità a breve termine nell'ospite;
- possibilità d'infezioni asintomatiche che contribuiscono alla diffusione virale.

Recenti dati epidemiologici hanno evidenziato un aumento dell'incidenza delle epidemie idrodiffuse nei Paesi industrializzati; in particolare i NoVs sono considerati patogeni emergenti responsabili di “*waterborne disease*”. Sono state descritte epidemie di gastroenteriti legate ad acque di tipo ricreativo, in particolare acque di piscine contaminate (a causa del rilascio di materiale fecale e secrezioni oro-faringee da persone infette) e inadeguatamente disinfettate. Le epidemie idriche da NoVs (da solo o in associazione ad altri patogeni enterici) sono frequenti in tutto il mondo ⁽²¹²⁾. Nel 1998 l'*Environmental Protection Agency of America* (USEPA) ha inserito i *Norovirus* nella “*Drinking Water Contaminant Candidate List*” che elenca i principali microrganismi patogeni non soggetti a regolamentazione normativa, da monitorare per le acque potabili sulla base delle evidenze di rischi di trasmissione idrica.

I virus enterici vengono eliminati dagli individui infetti attraverso le feci, arrivano nelle acque fognarie e, essendo sovente resistenti ai normali trattamenti di depurazione e disinfezione, provocano la contaminazione delle acque marine, attraverso i fiumi e gli scarichi afferenti. La diffusione dei virus di origine animale nell'ambiente avviene spesso con gli “scarti di produzione”: letame, pollina, acque reflue degli allevamenti, dei macelli, degli stabilimenti di produzione e lavorazione degli alimenti di origine animale o con i prodotti zootecnici (bivalvi, latte, carne, uova, pellame, ecc ...).

Nell'ambiente il numero di tali particelle si riduce sensibilmente per effetto della diluizione. La riduzione della contaminazione da virus nell'ambiente marino è imputabile, oltre che all'effetto della diluizione, anche all'azione di fattori inattivanti; tra di essi esplicano attività antivirale la salinità, la temperatura, la luce solare, le sostanze tossiche (come i metalli pesanti) e l'antagonismo microbico ⁽³⁶⁰⁾. Questi fattori causano il danneggiamento del capsido e degli acidi nucleici, con conseguente incapacità del virus di infettare nuove cellule. La presenza di questi agenti in acque destinate al consumo umano o ad attività produttive o ricreative costituisce un importante problema di sanità pubblica. Teoricamente una

sola particella virale è in grado di determinare l'infezione nell'uomo, anche se poi lo sviluppo della malattia clinica dipende da numerosi altri fattori come lo stato immunitario, l'età dell'ospite, la virulenza del microrganismo ed il tipo di virus.

D'altra parte, esistono dei fattori che possono esercitare un'azione protettiva nei confronti delle particelle virali. Due fenomeni in particolare sembrano svolgere un ruolo predominante nel garantire la persistenza e la diffusione di questi microrganismi nell'ambiente:

- l'aggregazione, che corrisponde alla formazione di raggruppamenti, sia nelle cellule ospiti che dopo lisi cellulare, di 2-10 unità virali chiamati Clumps; questo fenomeno garantisce una maggiore resistenza delle singole particelle alle condizioni ambientali avverse;
- il potenziale di adsorbimento a materiali particolati organici ed inorganici, come particelle argillose, silicati, batteri, cellule algali, che aumenta i tempi di sopravvivenza dei virus nelle acque e nei sedimenti (un reale reservoir dei virus), spesso grazie alla creazione di una vera e propria barriera fisica. Così protette le particelle virali riescono a sopravvivere per lunghi periodi nell'ambiente marino e possono essere rinvenute anche lontano rispetto ai punti di scarico, in relazione alle correnti marine incontrate.

La sopravvivenza dei virus patogeni per l'uomo al di fuori delle cellule ospiti è di giorni o addirittura mesi: in letteratura vengono riportati tempi di sopravvivenza virale di 2-168 gg in acqua di rubinetto, 2-130 gg in acqua di mare, 25-125 gg nel suolo e fino a 190 gg nei MEL. I virus che giungono al mare attraverso le feci vengono concentrati negli organismi filtratori e il corpo dei MEL esercita su di essi un effetto protettivo.

1.3 ASPETTI NORMATIVI

Dal punto di vista legislativo è importante differenziare il settore della molluschicoltura da quello degli altri prodotti della pesca per le sue peculiarità e per l'importanza che riveste in ambito sanitario.

I MEL, come è noto, sono in grado di filtrare oltre 400 litri d'acqua al giorno e per questo sono esposti al rischio di accumulo di inquinanti biologici e chimici, sono infatti capaci di concentrare nelle proprie carni da 100 a 200 volte il contenuto microbico e virale sospeso nell'acqua ⁽³³⁷⁾. Dalla difficoltà di utilizzare di routine tecniche finalizzate alla ricerca di tutti i possibili microrganismi patogeni, è sorta la necessità di ricercare organismi indice di contaminazione, la cui presenza possa essere indicatore della presenza dei patogeni ⁽³⁸⁵⁾. Nella Unione Europea, le direttive che regolamentano la commercializzazione dei molluschi indicano solamente i parametri fisici, chimici e batteriologici per determinarne l'adeguatezza alla vendita. Attualmente il controllo della contaminazione microbiologica viene effettuato mediante il rilevamento di batteri, considerati indicatori di contaminazione fecale (*Escherichia coli*), ma non sempre esiste una diretta correlazione tra presenza di virus e presenza di batteri indicatori ^(221, 222). Anzi è probabile che in acque ad elevata contaminazione batteriologica il reperimento di virus sia molto scarso, forse a causa dell'azione inattivante dei metaboliti batterici. Quindi MEL stabulati in acque batteriologicamente pulite potrebbero essere più esposti alla contaminazione virale. Lavori condotti di recente in Italia hanno, infatti, messo in evidenza la presenza di Norovirus in molluschi provenienti da allevamenti siti in aree di classe A ⁽³¹¹⁾, confermando che l'assenza di batteri non esclude una contaminazione di natura virale, pertanto i batteri fecali non possono essere considerati indicatori affidabili per i virus nei MEL.

Sono stati ampiamente definiti i requisiti di un organismo indicatore: deve essere simile al patogeno per ecologia, sopravvivenza, stabilità e caratteristiche di crescita; deve possedere caratteristiche biochimiche ben definite ed identificabili; deve essere presente nell'alimento in quantità tale da non costituire problemi per la ricerca; deve avere un metodo per la determinazione e/o quantificazione facile, rapido, economico, sensibile, validato, non pericoloso per la salute dell'operatore e che dia risultati applicabili al processo produttivo monitorato; deve esistere

corrispondenza fra la concentrazione dell'indicatore e il livello di pericolosità del patogeno correlato ⁽⁴³⁾.

Per tale motivo vi è un crescente interesse verso indicatori virali di contaminazione fecale umana delle acque. Tra di essi, possibili candidati sono ^(62, 65, 156, 221, 242, 310, 352, 357, 411).

- i batteriofagi F+, che condividono con i virus enterici umani alcune caratteristiche fisiche e genomiche ⁽¹⁵⁵⁾; tuttavia non presenti esclusivamente nelle emissioni umane ⁽¹⁹⁸⁾;
- i batteriofagi del batterio anaerobio asporigeno *Bacteroides fragilis* ⁽³⁷⁹⁾;
- i batteriofagi dei coliformi ⁽¹⁶⁵⁾, tuttavia non presenti esclusivamente nelle emissioni umane;
- i virus enterici umani più frequenti nelle acque contaminate, tra cui gli *Enterovirus*; sebbene la loro rilevazione comporti spesso difficoltà e costi tali da indurre i ricercatori ad abbandonare tale approccio;
- gli *Adenovirus* umani, i quali costituiscono un indice specifico di contaminazione virale di origine umana e sono ad elevata diffusione nell'ambiente ⁽³¹⁶⁾, nei liquami si presentano in maggiori concentrazioni rispetto ad altri virus enterici, inclusi i *Norovirus* e gli *Enterovirus* ^(172, 200, 216).

In Italia la produzione e commercializzazione di molluschi bivalvi vivi (MBV) destinati al consumo umano sono ampiamente disciplinate per quanto riguarda i parametri chimici e batteriologici, ma non è ancora adeguatamente definita e regolamentata la ricerca dei virus. Normative di riferimento a livello Nazionale e Regionale sono rispettivamente il Decreto del 27/12/2007 ⁽⁹⁰⁾ e il D.Lgs n. 193 del 06/11/2007 ⁽⁹⁴⁾, che recepiscono e applicano i regolamenti sulla sicurezza alimentare del Pacchetto Igiene, in vigore dal 1 gennaio 2006; tali decreti vanno ad integrare quanto disciplinato dal D.Lgs n. 530 del 30/12/1992 ⁽⁹²⁾, che stabilisce le norme igienico-sanitarie dei MEL.

Si riporta di seguito la **normativa in vigore in Italia inerente i MEL** più significativa in ambito virologico:

- Direttiva 91/492/CEE: riporta le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi (batteri, biotossine algali,

sostanze chimiche) e i requisiti che devono possedere i centri di depurazione molluschi (CDM) e i centri di spedizione molluschi (CSM) ⁽⁹⁹⁾.

- D.Lgs. n. 530/92: attuazione Direttiva 91/492/CEE ⁽⁹²⁾.
- Direttiva 2003/99/CE (Allegato I): inerente la sorveglianza delle zoonosi alimentari e degli agenti zoonotici (prende in considerazione anche la ricerca di virus, quali *calicivirus* e *Virus dell'Epatite A* in funzione della situazione epidemiologica). Modifica la decisione 90/424/CEE del Consiglio ed abroga la Direttiva 92/117/CEE del Consiglio (GU L325/31 del 12/12/2003) ⁽¹⁰⁰⁾.
- Regolamento (CE) n. 852/2004: norme di igiene dei prodotti alimentari ⁽³²⁹⁾.
- Regolamento (CE) n. 853/2004: riporta norme specifiche di igiene per gli alimenti di origine animale; l'art. 11, comma 5 lett. B lascia aperta la possibilità di stabilire requisiti igienico-sanitari supplementari (in particolare relativamente ai virus) in collaborazione con il laboratorio comunitario di riferimento permanente, comprese le procedure per le analisi virologiche e le relative norme virologiche ⁽³³⁰⁾.
- Regolamento (CE) n. 854/2004: norme per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano ⁽³³¹⁾.
- Regolamento n. 882/2004/CE: controlli ufficiali, laboratori comunitari di riferimento (anche virus) ⁽³³²⁾.
- Regolamento (CE) 2073/2005: previsione dell'inserimento della ricerca di virus patogeni (NoVs), previa standardizzazione dei metodi diagnostici ⁽³³³⁾.
- D.Lgs n. 193/2007 del 6/11/2007: attuazione della Direttiva 2004/41/CE relativa ai controlli in materia di sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore ⁽⁹⁴⁾.
- Decreto del 27/12/2007 (Recepimento delle intese tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano in materia di sicurezza alimentare. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale della Regione Sicilia (p.I) n. 4 del 25/01/2008 n.2). L'allegato E di tale decreto, relativo al settore dei molluschi, è stato predisposto per garantire un coordinamento generale della materia, per favorire l'applicazione uniforme dei regolamenti di igiene a livello nazionale e per facilitare il lavoro operativo introdotto con la nuova regolamentazione comunitaria ⁽⁹⁰⁾.

- Regolamento (UE) 2015/2285: modifica l'allegato II del Regolamento (CE) n. 854/2004 e l'allegato I del Regolamento (CE) 2073/2005⁽³³⁴⁾.

I regolamenti comunitari, in particolare il (CE) n. 852/2004 (igiene dei prodotti alimentari)⁽³²⁹⁾ e il (CE) n. 853/2004 (igiene per gli alimenti di origine animale)⁽³³⁰⁾, introducono alcune nozioni di carattere teorico-pratico riguardo il trasferimento della responsabilità primaria in materia di sicurezza alimentare a carico del produttore, a tutela della protezione della salute del consumatore. La prassi formale dei controlli è di tipo preventivo e viene applicata in tutte le fasi della produzione, trasformazione e distribuzione dei prodotti attraverso il piano di autocontrollo che si avvale del sistema di analisi dei rischi e di controllo dei punti critici (HACCP). Il regolamento (CE) n. 852/2004 ha esteso il controllo igienico-sanitario degli alimenti anche alla produzione primaria e pertanto i MBV vengono ad essere disciplinati lungo tutta la filiera alimentare fino al consumatore finale. Il regolamento (CE) n. 853/2004 stabilisce i requisiti in materia di igiene applicabili alla produzione, alla raccolta, al trattamento, alla stabulazione di MBV, nonché i requisiti strutturali e d'igiene per CDM e CSM.

I produttori possono raccogliere MBV provenienti soltanto da zone di produzione classificate dall'autorità competente in aree di categoria A, B o C, a seconda delle caratteristiche igienico-sanitarie date dal livello di contaminazione microbiologica di origine fecale. L'ubicazione ed i confini di tali aree sono stabiliti ai fini del controllo ufficiale dal regolamento (CE) n. 854/2004⁽³³¹⁾ e successive modifiche riportate nel Regolamento UE 2015/2285⁽³³⁴⁾.

Sono riportati in **Tabella 1.1** i requisiti principali che caratterizzano le tre aree di produzione.

Ulteriori parametri da prendere in considerazione per la classificazione delle aree di produzione sono il contenuto in salmonelle per 25 g di polpa, il contenuto in sostanze tossiche o nocive di origine naturale o immesse nell'ambiente, il tenore di nuclidi radioattivi, il tenore in biotossine algali PSP (paralytic shellfish poison), ASP (amnesic shellfish poison) e DSP (diarrhetic shellfish poison).

La riqualifica delle acque destinate alla mitilicoltura avviene con scadenza triennale.

Tabella 1.1. Livelli di *E. coli* che determinano la classificazione delle aree di raccolta dei MEL o MBV (Regolamento CE n. 854/2004 e aggiornamenti del Regolamento UE 2015/2285).

Categoria	Standard microbiologico	Trattamento richiesto
Classe A	< 230 <i>E. coli</i> per 100 g di carne e liquido intravalvare nel 80% dei campioni, il restante 20% deve essere < 700 <i>E. coli</i> per 100 g di polpa e liquido intravalvare.	I molluschi bivalvi possono andare direttamente al consumo umano.
Classe B	< 4.600 <i>E. coli</i> per 100 g di carne e liquido intravalvare nel 90% dei campioni, il restante 10% deve essere < 46.000 <i>E. coli</i> per 100 g di polpa e liquido intravalvare.	I molluschi bivalvi devono essere depurati o stabulati per avere i requisiti della classe A.
Classe C	< 46.000 <i>E. coli</i> per 100 g di carne e liquido intravalvare.	I molluschi bivalvi devono essere stabulati per almeno due mesi per avere i requisiti della classe A.
Proibita	> 60.000 coliformi fecali.	Raccolta proibita.

Solo i MEL provenienti da aree di tipo A possono essere destinati direttamente al consumo umano, mentre il prodotto di tipo B può essere destinato al consumo solo previo trattamento in idonee strutture di depurazione (CDM) o in zone marine di stabulazione preventivamente approvate come tali (zone A). I bivalvi di acque di categoria C non possono essere raccolti se non per essere trattati con il calore o con prolungati periodi di depurazione (non inferiori a due mesi in zone A). La depurazione, effettuata in centri riconosciuti dal Ministero della Salute, deve consentire ai molluschi di raggiungere i parametri precedentemente citati mediante il rilascio della contaminazione residua. I MEL devono essere messi nelle condizioni di riprendere rapidamente la nutrizione mediante filtrazione e devono mantenere intatta la loro vitalità⁽⁷⁷⁾. I MBV esitati al consumo dovranno rispettare i requisiti microbiologici previsti dai regolamenti (CE) n. 853/2004⁽³³⁰⁾ e (CE) n. 2073/2005 (criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari)⁽³³³⁾. L'avvenuta depurazione, secondo la legge, si basa su parametri fisici, chimici e batteriologici

ma la riduzione di questi parametri non assicura l'eliminazione da parte del mollusco di altri patogeni quali vibriionacee e virus enterici ⁽¹³⁹⁾.

Il principale problema, allo stato attuale, risiede nella mancanza di standardizzazione dei metodi diagnostici all'interno della Comunità Europea e dei singoli Stati. La sopravvivenza di virus enterici nei MEL è un problema esistente che è già stato preso in considerazione dalla normativa europea e conseguentemente italiana. A livello internazionale, i ricercatori stanno lavorando per individuare metodi analitici per la determinazione dei virus enterici, rapidi ed affidabili e che possano essere utilizzati per il controllo routinario dei MEL anche in laboratori periferici. Una Nota del Ministero della Salute del 20 aprile 2007 raccomanda l'applicazione di una tecnica di One-Step Real Time RT-PCR per la ricerca dei *Norovirus* ⁽³¹¹⁾. A maggio del 2013 sono state emesse le seguenti Norme ISO:

- 1) ISO/TS 15216-1:2013: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 1: Method for quantification ⁽¹⁷³⁾;
- 2) ISO/TS 15216-2:2013: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection ⁽¹⁷⁴⁾.

Anche la **legislazione sulle acque** è carente per quanto concerne i parametri virali, sebbene essi vengono citati in alcune norme:

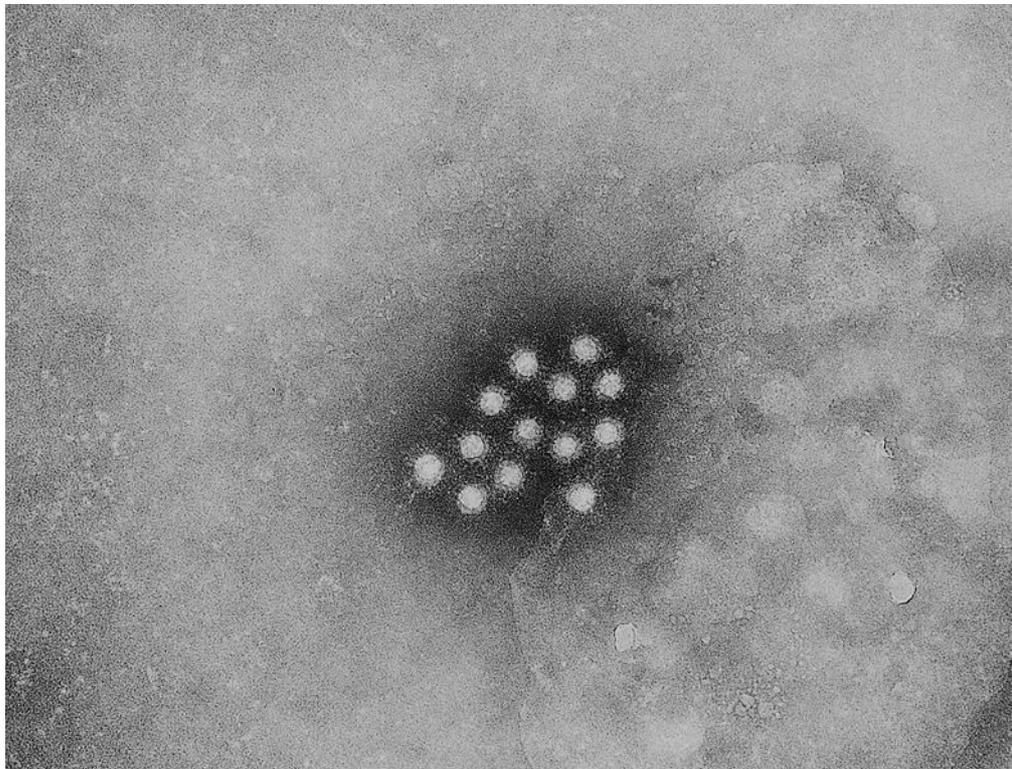
- D.Lgs n. 155 del 14/05/1988: attuazione Direttiva 76/160/CE, inerente le acque di balneazione (prevede la ricerca degli enterovirus in 10 L di campione). ⁽⁹¹⁾
- D.P.R. 236 del 24/05/1988: regola l'acqua ad uso potabile, prendendo in considerazione quali possibili parametri accessori gli enterovirus. ⁽¹⁰⁴⁾
- D.Lgs. n. 31 del 02/02/2001: attuazione Direttiva 98/83/CE, nel valutare le caratteristiche di idoneità dell'acqua potabile destinata al consumo umano, considera quali parametri accessori da ricercare gli enterovirus (in 100 L di campione). ⁽⁹³⁾

1.4 IL VIRUS DELL'EPATITE A (HAV)

1.4.1 Classificazione e struttura

Il virus dell'Epatite A appartiene alla famiglia dei *Picornaviridae*, che comprende 8 generi responsabili di infezioni enteriche, *Aphthovirus*, *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Parechovirus*, e *Teschovirus*. Numerosi fattori, quali alcune fasi del processamento della poliproteina virale, la morfogenesi del virione e l'interazione con la cellula ospite ⁽²⁵³⁾, hanno portato a classificare l'HAV, precedentemente classificato come enterovirus 72, in un genere a parte, *Hepatovirus* ⁽¹²⁵⁾. La particella virale (**Figura 1.4**) è priva di envelope, ha un diametro di 27 nm e un capsidico a simmetria icosaedrica contenente un genoma ad RNA a singola elica a polarità positiva ⁽²⁸⁾.

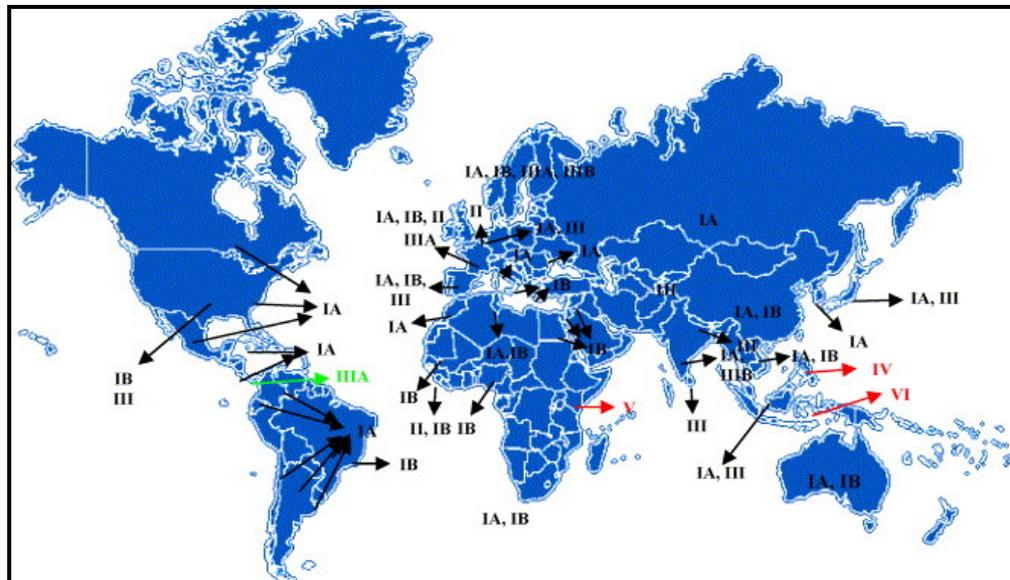
Figura 1.4. Struttura dell'HAV al microscopio elettronico
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hepatitis_A_virus_01.jpg)



Analisi filogenetiche, effettuate sull'intera sequenza di 900 nucleotidi del gene VP1 del virus, hanno portato a riconoscere 6 differenti genotipi di HAV

⁽⁷²⁾, quattro isolati dall'uomo (I, II, III, VII) ^(56, 294) e tre dalla scimmia (IV, V, VI) ⁽⁷⁰⁾, che presentano differenti distribuzioni geografiche ⁽²⁸⁷⁾. I genotipi umani I, II e III si differenziano in 6 sub-genotipi: IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB. Il genotipo I è quello predominante (80%) in tutto il Mondo ed il sub-genotipo IA è più comune dell'IB; entrambi sono stati più frequentemente riscontrati in Nord e Sud America, Europa, Cina e Giappone ^(68, 339, 395). La co-circolazione di genotipi e sub-genotipi (**Figura 1.5**) è stata riscontrata in diverse regioni del mondo, come ad esempio: IA e IB in Sud Africa ⁽³⁸⁰⁾, Brasile ^(394, 395) e Francia ⁽⁶⁹⁾; IA e IIIA in India ⁽¹⁶⁶⁾.

Figura 1.5. Distribuzione geografica dei genotipi di HAV



I genotipi isolati dall'uomo sono indicati in nero, quelli isolati dalla scimmia in rosso. Il ceppo PA21 (genotype IIIA), isolato dalle Panamanian Owl monkeys è indicato in verde.

L'HAV presenta delle differenze significative nella sua struttura rispetto agli altri membri della famiglia *Picornaviridae*; in particolare:

- il sito di legame ai recettori cellulari non presenta una struttura a “canyon” ben definita ⁽²⁵⁴⁾;
- le sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche sono molto differenti da quelle degli altri *Picornavirus* e così pure i pesi molecolari e le funzioni di alcune proteine;

- si adatta difficilmente a crescere in colture cellulari e cresce comunque molto lentamente, senza indurre, in genere, danni cellulari visibili (effetto citopatico);
- presenta un solo sierotipo, sebbene siano stati isolati molti ceppi differenti in diverse parti del mondo;
- è molto più resistente all'inattivazione degli altri *Picornavirus*.

Il genoma virale (**Figura 1.6**) è di circa 7.5 Kb e può essere suddiviso in tre parti:

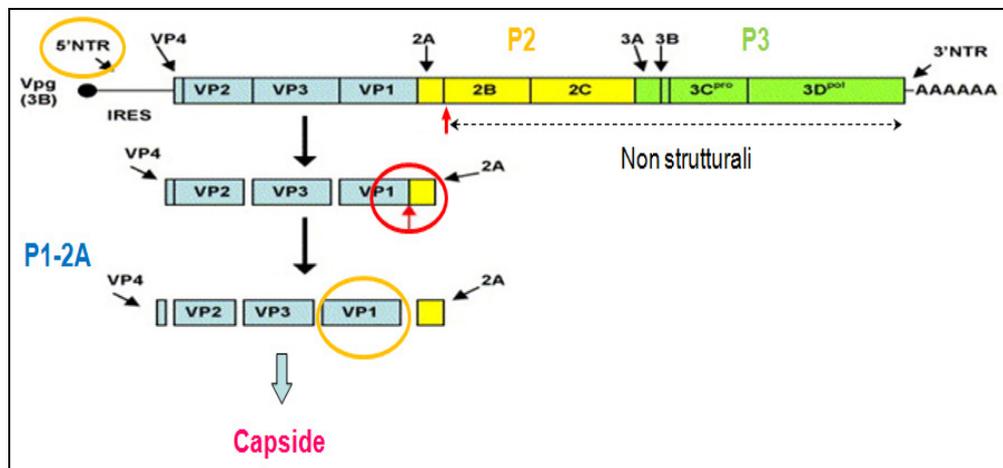
- una porzione non codificante all'estremità 5' (5'NTR) che costituisce circa il 10% del genoma;
- una singola open reading frame (ORF), codificante un'unica poliproteina nella quale le proteine del capsido rappresentano il terzo aminotermine. La rimanente porzione della poliproteina comprende una serie di proteine non strutturali necessarie nella replicazione del virus: 2B, 2C, 3A e 3B (anche nota come VPg, che lega covalentemente l'estremità 5' non codificante e probabilmente interviene nel processo di sintesi dell'RNA), 3C^{pro} (una cisteina proteasi responsabile della maggior parte degli eventi di clivaggio post-trascrizionale della poliproteina) e 3D^{pol} (la RNA polimerasi RNA-dipendente virale);
- una corta regione non codificante all'estremità 3' (3'NTR), seguita da una coda poli-A di 40-80 nucleotidi ⁽²⁸⁾.

La regione 5'NTR presenta numerose strutture secondarie che contengono segnali per il riconoscimento ed il legame dei ribosomi dell'ospite al genoma virale (IRES). 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 per la replicazione virale ^(39, 208). La poliproteina codificata dall'ORF viene tagliata, dopo la trascrizione, per dare origine alle proteine mature e a vari intermedi utilizzati durante la replicazione virale. Può essere suddivisa in tre regioni: P1-2A, che codifica per le proteine del capsido, P2 e P3 che codificano per le proteine non strutturali.

Nella cellula ospite il virus penetra per endocitosi, dopo essersi legato al recettore specifico sulla membrana cellulare e l'RNA viene tradotto nella poliproteina. Parte dell'RNA virionico viene usato come stampo per la replicazione che si verifica attraverso la sintesi intermedia di un RNA a polarità negativa, su cui è poi sintetizzato l'RNA genomico.

Alla sintesi dell'RNA, che utilizza la proteina VPg come primer, segue l'assemblaggio sulle membrane del reticolo endoplasmatico cellulare di un grosso complesso replicativo macromolecolare, contenente proteine non strutturali presenti nel segmento di poliproteina 2B-3D^{pol} (138).

Figura 1.6. Organizzazione del genoma di HAV



La ORF codifica per una poliproteina che viene processata dalla proteasi virale 3C^{pro}. Le frecce rosse indicano il punto in cui avviene il clivaggio in VP1-2A eseguito da una proteasi cellulare non ancora identificata. Le proteine strutturali (P1) sono indicate in blu, le proteine non strutturali (P2 e P3) in giallo e verde.

Il processamento proteolitico della poliproteina avviene simultaneamente alla traduzione ed è prevalentemente condotto dalla proteasi 3C^{pro}. Il primo clivaggio della poliproteina si realizza a livello della giunzione 2A/2B e differisce da quanto avviene negli altri *Picornavirus* (250). Il precursore strutturale P1-2A che ne risulta è successivamente clivato dalla proteasi virale per generare la proteina del capsidone VP3 matura e due precursori di proteine del capsidone: VP0 (VP4-VP2) e VP1-2A (anche conosciuta come pX) (13, 317). VP1-2A è un intermedio strutturale critico nella morfogenesi del virione (61); il taglio a livello di tale giunzione avviene tardivamente nel processo di morfogenesi ed è operato da una proteasi cellulare ancora non conosciuta (140).

²⁵²⁾ Le proteine strutturali si assemblano per formare un capsid 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 il blocco della sintesi proteica cellulare e tutte le sue fasi provocano danni visibili alla cellula.

Una delezione del 60% a carico della regione C-terminale della sequenza 2A non influisce sulla capacità replicativa del virus a dimostrazione che tale segmento proteico non è necessario affinché avvenga la sintesi dell'RNA; questo aspetto della biologia dell'HAV differisce dagli altri membri della famiglia *Picornaviridae*.

Molti *Picornavirus* possiedono quattro polipeptidi nel loro capsid compresa una piccola proteina VP4 sita nella porzione N-terminale della poliproteina; il genoma di HAV sembra, invece, codificare per un segmento polipeptidico VP4 molto breve. Inoltre, mentre la miristilazione N-terminale della proteina VP4 è importante nella morfogenesi degli altri *Picornavirus*, nel virus dell'epatite A la proteina VP4 non sembra contenere un segnale di miristilazione simile ⁽³⁸³⁾.

Il motivo per cui l'assemblaggio del capsid differisca talmente da quello degli altri *Picornavirus* non è ancora noto, ma una possibile ipotesi potrebbe essere collegata all'unicità del tropismo epatico dell'HAV ⁽²⁵⁴⁾.

La regione VP1-VP2 presenta maggiore omologia tra i vari ceppi rispetto alla 5'NTR, pertanto i primers utilizzati in alcune metodiche di RT-PCR per la ricerca dell'HAV da campioni ambientali sono stati scelti in questa regione.

L'HAV è resistente a molte condizioni ambientali così come ad agenti fisici e chimici. L'infettività è mantenuta anche dopo la permanenza di oltre due mesi nei cibi, nell'acqua e su molti tipi di superfici, sia in ambiente umido che essiccato. Sopravvive per diverse ore sulle mani e su numerose superfici ambientali, più a lungo di altri patogeni virali e batterici ⁽³⁶⁵⁾. Resiste a pH fortemente acidi, è inattivato alla temperatura di circa +100°C e dal cloro a concentrazioni di 2-2.5 mg/l per 15 minuti, sopravvive per più di un mese a +25°C al 42% di umidità ⁽⁴⁸⁾.

Negli alimenti, il virus dell'Epatite A, sopravvive per periodi più o meno lunghi anche se questi vengono sottoposti a trattamenti di conservazione ⁽³⁴⁹⁾.

Ad esempio il congelamento dei MEL consente la sopravvivenza del virus per settimane o addirittura mesi e per alcuni anni a -20°C (1, 28, 351, 362).

Alcuni trattamenti di bonifica sono in grado di inattivare i virus presenti, come il riscaldamento (al di sopra dei $+70^{\circ}\text{C}$) e l'irraggiamento, che provocano una denaturazione delle proteine del capsido e/o una frammentazione dell'acido nucleico. Il virus viene completamente inattivato solo dopo alcuni minuti a $+98/+100^{\circ}\text{C}$ o in autoclave a $+121^{\circ}\text{C}$ per 20 minuti; inoltre, sono efficaci il trattamento con formalina, con composti contenenti cloro e con radiazioni ultraviolette (48). Il più vantaggioso è il calore ma spesso i componenti stessi degli alimenti, quali le proteine, possono proteggere il virus dall'effetto della temperatura.

Da alcuni studi risulta che i MEL forniscano una buona protezione al trattamento termico; è stato evidenziato che a $+80^{\circ}\text{C}$ occorre prolungare i tempi di trattamento di diversi minuti per inattivare la stessa quantità di virus contenuto in un omogenato di mollusco (oltre 15 minuti) rispetto a quello contenuto in una sospensione virale (soltanto 3 minuti). Alcuni Autori hanno dimostrato che temperature di $+85/+90^{\circ}\text{C}$ all'interno di un mollusco per un minuto siano sufficienti ad inattivare completamente il virus presente (347). Considerando, però, che per alcune preparazioni domestiche i molluschi si ritengono cotti all'apertura delle valve e questa può avvenire nella cottura a vapore dopo poco meno di un minuto ad una temperatura inferiore a $+70^{\circ}\text{C}$, risulta evidente come tale trattamento non sia assolutamente sufficiente a rendere salubri i MEL contaminati (77). Durante i procedimenti di cottura, quindi, pur preservando il gusto del prodotto, è consigliabile porre particolare attenzione ai tempi ed 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.

Il virus dell'epatite A è coltivabile in diverse linee cellulari derivate dall'uomo e dai primati, tra cui fibroblasti umani diploidi e cellule di rene di scimmia. Il virus wilde-type si moltiplica con difficoltà in coltura ma dopo diversi passaggi si adatta alla crescita "in vitro", con il risultato di una progenie virale a titolo più elevato e con ciclo replicativo più breve.

Non sono ancora note le modifiche che intervengono nel genoma dell'HAV durante questo processo di adattamento alla coltura cellulare, ma è noto che il

ceppo HM-175 dopo solo 10 passaggi, in cellule di rene di scimmia, diventa parzialmente attenuato per lo scimpanzé. Il ceppo HM-175 è stato isolato da una epidemia verificatasi in Australia nel 1979 ⁽¹⁴⁷⁾ e successivamente sottoposto a tre passaggi in cellule di uistiti (scimmie del nuovo mondo). Di tale ceppo si conosce l'intero genoma poiché è stato effettuato il clonaggio del cDNA dal ceppo reisolato dal fegato di uistiti con epatite acuta ⁽⁶⁰⁾.

1.4.2 Aspetti clinici

Il virus dell'epatite A presenta uno spettro d'ospite limitato, in quanto infetta esclusivamente i primati. L'infezione avviene primariamente per via fecale-orale, tramite contatto persona-persona o attraverso ingestione di acqua e/o cibo contaminato. Le particelle virali replicano esclusivamente negli epatociti e nelle cellule intestinali epiteliali e sono rilasciate nel sangue e nella bile (l'assenza dell'envelope rende il virus resistente all'azione litica degli acidi biliari) attraverso un meccanismo che non determina lisi cellulare; le cellule epatiche sono, infatti, distrutte principalmente dalla risposta immune cellulo-mediata ^(80, 188).

L'epatite virale acuta itterica (*Tabella 1.2*) presenta un periodo di incubazione che va dai 10 ai 50 giorni (in media dai 25 ai 30 giorni) ed una fase prodromica di 2-10 giorni, durante la quale possono essere presenti sintomi di tipo simil-influenzale con malessere generale, anoressia, nausea con vomito, mialgie e febbre. In questa fase si osserva l'aumento graduale delle transaminasi sieriche che possono raggiungere valori elevatissimi durante la fase itterica (500-2.000 UI), in conseguenza della necrosi delle cellule epatiche infette e del passaggio degli enzimi epatici nel torrente ematico.

Durante le due settimane precedenti la comparsa della sintomatologia si raggiunge il picco dell'infettività, correlato con una maggiore eliminazione di virus con le feci. La viremia si osserva subito dopo l'infezione e per tutto il periodo in cui persiste l'innalzamento dei valori epatici. In rare occasioni l'epatite A è stata trasmessa dalla trasfusione di sangue prelevato da donatori in fase viremica ⁽¹⁸⁸⁾. La viremia è, infatti, generalmente breve e la quantità di virus presente nel sangue è relativamente bassa rispetto alla sua presenza

nelle feci. Quest'ultime, per l'elevata concentrazione virale che possono raggiungere (fino a 10^9 virioni/g), sono altamente infettive e permettono la trasmissione del virus fino a circa 2 settimane dopo la comparsa dei sintomi.

Tabella 1.2. Evoluzione dell'epatite A 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> <ul style="list-style-type: none"> • Malessere • Anoressia • Febbre (< 39°C) • Nausea • Vomito • Mialgie • Aumento Transaminasi • Aumento Bilirubina 	<i>Dati Clinici e di Laboratorio</i> <ul style="list-style-type: none"> • Ittero sclerale, poi ittero diffuso • Urine scure • Feci ipocoliche • Epato-splenomegalia • Transaminasi elevate (500-2.000 UI/L) • Aumento Bilirubina (10-15 mg/dl) 	<i>Dati Clinici e di Laboratorio</i> <ul style="list-style-type: none"> • Normalizzazione Transaminasi • Normalizzazione Bilirubina • Scomparsa ittero • Fegato normale • Feci normali • Urine normali

La fase sintomatica prevede presenza di ittero, prima sclerale e poi diffuso alla superficie cutanea. Le urine assumono il tipico color marsala (a causa della iperbilirubinemia) e le feci sono ipocoliche. Il fegato è ingrandito (epatite acuta) e nel 20% dei casi si osserva anche splenomegalia. Dopo 3-4 settimane i sintomi si attenuano fino a scomparire, le transaminasi e la bilirubina ritornano ai valori normali.

La presenza e la severità dei sintomi sono correlati all'età del paziente: circa il 70% degli adulti infetti sviluppa i sintomi e l'ittero ⁽⁸⁰⁾. In età infantile, invece, solo il 30% dei bambini sopra i sei anni sviluppa sintomi, solitamente non specifici e simil-influenzali, senza ittero. Poiché anche i bambini infetti asintomatici possono eliminare il virus con le feci per oltre sei mesi, l'infezione in età infantile spesso inizia e si perpetua in episodi epidemici.

Le IgM compaiono 4 settimane dopo il contatto con il virus e persistono per un anno. Le IgG, invece, compaiono poco dopo le IgM e persistono per tutta la vita, svolgendo un ruolo protettivo contro tutti i ceppi di HAV, poiché esiste un solo sierotipo virale.

Durante la fase iniziale dell'infezione, quando la produzione di virus è maggiore, non si osservano danni epatici e ciò suggerisce che non sia la replicazione virale a determinare l'epatopatia ma, più probabilmente, è il sistema immunitario dell'ospite responsabile della patogenesi della malattia.

I casi di epatite fulminante sono rari (1,5 % dei casi di epatite acuta) e sono dovuti alla necrosi massiva del fegato con compromissione delle funzioni epatiche, conseguenza di una eccessiva risposta immunitaria cellulare da parte dell'individuo o di varianti virali maggiormente patogene, che portano alla morte del paziente ⁽⁷⁷⁾. Sono stati anche osservati casi di epatite recidivante, ovvero un prolungamento ed una recrudescenza dei sintomi clinici dopo apparente guarigione ma, diversamente da ciò che avviene nel caso di altri virus epatitici, l'infezione da HAV non tende mai a cronicizzare ⁽²⁸⁾.

È disponibile in commercio il vaccino inattivato per l'epatite A, che va somministrato per via intramuscolare nel deltoide, dando una buona protezione già dopo 15 giorni dalla prima dose.

La vaccinazione ⁽⁴⁾ è raccomandata per:

- personale di laboratorio che lavora a diretto contatto con il virus;
- personale sanitario;
- soggetti che lavorano a contatto con i primati;
- personale di cucina e lavoratori dell'industria alimentare;
- personale di asili-nido e scuole materne;

- personale a rischio di esposizione a liquami non trattati;
- soggetti emofiliaci trattati con fattori plasmatici della coagulazione;
- pazienti con epatopatie gravi;
- viaggiatori in Paesi ad alto rischio;
- soggetti con comportamenti sessuali a rischio;
- tossicodipendenti (che assumono sostanze per via parenterale);
- militari.

La vaccinazione dovrebbe essere considerata per:

- pazienti con malattie epatiche croniche, quali epatite B ed epatite C;
- prevenzione dell'infezione in persone a stretto contatto con casi confermati di epatite, entro 7 giorni dall'insorgenza della malattia.

Diversi sono i vaccini anti HAV registrati in Italia, disponibili sia nella formulazione per bambini che per adulti; commercializzati in forma monovalente o associati ad altri vaccini. Quando è richiesta una protezione rapida, il vaccino può essere somministrato contemporaneamente alle immunoglobuline, che vanno inoculate in un sito corporeo diverso.

1.4.3 Epidemiologia

L'HAV ha una distribuzione cosmopolita ed è causa di circa 1,5 milioni di casi clinici ogni anno. La trasmissione è principalmente fecale-orale, sia tramite cibi ed acque contaminate sia tramite contatto diretto con persone infette.

In passato le scarse condizioni igieniche, ambientali e sanitarie rendevano estremamente frequenti le possibilità di infezione. Negli ultimi decenni il modello epidemiologico è cambiato notevolmente. Con il miglioramento del tenore di vita, il rischio di contrarre l'infezione è diminuito e si osserva una riduzione dell'incidenza. L'esposizione al virus in età infantile è meno comune che in passato. Di contro, la riduzione di nuovi casi di infezione, nella popolazione, ha portato ad un declino della prevalenza anticorpale nei confronti dell'HAV e dunque alla comparsa di una popolazione adulta con

una ridotta immunità specifica. I soggetti giovani adulti e gli adulti sono, quindi, maggiormente suscettibili all'infezione e presentano più spesso forme sintomatiche e di maggiore gravità, soprattutto se è già presente un'epatopatia. Inoltre, è stata descritta negli ultimi anni la trasmissione per via sessuale (SEIEVA 2014: <http://www.iss.it/seieva/>, 246, 367). Un importante fattore di rischio è rappresentato dai viaggi in aree ad alta endemia.

Le condizioni epidemiologiche nel mondo variano da paese a paese e addirittura da regione a regione, in base al grado di sviluppo socio-economico. Si distinguono, infatti, aree a bassa, media ed alta endemia⁽¹⁷⁷⁾:

- nelle aree ad alta endemia (Africa, Medio Oriente, Sud Est Asiatico, America Latina) il rischio di infezione è del 90% e la malattia, essendo generalmente contratta in giovane età, è più spesso asintomatica;
- nelle aree a media endemia (Europa dell'Est, Russia) la trasmissione avviene prevalentemente da persona a persona, spesso con epidemie periodiche;
- nelle aree a bassa endemia (Giappone, Australia, Nuova Zelanda, Canada, Stati Uniti, Sud e Nord Europa) la malattia si manifesta, più frequentemente, in giovani appartenenti a gruppi a rischio (omosessuali, tossicodipendenti)^(126, 364) ed in soggetti che viaggiano in zone ad elevata endemicità⁽³⁶⁶⁾.

In Italia esiste un Sistema Epidemiologico Integrato Epatiti Virali Acute (SEIEVA), nato nel 1984 presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), ad integrazione della sorveglianza delle malattie infettive affidata al Sistema Informativo delle Malattie Infettive (SIMI) del Ministero della Salute. Il SEIEVA utilizza le notifiche giunte al centro di riferimento e le integra con le informazioni provenienti dai questionari epidemiologici ed i risultati di laboratorio, ciò permette di acquisire una migliore conoscenza dell'epidemiologia dell'epatite virale a livello nazionale, attraverso la stima dell'incidenza e del contributo relativo dei diversi fattori di rischio. Grazie al SEIEVA è possibile, inoltre, definire ed impostare le strategie di prevenzione e monitorare gli effetti delle diverse misure preventive. Il sistema di sorveglianza si basa sulla stretta e continua collaborazione tra l'ISS e le

ASP/AUSL partecipanti. L'adesione è su base volontaria; attualmente alle ASP/AUSL partecipanti aderisce più del 77% della popolazione italiana.

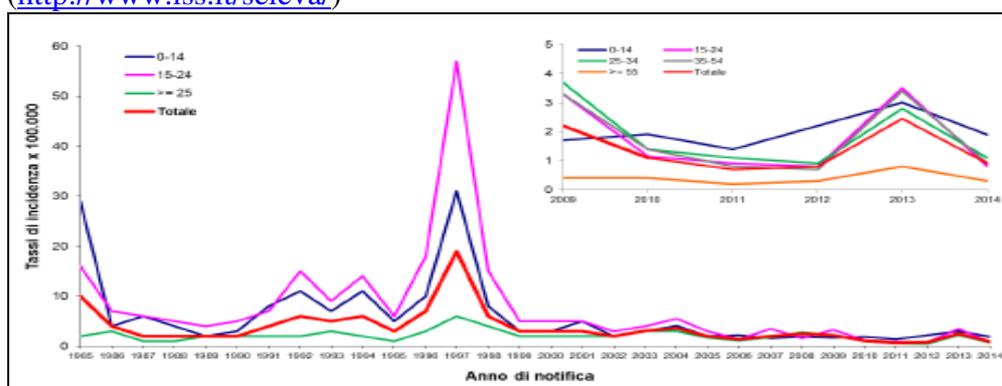
Ad oggi l'Italia è una nazione ad endemicità medio-bassa per Epatite A, grazie soprattutto ai miglioramenti nelle condizioni sanitarie ed economiche, che hanno contribuito ad una forte diminuzione della circolazione del virus.

Ad eccezione delle epidemie associate al consumo di frutti di mare crudi, che si sono verificate negli anni 1992, 1994 e 1997 in alcune Regioni dell'Italia meridionale, l'incidenza ha mostrato nel tempo un andamento in diminuzione (*Tabella 1.3, Figura 1.7*), seppure non costante, passando da 10/100.000 nel 1985 a 0,9/100.000 nel 2014, con un aumento nel 1996-1997 (19/100.000) dovuto ad una epidemia registrata in due regioni del sud Italia: Puglia ⁽⁵⁵⁾ e Campania ⁽²³⁶⁾.

Tabella 1.3. Tassi di incidenza (x 100.000) dell'Epatite A per fascia di età ed anno. SEIEVA 1985-2014 (<http://www.iss.it/seieva/>)

ANNO	ETA'			Totale
	0-14	15-24	≥ 25	
1985	29,0	16,0	2,0	10,0
1986	4,0	7,0	3,0	4,0
1987	6,0	6,0	1,0	2,0
1988	4,0	5,0	1,0	2,0
1989	2,0	4,0	2,0	2,0
1990	3,0	5,0	2,0	2,0
1991	8,0	7,0	2,0	4,0
1992	11,0	15,0	2,0	6,0
1993	7,0	9,0	3,0	5,0
1994	11,0	14,0	2,0	6,0
1995	5,0	6,0	1,0	3,0
1996	10,0	18,0	3,0	7,0
1997	31,0	57,0	6,0	19,0
1998	8,0	15,0	4,0	6,0
1999	3,0	5,0	2,0	3,0
2000	3,0	5,0	2,0	3,0
2001	5,0	5,0	2,0	3,0
2002	2,0	3,0	2,0	2,0
2003	3,0	4,0	3,0	3,1
2004	4,1	5,5	3,0	3,6
2005	2,0	3,0	1,7	2,0
2006	2,2	1,4	1,1	1,4
2007	1,6	3,5	1,8	2,0
2008	1,9	1,6	2,8	2,5
2009	1,7	3,3	2,2	2,2
2010	1,9	1,2	1,0	1,1
2011	1,4	0,9	0,6	0,7
2012	2,2	0,8	0,5	0,8
2013	3,0	3,5	2,2	2,5
2014	1,9	0,8	0,7	0,9

Figura 1.7. Tassi di incidenza (x 100.000). SEIEVA 1985-2014
(<http://www.iss.it/seieva/>)



Anche nel 2004 la Campania è stata scenario di una epidemia di epatite A, in cui sono stati notificati 621 casi, probabilmente a causa di consumo di molluschi; l'incidenza annuale registrata è stata del 3,6/100.000. Dal 2011 l'incidenza si è mantenuta sotto l'1 per 100.000 abitanti. Nel 2013 si è registrata una nuova epidemia di epatite A legata al consumo di frutti di bosco congelati, che ha colpito tutto il territorio nazionale ed in particolare alcune Regioni del Nord e del Centro Italia.

La distribuzione dei casi di epatite A non è uniforme in tutta Italia. Le regioni del centro-nord sono ritenute a bassa endemia, mentre quelle del sud ed insulari a endemia intermedia, ma l'epidemia da HAV legata al consumo di frutti di bosco, registrata prevalentemente nelle Regioni del Nord ⁽²¹⁹⁾ e del Centro Italia nel 2013, conclusasi nel corso dell'anno successivo, ha determinato una notevole variazione dei tassi del 2014 (*Tabella 1.4*).

Tabella 1.4. Tassi annuali/100.000 per età, sesso ed area geografica dell'epatite A. SEIEVA 2014 (<http://www.iss.it/seieva/>)

Epatite A	Nord-centro*			Sud-isole**			Italia		
	Maschio	Femmina	Totale	Maschio	Femmina	Totale	Maschio	Femmina	Totale
Età									
0-14	2,41	2,32	2,37	0,40	0,42	0,41	1,91	1,85	1,88
15-24	0,98	0,78	0,89	0,64	0,34	0,49	0,89	0,67	0,78
25-34	1,18	0,98	1,08	1,75	0,72	1,24	1,30	0,92	1,11
35-54	1,08	0,92	1,01	0,84	0,29	0,56	1,03	0,79	0,92
≥55	0,54	0,22	0,36	0,00	0,14	0,08	0,44	0,20	0,31
Totale	1,11	0,84	0,97	0,66	0,33	0,49	1,01	0,73	0,87

* Nord-Centro: Prov. Aut. Bolzano, Prov. Aut. Trento, Piemonte, Lombardia, Friuli Venezia Giulia, Veneto, Liguria, Emilia Romagna, Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Abruzzo.

** Sud-Isola: Molise, Campania, Puglia, Basilicata, Calabria, Sardegna, Sicilia.

Il principale fattore di rischio riportato dal SEIEVA nel 2014 è sicuramente il consumo di molluschi, mangiati crudi o poco cotti, seguito dal consumo di frutti di bosco; pochi casi secondari possono essere collegati al contatto diretto con persone infette, all'esposizione per via parenterale, alla trasmissione sessuale o a viaggi in Paesi ad alta endemia (**Tabella 1.5**).

Tabella 1.5. Casi* notificati di epatite A con fattore di rischio identificato. SEIEVA 2014 (<http://www.iss.it/seieva/>)

Fattore di rischio	Fascia di età										TOTALE		
	0-14		15-24		25-34		35-54		55+		N.	%	
	N.	(%)	N.	(%)	N.	(%)	N.	(%)	N.	(%)			
Oro-fecale	Consumo di frutti di mare	20	(19,2)	11	(32,4)	45	(64,3)	69	(60,5)	12	(31,6)	157	(43,6)
	Consumo di frutti di bosco	10	(11,5)	8	(25,0)	17	(27,0)	35	(35,4)	4	(11,1)	74	(23,3)
	Contatto con itterico nelle 6 settimane	24	(27,9)	6	(18,8)	9	(13,2)	8	(7,6)	3	(8,3)	50	(15,2)
	Notte fuori città	75	(69,4)	17	(51,5)	43	(60,6)	52	(44,8)	19	(47,5)	206	(56,0)
Parenterale o sessuale	Trasfusione sangue	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(2,6)	1	(0,3)
	Interventi chirurgici	2	(1,9)	1	(3,1)	2	(2,9)	6	(5,4)	2	(5,3)	13	(3,7)
	Ospedalizzazione	1	(1,0)	0	(0,0)	2	(3,0)	1	(0,9)	0	(0,0)	4	(1,2)
	Altre esposizioni parenterali**	6	(5,7)	7	(20,6)	25	(36,8)	10	(8,9)	10	(25,6)	58	(16,2)
	Terapia odontoiatrica	10	(9,9)	8	(23,5)	18	(26,5)	25	(22,3)	10	(25,6)	71	(20,1)
	Uso di droghe E.V.	0	(0,0)	1	(3,3)	4	(6,1)	2	(1,8)	0	(0,0)	7	(2,0)
	Convivente tossicodipendente	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(0,9)	0	(0,0)	1	(0,3)
	Contatto con itterico nei 6 mesi	28	(31,1)	7	(21,2)	9	(13,2)	9	(8,4)	3	(8,3)	56	(16,8)
	Partner sessuali (>1 nell'ultimo anno)	0	(0,0)	2	(12,5)	7	(16,7)	7	(10,8)	3	(23,1)	19	(14,0)
	Convivente di soggetto HBsAg+	0	(0,0)	1	(3,2)	2	(3,3)	1	(1,0)	1	(2,8)	5	(1,7)
	Convivente di soggetto HCV+	2	(2,4)	0	(0,0)	3	(4,8)	2	(2,0)	1	(2,8)	8	(2,6)
	TOTALE CASI***	111		36		73		118		43		381	

* I casi possono avere più di un fattore di rischio

** Piercing, tatuaggi, agopuntura, manicure/pedicure, rasatura dal barbiere

*** Per alcuni casi l'informazione relativa ad alcuni fattori di rischio non è disponibile

In Italia, come risulta dai dati del SEIEVA, l'incidenza della malattia è di un migliaio di casi l'anno, di cui il 44% associato al consumo di frutti di mare.

1.5 I NOROVIRUS

1.5.1 Classificazione e struttura

I *Norovirus* (NoVs), già noti come “Small Round Structured Viruses” (SRSV), appartengono alla famiglia *Caliciviridae*, che comprende quattro generi, *Lagovirus*, *Vesivirus*, *Sapovirus* e *Norovirus*. Mentre i primi due sono di esclusiva pertinenza veterinaria, *Sapovirus* e *Norovirus* sono in grado di infettare sia gli animali che l’uomo anche se la trasmissione diretta tra uomo e animale non è ancora stata dimostrata ⁽¹⁷⁶⁾. Tra i NoVs animali, quelli dei suini sono i più geneticamente vicini agli umani ⁽³⁵⁴⁾. I *Norovirus* presentano una elevata variabilità genetica che permette di distinguerli filogeneticamente in 6 genogruppi diversi denominati da GI a GVI; tali genogruppi sono suddivisi in almeno 40 cluster genotipici (9 in GI, 22 in GII, 3 in GIII, 2 ciascuno in GIV, GV e GVI) ^(52, 397, 416). Tre genogruppi (I, II, IV) infettano l’uomo, mentre virus di genogruppo III sono tipicamente bovini, il genogruppo V è infettivo per il topo e il VI per i canidi. Il genogruppo II comprende anche ceppi di virus suini (GII.11, GII.18 e GII.19), strettamente correlati ai NoVs umani ⁽⁴⁰³⁾. Il genogruppo GIV è stato isolato, oltre che nell’uomo ⁽²¹³⁾, in felidi ⁽²⁴⁷⁾ e canidi ⁽²⁴⁸⁾. Recentemente è stata proposta l’esistenza di un VII genogruppo in grado di infettare i cani ⁽³⁹⁷⁾.

Nel genogruppo I (GI) vengono classificati, il ceppo *Norwalk* (GI.1), il *Southampton* (GI.2), il *Desert Shield* (GI.3) e il *Valletta* (GI.4). Nel genogruppo 2 (GII) sono inclusi i ceppi *Hawaii* (GII.1), *Snow Mountain* e *Melksham* (GII.2), il *Toronto e Mexico* (GII.3) e il *Bristol e Grimsby* (GII.4). Il Genogruppo III (GIII) ha come prototipo il ceppo *Jena* (isolato da feci di vitello) ⁽²³³⁾. Il Genogruppo IV ha come prototipo il virus *Alphatron* ⁽¹⁹⁶⁾. Il Genogruppo V comprende il *Norovirus Murino 1* (MNV-1) ⁽¹⁶³⁾. Tra i diversi genogruppi esiste una sostanziale diversità genetica (60% di divergenza nella ORF2) e anche tra i genotipi all’interno di uno stesso genogruppo la variabilità è considerevole (20-30% di divergenza).

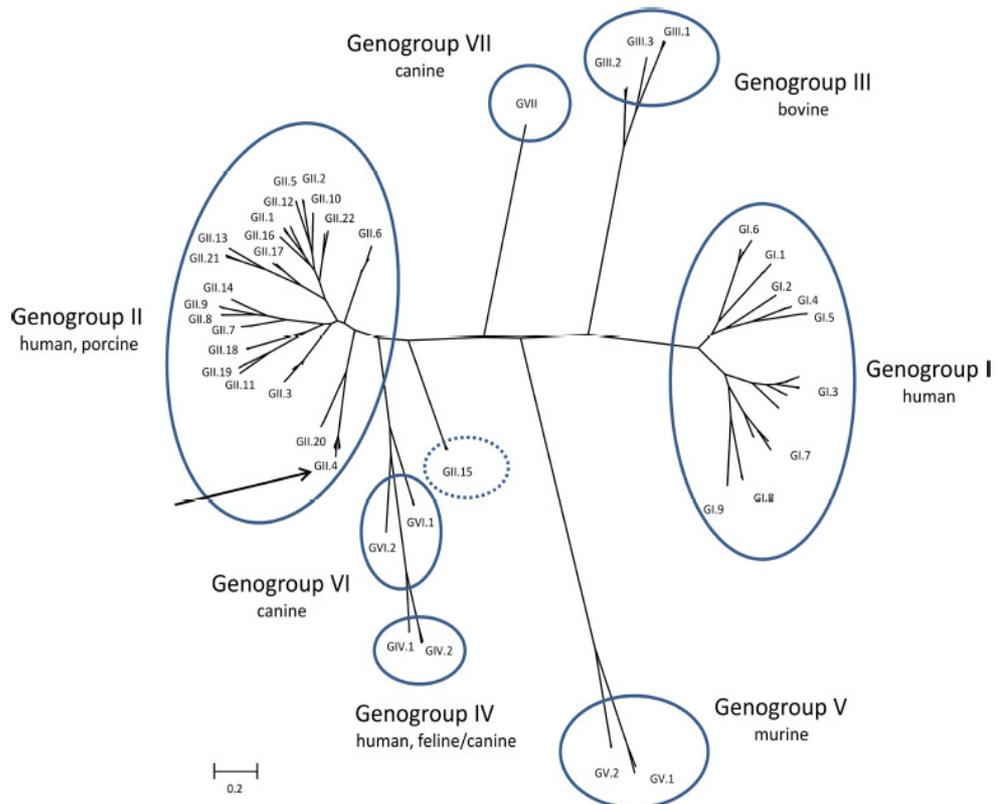
La **Tabella 1.6** mostra le caratteristiche dei 6 genogruppi di *Norovirus*, ciascuno con i principali prototipi.

Tabella 1.6. Classificazione dei *Norovirus*

Genogruppo	Ospite	Genotipi	Prototipi
GI	Uomo	9	Norwalk, Southampton, Desert Shield virus, Valletta virus
GII	Uomo Suino	22	Lordsdale, Hawaii, Snow Mountain Melksham, Toronto, Mexico, Bristol Grimsby
GIII	Bovino	3	Jena
GIV	Uomo Cane Felini	2	Alphatron
GV	Topo	2	Norovirus Murino 1
GVI	Cane	2	Bari91

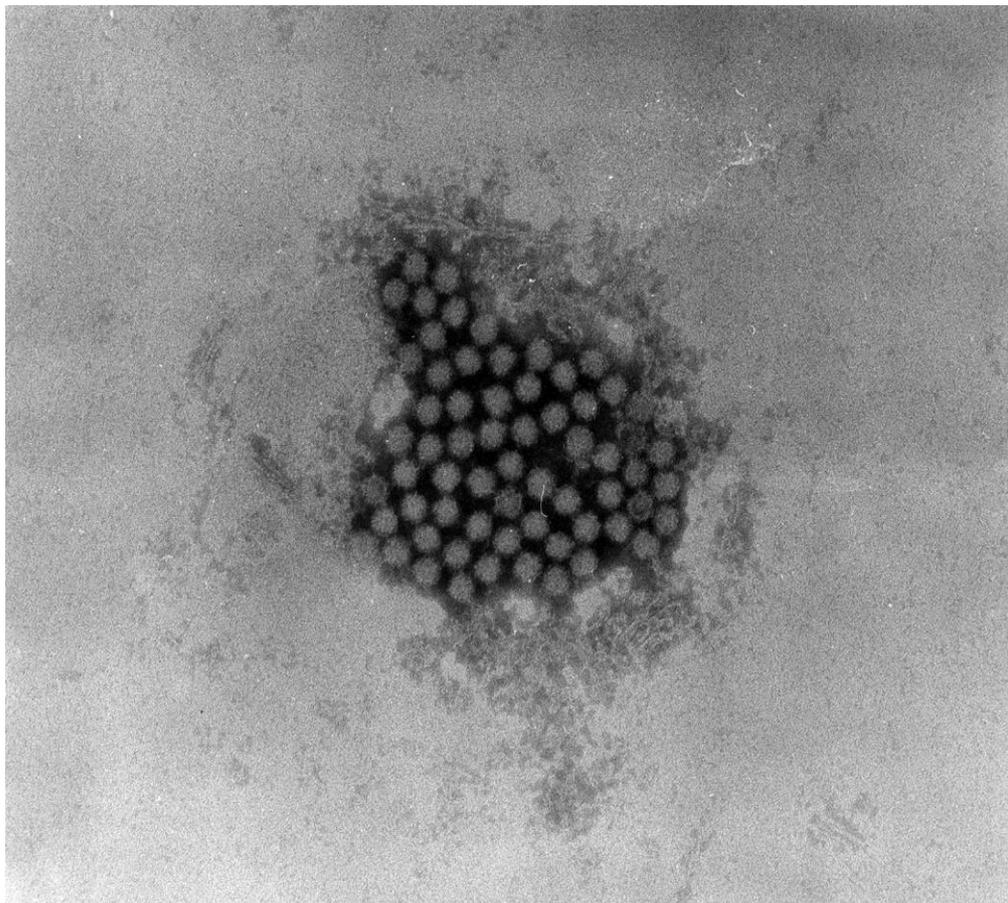
La **Figura 1.8** mostra l'albero filogenetico dei *Norovirus* costruito nella regione codificante per la proteina capsidica VP1. Sono evidenziati 5 diversi cluster per i diversi genogruppi, inoltre sono mostrati i genotipi e sottotipi all'interno dei cluster principali.

Figura 1.8. Albero filogenetico dei *Norovirus* ⁽³⁹⁷⁾



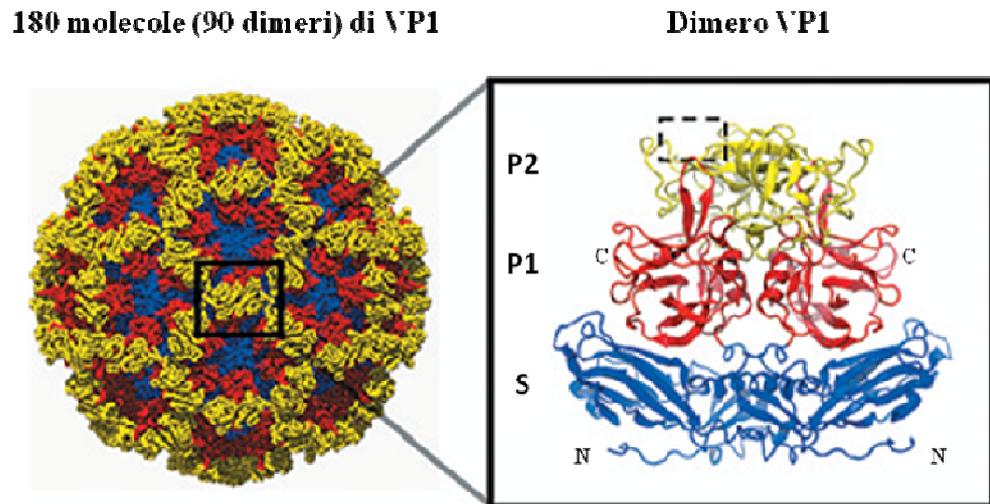
I *Norovirus* (**Figura 1.9**) sono di piccole dimensioni (27-35 nm), privi di envelope e con un capsidico a simmetria icosaedrica, contenente un genoma ad RNA a singolo filamento a polarità positiva di 7.4-7.7 Kb, contenente tre *Open Reading Frames* (ORFs) ^(102, 143, 152). Al 5' non codificante l'RNA è legato covalentemente ad una proteina virale nota come VPg, mentre il 3' è poliadenilato.

Figura 1.9. Struttura dei *Norovirus* al microscopio elettronico (<http://www.clinical-virology.org/gallery/images/em/norovirus2.jpg>)



L'involucro capsidico è costituito da 180 molecole di VP1, la principale proteina del capsidico, organizzate in 90 dimeri; ciascun dimerico è suddiviso in un dominio S (*shell*, guscio) più interno, e un dominio P (*protruding*, sporgente) più esterno. Il dominio P a sua volta si divide in P1 e P2, dei quali P2, altamente variabile, si trova nella parte più distale del capsidico ed è coinvolto nel legame ai recettori cellulari ⁽³⁴¹⁾ (**Figura 1.10**).

Figura 1.10. Struttura del capsid dei *Norovirus*. La parte tratteggiata indica la regione del sottodominio P2 coinvolta nel legame ai recettori cellulari (<http://www.sepeap.org/archivos/pdf/11191.pdf>)



Nel capsid sono presenti anche una o due copie della proteina strutturale VP2 il cui ruolo non è stato ancora chiarito. In uno studio su un Calicivirus felino (FCV) la VP2 si è dimostrata essenziale per la produzione di virus infettivi ⁽³⁶³⁾. È stato ipotizzato che VP2 possa essere coinvolta nell’impacchettamento dell’RNA genomico, ma ad oggi ancora non ci sono ancora evidenze sperimentali che dimostrano la capacità di VP2 di legare gli acidi nucleici ⁽¹⁵²⁾.

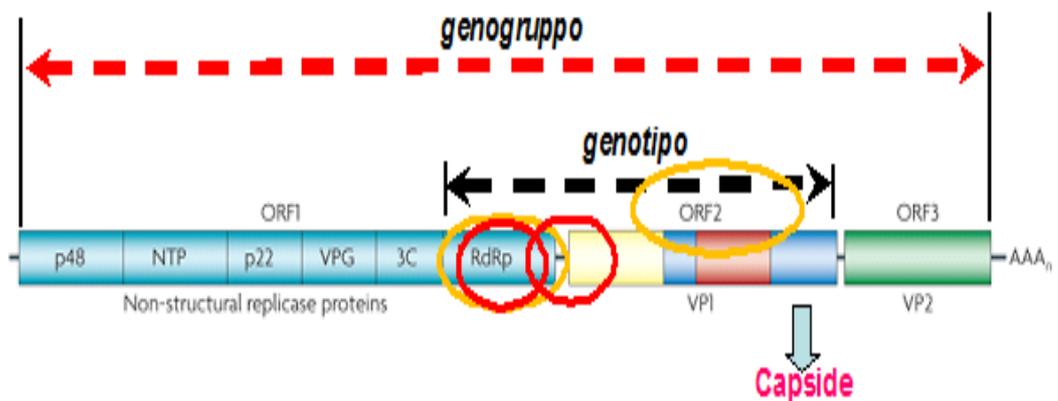
I tre domini codificanti (ORF) del genoma sono caratterizzati da:

- ORF1: (5 Kb), copre circa i due terzi del genoma e codifica per una poliproteina precursore di 1738 amminoacidi che viene processata da una specifica proteasi virale (Pro) in sei proteine non strutturali; partendo dall’estremità N terminale distinguiamo i geni codificanti per le seguenti proteine:
 - una proteina N terminale, p48 (37-48 KDa), il cui ruolo non è ancora chiaro. È stato ipotizzato che possa svolgere un ruolo nel regolare il traffico proteico intracellulare e nell’indurre riarrangiamenti delle membrane ^(114, 119).
 - una NTPasi (nucleoside trifosfatasi) (48 KDa), che lega e idrolizza i nucleosidi trifosfato.
 - P20, una proteina la cui funzione non è nota (40 KDa);

- VPg (16 KDa) la quale è associata al 5' terminale del genoma virale. Si ritiene che questa proteina giochi un ruolo fondamentale nell'inizio della trascrizione e della traduzione; si ipotizza che la VPg sia coinvolta nel reclutamento del ribosoma durante l'inizio della traduzione dell'RNA virale ⁽⁸⁷⁾.
- Pro (3C): (19 KDa), una proteasi virale coinvolta nel processamento della poliproteina codificata dall'ORF1. Questa proteina inoltre inibisce la traduzione cellulare ⁽⁴¹⁴⁾.
- Pol: (57 KDa) RNA polimerasi RNA dipendente (RdRp) necessaria alla replicazione del genoma virale.
- ORF2: (1,8 Kb), la seconda ORF codifica per una proteina di 530 amminoacidi, la VP1, che costituisce la principale proteina strutturale del capsid (57 KDa). Questa regione è suddivisa in due domini: il dominio S, che forma l'involucro icosaedrico ed è molto conservato nell'ambito dei Calicivirus, ed il dominio P, costituito da P1 e P2 che formano la parte più esterna e variabile del capsid.
- ORF3: (0,6 Kb), codifica per una piccola proteina strutturale basica di 212 amminoacidi, VP2, la cui funzione non è ancora nota. Si ipotizza possa svolgere il ruolo di trasportare il genoma del virus all'interno dei virioni durante il ciclo replicativo.

La **Figura 1.11** mostra una rappresentazione schematica del genoma dei NoVs

Figura 1.11. Organizzazione del genoma dei NoVs



Il meccanismo di replicazione dei *Norovirus* non è stato ancora del tutto chiarito; si ipotizza che l'RNA genomico venga utilizzato come template per la sintesi di un filamento negativo il quale a sua volta farà da stampo per la trascrizione di RNA genomici, che saranno poi impacchettati nei nuovi virioni, e RNA subgenomici, utilizzati per la sintesi delle proteine strutturali. Inoltre, è stato proposto che durante la replicazione del genoma la polimerasi virale uridili la proteina VPg, in modo tale che si possa legare alla coda di poliA dell'RNA genomico e agire da primer per l'inizio della sintesi del filamento negativo. Non è richiesto alcun primer invece per la sintesi dell'RNA a polarità positiva. A seguito della replicazione l'RNA virale verrà impacchettato nei nuovi virioni; il sito in cui avviene l'assemblaggio non è stato ancora identificato ⁽¹⁰²⁾.

I *Norovirus* possono resistere a temperature superiori a +60°C ed inferiori a 0°C. *Norovirus* resiste a concentrazioni di cloro fino a 100 ppm ed ad altri disinfettanti ambientali, per cui è molto difficile la sua eliminazione dall'acqua potabile e dall'ambiente. Studi condotti allo scopo di testare l'efficacia di diversi processi di depurazione a cui sono normalmente sottoposti i molluschi hanno dimostrato che tali trattamenti non assicurano la bonifica del prodotto da contaminazioni virali.

La dose infettante minima è molto bassa (da 10 a 100 particelle virali), mentre durante il picco dell'infezione sono presenti più di un miliardo di particelle virali per grammo di sostanza fecale ed un solo episodio di vomito può disseminare nell'ambiente 3×10^6 particelle virali. Per tali caratteristiche la contagiosità dei NoVs è molto elevata soprattutto in comunità più o meno ristrette come ospedali, ristoranti, case di cura, scuole e navi da crociera.

L'assenza di sistemi di coltura in vitro ha ostacolato le conoscenze circa la diffusione di questi virus ed i loro meccanismi di patogenicità; solo negli anni '90 la scoperta della loro organizzazione genomica e la conseguente messa a punto di sistemi diagnostici molecolari hanno permesso di conoscerne la reale diffusione. Recentemente alcuni autori hanno riportato che ceppi di NoVs umani possono infettare e replicarsi in un modello tridimensionale di coltura cellulare derivata da epitelio intestinale umano ⁽³⁶⁸⁾. Inoltre, è stato dimostrato che i *Norovirus* isolati da feci di volontari possono essere coltivati in cellule di epatoma umano con espressione di antigeni virali, replicazione e rilascio

delle particelle virali nel medium ⁽¹⁴⁶⁾. Tuttavia ad oggi sistemi cellulari efficienti e riproducibili non sono disponibili.

1.5.2 Aspetti clinici

Il periodo di incubazione del virus è di 10-50 ore ed il rischio di trasmissione persiste almeno 48 ore dopo la scomparsa dei sintomi clinici. I sintomi dell'infezione sono quelli comuni alle gastroenteriti: nausea, vomito (caratteristica distintiva delle gastroenteriti da NoVs) diarrea acquosa, crampi addominali. Sintomi sistemici di accompagnamento sono: malessere, mialgia, cefalea e brividi. Nel 37-45% dei casi si manifesta anche febbre che normalmente recede in 24 ore. La gastroenterite da NoVs è in genere severa ma autolimitata ⁽³⁰⁹⁾. La terapia è di tipo sintomatico, basata sull'assunzione di liquidi ed elettroliti per bocca o per via parenterale nei casi di vomito e diarrea grave, con disidratazione in atto. La malattia si risolve spontaneamente nel giro di 15-48 ore. La durata della malattia può prolungarsi fino a 4-6 giorni in pazienti infettati durante epidemie ospedaliere e nei bambini con età inferiore agli 11 anni ^(237, 340). Soggetti vulnerabili, con precario equilibrio metabolico o cardiocircolatorio, come anziani, bambini e pazienti immunocompromessi possono manifestare sintomatologie severe. Sono state descritte infatti epidemie all'interno di case di cura nelle quali si sono registrati decessi in diversi pazienti.

Recentemente è emerso che il tropismo dei NoVs non è limitato esclusivamente agli enterociti e quindi questi virus possono indurre manifestazioni cliniche diverse dalla gastroenterite come encefalopatia, enterocolite necrotizzante nei neonati, coagulazione disseminata intravascolare, sindrome del colon irritabile post-infettiva, convulsioni infantili benigne ^(54, 175, 262). I fattori endogeni di rischio che favoriscono l'infezione da *Norovirus* non sono ancora del tutto conosciuti ^(230, 231).

La diffusione del virus può essere limitata mediante adozione di adeguate misure igieniche (efficace e frequente lavaggio delle mani, particolare attenzione nella manipolazione del cibo e dell'acqua). Studi su volontari hanno mostrato che alcuni individui (30%) sviluppano una infezione asintomatica ed hanno pertanto un ruolo importante nella diffusione e trasmissione del virus ⁽⁵²⁾.

I meccanismi di immunizzazione sono ancora poco conosciuti dal momento che i *Norovirus* sono geneticamente ed antigenicamente molto variabili. L'immunità acquisita in seguito all'infezione è solitamente temporanea e legata al ceppo virale che ha causato l'infezione ^(307, 410); lo stesso individuo può quindi essere infettato da differenti varianti del virus nel corso della vita. L'elevata prevalenza delle infezioni da NoVs nei bambini e negli anziani ha portato alcuni gruppi di ricerca ^(157, 234, 324) allo studio di potenziali vaccini preventivi al fine di controllare la malattia in particolari classi a rischio (bambini e anziani, militari, viaggiatori, assistenti sanitari e personale delle case di cura). Inoltre vaccini per i *Norovirus* potrebbero svolgere un ruolo importante nei programmi di prevenzione della mortalità infantile per patologie gastroenteriche nei Paesi in via di sviluppo. Dati pubblicati di recente dimostrano infatti che il 15% delle ospedalizzazioni pediatriche per diarrea in India e il 31% in Perù sono associate a infezioni da NoVs, percentuali che contribuiscono alla stima di 1,6 milioni di bambini che muoiono ogni anno per diarrea ⁽³⁰⁸⁾.

1.5.3 Epidemiologia

I NoVs, originariamente denominati Norwalk-like virus, sono stati descritti per la prima volta nel 1972 in occasione di un'epidemia di gastroenterite in una scuola della cittadina di Norwalk, nello stato americano dell'Ohio; il virus responsabile dell'epidemia fu identificato mediante microscopia ⁽¹⁸⁶⁾. Presentano diffusione mondiale e nei Paesi industrializzati sono attualmente considerati i più comuni agenti virali responsabili di epidemie gastroenteriche e di casi sporadici di gastroenterite nel mondo ^(29, 115, 136). Le infezioni si verificano in tutti i gruppi di età e hanno luogo soprattutto nel periodo invernale, per questo la patologia correlata è stata definita anche “vomito invernale”. Sono talvolta denominati “virus dell'influenza intestinale” (gastric flu), a sottolineare le somiglianze con i virus influenzali; come per l'influenza, infatti, i ceppi di NoVs mutano rapidamente antigenicità, creando varianti in grado di diffondere in modo pandemico.

Recenti acquisizioni mostrano, infatti, l'elevata capacità dei NoVs di ricombinare a livello della sequenza di giunzione tra ORF1 e ORF2 (*shift*

genetici), attraverso un meccanismo simile al *crossing-over*, con frequenze dell'ordine del 10% nel corso di infezioni multiple con diversi ceppi virali ^(41, 42). In tal modo si generano continuamente nuove varianti che possono sostituire i ceppi predominanti circolanti in un dato momento nella popolazione ⁽³⁸⁹⁾ in quanto meglio adattate ad infettare ospiti suscettibili o a sopravvivere nell'ambiente in presenza di fattori inattivanti. Recentemente nuove varianti, in particolare del genotipo GII.4, sono state descritte in diversi Paesi europei ed in altre parti del mondo ^(24, 40, 57, 128, 288, 335, 358, 393). Sono state descritte anche nuove varianti ricombinanti sia intergenotipo che intergenogruppo ⁽⁴²⁾, ma anche episodi di ricombinazione intragenotipo ⁽²⁴⁹⁾.

I Centers for Disease Control and Prevention (CDC) stimano che ogni anno 23 milioni di casi di gastroenteriti acute siano dovuti ad infezioni da NoVs contro i circa 7 milioni di episodi dovuti a batteri o parassiti. Inoltre i *Norovirus* rappresentano la causa del 50-65% di tutti gli episodi epidemici, definiti come "tossinfezioni" alimentari negli USA. Anche nei Paesi europei i *Norovirus* sono considerati i più importanti agenti di infezione gastrointestinale non batterica. I sistemi di sorveglianza europei indicano i *Norovirus* come responsabili di circa il 50% dei casi di gastroenteriti riportati in Inghilterra e in Galles; dati simili provengono anche dalla Finlandia, Svezia, Olanda, Germania ^(202, 203). Nei Paesi sviluppati i NoVs sono tra i principali patogeni responsabili di epidemie gastroenteriche in bambini, anziani, immunocompromessi e militari.

Di rilievo è il ruolo dei *Norovirus* all'interno delle popolazioni pediatriche; attualmente i NoVs sono la seconda causa più comune di gastroenterite grave in bambini sotto i 5 anni di età sia in Paesi in via di sviluppo che industrializzati, secondi solo ai Rotavirus; sono inoltre responsabili di circa il 12% delle ospedalizzazioni per gastroenteriti gravi in bambini sotto i 5 anni in tutto il mondo ⁽¹⁹⁴⁾. In particolare, ogni anno si registrano circa 900.000 casi di gastroenterite pediatrica nei Paesi industrializzati, almeno 1,1 milioni di nuovi episodi, e 218.000 decessi nei Paesi in via di sviluppo ⁽³⁰⁸⁾. Per quanto riguarda l'Italia, uno studio annuale dei casi sporadici di gastroenterite pediatrica in un ospedale del nord Italia, conferma i NoVs tra i principali agenti patogeni responsabili (10.4%) dopo i *Rotavirus* (21.1%) ⁽²⁶⁰⁾. A seguito dell'introduzione di vaccini efficaci contro le infezioni da *Rotavirus*, presto i

Norovirus potrebbero diventare i principali patogeni enterici della popolazione pediatrica nel mondo.

Le infezioni da NoVs sono spesso contratte da viaggiatori nei Paesi in via di sviluppo nei quali si verificano contaminazioni fecali di alimenti e acqua a causa delle scarse condizioni igieniche; sono documentate infezioni in viaggiatori in Messico, India e Guatemala⁽¹⁹⁴⁾.

Particolarmente nota è la cosiddetta “malattia del viaggiatore” che si manifesta spesso a bordo delle navi da crociera dove l’affollamento e la ristrettezza ambientale comportano lo sviluppo di fenomeni epidemici che coinvolgono la quasi totalità dei passeggeri e dell’equipaggio.

I NoVs sono responsabili di più della metà delle epidemie di gastroenterite all’interno di case di cura^(142, 144, 344), con un netto aumento negli ultimi anni; si è inoltre registrato un aumento nel numero delle ospedalizzazioni e decessi in queste popolazioni. Un aspetto importante da sottolineare è il ruolo del personale sanitario (spesso infettato durante le epidemie) nel diffondere il virus tra i pazienti attraverso il contatto persona-persona⁽¹⁸²⁾. In nord Italia nel 2009 è stata descritta un’epidemia in una casa di riposo che ha coinvolto 60 pazienti⁽²⁶¹⁾; nello stesso anno a Malta è stata descritta un’epidemia di gastroenterite in una casa di cura che ha coinvolto 44 persone, di cui 35 residenti e 9 impiegati⁽¹⁴⁵⁾.

A partire dal 2002 si è registrato un incremento delle epidemie da NoVs in Europa e negli USA, accompagnato dalla emergenza di nuove varianti. L’aumentata consapevolezza sul rischio rappresentato da questo patogeno ha portato alla istituzione di sistemi di sorveglianza in diversi Paesi, NORS (National Outbreak Reporting System) negli USA e FBVE (Food-Borne Viruses in Europe) costituito in Europa nel 1999. Nei 13 Stati che partecipano al programma FBVE dal 2002 al 2006 sono stati segnalati 9.430 focolai di infezione. La Germania è la più colpita con 5.391 focolai, segue l’Inghilterra con 1.893 episodi epidemici. Per l’Italia sono state inviate solo 19 segnalazioni. Per quanto riguarda le modalità di trasmissione, nell’88% dei casi si trattava di una trasmissione tramite contatto persona-persona, il 10% da alimenti contaminati, e il 2% da acqua contaminata^(202, 203). Il quadro che emerge dai dati epidemiologici è che il genogruppo II è responsabile della maggior parte delle epidemie (oltre l’80%) soprattutto quelle trasmesse

attraverso gli alimenti, mentre il genogruppo I ha un ruolo minore ed è associato principalmente alle epidemie idrotrasmesse. Non esistono invece dati sul terzo genogruppo di NoVs in grado di infettare l'uomo, il GIV, che è stato identificato per la prima volta nel 2000 come agente responsabile di casi di gastroenterite. In Italia gli studi clinico-epidemiologici sui NoVs indicano un crescente impatto di questi patogeni sulla popolazione ^(132, 133, 210, 213, 214, 249, 259, 261, 263, 264, 265, 326, 327). Ancora poco si conosce sulla diffusione del patogeno nell'ambiente attraverso i sistemi di depurazione, le acque superficiali e le acque destinate al consumo umano o a scopi ricreativi ^(12, 210, 213, 214, 215, 313). È però verosimile che il fenomeno delle gastroenteriti da *Norovirus* sia ancora largamente sottostimato in Italia. Un recente lavoro condotto in Italia ⁽²¹³⁾, ha dimostrato la presenza di *Norovirus* GIV sia nel contesto clinico (bambini ospedalizzati per gastroenterite) che ambientale (reflui urbani).

NoVs suini sono stati rilevati nei maiali provenienti dal Giappone, USA, Canada, Ungheria, Paesi Bassi, Nuova Zelanda, Belgio, indicando una distribuzione a livello mondiale di questi virus ^(21, 79, 190, 289).

La presenza simultanea di NoVs umani e animali è stata rilevata nei MEL ⁽⁷¹⁾. Questa osservazione desta preoccupazione circa il rischio di co-infezione di esseri umani con virus umani e animali, per il possibile rischio di ricombinazione e comparsa di nuovi ceppi. Ulteriori sforzi appaiono necessari per una valutazione del ruolo dei *Norovirus* nella trasmissione zoonotica.

1.6 GLI ENTEROVIRUS

1.6.1 Classificazione e struttura

Il termine *Enterovirus* (EVs) non deve essere confuso con il termine virus enterici che comprende la totalità dei virus ad interessamento o eliminazione enterica reperibili nell'ambiente. Tali virus, così come l'HAV, costituiscono un genere appartenente alla famiglia *Picornaviridae*, pertanto presentano genoma ad RNA a singolo filamento con polarità positiva, delle dimensioni di 7.5 Kb e capsidi a simmetria icosaedrica di 27-30 nm.

L'assenza dell'envelope lipidico è una caratteristica che li rende stabili a pH acido (compreso tra 3 e 9), resistenti al calore e a numerosi detergenti, insensibili agli eteri. In particolare, resistono all'acidità del succo gastrico ed alla bile presente nell'intestino e possono sopravvivere a lungo nell'ambiente esterno.

Fino agli anni '60 comprendevano le specie *Poliovirus*, *Echovirus* e *Coxsackievirus* (A e B), suddivisione che permane per quanto riguarda i caratteri biologici e patogenetici. Successivamente, basandosi su omologie genomiche, è stata modificata la nomenclatura ed oggi possono essere classificati in 9 specie (etichettate in ordine alfabetico da EV-A a EV-H e EV-J). Questa classificazione del genere *Enterovirus* si basa sui livelli di divergenza nelle sequenze genomiche, sullo spettro d'ospite, su somiglianze nei meccanismi di replicazione e sulla restrizione nella ricombinazione tra i membri della stessa specie. Gli enterovirus che infettano l'uomo comprendono le specie da EV-A a EV-D, mentre le altre cinque raggruppano virus che infettano principalmente bovini (EV-E e EV-F), suini (EV-G) e scimmie (EV-H e EV-J).

Dei più di 300 sierotipi di Enterovirus riconosciuti, almeno 107 possono interessare l'uomo, distribuiti fra (**Figura 1.12**):

- *Enterovirus* di gruppo A (precedentemente *Human Enterovirus A*), che consiste di 25 sierotipi: Coxsackie virus A2 (CV-A2), CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A7, CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16; Enterovirus A71 (EV-A71), EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91,

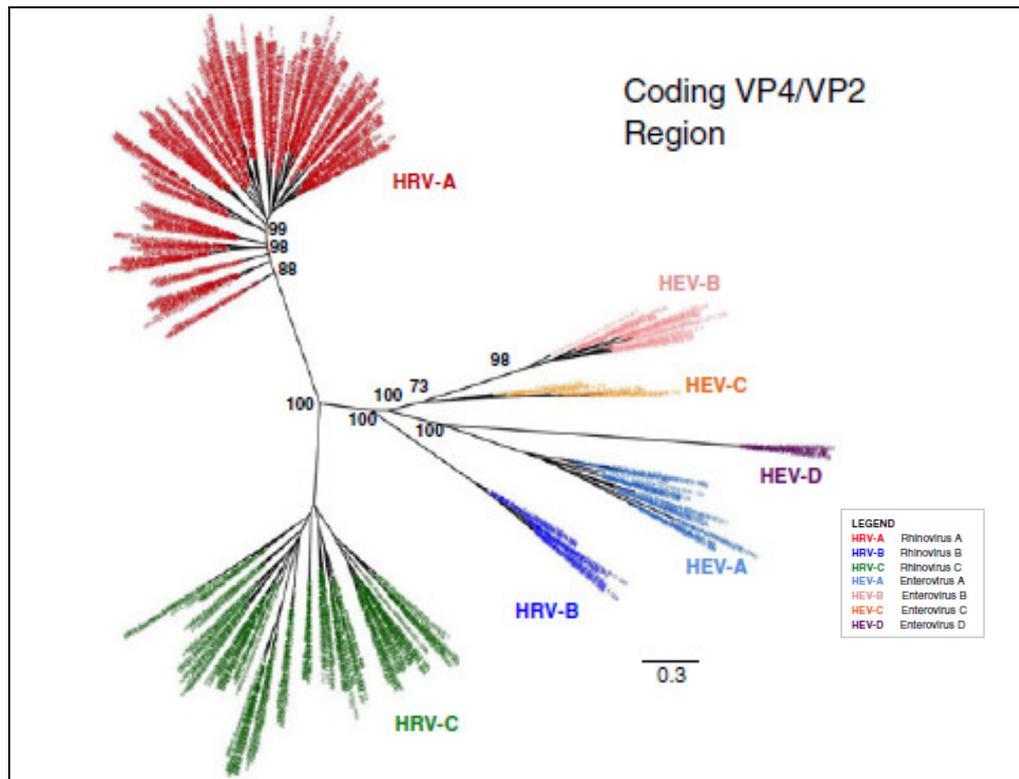
EV-A92, EV-A114, EV-A119, EV-A120, EV-A121, enterovirus della scimmia (SV19, SV43, SV46) e del babbuino (BA13);

- *Enterovirus* di gruppo B (precedentemente *Human Enterovirus B*), che comprende 63 sierotipi: Coxsackie virus B1 (CV-B1), CV-B2, CV-B3, CV-B4 (include swine vesicular disease virus 2 [SVDV-2]), CV-B5 (include SVDV-1), CV-B6, CV-A9, Echovirus 1 (E-1; include E-8), E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7, E-9 (include CV-A23), E-11, E-12, E-13, E-14, E-15, E-16, E-17, E-18, E-19, E-20, E-21, E-24, E-25, E-26, E-27, E-29, E-30, E-31, E-32, E-33, Enterovirus B69 (EV-B69), EV-B73, EV-B74, EV-B75, EV-B77, EV-B78, EV-B79, EV-B80, EV-B81, EV-B82, EV-B83, EV-B84, EV-B85, EV-B86, EV-B87, EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107, EV-B110 (dello scimpanzé), EV-B111, EV-B112 (dello scimpanzé), EV-B113 (del mandrillo), Enterovirus della scimmia SA5;
- *Enterovirus* di gruppo C (precedentemente *Human Enterovirus C*), che include 23 sierotipi: Poliovirus 1 (PV-1), PV-2, PV-3, Coxsackie virus A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117, EV-C118;
- *Enterovirus* di gruppo D (precedentemente *Human Enterovirus D*), che comprende 5 sierotipi: EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111 (sia umano che dello scimpanzé), EV-D120 (del gorilla) (<http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>)⁽¹⁶⁷⁾.

La classificazione degli enterovirus è in continua evoluzione e sempre nuovi sierotipi vengono proposti^(131, 297, 298, 303).

Il capsido dei *Picornaviridae* presenta 60 unità strutturali (capsomeri). I capsomeri sono composti da quattro polipeptidi, VP1, VP2, VP3 e VP4, che si originano dal taglio di un unico precursore VP0 ad opera di una proteasi virale. VP1, VP2 e VP3, costituiscono la struttura esterna del capsido, mentre VP4 è collocato internamente e svolge funzione stabilizzatrice. L'assemblaggio dei 4 polipeptidi crea uno spazio vuoto, un "canyon" (fattore distintivo rispetto all'HAV), con funzione di antirecettore virale che permette l'interazione con proteine di membrana delle cellule suscettibili ai virus.

Figura 1.12. Albero filogenetico degli *Enterovirus* ⁽¹³¹⁾



I virus penetrano nelle cellule legandosi a specifiche proteine della membrana, diverse a seconda della specie. La presenza o assenza di queste proteine che fungono da recettori determina il tropismo dei vari ceppi virali e la patogenesi delle malattie causate da questi virus. Le particelle virali vengono internalizzate in endosomi cellulari, nei quali avviene l'uncoating del virus, il capsido perde unità strutturale e l'acido nucleico viene liberato nel citoplasma delle cellule infettate. Il genoma presenta un unico ORF e viene tradotto immediatamente in una poliproteina, successivamente processata dalle proteasi virali in proteine di dimensioni minori con funzioni strutturali ed enzimatiche, inclusa la stessa polimerasi virale che servirà per sintetizzare copie aggiuntive del genoma. In seguito il genoma viene trascritto in un filamento complementare negativo, che servirà da "templato" per la produzione di numerose copie di RNA positivo, in parte tradotte nelle proteine strutturali del capsido e in parte utilizzate come stampo genomico per la progenie virale. Lo stadio finale dell'infezione consiste nel rilascio della progenie virale mediante lisi delle cellule.

1.6.2 Aspetti clinici

Sebbene la maggioranza delle infezioni enterovirali umane sia asintomatica, questi virus, a causa dell'ampio spettro di suscettibilità, possono causare un'ampia gamma di sindromi cliniche, dalle patologie delle vie respiratorie superiori a rash febbrile, meningite asettica, pleurodinia, encefalite, paralisi flaccida acuta e malattia simil-settica neonatale, che dipendono dal sito principale di replicazione virale. Possono essere implicati anche nella patogenesi di gravi malattie croniche, tra cui diabete mellito di tipo 1, miocardite, cardiomiopatia congestizia e malattie neuromuscolari.

Gli *Enterovirus* diffondono attraverso le vie respiratorie e la parete intestinale dell'ospite, dove svolgono un primo ciclo di replicazione al livello del tessuto linfoide associato all'intestino (gut-associated lymphoid tissue o GUT) o associato alle mucose (mucose-associated lymphoid tissue o MALT).

Per via linfatica, dopo un periodo d'incubazione di 7-14 giorni, raggiungono gli organi bersaglio secondari come la cute, il sistema nervoso centrale, il fegato e il cuore. L'ampio spettro d'ospite si riflette nella suscettibilità di molti citotipi all'infezione con EVs. La trasmissione degli *Enterovirus* umani avviene attraverso il circuito fecale-orale con un'incidenza prevalente durante il periodo estivo-autunnale. L'Enterovirus 70, invece, si trasmette per impianto diretto sulla congiuntiva (dita contaminate).

Le patologie più conosciute e rilevanti sono:

- la congiuntivite acuta emorragica, causata dall'Enterovirus 70, che è un'inflammazione della congiuntiva accompagnata da emorragia sottocongiuntivale.
- la congiuntivite acuta non emorragica che è una congiuntivite senza manifestazioni emorragiche, causata da ceppi di Coxsackievirus A24 ed Echovirus 7.
- esantemi e rash cutanei, causati da Coxsackievirus ed Echovirus.
- Herpangina, malattia causata da Coxsackievirus A e, talvolta, da altri EVs come Coxsackie B ed Echovirus, si presenta spesso in forma epidemica in lattanti e bambini e occasionalmente coinvolge adolescenti e adulti.

- Hand, foot and mouth disease (Malattia “Mani, piedi, bocca”): patologia causata dal Coxsackievirus A16 e dall’Enterovirus 71, con un periodo di incubazione che va dai 3 ai 7 giorni e con un decorso simile a quello dell’herpangina. È frequente nei bambini e negli adulti immunodeficienti. Le lesioni vescicolari sono di diametro maggiore rispetto a quelle provocate dall’herpangina e perciò distinguibili all’osservazione.
- Malattie respiratorie causate da Coxsackievirus che possono colpire lattanti e bambini, caratterizzate da febbre, coriza, faringite. Sopraggiate complicazioni possono fare evolvere le patologie lievi in bronchiti e polmoniti interstiziali.
- Meningite asettica, infezione virale dovuta a ceppi di Coxsackievirus di gruppo A o B o Echovirus.
- Miocardite e pericardite, causate in particolar modo da Coxsackievirus B. Pleurodinia (Malattia di Bornholm).
- infiammazione della pleura causata dai Coxsackievirus gruppo B.
- Poliomielite, un’infiammazione della sostanza grigia del midollo spinale causata da Poliovirus; la forma clinica più comune è la poliomielite anteriore o paralisi infantile o malattia di Heine-Medin, infezione contagiosa che può presentare qualche variazione da un’epidemia all’altra e da una regione all’altra.

1.6.3 Epidemiologia

Le infezioni da non-polio *Enterovirus* sono abbastanza diffuse in tutto il mondo. I numeri esatti non sono disponibili ^(170, 323, 386). Il tasso di mortalità complessivo dei non-polio *Enterovirus* è estremamente basso. I pazienti a maggior rischio sono quelli con sepsi neonatale. Dal 2002 al 2004, gli Echovirus 9 e 30 sono stati i sierotipi di non-polio *Enterovirus* più comunemente registrati negli Stati Uniti. Nel 2007, il Coxsackie B1 è stato frequentemente segnalato e nel 2008 i sierotipi più frequentemente segnalati sono stati i Coxsackie B1 e B4. A settembre del 2014, negli Stati Uniti d’America, in poco più di un mese, si è diffuso enormemente l’*Enterovirus* 68 (EV-D68), appartenente agli *Enterovirus* umani di gruppo D, coinvolgendo

circa 38 Paesi e contagiando 226 persone, tutti bambini, ad eccezione di un adulto.

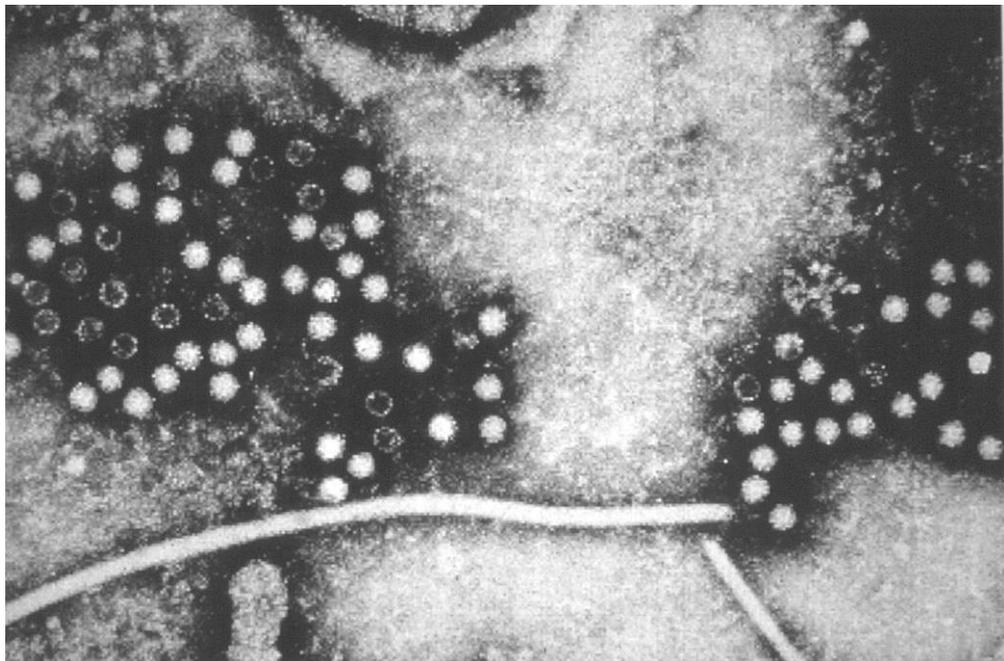
La Poliomielite è ancora presente in alcuni Paesi in via di sviluppo, ma la campagna di eradicazione globale intrapresa nel 1988 tramite la sistematica somministrazione dei vaccini ha consentito di ridurre il numero di casi di polio di oltre il 99%, dai 350.000 casi del 1988 si è scesi ai 359 segnalati nel 2014. La riduzione è il risultato dello sforzo globale per debellare la malattia. Oggi, solo 2 Paesi (Afghanistan e Pakistan) rimangono polio-endemici, mentre erano 125 nel 1988 (407). A settembre del 2015, la Nigeria, ultimo paese del continente africano in cui ancora il virus circolava, è stata dichiarata polio-free. L'eradicazione in tutto il Mondo è attesa nel prossimo futuro.

1.7 IL VIRUS DELL'EPATITE E (HEV)

1.7.1 Classificazione e struttura

Il virus dell'Epatite E (HEV) è l'unico membro appartenente al genere *Hepevirus* della famiglia *Hepeviridae* ^(109, 111). L'agente eziologico dell'Epatite E è un piccolo virus sferico di circa 32-34 nm con capside a simmetria icosaedrica e privo di envelope (**Figura 1.13**), trasmesso principalmente per via fecale-orale ^(271, 325).

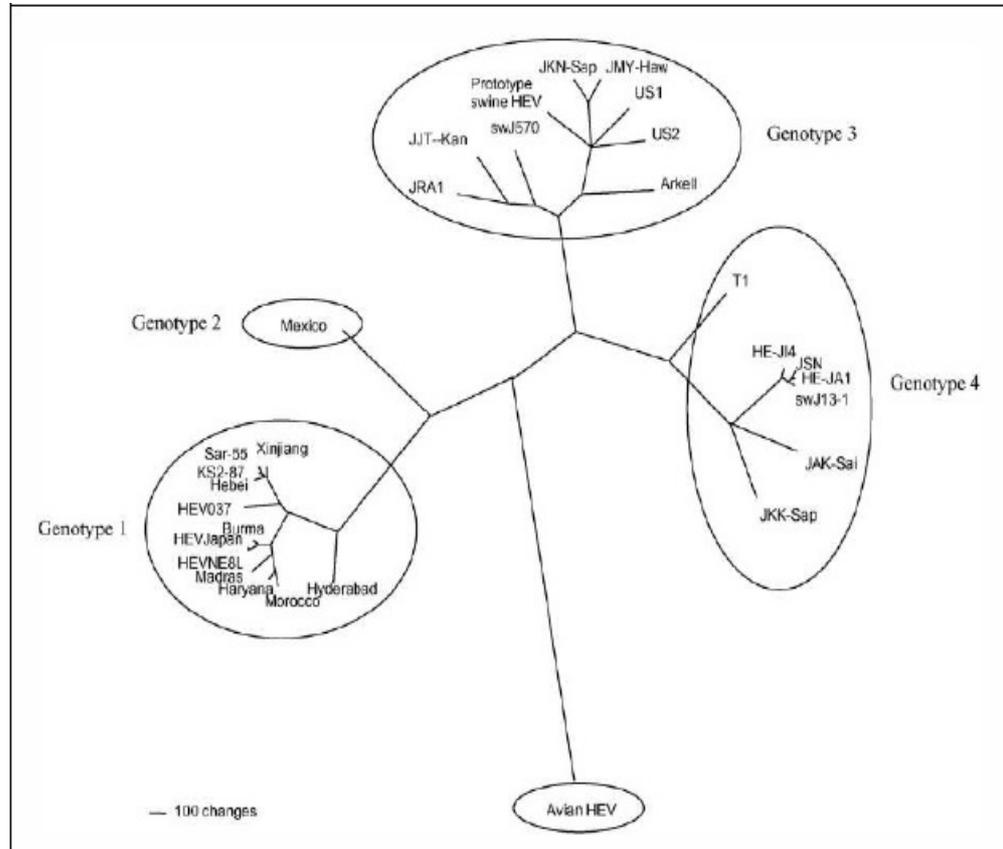
Figura 1.13. Struttura di HEV al microscopio elettronico
(https://it.wikipedia.org/wiki/File:Hepatitis_E_virus.jpg#file)



Il genoma è costituito da una molecola di RNA a singolo filamento con polarità positiva di circa 7.2 Kb ^(271, 374), che presenta un *cap* all'estremità 5' ed una coda poly-(A) all'estremità 3'. I virioni sono costituiti dalla proteina maggiore del capside, di dimensioni di 72 kDa, e da una piccola proteina (1,5 kDa), la cui funzione è tuttora sconosciuta ⁽¹¹⁷⁾. I diversi ceppi di HEV sono classificati sulla base delle omologie nucleotidiche tra i residui 5185-7178 nell'ORF2, distinguendo i diversi genotipi in base a differenze di almeno il 20% nella sequenza nucleotidica ^(240, 402). Fino ad oggi sono stati

identificati 4 genotipi maggiori virali (**Figura 1.14**)⁽²⁴⁰⁾ ed è riconosciuto un solo sierotipo⁽⁴⁰²⁾.

Figura 1.14. Albero filogenetico di HEV⁽²⁷¹⁾



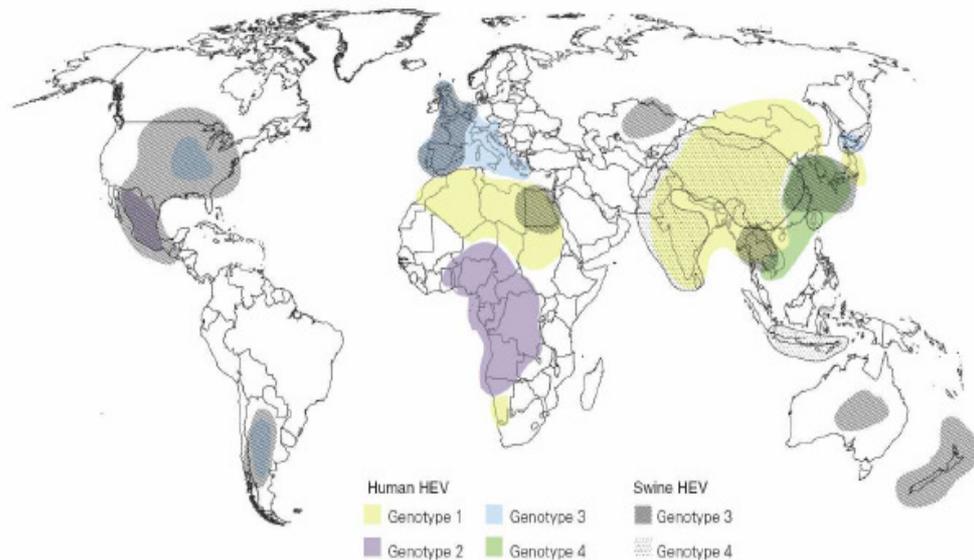
Mentre i ceppi dei genotipi 1 e 2 sono stati isolati solo dall'uomo (tranne il caso del ceppo suino cambogiano identificato da Caron e colleghi nel 2006, e appartenente al genotipo 1), quelli appartenenti ai genotipi 3 e 4 sono stati identificati sia nell'uomo sia in diverse specie animali, tra cui il suino domestico, il cinghiale, il coniglio, il ratto e il cervo^(137, 180, 267, 299, 304, 415).

È anche largamente adottata l'ulteriore suddivisione in sottotipi all'interno dei 4 genotipi, basata sulle sequenze dei 300-450 nucleotidi terminali della regione genomica dell'ORF2. Secondo questo studio, il genotipo 1 comprende 5 sottotipi, il genotipo 2 comprende 2 sottotipi, il genotipo 3 comprende 10 sottotipi e il genotipo 4 comprende 7 sottotipi⁽²⁴⁰⁾.

La maggior parte delle infezioni in Asia e in Africa sono causate da ceppi di HEV di genotipo 1, mentre in Messico e in Nigeria prevale il genotipo 2, che appare meno diffuso geograficamente rispetto al genotipo 1⁽²⁴⁰⁾. Nei Paesi

industrializzati, dove fino a poco tempo fa l'infezione era considerata sporadica, sono stati individuati i genotipi 3 e 4 ^(6, 108, 109, 130, 240, 402). Virus di genotipo 3 prevalgono in USA e in Europa, mentre il genotipo 4 (g4) è tipicamente riscontrato in Cina e Taiwan ⁽⁴⁰²⁾ (**Figura 1.15**); studi recenti hanno messo in evidenza la presenza del g4 anche in Italia ⁽¹³⁰⁾.

Figura 1.15. Distribuzione geografica dei genotipi di HEV di origine umana e suina ⁽⁷⁾

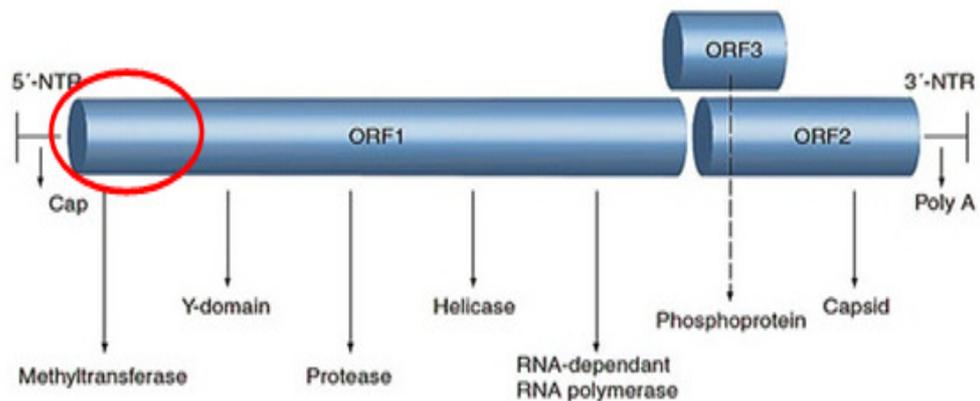


Il primo ceppo animale di HEV è stato identificato nel suino nelle regioni centro-occidentali degli USA nel 1997. Il virus, denominato Swine Hepatitis E virus, apparteneva al genotipo 3 e presentava un'omologia dell'ORF2 con ceppi umani. In particolare, l'ORF2 del ceppo suino presentava il 92% di identità nucleotidica e il 98-99% di identità amminoacidica con 2 ceppi americani di HEV di origine umana (ceppi US1 E US2); tale analogia dimostrò l'appartenenza dei ceppi suini e umani alla medesima famiglia ⁽²⁶⁷⁾. Ceppi di HEV sono stati isolati anche nei polli ⁽¹⁵¹⁾. L'HEV aviare è, però, filogeneticamente distinto dagli altri ceppi di HEV animali e umani. L'omologia nucleotidica dell'HEV aviare con ceppi umani e suini è soltanto del 48-60% ⁽¹⁵¹⁾. Inoltre, la malattia causata nei polli non è una epatite, ma una epato-spleno megalia.

La regione codificante del genoma è preceduta da una corta regione non codificante (5'NTR) di circa 25 nucleotidi, ed è seguita da una seconda 3'NTR più lunga (65-74 nucleotidi) e da una estremità poly-(A) ⁽²⁹⁹⁾. La regione codificante è costituita da tre *Open Reading Frames* denominate ORF1, ORF2 e ORF3, parzialmente sovrapposte ^(374, 401) (**Figura 1.16**).

Figura 1.16 Organizzazione del genoma di HEV

(<https://rickjohnson303.files.wordpress.com/2011/04/hevgenome.jpg>)



Il gene della ORF1, che misura approssimativamente 5 kb, è localizzato all'estremità 5' del genoma virale e codifica per una poliproteina di circa 1.693 amminoacidi, comprendente proteine non strutturali, coinvolte nella replicazione del genoma e nella maturazione delle proteine virali. In particolare, la sequenza di tale poliproteina contiene domini caratteristici per una metiltransferasi virale, una cisteina proteasi papaina-simile, una elicasi e una RNA polimerasi RNA-dipendente ^(6, 195). In aggiunta, la ORF1 possiede due regioni chiamate domini X e Y, di funzione sconosciuta.

La ORF2 misura approssimativamente 2 kb, è localizzata all'estremità 3' del genoma virale e codifica per la proteina strutturale del capsido, di 660 amminoacidi. Si tratta di una glicoproteina con un peso molecolare di 72 kDa, caratterizzata dalla presenza di aminoglicani e da una regione ricca di arginina e lisina all'estremità N-terminale, la quale costituisce il sito di aggancio al reticolo endoplasmatico. Inizialmente sintetizzata come precursore, la proteina capsidica viene in seguito processata tramite clivaggio in una proteina matura e glicosilata in tre siti (fenomeno frequente nelle proteine dell'envelope, ma raro per una proteina capsidica). La proteina

capsidica codificata dalla regione ORF2 (pORF2) contiene epitopi immunogenici, è responsabile della risposta anticorpale, e rappresenta il bersaglio per lo sviluppo di vaccini ^(6, 271).

La ORF3 è una regione di circa 366-369 nucleotidi che si sovrappone alla ORF2. Codifica per una piccola fosfoproteina immunogenica di 123 amminoacidi (pORF3), di funzione ancora non ben definita ma che sembra interagire con la pORF2 ⁽²⁹⁹⁾. È stato ipotizzato che pORF3 sia in grado di associarsi al citoscheletro delle cellule epatiche fungendo da sito di ancoraggio nel quale la pORF2 e l'RNA possono avviare il processo di assemblaggio del nucleocapside virale ⁽⁴⁰²⁾.

Le particelle di HEV sono sensibili a basse temperature di conservazione e a disinfettanti iodati ⁽³²⁵⁾. Si ritiene che HEV sia in grado di tollerare cambiamenti di pH da condizioni moderatamente alcaline ad acide, assicurando la sopravvivenza nel tratto gastrointestinale durante la trasmissione fecale-orale, ma non sembra tollerare elevate concentrazioni di sali ^(304, 325). Per quanto riguarda la resistenza del virus al calore, è stata dimostrata un'inattivazione totale a temperature superiori ai +60°C ⁽¹¹⁸⁾. È stato, inoltre, dimostrato che solo campioni di fegato incubati a +56°C contenevano virus ancora infettante, questo prova che l'infettività di HEV in fegati suini commercializzati è completamente inattivata mediante adeguata cottura. Sebbene HEV si sia dimostrato meno stabile al calore rispetto al virus dell'Epatite A, alcuni ceppi di HEV potrebbero sopravvivere alle temperature interne della carne non adeguatamente cotta ⁽¹¹⁰⁾.

Già nel 2006 Tanaka e colleghi ⁽³⁷⁶⁾ avevano condotto uno studio comparativo dei metodi di coltivazione di HEV su 21 linee cellulari epatiche di derivazione umana, di scimmia o suina. Nel 2007, gli stessi autori ⁽³⁷⁷⁾ hanno dimostrato che è possibile sviluppare un sistema colturale adeguato per HEV, anche se questo rimane un virus difficile da coltivare con rese accettabili. Solo negli ultimi anni, sono stati descritti in letteratura sistemi di crescita del virus *in vitro*, i quali risultano tuttavia poco efficienti ⁽³⁰⁰⁾. Conseguentemente, ad oggi la diagnosi e la caratterizzazione dei ceppi sono basate sull'analisi dell'RNA virale mediante tecniche biomolecolari ⁽³⁰⁴⁾.

1.7.2 Aspetti clinici

Nella maggior parte degli individui l'infezione con HEV esita in una malattia di lieve entità, eccetto che per le donne in gravidanza, per le quali la letalità può raggiungere il 20%, almeno in Paesi non sviluppati. La possibilità di aborti, nascite premature e mortalità neonatale possono inoltre essere elevati. Il motivo per il quale questa malattia è particolarmente grave nelle donne in gravidanza non è chiaro ⁽⁶⁾. Sembrerebbe che HEV danneggi le cellule epatiche riducendo la loro resistenza alle endotossine prodotte dai batteri nel tratto intestinale. La stessa reazione infiammatoria evocata dal virus provocherebbe la sintesi di prostaglandine e altri mediatori ad azione chemiotattica. L'azione combinata delle endotossine e dei prodotti dell'infiammazione porterebbe all'occlusione delle vie biliari con conseguente colestasi ⁽¹⁷⁸⁾. Dalla comparsa dei primi sintomi epatici, nei soggetti più gravi, la morte sopravviene in 4-8 settimane a causa di un'encefalopatia fulminante, diatesi emorragica o collasso renale ⁽³⁰⁴⁾.

L'infezione può essere trasmessa verticalmente dalla madre al feto, mentre non è stata segnalata la trasmissione per via venerea ⁽¹⁰⁸⁾.

Non è ancora chiaro se l'immunità acquisita nel corso di infezione da HEV sia permanente, come nel caso dell'epatite A ⁽³⁰⁴⁾.

L'epatite E si manifesta con diverse forme cliniche. L'epatite acuta itterica è la forma più comune ed è caratterizzata da una fase prodromica che dura pochi giorni, nella quale si manifestano sintomi simil-influenzali come febbre, tremori, anoressia, nausea, vomito, dolori addominali, diarrea, dolori articolari e astenia. Questi sintomi sono seguiti dopo pochi giorni da ittero, con iscurimento delle urine e feci ipocoliche. Con la comparsa dell'ittero, la febbre e gli altri sintomi prodromici tendono a diminuire o a scomparire del tutto. Le indagini di laboratorio mostrano bilirubinuria, bilirubinemia (principalmente coniugata), elevazione degli enzimi epatici. Con il regredire della malattia, che in genere ha una durata di 1-4 settimane, i valori ematochimici tornano gradualmente alla normalità. In alcuni pazienti la sintomatologia può perdurare con persistenza di ittero e intenso prurito, e in questi casi è presente un innalzamento della fosfatasi alcalina e una persistente bilirubinemia, anche quando i valori delle transaminasi ritornano

alla normalità. La prognosi è normalmente di 2-6 mesi ^(6, 108). Nei pazienti che manifestano sintomi simil-influenzali, la malattia è riconoscibile solo con indagini di laboratorio. L'infezione da HEV può essere del tutto asintomatica, ma la frequenza di queste forme non è nota, anche se potrebbe essere molto comune, considerati gli alti valori di sieroprevalenza riscontrati in molti Paesi industrializzati contro la sostanziale rarità dei casi di malattia accertata clinicamente. L'infezione stimola una risposta immunitaria di tipo umorale, con la comparsa nel siero di anticorpi IgM, che sono riscontrabili tra una settimana e due mesi dall'inizio della malattia in oltre il 90% dei pazienti. Anticorpi IgG sono invece riscontrabili nel siero solo successivamente, aumentando di titolo tra la fase acuta e la convalescenza (sierconversione) ^(150, 268, 269, 408). Anticorpi IgG possono persistere per periodi molto lunghi, fino e oltre 14 anni ⁽⁶⁾.

1.7.3 Epidemiologia

Caratteristiche epidemiologiche dei focolai epidemici di HEV sono, come già rilevato nel corso della prima epidemia in New Delhi, alta percentuale di rischio d'infezione nei giovani e letalità molto elevata nelle donne in gravidanza, che arriva fino al 20% ^(191, 290). Pochi studi hanno quantificato l'incidenza dell'epatite E nella popolazione. Alcuni Autori ⁽²⁰⁹⁾ hanno descritto un'epidemia comprendente 1.134 soggetti nel sud del Bangladesh, dove la prevalenza di anticorpi anti HEV era del 22,5%. Sono stati condotti numerosi studi sulla prevalenza di HEV in differenti gruppi di popolazione; in Francia nel 2007 è stata descritta una prevalenza di anticorpi anti-HEV in campioni di sangue di donatori pari al 3,20%, valore simile a quello riscontrato in altri Paesi industrializzati ⁽³⁵⁾. Tuttavia, le informazioni ad oggi disponibili relativamente alla reale diffusione dell'infezione nelle popolazioni umane sono ancora scarse. Il motivo è da imputare alla mancanza di test standard con sensibilità e specificità adeguati in grado di rilevare tutti i ceppi circolanti ⁽²²⁰⁾; inoltre, i test sierologici sviluppati per i genotipi 1 e 2 potrebbero non essere in grado di rilevare con uguale efficienza gli anticorpi prodotti nei confronti degli altri genotipi, nonostante sia sinora accertata l'esistenza di un solo sierotipo.

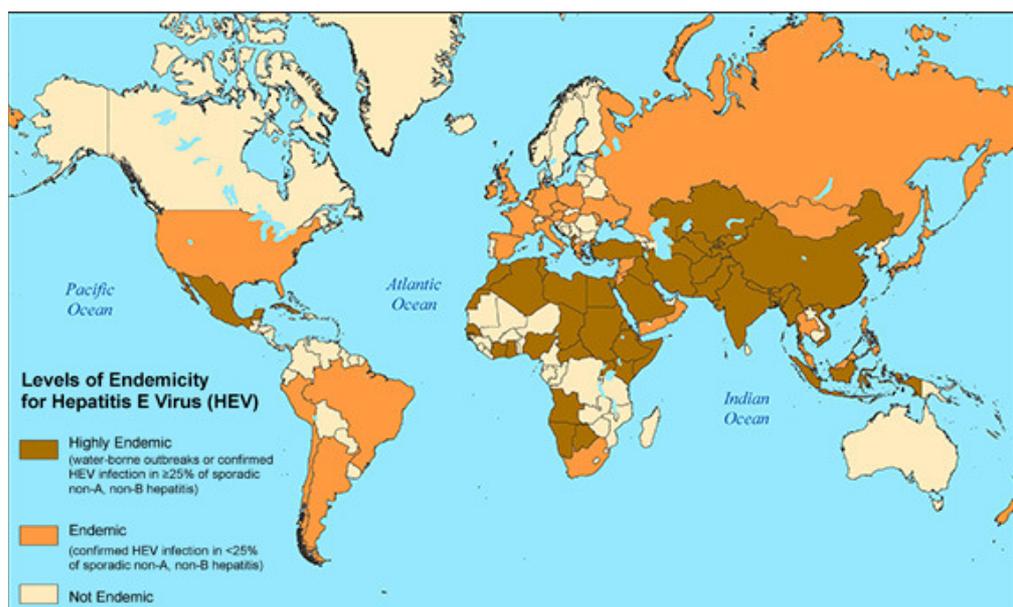
Nonostante ciò, la sieroprevalenza è elevata nella popolazione anche in quei contesti in cui le forme cliniche di epatite E sono rare o non segnalate ⁽²⁷¹⁾.

Si possono riconoscere distinti pattern epidemiologici di infezione da HEV nell'uomo (**Figura 1.17**):

- aree ad alta endemia con focolai epidemici (HEV confermato in $\geq 25\%$ dei casi di epatiti non-A non-B), interessa prevalentemente le aree tropicali e subtropicali;
- aree a bassa endemia o con trasmissione sporadica (HEV confermato in $< 25\%$ dei casi di epatiti non-A non-B), proprio invece dei Paesi industrializzati ^(58, 304, 381);
- aree non endemiche.

La malattia è considerata endemica nei Paesi tropicali e sub-tropicali *in via di sviluppo*, quali gran parte dell'Asia, Nord Africa, Medio Oriente e America centro-meridionale, dove si manifesta anche con episodi epidemici generalmente associati al consumo di acqua contaminata da feci ^(304, 381). In queste aree, i casi coinvolgono ampie fasce d'età, ma i più colpiti sono gli adulti. Infatti, la sieroprevalenza è di circa il 5% nei bambini al di sotto di 10 anni e tende ad aumentare fino al 10-40% negli adulti ^(6, 108, 229, 378).

Figura 1.17. Aree endemiche e non endemiche per la presenza dell'Epatite E (www.cdc.gov/hepatitis/HEV/HEVfaq.htm) ⁽⁵³⁾



Nel sud-est dell'Asia, le epidemie sono per lo più concentrate durante le stagioni delle piogge, quando piogge torrenziali e alluvioni possono, in condizioni igienico-sanitarie generalmente scarse, creare gravi problemi alle reti fognarie e conseguente contaminazione delle acque chiare ^(18, 31, 66, 108, 171, 191, 304, 381). Recenti evidenze in queste epidemie suggeriscono anche una trasmissione persona-persona ⁽³⁸⁴⁾. La trasmissione interumana diretta è ritenuta rara, con bassi tassi di infezione secondaria, attorno al 5% all'interno dei nuclei familiari di soggetti malati ^(6, 58; 108, 169, 227, 228). Questo quadro sembra compatibile con una trasmissione indiretta di tipo ambientale, anche in relazione alle caratteristiche di resistenza del virus escreto con le feci nell'ambiente ⁽⁶⁾.

In alcune regioni dell'Africa (Sudan, Chad, Kenya e Somalia), un numero maggiore di casi di epatite E sono stati descritti in soggetti che vivono in campi profughi o in accampamenti ⁽³⁸⁴⁾, in scarse condizioni igienico-sanitarie. Altri fattori di rischio per le popolazioni dei Paesi in via di sviluppo potrebbero essere rappresentati dalle condizioni di malnutrizione, con conseguente compromissione del sistema immunitario. Questo potrebbe spiegare in parte anche l'alta letalità registrata durante le epidemie di HEV in Africa ⁽³¹⁾. Focolai epidemici di HEV sono stati segnalati anche in gruppi di lavoratori che si spostavano dalle città e andavano a vivere in baraccopoli affollate ⁽³⁵⁵⁾.

L'infezione da HEV è oggi ritenuta un problema emergente nei **Paesi industrializzati**, compresa l'Italia ^(46, 217, 301, 342), nei quali di recente sono stati descritti diversi casi sporadici e piccole epidemie ^(6, 34, 83, 271, 284, 291, 314, 343). Fino a pochi anni fa, la maggior parte dei casi di malattia erano registrati in viaggiatori provenienti da aree del mondo endemiche per HEV. Tuttavia, già nel 1999 ⁽⁴¹³⁾ venne identificata una nuova variante virale considerata autoctona nelle feci di un paziente che non aveva viaggiato né era venuto a contatto con individui di ritorno da zone a rischio. Questo virus presentava analogie nucleotidiche con ceppi americani del genotipo 3, ma non sufficienti a sostenerne l'importazione dagli USA. Studi recenti hanno dimostrato la circolazione del genotipo 1 e del genotipo 3 dell'HEV anche in Italia ⁽²²⁰⁾. Per i casi autoctoni nei Paesi industrializzati, la via di trasmissione più probabile è quella zoonotica da specie animali serbatoio ^(2, 6, 44, 58, 108, 304, 381).

Come altra possibilità di trasmissione di HEV è stata anche considerata la via parenterale tramite trasfusioni, ma le probabilità che questa trasmissione giochi un ruolo importante appaiono molto basse sia nei Paesi in via di sviluppo che in quelli industrializzati ^(17, 187, 304). Tuttavia, sono stati riportati casi di trasmissione diretta da donatore di sangue infetto da HEV ⁽²⁵⁶⁾ e non vanno sottovalutate le sieroprevalenze elevate (52,5% di soggetti positivi per IgG anti HEV) riscontrate tra i donatori di sangue nel sud-est della Francia ⁽²⁴⁵⁾. A tale proposito, le informazioni disponibili sono tuttavia discordanti. In Svizzera, un lavoro condotto da Kaufmann e colleghi ha riscontrato una bassa sieroprevalenza per HEV nella popolazione normale (5,4% negli uomini e 4,1% nelle donne). Questa differenza con quanto descritto in Francia potrebbe sia essere spiegata con una bassa sensibilità dei test commerciali utilizzati nello studio Svizzero, ma gli autori propongono che possa anche dipendere dalla regolamentazione rigorosa degli allevamenti di animali e delle importazioni di carne ⁽¹⁸⁷⁾. La trasmissione verticale dalle donne in gravidanza ai feti è stata ben documentata da Khuroo e colleghi, i quali hanno indagato la presenza d'infezione da HEV in donne gravide, sia sintomatiche che asintomatiche, concludendo che la causa della morte del feto era ascrivibile a un danno epatico causato dalla replicazione di HEV ⁽¹⁹²⁾. Ad oggi, non è stata dimostrata la trasmissione dell'infezione per via venerea.

La sieroprevalenza di anticorpi anti-HEV varia tra il 60% in comunità rurali del sud della Cina ⁽²²⁷⁾, dove HEV rappresenta la maggiore causa di epatite, al 4-10% in Europa ^(25, 148, 243) e USA ^(207, 270). In queste ultime aree, i casi di epatite E sono sporadici ^(38, 217, 342), sebbene siano state descritte alcune piccole epidemie ⁽⁶⁴⁾.

Molti dei casi umani di epatite E descritti in Europa sono causati da virus del genotipo 1 (g1), e vengono messi in relazione a individui con anamnesi di viaggi in aree endemiche. Recentemente, un incremento del numero di casi sporadici di infezione è stato riportato in Europa e in altri Paesi industrializzati ^(33, 44, 82, 217, 244), nei quali il virus implicato apparteneva al genotipo 3 (g3). Dei 4 genotipi di HEV messi in evidenza anche nell'uomo, il g3 è quello che circola anche nelle popolazioni di suini ⁽³⁴³⁾. Sono stati riportati casi sporadici di epatite E causati da ceppi di HEV appartenenti al genotipo g3 in tutto il mondo ^{(19, 44, 58, 81, 95, 121, 158, 169, 204, 220, 226, 267, 296, 304, 336,}

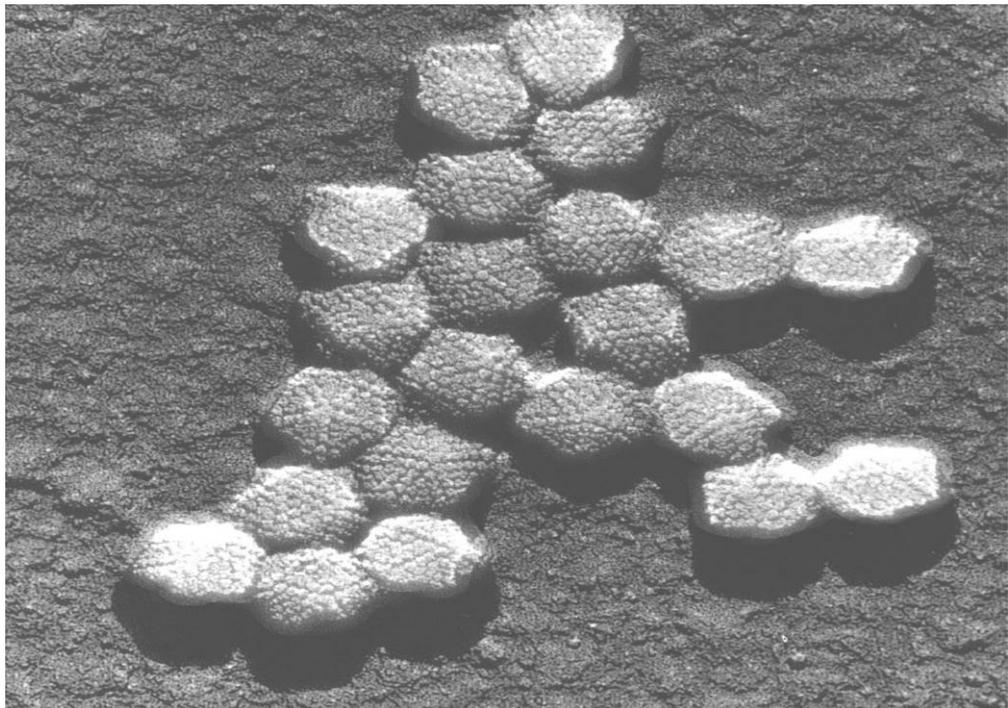
373, 381, 413) in soggetti senza anamnesi di viaggi all'estero, suggerendo che questi casi di malattia siano ascrivibili a virus endemici sul territorio (2, 20, 108, 162, 295, 413).

1.8 GLI ADENOVIRUS

1.8.1 Classificazione e struttura

Gli *Adenovirus* (AdVs) sono particelle prive di envelope, di dimensioni comprese tra 65 e 85 nm; il capside, a simmetria icosaedrica, presenta estroflessioni denominate fibre ed è costituito da 252 capsomeri poligonali: 240 costituiscono le facce ed i lati di triangoli equilateri (esoni) mentre 12 sono i vertici costituiti da capsomeri che, essendo contigui con altri 5, vengono definiti pentoni. Ogni pentone è legato al capside e proietta una singola fibra ad eccezione dei pentoni degli AdVs enterici che proiettano due fibre ⁽²⁶⁾ (*Figura 1.18*).

Figura 1.18. Struttura degli *Adenovirus* al microscopio elettronico (http://www.virology.net/Big_Virology/EM/Adeno-FD.jpg)

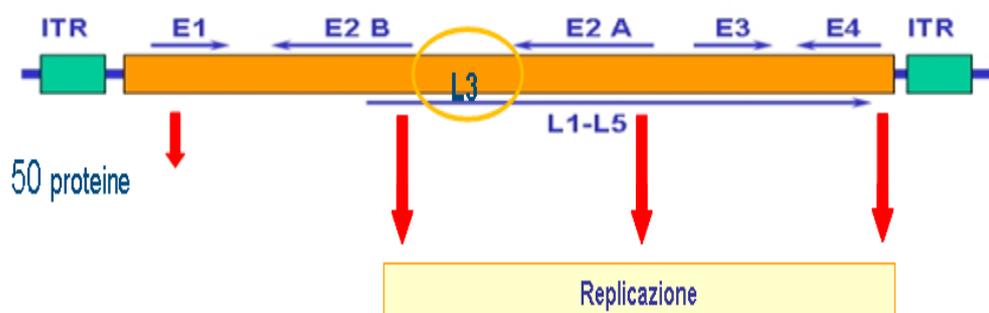


Esoni, pentoni e fibre costituiscono i tre principali antigeni utilizzati nell'analisi di tipizzazione e identificazione. Le 20 facce dell'icosaedro sono formate dalle proteine esoniche costituite da trimeri della proteina II; i vertici sono formati da pentameri della proteina III e le fibre da trimeri della proteina

IV, avvolti in una tripla elica la cui estremità si ripiega formando dei rigonfiamenti (*knob*) coinvolti nell'infettività del virus. Le proteine di adesione sono 11, le principali sono la piccola proteina IIIa che è intercalata tra gli esoni, la proteina IX che tiene insieme gli esoni delle facce, la proteina VI la più interna, ed infine la proteina VIII che ancora gli esoni delle facce al *core*. All'interno del capsid vi è il genoma stabilizzato dal complesso delle proteine *histon-like* V e VII; nel *core* è presente anche la proteasi detta proteina X o adenina.

Il genoma è a doppio filamento lineare (dsDNA) di grandezza variabile da 26 a 45 Kb e comprende 30-40 geni (**Figura 1.19**). All'estremità 5' di ogni filamento c'è una proteina terminale (TP) di 55 kDa legata covalentemente tramite un residuo di serina. Alle due estremità di ogni filamento genomico sono presenti delle sequenze terminali ripetute ed invertite (ITR, *Inverted Terminal Repeats*) di 36-368 bp ⁽¹⁵⁴⁾. Le ITR contengono sequenze in grado di reclutare i fattori responsabili della trascrizione del genoma come la RNA polimerasi II cellulare e il precursore da 80 kDa della proteina TP. Inoltre a livello di queste ripetizioni ci sono sequenze specifiche che serviranno per il *packaging* del DNA nel capsid ⁽²⁶⁾.

Figura 1.19. Organizzazione del genoma degli *Adenovirus*



Durante l'infezione la prima interazione si ha tra i trimeri della proteina IV (dominio *knob* della fibra) con il recettore CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*) degli AdVs umani A, C, D, E, F (ma non B), facente parte della superfamiglia delle immunoglobuline, che si trova sulla superficie delle cellule epiteliali. Altri recettori utilizzati sono CD46, CD80/86, acido

sialico (sierotipi 8, 19a e 37), eparansolfato, proteoglicani. La specificità degli *Adenovirus* dipende sia dalla sequenza amminoacidica della proteina delle fibre che dalla lunghezza delle fibre stesse, determinando il tropismo del virus. La specificità è data anche da una seconda interazione basata sul riconoscimento, da parte del motivo RGD (Arg-Gly-Asp) della base del pentone, di un'altra proteina di membrana chiamata integrina. Si è visto che alcuni AdVs possono usare due tipi d'integrine leganti la vitronectina, l' $\alpha_V\beta_3$ o l' $\alpha_V\beta_5$, determinando quindi una diversa specificità. Avvenuto il riconoscimento, la particella virale, dopo circa 10 minuti dal legame, viene internalizzata con un meccanismo di endocitosi recettore-mediata.

L'espressione genica è principalmente regolata a livello trascrizionale. Il virus utilizza entrambi i filamenti di DNA per trascrivere l'RNA; la maggior parte dei trascritti sono prodotti dall'elica definita "codificante" ed altri dall'elica complementare. Attraverso l'utilizzo di varie regioni di promotori e differenti siti di poliadenilazione, il virus riesce a codificare più di 50 proteine, distinte in due classi temporali: precoci (E, *Early*), sintetizzate prima della replicazione del DNA, e tardive (L, *Late*) sintetizzate dopo la replicazione del genoma virale. Per i geni precoci il virus usa 6 promotori diversi e si possono identificare unità trascrizionali ben definite, dette cassette di trascrizione: E1A ed E1B, che usano due promotori diversi; E2A ed E2B, che usano lo stesso promotore; ed infine le cassette E3 ed E4. La trascrizione dei geni tardivi (L1-2-3-4-5) inizia da un unico promotore definito *Major Late Promoter* (MLP) e porta alla produzione di 18 trascritti ⁽³⁾. Durante la replicazione, vengono espressi per primi i geni della cassetta E1, i quali consentono la transattivazione dei geni delle cassette E2 ed E4. Dalla cassetta E2 vengono sintetizzate le proteine deputate alla replicazione del DNA. Nelle regioni ITR è presente la sequenza Ori che indica l'origine di replicazione del DNA; essa è localizzata in una sequenza di circa 50 nt in entrambe le ITR. Inoltre, in questa sequenza sono presenti siti di legame per fattori trascrizionali e replicativi che aumentano l'efficienza di entrambi i processi, in particolare la trascrizione della cassetta genica E1A, molto vicina alla sequenza Ori. A tali siti si legano la DNA polimerasi virale e la pTP

(precursore della proteina terminale). La pTP facilita l'associazione della polimerasi sulla sequenza Ori e l'attiva, fungendo da primer per la replicazione. Mentre si allunga l'elica copiata sullo stampo, si ha una dislocazione dell'elica complementare. Alla fine del processo si hanno due eliche di DNA completamente replicate; in ultimo la proteasi virale cliva la pTP che rimane legata all'estremità 5' del DNA a doppio filamento. Una volta che la replicazione del genoma è avvenuta, si ha l'espressione dei geni tardivi del virus. A partire da un singolo promotore, si ha la trascrizione di 5 classi di mRNA (L1-L5) che per *splicing* codificheranno per tutte le proteine strutturali del virione. I prodotti dei geni tardivi possono essere così schematizzati:

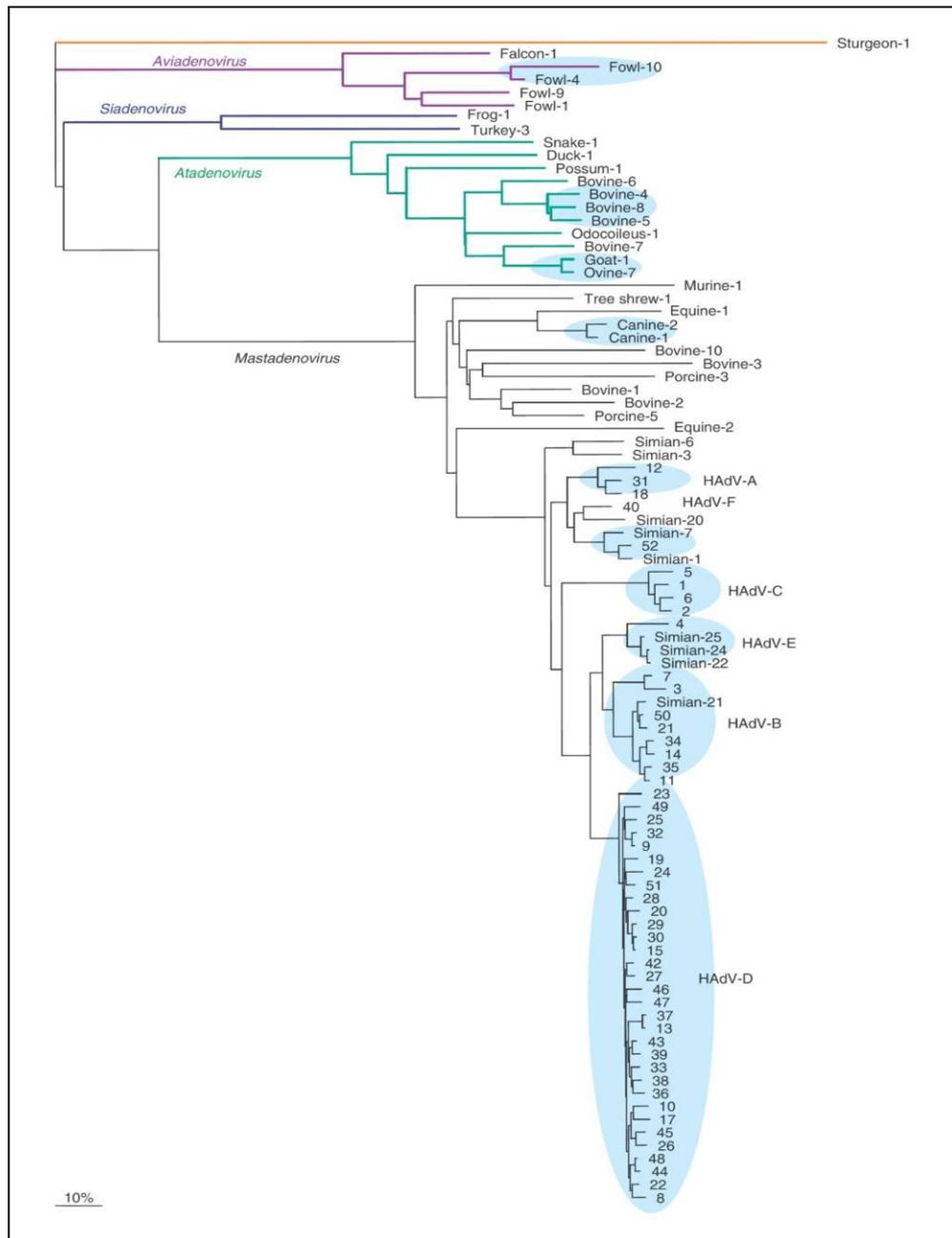
- **L1:** polipeptidi **52/55** kDa e **IIIa**;
- **L2:** polipeptide **III** (base dei pentoni);
- **L3:** polipeptide **II** (esoni) e **proteasi**;
- **L4:** polipeptide **100** kDa;
- **L5:** polipeptide **IV** (fibre).

Attualmente sono stati identificati 146 tipi di virus diversi, tutti raggruppati nella famiglia *Adenoviridae* che comprende 5 generi caratterizzati da diversi spettri d'ospite:

- *Atadenovirus* (*At* acronimo di adenina e timina; infettano bovini ed ovini);
- *Aviadenovirus* (*Avi* dal latino *avis*, uccello; infettano uccelli);
- *Siadenovirus* (*Si* da sialidasi; infettano anfibi, rettili, uccelli: tacchino);
- *Mastadenovirus* (*Mast* dal greco *mastos*, mammella; infettano mammiferi tra cui l'uomo), gruppo più numeroso;
- *Ichtadenovirus* (*Icht* dal greco *ichthys*, pesce; infettano specificatamente lo storione bianco).

Nell'albero filogenetico mostrato in **Figura 1.20**, costruito sulla base delle omologie di sequenze della regione conservata dell'esone, sono rappresentati i 5 generi di AdVs; membri appartenenti a diversi generi sono rappresentati con colori differenti.

Figura 1.20. Albero filogenetico degli *Adenovirus* ⁽¹¹²⁾



I *Mastadenovirus* comprendono gli AdVs umani, rappresentati da 51 sierotipi (AdV1-AdV51) divisi in 6 Specie (A-F) in base alle caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche e 4 gruppi di emoagglutinazione (I-IV) ⁽²⁶⁶⁾, definiti utilizzando le caratteristiche biologiche. La Specie B è divisa inoltre in 2 sotto-Specie, B1 e B2 ⁽³⁹⁸⁾. Ulteriori 4 genotipi (dal 52 al 55), sono stati caratterizzati utilizzando metodi di genomica e bioinformatica. Il tipo 52 (HAdV-G52) identificato e descritto da Jones nel 2007 ⁽¹⁸¹⁾ è stato accettato dall'ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) come il primo

membro della Specie G. Successivamente sono stati caratterizzati altri tre genotipi, tutti ricombinanti, il 53 ed il 54, appartengono alla Specie D, ^(185, 359, 399) ed il 55, identificato come responsabile di una epidemia di malattia respiratoria acuta, alla Specie B ⁽⁴⁰⁰⁾. Alcuni sierotipi producono tumori se inoculati in neonati di criceto, ma l'attività oncogena nell'uomo non è mai stata dimostrata. Il primo sierotipo oncogeno identificato nel criceto, nel 1962, è l'AdV-12 ⁽³⁸⁷⁾. Successivamente, anche i sierotipi 7, 18 e 31 hanno mostrato capacità d'indurre neoplasie nel criceto ^(135, 164, 312). Nella **Tabella 1.7** sono rappresentati i diversi sierotipi e genotipi di AdVs umani suddivisi per Specie.

Tabella 1.7. Sierotipi e genotipi di *Adenovirus* umani divisi per Specie

Specie	Sierotipi	Genotipi
A	12, 18, 31	
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	55
C	1, 2, 5, 6	
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	53, 54
E	4	
F	40, 41	
G		52

Le proprietà chimico-fisiche e strutturali, degli AdVs consentono loro di sopravvivere per periodi prolungati al di fuori delle cellule ospiti. Sono stabili rispetto a molti agenti fisici e chimici come variazioni estreme di pH (*range* tra 5.0 e 9.0). L'infettività è ottimale ad un pH compreso tra 6.5 e 7.4. La stabilità a valori bassi di pH, come quelli delle secrezioni gastriche, consente la loro diffusione per via fecale-orale. Gli AdVs sono resistenti anche ai solventi poiché sono carenti di lipidi nelle loro strutture ⁽²³²⁾. Sono inoltre resistenti al calore (particolarmente l'AdV-4) e possono rimanere infettivi in seguito a congelamento ⁽¹²⁴⁾. L'elevata sopravvivenza in ambienti acquatici è dovuta oltre che alla mancanza di envelope, alla presenza di un capsido

proteico particolarmente resistente in grado di adsorbirsi alle particelle colloidali in sospensione presenti nel mezzo idrico.

Gli *Adenovirus* umani sono stati scoperti nel 1953 dal Dr. Rowe e collaboratori, i quali dimostrarono che l'agente virale individuato in adenoidi e tonsille di un individuo infetto, era in grado di replicarsi in colture cellulari di tessuti primari, provocando effetto citopatico ⁽³⁴⁵⁾. Nel 1954, Hilleman e Werner identificarono agenti virali simili nelle secrezioni di reclute militari con sintomi di malattia respiratoria acuta ⁽⁴⁰⁹⁾. Nel 1956 è stato adottato il nome *Adenovirus*, denotando il tessuto in cui questi virus sono stati per prima scoperti ⁽¹¹³⁾. Lo studio di questi virus ha avuto una grande importanza per la virologia: nel '77 Sharp e Roberts identificarono lo *splicing* degli RNA, meccanismo di maturazione usato dal virus per formare i suoi trascritti ⁽³⁾. Per questa scoperta ai ricercatori fu assegnato il premio Nobel nel '93.

1.8.2. Aspetti clinici

Le manifestazioni cliniche delle infezioni da AdVs sono determinate dal tropismo tissutale dei gruppi e dai sierotipi virali. La patogenicità è legata anche all'inibizione dei meccanismi antivirali indotti dall'interferone; in particolare il virus, grazie alla RNA polimerasi III cellulare, trascrive geni detti VA (Virus Associated); questi corti RNA (150-200 bp) sono coinvolti nel controllo della traduzione attraverso l'inibizione della Protein Kinasi RNA-dipendente (PKR), uno dei *pathway* cellulari attraverso il quale agisce l'interferone. Le principali vie di trasmissione comprendono il contatto fecale-orale (tramite consumo di acqua e/o alimenti contaminati), la via respiratoria (tramite aerosol e/o "goccioline di Flügge") e il contatto indiretto (con oggetti o superfici contaminate).

Le infezioni da AdVs sono associate ad un ampio spettro di sintomi clinici ma possono essere raggruppate in tre principali categorie ⁽²¹¹⁾:

- infezioni dell'apparato respiratorio;
- infezioni oculari;
- infezioni dell'apparato gastroenterico.

La **Tabella 1.8** rappresenta le principali tipologie di malattie causate da AdVs umani.

Tabella 1.8. Patologie associate agli *Adenovirus* umani

Patologia	Sierotipo responsabile
RESPIRATORIA	
Malattia acuta respiratoria febbrile	1, 2, 3, 5, 6
Malattia acuta respiratoria (MAR)	4, 7 (raramente 14 e 21)
Polmonite virale del lattante	4, 7 (raramente 14 e 21)
Polmonite virale negli adulti	4, 7 (raramente 3 e 21)
OCULARE	
Congiuntivite follicolare acuta	3, 7 (raramente 2, 4, 6, 9, 10, 21)
Cheratocongiuntivite epidemica (CCE)	8 (raramente 3, 7, 19, 37)
Febbre acuta faringo-congiuntivale (FAFC)	3, 4, 7 (raramente 1, 2, 5, 6, 14, 21)
GASTROENTERICA	
Gastroenterite	40, 41

Infezioni dell'Apparato Respiratorio:

Le infezioni respiratorie sono ben documentate negli adulti. In genere il 5-6% delle malattie respiratorie diagnosticate clinicamente è provocato da AdVs. Gli AdVs sono responsabili sia di malattie dell'apparato respiratorio superiore (come faringiti, tonsilliti e il comune raffreddore), che dell'apparato respiratorio inferiore (bronchiti, bronchioliti e polmoniti). Le infezioni respiratorie possono verificarsi in forma sporadica o epidemica; sono diffuse in tutto il mondo e si verificano tutto l'anno, sebbene nei climi temperati siano prevalenti in inverno e in primavera. Gli AdVs dal sierotipo 1 al 6 contribuiscono all'eziologia delle malattie respiratorie acute in tutto il mondo, specialmente nei bambini ^(283, 353). Oltre il 5% delle malattie respiratorie, nei bambini inferiori a 5 anni di età, sono il risultato d'infezioni da AdVs; studi sierologici stimano che nei bambini il 10% di tutte le malattie respiratorie

(faringiti e tracheiti) sono determinate dagli AdVs ⁽³⁷⁾; inoltre, l'AdV-7 è stato segnalato come causa di polmoniti e bronchioliti fulminanti ⁽²³⁾.

La malattia acuta respiratoria febbrile è un'infezione che interessa soprattutto i bambini e si manifesta principalmente con febbre, in alcuni casi associata a faringite, tracheite, bronchite e tosse persistente. Sono coinvolti i sierotipi 1, 2 e 5 considerati endemici e il sierotipo 3 che è talvolta epidemico; questi insieme al sierotipo 6 sono responsabili del 5-10% delle malattie respiratorie dell'infanzia, molte delle quali autolimitanti ⁽¹⁷⁹⁾. Oltre il 60% dei bambini in età scolare possiede anticorpi contro i più frequenti sierotipi respiratori ⁽⁸⁵⁾ mentre la maggior parte degli adulti ha anticorpi per i sierotipi da 1 a 7.

La malattia acuta respiratoria (MAR), è una patologia osservata principalmente tra le reclute militari, nei civili adulti si presenta solo in forma sporadica, che si manifesta con congestione nasale, rinorrea, malessere generale, brividi, cefalea, febbre alta e mialgia ⁽⁴⁰⁹⁾. Possono presentarsi anche faringite, raucedine, tosse secca, ed a volte eruzioni eritematose e maculari. La malattia ha un periodo d'incubazione di 5-6 giorni. I sierotipi maggiormente coinvolti sono il 4 ed il 7 (raramente il 14 ed il 21). Il sierotipo 4, sebbene sia presente nelle reclute militari dove causa sporadicamente decessi da polmonite ⁽⁵⁰⁾, non è molto frequente tra i civili ⁽³⁵⁰⁾. La febbre solitamente regredisce in 2-4 giorni mentre la convalescenza può richiedere altri 10-14 giorni. Negli individui immunocompromessi può verificarsi viremia cronica ⁽²⁰¹⁾ ed a causa della polmonite la malattia può progredire e diventare fatale. Negli ultimi anni ha richiamato notevole attenzione l'AdV-14 (Specie B) denominato “*killer cold*” a causa di una mutazione che lo ha reso molto più virulento; come per gli altri AdVs simil-influenzali i sintomi ricordano quelli di una classica influenza (diarrea, febbre, dolori articolari, *etc.*), ma nel 10% circa dei pazienti la malattia evolve e provoca sintomatologie più gravi come la polmonite. Peculiarità di questo “nuovo” AdV-14 è infatti la capacità d'infettare anche giovani immunocompetenti e dal 2007 è stato rilevato un aumento di casi gravi di polmonite seguiti da diversi decessi in comunità militari e civili ⁽⁵¹⁾. I sierotipi responsabili della MAR sono anche in grado di provocare infezioni latenti; infatti possono permanere nelle adenoidi, nelle tonsille ed in altri organi linfoidi come le Placche del Peyer del soggetto infetto; da questi tessuti, in seguito al

verificarsi di condizioni favorevoli, possono riattivarsi e nuovamente diffondere nell'organismo. L'introduzione nel 1971 della vaccinazione, con i sierotipi 4 e 7 per le reclute militari, ha ridotto drasticamente le malattie respiratorie ed in particolare la MAR. La produzione di questi vaccini cessò nel 1996 e la conseguenza fu un considerevole aumento delle epidemie di MAR ^(22, 258). Sono in fase di studio nuovi vaccini da utilizzare per la popolazione militare; per quanto riguarda invece la popolazione civile non sono raccomandati vaccini dalle autorità sanitarie. Sebbene la MAR sia stata inizialmente riconosciuta nelle reclute militari, alcuni studi hanno evidenziato altre classi a rischio in strutture ad alta densità antropica fra cui college, asili e case di cura ⁽⁴⁹⁾.

La polmonite virale del lattante è una manifestazione clinico-patologica rara che in alcuni casi può risultare letale. Si manifesta principalmente nei reparti di maternità degli ospedali; i sintomi della polmonite adenovirale includono febbre, tosse, dispnea e respiro sibilante ⁽²³²⁾. Piccole epidemie sono state documentate in Francia, in Sud Africa, negli USA, in Cina ed in Giappone. Il sierotipo principalmente coinvolto è il 7 (raramente i sierotipi 1 e 3).

La polmonite virale negli adulti è una manifestazione clinica non comune, spesso associata con la MAR. Gli AdV-3 e 7 sono stati individuati come responsabili di focolai di polmonite severa o fatale sia nei bambini che nelle reclute militari ⁽¹¹⁶⁾.

Infezioni Oculari:

La cheratocongiuntivite epidemica (CCE) è una malattia epidemica altamente contagiosa osservata in Giappone, in USA, in Europa e in Asia, che colpisce soprattutto gli adulti; caratterizzata da una grave infiammazione della congiuntiva e della cornea. La CCE inizialmente è stata definita come "*Shipyard Eye*" poiché descritta per la prima volta, nel 1941, in lavoratori di un cantiere navale nel porto di San Francisco ⁽⁴⁰⁹⁾. La CCE si trasmette per contatto diretto ed il periodo d'incubazione varia da 5 a 10 giorni; ha inizio con un edema della palpebra, lacrimazione e fotofobia; l'occhio appare arrossato e chemotico, successivamente mostra rigonfiamento periorbitale, linfoadenopatia preauricolare e opacità corneali superficiali. L'altro occhio può essere coinvolto nell'arco di 7 giorni e la malattia si risolve entro 3-4

settimane anche se si sono registrate guarigioni dopo alcuni mesi e si possono verificare recidive; possibili complicanze includono la congiuntivite emorragica. La terapia è a base di colliri cortisonici che si dimostrano estremamente efficaci. La congiuntivite può essere sporadica o epidemica. Il sierotipo principale associato alle epidemie di CCE è il 37 ⁽¹⁸⁹⁾ sebbene siano stati rinvenuti anche i sierotipi 8 e 19. Epidemie di CCE sono frequentemente descritte negli ambulatori di oftalmologia ⁽¹⁹³⁾, dove la diffusione può avvenire attraverso una sterilizzazione insufficiente degli strumenti ⁽¹⁹⁹⁾, manipolazione diretta dell'occhio o attraverso l'uso di soluzioni oculari. È stata documentata inoltre una diffusione secondaria che avviene tra membri della famiglia stessa (trasmissione per contatto diretto o contatto con superfici contaminate).

La febbre acuta faringo-congiuntivale (FAFC) è una malattia caratterizzata da febbre, faringite e congiuntivite che si manifesta in forma epidemica nei bambini e sporadica negli adulti; le infezioni da FAFC sono spesso di origine idrica. Il periodo d'incubazione è di 5-10 giorni. In una tipica epidemia il 50% dei pazienti possiede tutti e tre i componenti della triade clinica (febbre, faringite e congiuntivite), mentre gli altri ne presentano uno o due. La congiuntivite è inizialmente unilaterale e talvolta dolorosa; la malattia abitualmente recede nell'arco di una settimana, ma per diversi giorni può persistere una congiuntivite follicolare.

La congiuntivite follicolare acuta è una malattia sporadica che colpisce soprattutto gli adulti. I sintomi di questa sindrome includono congiuntivite unilaterale o bilaterale, mal di gola e febbre elevata. La malattia generalmente persiste dai 5 ai 7 giorni ma non produce danni oculari permanenti ⁽²³²⁾. Il sierotipo prevalentemente coinvolto è il 3 anche se sono stati isolati i sierotipi 7 e 14 ⁽⁴⁰⁹⁾. Spesso, la congiuntivite follicolare è contratta in piscine inadeguatamente clorate ed è più frequente nel periodo estivo essendo associata ai campi estivi, piscine e laghetti; l'acqua facilita l'accesso del virus sia agli occhi che alle alte vie respiratorie. È possibile anche una diffusione secondaria, per contatto interpersonale; sebbene gli adulti che contraggono la malattia per via secondaria hanno tendenza ad avere sintomi più lievi, in genere solo la congiuntivite ⁽²⁶⁶⁾.

Infezioni dell'Apparato Gastroenterico:

Gli AdVs “enterici” si replicano attivamente negli enterociti del tratto intestinale e vengono pertanto espulsi con le feci in elevate concentrazioni. I sierotipi 40 e 41, appartenenti alla Specie F, sono i principali responsabili della maggior parte delle gastroenteriti infantili, secondi soltanto ai *Rotavirus* come causa primaria della gastroenterite nei bambini ^(356, 398). Recentemente anche l'AdV-31, strettamente correlato con gli AdV-40 e 41 è associato con la gastroenterite infantile ⁽³²⁰⁾. La diarrea, in genere associata con la febbre, può durare fino a 2 settimane. È stato stimato che gli AdV-40 e 41 contribuiscono dal 5% al 20% delle ospedalizzazioni, per diarrea, nei Paesi sviluppati ⁽²²⁵⁾. Bambini di età inferiore ai due anni sono più vulnerabili all'infezione, anche se diverse epidemie sono state documentate negli adulti, in strutture ad elevata densità (centri di assistenza, ospedali, caserme e piscine). Poiché gli AdVs sono stabili nell'ambiente esterno e si replicano nell'intestino dei pazienti, tutte le pratiche d'igiene e disinfezione accurata sono fondamentali nella prevenzione ⁽¹⁷⁹⁾. La più alta percentuale d'infezione è presente in bambini che hanno meno di 6 mesi ⁽⁸⁸⁾.

Altre Patologie:

Oltre ai principali gruppi di patologie descritti in precedenza, gli AdVs possono determinare una serie di manifestazioni cliniche, croniche ed acute, che includono: ostruzione cronica delle vie aeree, displasia polmonare, miocardite (sierotipi 7 e 21), cardiomiopatia dilatatoria, pericardite, sindrome mononucleosi-simile, intussuscezione, meningoencefalite, sindrome della morte improvvisa del lattante, sindrome da tosse sibilante, malattie veneree (AdV-2), fibrosi interstiziale cronica, malattia rubeoliforme, obesità e diabete ^(390, 391), cistite emorragica acuta.

I sierotipi 11 e 21 sono associati con la cistite emorragica acuta, che colpisce più spesso pazienti che hanno subito un trapianto renale ⁽³⁰⁾; in tali pazienti la mortalità è elevata (18%). Il virus può essere introdotto con l'organo trapiantato o contratto in seguito a trattamenti immunosoppressivi. La cistite è più frequente nel sesso maschile ed è associata con ematuria ⁽⁴⁰⁹⁾. La meningoencefalite, causata dai sierotipi 3, 5, 6, 7 e 12, è più frequente negli ospiti immunocompromessi che negli individui sani; infatti la severità della

malattia dipende principalmente dallo stato del sistema immunitario dell'ospite al momento dell'infezione. Quindi, sebbene le infezioni da AdVs possono risultare lievi o asintomatiche, negli immunocompromessi tendono ad essere più prolungate, gravi, e talvolta fatali; causando meningoencefaliti, coliti, pancreatiti, epatiti e polmoniti ⁽³⁴⁸⁾. Anche le coinfezioni con più di un sierotipo adenovirale sono maggiormente frequenti nei pazienti immunocompromessi (30%) rispetto ai pazienti immunocompetenti (5%). Differenti gruppi di immunocompromessi mostrano una diversa suscettibilità alle differenti Specie del virus: bambini con SCIDS (*Severe Combined Immunodeficiency Syndrome*) sono suscettibili ai sierotipi 1, 7 e 31 mentre bimbi con trapianti di midollo osseo ai sierotipi delle Specie A, B, C ed E. Gli adulti con trapianti di rene si infettano quasi sempre con gli AdVs della Specie B, in modo particolare AdV-11, 34 e 35. I sierotipi comunemente isolati da pazienti con AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) sono l'AdV-11, 16, 21, 34 e 35 ⁽¹⁶⁰⁾. In questi pazienti sono state documentate infezioni provocate da tutte le specie e da tutti i sierotipi di AdVs, ma i sierotipi dal 42 al 49 ed il 51, così come il sierotipo 50 (Sotto-Specie B1), sono stati riscontrati solo in pazienti con AIDS ^(89, 124). Gli AdVs enterici sono raramente isolati in pazienti immunocompromessi con gastroenterite o diarrea ⁽¹⁰⁵⁾. In generale, è stato stimato che il 12 % dei pazienti immunocompromessi vengono infettati da AdVs ed il 45% di queste infezioni terminano con il decesso entro il secondo mese ⁽¹⁶¹⁾.

1.8.3 Epidemiologia

La diffusione degli AdVs in ambienti idrici (acque reflue, acque trattate provenienti dai depuratori urbani, acque superficiali destinate ad uso ricreativo ed acque destinate alla potabilizzazione) è ampiamente documentata ^(211, 266). La **Tabella 1.9** mostra le epidemie di origine idrica causate dagli AdVs. In alcuni casi il patogeno è stato identificato sia nel paziente che nella matrice idrica.

Tabella 1.9. Epidemie di origine idrica associate agli *Adenovirus*

Anno	Località	Specie/Sierotipo	Tipologia d'acqua	Bibliografia
1951	Colorado	B/3	uso ricreativo	Cockburn (1953)
1966	Washington	B/3	uso ricreativo	Foy <i>et al.</i> (1968)
1977	Georgia	E/4	uso ricreativo	D'Angelo <i>et al.</i> (1979)
1977	Georgia	B/3	uso ricreativo	Martone <i>et al.</i> (1980)
1982	Oklahoma	B/7	uso ricreativo	Turner <i>et al.</i> (1987)
1995	Grecia	n.i.	uso ricreativo	Papapetropoulou & Vantarakis (1998)
1995 ^a	Finlandia	n.i.	potabile	Kukkula <i>et al.</i> (1997)
2000	Australia	B/3	uso ricreativo	Harley <i>et al.</i> (2001)
2004 ^a	Albania	n.i.	potabile	Divizia <i>et al.</i> (2004)
2007 ^a	Finlandia	A-C-F/n.i.	potabile	Räsänen <i>et al.</i> (2010)
2008	Spagna	E/4	uso ricreativo	Artieda <i>et al.</i> (2009)

^aIn queste epidemie gli AdVs sono in associazione con altri virus enterici nella matrice idrica. n.i.= non identificato

In particolare l'epidemia di origine idrica da AdVs, descritta in Colorado nel 1951 ⁽⁵⁹⁾ rappresenta la prima epidemia di febbre faringo-congiuntivale descritta in piscine natatorie; un'altra epidemia di febbre faringo-congiuntivale, provocata da un AdV-3, è stata descritta nel 1968 da Foy e collaboratori ⁽¹²³⁾; gli autori hanno ipotizzato la contaminazione fecale delle acque (non trattate con cloro) come sorgente di contaminazione. Un'ulteriore epidemia di febbre faringo-congiuntivale, in una piscina privata in Georgia ⁽⁸⁴⁾, fu causata da un AdV-4. L'epidemia coinvolse 72 soggetti da alcuni dei quali fu isolato il virus; anche nelle acque della piscina ne furono isolati. Anche in questo caso si evidenziò un inadeguato livello di clorazione nell'impianto. Nella stessa località e nello stesso anno un'epidemia descritta da Martone e collaboratori nel 1980 ⁽²⁵⁵⁾ coinvolse 105 casi con febbre, mal di gola, raffreddore e congiuntivite. Il sierotipo 3 fu identificato come agente causale dell'infezione. Si dimostrò che problemi nel sistema di filtraggio della piscina e malfunzionamento del sistema di clorazione (con livello di

cloro in acqua inferiore a 0,4 mg/L) furono cause dell'epidemia. Gli autori hanno ipotizzato che, dopo un iniziale ruolo dell'acqua nell'insorgenza dell'infezione, l'epidemia si propagò successivamente per contatto diretto persona-persona. Turner ha descritto nel 1987 una epidemia di faringite acuta in 77 bambini frequentatori di una piscina comunale in Oklahoma (USA); i sintomi prevalenti risultarono febbre, raffreddore, dolori addominali e congiuntivite. Nei tamponi faringei fu rilevato il sierotipo 7⁽³⁸⁸⁾. Nel 1995, in Grecia, 80 atleti che parteciparono ad una gara sportiva, manifestarono i classici sintomi della febbre faringo-congiuntivale; gli *Adenovirus* vennero identificati nelle acque della piscina mediante metodi molecolari ma il sierotipo non venne identificato⁽³⁰⁵⁾. In seguito venne dimostrato che i livelli del cloro nella piscina risultavano inadeguati (< 0,2 mg/L). Nel medesimo anno, in Finlandia, è stata notificata un'epidemia di gastroenterite che ha coinvolto circa 3000 individui a seguito dell'utilizzo di acqua potabile in cui furono rilevati gli AdVs, insieme a NoVs e *Rotavirus* dei gruppi A e C⁽²⁰⁵⁾. Nell'epidemia da *Adenovirus*, verificatasi nel 2000 in un campo scuola di North Queensland (Australia), il sierotipo coinvolto fu il 3⁽¹⁵³⁾. Anche in questo caso le acque della piscina risultarono inadeguatamente clorate. L'epidemia del 2007, descritta da Räsänen ha interessato 50 bambini con gastroenterite acuta provocata dal consumo di acqua potabile contaminata da liquami; nel 12% dei casi è stata rilevata la presenza di AdVs⁽³²⁸⁾. L'epidemia più recente è stata la febbre faringo-congiuntivale che nel 2008 ha colpito 59 bambini che frequentavano una piscina comunale che si è dimostrata insufficientemente clorata⁽¹⁴⁾.

Capitolo 2

OBIETTIVI DELLA TESI

Gli alimenti sono stati identificati come veicolo di malattie enteriche di origine virale fin dagli anni '50 ma i rischi epidemiologici relativi a questo tipo di contaminazione sono ancora poco conosciuti, anche a causa della mancanza all'interno della Comunità Europea di metodi diagnostici standardizzati per la determinazione di tali agenti patogeni.

L'elaborazione di protocolli per la determinazione dei virus enterici ha incontrato molte difficoltà sia per la bassa carica virale che per la presenza negli alimenti di molecole che interferiscono con le metodologie utilizzabili.

Gli alimenti responsabili delle epidemie virali a trasmissione fecale-orale sono molteplici e vanno dall'acqua, che rappresenta una delle principali fonti d'infezione, al latte, alla carne, alla frutta; un ruolo particolarmente importante è rivestito dai prodotti vegetali e dai prodotti della pesca (soprattutto molluschi eduli lamellibranchi) in ragione del fatto che possono essere consumati crudi.

La mancanza di normative che prevedano la ricerca di virus enterici a garanzia della salubrità degli alimenti, nasce dalla assenza di un metodo di analisi sufficientemente sensibile e semplice da essere usato nelle svariate realtà operative. Tale carenza ha impedito di effettuare controlli standardizzati che forniscano l'incidenza delle contaminazioni di origine virale negli alimenti.

Le difficoltà derivate dalla messa a punto di metodi diagnostici applicabili su larga scala al controllo routinario delle contaminazioni virali negli alimenti, hanno suggerito a diversi ricercatori l'esigenza di individuare un organismo indicatore di facile determinazione, che risultasse strettamente correlato alla presenza di contaminanti virali di origine umana.

A tale scopo è stato proposto l'utilizzo di vari organismi sia di origine batterica (coliformi, *E. coli* e streptococchi fecali) che di origine virale (colifagi, fagi F+, fago del *Bacteroides Fragilis* e *Adenovirus*)^(156, 221, 242, 316).

I virus enterici mostrano, però, una più elevata resistenza nell'ambiente rispetto ai batteri, d'altro canto, in acque batteriologicamente molto contaminate, il reperimento di virus è spesso molto scarso a causa dell'azione inattivante dei metaboliti batterici.

È stata inoltre recentemente dimostrata, in un'indagine compiuta su campioni di MEL prelevati in diverse aree del Mar Adriatico, la mancanza di correlazione tra presenza di fagi e di virus enterici⁽⁷⁴⁾.

L'Area Diagnostica Virologica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" da alcuni anni si occupa della ricerca di virus enterici, nell'ambiente,

nell'acqua, nei molluschi e più recentemente anche nei vegetali, impiegando sia sistemi integrati di metodiche tradizionali, che si basano sull'utilizzo di colture cellulari, sia metodiche di biologia molecolare.

Obiettivi della presente tesi, sviluppata presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, sono stati:

- 1) reperimento e preparazione di linee cellulari permissive per i virus coltivabili fra quelli ricercati (HAV, *Enterovirus*, *Adenovirus*);
- 2) reperimento e preparazione degli stock di virus di riferimento che si intende monitorare nel corso dell'indagine: Virus dell'Epatite A, Norwalk virus, *Enterovirus*, Virus dell'Epatite E, *Adenovirus*;
- 3) preparazione di controlli positivi per le prove diagnostiche;
- 4) individuazione dei CDM e CSM esistenti nel territorio regionale;
- 5) confronto di differenti protocolli operativi per l'estrazione/concentrazione dei virus enterici eventualmente presenti nei MEL;
- 6) confronto di differenti metodologie di estrazione genomica;
- 7) valutazione delle performance operative attraverso la partecipazione a Circuiti Interlaboratorio;
- 8) messa a punto e confronto di varie metodiche di RT-PCR/PCR Classica e Real Time per la determinazione dei virus enterici;
- 9) raccolta dei campioni. Si prevede di controllare MEL prelevati da impianti di mitilicoltura, centri di depurazione/spedizione ed esercizi commerciali della Regione Sicilia, nonché acque di allevamento dei MEL del territorio regionale;
- 10) acquisizione di dati sulla epidemiologia (prevalenza e diversità genetica) dei *Norovirus* e dell'HAV nei MEL e nelle acque nel territorio siciliano, applicando protocolli analitici in linea con le indicazioni fornite da network nazionali e/o comunitari;
- 11) concomitante valutazione della presenza nei MEL e nelle acque di altri virus di origine enterica responsabili di patologie nell'uomo, quali *Enterovirus*, HEV e *Adenovirus*.

I risultati della ricerca contribuiranno ad ampliare le conoscenze riguardo il problema delle contaminazioni virali dei molluschi e delle acque di allevamento e potranno essere utilizzate come supporto scientifico per ottimizzare la legislazione in tema di sicurezza alimentare prevedendo l'implementazione del sistema di autocontrollo attraverso

l'applicazione di controlli virologici sistematici degli impianti di allevamento, depurazione e distribuzione dei MEL.

I dati e la tecnologia sviluppata nel corso del progetto verranno messi a disposizione del Servizio Sanitario Nazionale. Tali dati saranno a disposizione anche degli operatori del settore molluschicoltura e saranno divulgati tramite pubblicazioni a carattere scientifico. I risultati attesi da questa ricerca sottolineano l'importanza di un approccio coordinato al fine di definire con esattezza l'entità del problema e disporre di un panel diagnostico completo e validato. Inoltre, impiegando nel progetto sia metodiche biomolecolari che di isolamento virale in colture cellulari, sarà possibile integrare e confrontare i risultati ottenuti da approcci diagnostici diversi.

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

I materiali e metodi di seguito riportati costituiscono parte integrante degli obiettivi e dei risultati di tale lavoro, essendo frutto di elaborazione ed approfondimenti della bibliografia nazionale ed internazionale e successivamente della messa a punto, standardizzazione e stesura di protocolli di lavoro. Costituendo, però, attività propedeutica all'esecuzione delle analisi, si è ritenuto opportuno inserirli in questo capitolo a sé stante.

3.1 REPERIMENTO E PREPARAZIONE DI LINEE CELLULARI PERMISSIVE

Sono state scelte fra le linee cellulari già disponibili presso il laboratorio quelle maggiormente idonee, sensibili e permissive, all'isolamento degli agenti virali coltivabili fra quelli oggetto di studio: Virus dell'Epatite A (HAV), *Enterovirus* e *Adenovirus* umani di provenienza enterica. Tali substrati cellulari sono, quindi, stati opportunamente amplificati al fine di ottenerne una quantità sufficiente alla conduzione del progetto. Poiché ad oggi non sono disponibili sistemi cellulari efficienti e riproducibili per la crescita di *Norovirus* e Virus dell'Epatite E (HEV), anche se qualche progresso è stato recentemente fatto in questo campo ^(146, 300, 368, 376, 377), la loro ricerca è stata realizzata solo attraverso metodiche di biologia molecolare.

Le linee cellulari selezionate e utilizzate nel corso del progetto si sono differenziate a seconda degli agenti virali da isolare e/o titolare:

- HAV: **FRhK-4, FrP3.**
- *Enterovirus*: **BGM.**
- *Adenovirus*: **A549, Hep 2.**

FRhK-4 (*Fetal Rhesus monkey Kidney*): specie Monkey, origine American Type Culture Collection, Rockville Md (USA) acquisite da: Laboratorio Centro Substrati Cellulari dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia (BS). Morfologia Epiteliale, passaggio BS77.

Applicazione: isolamento del *Virus dell'Epatite A*.

Propagate con terreno Dulbecco's modified Eagle's medium + 10% Siero bovino fetale; split finale 1:2. Il 31/01/2003 stoccati in azoto liquido 6 cryotubes, passaggio

77BS/3PA, contenenti 3.8×10^6 di cellule. Da questi sono stati ottenuti i monostrati cellulari necessari per l'analisi dei campioni.

FrP3 (*Fetal rhesus monkey kidney, FRhK-4 derivative*): specie Monkey, derivate da clone FRhK 4 origine Istituto Superiore di Sanità Roma; acquisite da: Laboratorio Centro Substrati Cellulari dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia (BS). Morfologia Epiteliale, passaggio BS30.

Applicazione: isolamento del *Virus dell'Epatite A*.

Propagazione con terreno Dulbecco's modified Eagle's medium + 10% Siero bovino fetale; split finale 1:2 / 1:3. Il 31/01/2013 stoccati in azoto liquido 8 cryotubes, passaggio 30BS/3PA, contenenti 3.5×10^6 di cellule. Da questi sono stati ottenuti i monostrati cellulari necessari per l'analisi dei campioni.

BGM (*Buffalo green monkey kidney*): specie Monkey, origine Flow Laboratories, Irvine (BG), acquisite da: Laboratorio Centro Substrati Cellulari dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia (BS). Morfologia Fibroblastica, passaggio BS87.

Applicazione: *Poliovirus 1-2-3*; *ECHO viruses 3-6-7-9-11-12-27*; *Coxsackie viruses A9-B1-2-3*; Reovirus 1; Rotavirus SA11; Chlamydia.

Propagate con terreno Eagle's minimum essential medium in Earle's BSS + 10% Siero bovino fetale; split finale 1:3. Il 25/01/2013 stoccati in azoto liquido 8 cryotubes, passaggio 87BS/3PA, contenenti 3.6×10^6 di cellule. Da questi sono stati ottenuti i monostrati cellulari necessari per l'analisi dei campioni.

A549 (*Human lung carcinoma*): specie Human origine American Type Culture Collection, Rockville Md (USA) acquisite da: Laboratorio Centro Substrati Cellulari dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia (BS). Morfologia Epiteliale, passaggio BS88.

Non contaminate da: EBV, HBV, HCV, HCMV, HIV, HTLV.

Applicazione: *Adenovirus umani*, produzione di lecitina; espressione xenobica da metabolismo enzimatico.

Propagate con terreno Ham's F 12 Kaighn's Modification + 10% Siero bovino fetale; split finale 1:2. Il 18/01/2013 stoccati in azoto liquido 4 cryotubes, passaggio 88BS/3PA, contenenti 4.2×10^6 di cellule. Da questi sono stati ottenuti i monostrati cellulari necessari per l'analisi dei campioni.

Hep 2 (*Human larinx epidermoid carcinoma, HeLa derivative*): specie Human origine American Type Culture Collection, Rockville Md (USA) acquisite da: Laboratorio Centro Substrati Cellulari dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia (Bs). Morfologia Epiteliale, passaggio Bs 434.

Virus suscettibili: Polivirus - 1; Adenovirus - 3; Vesicular Stomatitis Virus (Indiana strain); herpes simplex e respiratory syncytial viruses.

Applicazione: *Adenovirus umani*, espressione xenobica da metabolismo enzimatico.

Non contaminate da: EBV, HBV, HCV, HCMV, HIV, HTLV; HeLa markers.

Propagate con terreno Eagle's minimum essential medium in Earle's BSS + 10% Siero bovino fetale; split finale 1:3. Il 18/01/2013 stoccate in azoto liquido 20 cryotube, passaggio 434Bs/3Pa, contenenti 3.5×10^6 di cellule.

3.2 REPERIMENTO E PREPARAZIONE DEGLI STOCK DI VIRUS DI RIFERIMENTO

Sono anche stati reperiti i ceppi virali di riferimento da utilizzare come controlli positivi nelle prove di laboratorio (*Tabella 3.1*).

Tabella 3.1. Elenco dei ceppi virali di riferimento

Identificativo	Identificativo ATCC	Organismo	Titolo	Volume (ml)	Data Isolamento	Origine
91, stock III, A-25, C4	2089-VR	Hepatitis A virus HM-175 (enterovirus 72)	--	0.2	1981	Australia
IZS-BS 2° Frp3 (da IZS Roma Lotto N° 4)	1402-VR	Hepatitis A virus HM-175/18F	$10^{5.74}$ TCID ₅₀ /0,1 ml	0.7	--	--
HAV RNA-EC Plasmidico	ISS	Hepatitis A	10^6 - 10^8 copie/ μ l	50 μ l	21/03/2014	Roma
146/1316, II, A-22, F9	ISS	Adenovirus 2	10^6 CCID ₅₀ /ml	1.8	1995	Roma
64, stock III, A-25, G5	931-VR	Adenovirus 40 strain Dugan	$10^{3.5}$ TCID ₅₀ /0.2 ml	0.1	1979	Netherland
65, stock III, A-5, H5	930-VR	Adenovirus 41 strain TAK	$10^{3.5}$ TCID ₅₀ /0.2 ml	0.1	1973	Netherland
--	--	Norovirus GI 316/09 (feci)	--	1.0	2009	Sicilia
NoVGI RNA-EC Plasmidico	--	Norovirus GI	10^6 - 10^8 copie/ μ l	50 μ l	21/03/2014	Roma
--	--	Norovirus GII (feci)	--	0.6	2006	Sicilia
2006b	--	Norovirus GII (feci)	--	1.0	2006	Brescia
5449/2009	--	Norovirus GII (feci)	--	1.0	2009	Sicilia
246/09	--	Norovirus GII GII.4 v2006b (feci)	--	1.0	2009	Sicilia
NoVGII RNA-EC Plasmidico	--	Norovirus GII	10^6 - 10^8 copie/ μ l	50 μ l	21/03/2014	Roma
673	ISS	Norovirus GIV.1 (feci)	--	100 μ l	2006	Roma
675	ISS	Norovirus GIV.1 (feci)	--	100 μ l	2006	Roma
682	ISS	Norovirus GIV.1 (feci)	--	100 μ l	2006	Roma
SW L45	--	Virus Epatite E Suino; (feci)	--	2.0	2012	Roma
8	ISS	Virus Epatite E GI (feci)	--	100 μ l	--	Roma
16	ISS	Virus Epatite E GI (feci)	--	100 μ l	--	Roma
85/829 III, A-32, F8	37-VR	Echovirus 7	--	2.0	1954	Ohio
45/610, III, A-25, D6	322-VR	Echovirus 30; strain Bastianni	10^{7-16} /100 μ l	1.5	1963	USA
75/825, III, A-32, E8	30-VR	Coxsackievirus B3, Nancy	--	2.0	1949	Connecticut
Albert Bosch (Università Barcellona)	1597-VR	Mengovirus; strain MC ₀	3.2×10^5 TCID ₅₀ /ml	1.0	2007	--

I ceppi virali di riferimento, laddove possibile (HAV, Echovirus 30, *Adenovirus*), sono stati amplificati nelle linee cellulari maggiormente idonee (permissive), applicando la modalità specifica in funzione delle caratteristiche biologiche del virus in oggetto (come descritto al punto 3.9). L'infettività del ceppo virale amplificato è stata saggiata quantitativamente in monostrati cellulari, esprimendo il titolo del virus in TCID₅₀/25 µl (come descritto al punto 3.3).

3.3 PREPARAZIONE DI CONTROLLI POSITIVI

I ceppi virali di riferimento di HAV, Echovirus 30 e *Adenovirus*, dopo essere stati amplificati nelle idonee linee cellulari, applicando la modalità specifica in funzione delle caratteristiche biologiche del virus (come descritto al punto 3.9), sono stati aliquotati in criotubes in ragione di 700 µl/criotube e sono stati conservati in contenitori di azoto liquido. Dopo almeno una notte in azoto ne è stata saggiata la carica virale in monostrati cellulari, esprimendo il titolo del virus in TCID₅₀/25 µl. Una volta titolati, tali ceppi di riferimento sono stati utilizzati come controlli positivi per le prove di biologia molecolare.

Titolazione Virale su Monostrato Cellulare mediante determinazione della TCID₅₀:

- 1) Predisporre il foglio di lavoro “*Titolazione Ceppo Virale*” seguendo lo schema indicato nell’**APPENDICE C** per le modalità di distribuzione in piastra.
- 2) Siglare la piastra corrispondente riportando: titolazione, sigla del virus in esame, diluizioni della sospensione virale in esame (12 repliche per ogni diluizione), controllo cellule (12 repliche) e data di esecuzione analisi.
- 3) Prelevare una fiala del virus in esame dall’azoto liquido. Scongelare rapidamente la fiala a bagnomaria a $\cong +37^{\circ}\text{C}$.
- 4) A partire da questo step eseguire il lavoro in sterilità sotto cappa a flusso laminare. Distribuire 25 µl di terreno di mantenimento (**APPENDICE A**) nei pozzetti delle diluizioni del virus e 50 µl nei pozzetti controllo cellule.
- 5) Allestire diluizioni in base 10, da 10^{-1} a 10^{-7} , della sospensione virale in idoneo terreno di diluizione (**APPENDICE A**).
N.B.: qualora il virus presenta un titolo maggiore o uguale a 10^{-7} , ripetere la prova allestendo ulteriori diluizioni in base 10 fino ad ottenere una diluizione idonea per la determinazione del titolo virale (da 10^{-1} a $10^{-10}/10^{-14}$).
- 6) Distribuire 25 µl per pozzetto di ogni diluizione della sospensione virale in 12 repliche, partendo dalla più elevata.

- 7) Aggiungere 50 µl di sospensione cellulare pari a 2×10^5 cellule/ml in tutti i pozzetti della piastra iniziando dal controllo cellule e proseguendo con le diluizioni, partendo anche questa volta dalla più elevata.
- 8) Incubare a $\cong +37^\circ\text{C}$ in atmosfera umida a $\cong 5\%$ di CO_2 ;
- 9) Eseguire la lettura alle 72 h (*Enterovirus, Adenovirus*) o dopo 10 gg. (HAV). Talvolta può essere necessario protrarre il tempo di osservazione della prova. Le colture cellulari di controllo devono rimanere indenni per tutto il periodo di incubazione.

Raccolta dei risultati

I risultati, registrati in base alla produzione di ECP nelle colture inoculate, vengono riportati su apposito foglio di lavoro “*Titolazione Ceppo Virale*”.

Vengono considerati positivi i pozzetti che presentano anche un solo focolaio di ECP.

Per il calcolo del titolo virale, riportare gli esiti della lettura nell'apposito foglio di lavoro “*Calcolo Titolo Virale (metodo Reed e Muench)*” e consultare l'**APPENDICE D**.

Il metodo di calcolo applicato è quello di Reed e Muench.

APPENDICE A

Terreno di mantenimento:

I terreni di coltura impiegati per l'esecuzione di tale procedura variano in funzione del monostrato cellulare e del ceppo virale da titolare; quello di più frequente utilizzo è il MEM (Eagle Minimum Essential Medium, with Earle's salts).

- **MEM 1X**

MEM con aggiunta (al momento dell'uso) di soluzione antibiotata sterile in quantità tale da avere per ogni ml di terreno 100 unità di penicillina, 0.1 mg di streptomicina, 0.25 µg di anfotericina B. Per ottenere tale concentrazione di antibiotici occorre diluire 1:10 il MEM 10X.

- **Altro Terreno di mantenimento idoneo 1X**

Terreno di coltura (vedi **APPENDICE B**) con aggiunta (al momento dell'uso) di soluzione antibiotata sterile in quantità tale da avere per ogni ml di terreno 100 unità di penicillina; 0.1 mg di streptomicina; 0.25 µg di anfotericina B.

APPENDICE B

TERRENI PER COLTURE CELLULARI

MEM

All'apertura aggiungere al flacone di MEM del commercio l'1% di Soluzione NEAA. Qualora il MEM viene preparato secondo la POS-VIR46 non è necessario aggiungere gli NEAA.

- Il MEM viene utilizzato per le seguenti linee cellulari: **BGM, Hep2**.

D-MEM

Il D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium, with high glucose 4,5 gr./litro) viene utilizzato per le seguenti linee cellulari: **FRhK-4; FrP3**.

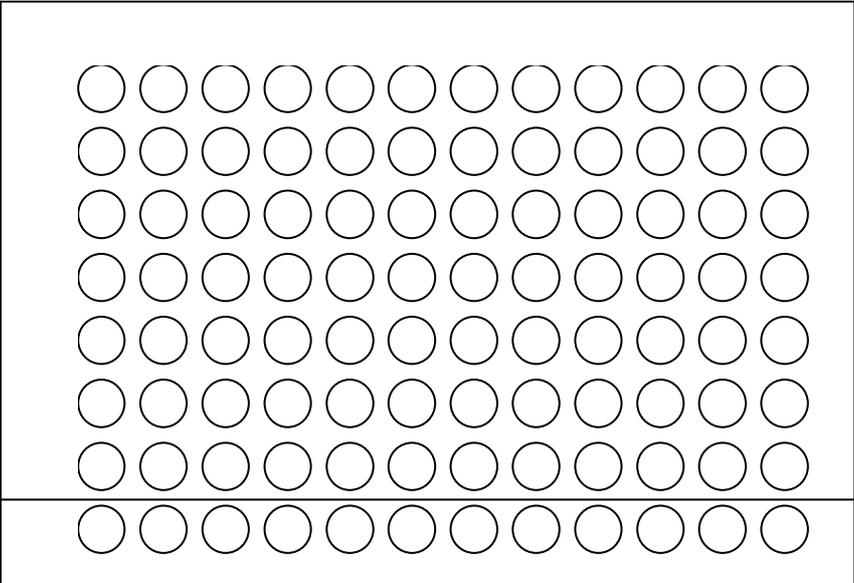
F-12K

L'F-12K (Ham's F-12 Kaighn's modification Medium) viene utilizzato solo per le **A549**.

N.B.: il terreno è molto sensibile alla luce per cui deve essere avvolto con carta stagnola, inoltre è consigliabile mettere a riscaldare solo la quantità da utilizzare e tenere il resto a $\cong +4^{\circ}\text{C}$.

APPENDICE C

Disposizione in piastra delle diluizioni e del controllo cellule

												10^{-1}
												10^{-2}
												10^{-3}
												10^{-4}
												10^{-5}
												10^{-6}
												10^{-7}
												K_C
Test N°: TITOLAZIONE												Data:

Legenda: + = positivo; - = negativo

APPENDICE D

Calcolo del titolo virale

Dopo aver riportato nelle colonne dei valori Normali rispettivamente il totale dei pozzetti positivi (+) e negativi (-) a ciascuna diluizione, determinare la proporzione totale dei pozzetti positivi facendo le sommatorie e riportandole nelle colonne dei valori Cumulativi. Per far ciò sommare i dati di ciascuna diluizione della colonna (+) verso l'alto e quelli della colonna (-) verso il basso come nel seguente esempio. Quindi calcolare la percentuale di positività.

Diluizione Sospensione	Normali		Cumulativi		% Cumulativi
	+	-	+	-	+
- 1	12	0	72	0	100
- 2	12	0	60	0	100
- 3	12	0	48	0	100
- 4	12	0	36	0	100
- 5	12	0	24	0	100
- 6	10	2	12	2	85,71
- 7	2	10	2	12	14,29

Nel suddetto esempio il punto finale di infettività 50% si trova tra le diluizioni di virus 10^{-6} e 10^{-7} . Occorre, adesso, calcolare l'esatta distanza percentuale (X) tra le due diluizioni:

$$X = \frac{(C\% \text{ con ECP} \geq 50\%) - 50\%}{(C\% \text{ con ECP} \geq 50\%) - (C\% \text{ con ECP} \leq 50\%)} = \frac{85,71 - 50}{85,71 - 14,29} = \frac{35,71}{71,42} = 0,5$$

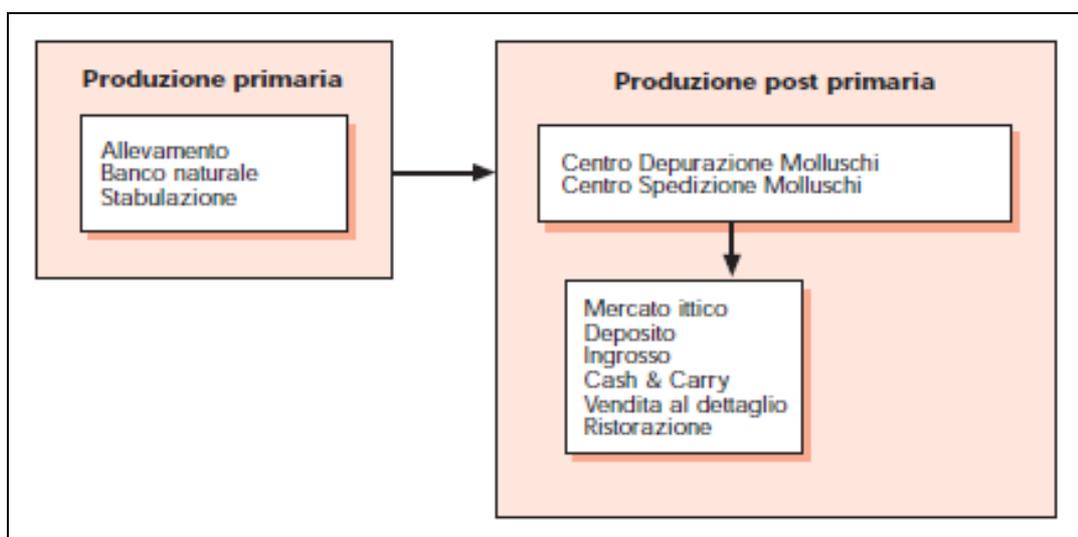
Il punto finale di infettività è pertanto alla diluizione $10^{-6,5}$. Poiché il volume di inoculo usato era 25 μ l, allora 25 μ l di diluizione $10^{-6,5}$ di virus contengono 1 TCID₅₀ e 25 μ l di virus non diluito contengono $10^{6,5}$ TCID₅₀.

Legenda: ECP = effetto citopatico; C% = percentuale cumulativi positivi.

3.4 INDIVIDUAZIONE DEI CDM E CSM DELLA REGIONE SICILIA

Per una migliore comprensione dei flussi di prima commercializzazione si è ritenuto interessante conoscere la distribuzione sul territorio siciliano dei Centri di Depurazione Molluschi (CDM) e dei Centri di Spedizione Molluschi (CSM), in quanto rappresentano tappe importanti lungo il percorso dei bivalvi verso il consumatore finale (*Figura 3.1*).

Figura 3.1. Filiera dei Molluschi Bivalvi



I CDM ed i CSM sono stabilimenti riconosciuti dal Ministero della Salute ai sensi del Reg. (CE) 853/2004, essi devono garantire il rispetto delle buone pratiche di lavorazione sottoponendosi a controlli da parte di personale laureato in discipline sanitarie (veterinari, biologi, ecc.) e a verifiche analitiche mirate, che valutino i parametri igienico-sanitari dei MEL. Il Ministero, verificate le caratteristiche dello stabilimento, dà l'autorizzazione ad operare attribuendogli un codice identificativo alfa-numerico corrispondente all'autorizzazione concessa, tale numero indica il tipo di concessione e verrà registrato con la data di inizio dell'attività dello stabilimento. Qualora non vengano mantenuti i requisiti o per altre motivazioni, verrà revocata l'autorizzazione e si avrà la cessazione dell'attività.

I CDM intervengono nel momento in cui il prodotto allevato non rispetta i requisiti igienico sanitari imposti dal reg. CE 2073/2005 o quando la zona di produzione non presenti consolidate caratteristiche di salubrità.

In base ai criteri di classificazione adottati, specificati nel Regolamento CE n.854/2004 ⁽³³¹⁾ e successive modifiche riportate nel Regolamento (UE) 2015/2285 ⁽³³⁴⁾, le zone di produzione dei MEL sono suddivise in A, B e C, a seconda delle caratteristiche igienico-sanitarie date dal livello di contaminazione microbiologica di origine fecale.

Solo i MEL provenienti da aree di tipo A possono essere destinati direttamente al consumo umano, mentre il prodotto di tipo B può essere destinato al consumo solo previo trattamento in idonee strutture di depurazione (CDM) od in zone marine di stabulazione preventivamente approvate come tali. I bivalvi di acque di categoria C non possono essere raccolti se non per essere trattati con il calore o con prolungati periodi di depurazione. Successivamente alla depurazione o direttamente (se provenienti da zone di tipo A) i MEL giungono presso i CSM, i soli luoghi autorizzati dalla Commissione Europea (CE) a compiere le operazioni di cernita e confezionamento, per destinare poi i molluschi bivalvi al consumo.

Il confezionamento è una procedura obbligatoria che prevede l'apposizione sulla confezione di un cartellino con indicati la data di confezionamento, il numero di riconoscimento del CDM/CSM di provenienza (o del solo CSM in caso di provenienza da area di tipo A) e la specie di bivalve contenuta. La data di scadenza può essere sostituita dalla dicitura "Il prodotto deve essere vivo al momento dell'acquisto". Il prodotto finale deve essere mantenuto a temperatura di refrigerazione (da 0°C a +4°C). Generalmente i CDM sono anche dotati di autorizzazione ad operare come CSM.

Il CDM è un impianto dove i bivalvi vengono immersi, per un tempo che va da 6-8 ore a 48 ore o più a seconda della qualità dell'acqua dell'area B di provenienza, in particolari vasche dove circola acqua pulita in modo che il bivalve si liberi del particolato che ha accumulato e raggiunga le stesse caratteristiche sanitarie del mollusco proveniente da aree di tipo A. In un sistema ben disegnato e gestito, un periodo di 48 ore dovrebbe garantire la rimozione della maggior parte dei patogeni batterici provenienti dalle acque di scarico e avvicinarsi alla rimozione dei due terzi degli agenti patogeni virali come i *Norovirus*. Circa un terzo della carica virale iniziale rimarrà dopo 2 giorni di trattamento a +8°C. A temperature più elevate, ad esempio +18/+21°C, i virus vengono rimossi dai molluschi bivalvi più velocemente. L'estensione del tempo di depurazione (per esempio a 5 giorni) dovrebbe migliorare la rimozione dei patogeni virali, se la temperatura e le altre

condizioni sono soddisfacenti, comunque è possibile che dopo 5-7 giorni di trattamento a tali temperature permangano paricelle virali, nonostante la contaminazione iniziale moderata. Considerato che la dose infettiva di questi patogeni virali è molto bassa, la depurazione non può essere considerata come il fattore primario di eliminazione del rischio, ma piuttosto come un processo che riduca in una certa misura il rischio di malattia. Periodi di depurazione di 18-24 ore sono usati comunemente in Italia e in alcuni casi il periodo può essere molto più breve.

Il **CSM** è un impianto, a terra o galleggiante, dove avvengono le seguenti fasi di lavoro: rifinitura, lavaggio, pulitura, calibratura, confezionamento e imballaggio del prodotto. Tutti i bivalvi passano attraverso questo impianto.

La depurazione effettuata presso i CDM deve consentire ai molluschi di raggiungere i parametri delle Zone A, mantenendone intatta la vitalità e garantendone la capacità di riprendere rapidamente la nutrizione mediante filtrazione. Il processo di depurazione deve essere ininterrotto e lotti diversi di molluschi non devono mai trovarsi a stabulare contemporaneamente nelle stesse vasche di depurazione

I metodi attuali ⁽⁹⁾ di disinfezione delle acque destinate alla depurazione dei MEL si basano sull'impiego di agenti chimici e fisici quali:

- cloro;
- iodofori;
- ozono;
- UV;
- 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 negativamente l'attività di filtrazione dei molluschi e quindi il cloro residuo nell'acqua deve essere abbattuto mediante tiosolfato ed 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 dei virus enterici se non a concentrazioni che danneggiano i molluschi stessi (l'HAV viene inattivato a concentrazioni di iodio attivo superiori a 100 ppm).

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 SH) e blocco enzimatico. Nei virus l'ossidazione delle proteine avviene più facilmente rispetto ai batteri poiché essi sono privi di membrana cellulare.

Altro processo di disinfezione è quello basato sull'impiego dei raggi UV. Questo sistema è capace di distruggere i microrganismi solo quando 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. È 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.

Una volta depurata, l'acqua viene immessa nelle vasche dove vengono posti a stabulare i molluschi che, mediante un meccanismo di rilascio, riescono a purificarsi dai microrganismi accumulati ^(77, 96).

I tempi di depurazione (48h) 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 ad altri virus enterici ⁽³⁶¹⁾.

3.5 PROTOCOLLI DI ESTRAZIONE/CONCENTRAZIONE DEI VIRUS DAL CAMPIONE

Nel progetto sono stati analizzati sia campioni di campioni di MEL che di acque, pertanto sono state prese in considerazione le modalità di preparazione di queste due tipologie di matrici. Le procedure di preparazione dei campioni di MEL e di acque sono state oggetto di precedenti studi e dopo essere state standardizzate sono utilizzate nella attività di routine.

In seguito alla consultazione bibliografica e alle esperienze già consolidate si è stabilito di introdurre in tale progetto l'impiego in parallelo di un nuovo metodo di preparazione dei **campioni di MEL** e di mettere a confronto i due protocolli operativi. Gli estratti di mollusco sono altamente citotossici e dunque inappropriati per l'inoculazione diretta in monostrati cellulari; la semplice diluizione del campione per ridurre la tossicità produrrebbe volumi troppo grandi di estratto, determinando peraltro la contemporanea diluizione del virus eventualmente presente. Al fine, quindi, di ottenere un estratto di MEL con effetto citotossico lieve, di piccolo volume e ad elevato contenuto virale, è necessario utilizzare un protocollo di estrazione/concentrazione che prevede: il prelievo dell'epatopaneas, ossia la ghiandola digestiva dei MB in cui si concentrano le particelle filtrate; la preparazione di un omogenato e, quindi, il trattamento del campione per tre giorni consecutivi, con cicli di eluizione e concentrazione in tampone *glicina* 0.05mM pH 9.2 e *PEG₈₀₀₀*. Questo trattamento fornisce un campione idoneo sia per l'isolamento in colture cellulari che per le metodiche di biologia molecolare.

A questa procedura già con solidata ne è stata affiancata un'altra, più breve, che prevede l'utilizzo di una Soluzione di *Proteinasi K* (0,1 mg/ml). In questo caso il campione non è però idoneo per un eventuale isolamento del virus in colture cellulari.

Nel caso in cui il campione da esaminare era un **campione d'acqua** è stata utilizzata la tecnica dell'*Ultrafiltrazione Tangenziale*, al fine di concentrare e recuperare i virus eventualmente presenti. In base alla quale il campione passa attraverso membrane filtranti (cassette in cellulosa rigenerata Hydrosart dal taglio molecolare di 10 Kd), trattate con estratto di carne 3% a pH 7 e successivamente a pH 9.5, che non si lasciano attraversare dai virus, per cui essi vengono trattenuti. La concentrazione del campione viene ottenuta facendo circolare ripetutamente l'acqua

tangenzialmente alle membrane, fino alla riduzione del volume del campione da 10 L a pochi mL (9-10 mL).

Vediamo adesso in dettaglio i diversi protocolli di preparazione dei campioni.

MEL:

Un **campione di MEL** è considerato idoneo ai fini dell'isolamento virale quando perviene in laboratorio in adeguati contenitori a chiusura ermetica o nello stesso contenitore con cui è commercializzato, entro 24-48 h dal prelievo e refrigerato ($\cong +4^{\circ}\text{C}$), altrimenti (poiché deperibile) congelato alla temperatura di $\cong -80^{\circ}\text{C}$. I molluschi bivalvi da sottoporre alla prova, dovrebbero essere vivi o, se congelati, non danneggiati. In nessun caso un MEL deve presentare segni di deterioramento o decomposizione.

Nel caso in cui il campione da sottoporre a prova sono **MEL**, devono pervenire in laboratorio un numero di soggetti per campione in grado di assicurare da 75 g a 100 g tra polpa e liquido intervalvare (corrispondenti a circa 25 g di epatopancreas). È preferibile che il campionamento sia effettuato in doppia aliquota, per una eventuale riprova nel caso in cui le analisi abbiano esito positivo; per essere sicuri di avere una quantità sufficiente di campione sono sufficienti due aliquote da $\cong 1,5$ Kg (o un'aliquota unica da $\cong 3$ Kg) qualora i MEL pervengano completi di conchiglia, un'aliquota da $\cong 1$ Kg qualora sono già sgusciati.

ACQUE:

Un **campione di acqua** è considerato idoneo ai fini dell'isolamento virale quando perviene in laboratorio in adeguati contenitori a chiusura ermetica, entro 24-48 h dal prelievo e refrigerato ($\cong +4^{\circ}\text{C}$), altrimenti congelato alla temperatura di $\cong -80^{\circ}\text{C}$. Per il campionamento dell'**acqua** si utilizzano contenitori sterili (in vetro o in plastica atossica e monouso) o in alternativa contenitori in polietilene precedentemente sanitizzati (con ipoclorito di sodio allo 0,1%, poi neutralizzato con iposolfito allo 0,2%).

Nel caso in cui si deve sottoporre a prova un campione d'acqua (superficiale, di mare, condottata, ecc.), al fine di concentrare e recuperare i virus eventualmente presenti, si utilizza la tecnica dell'*Ultrafiltrazione Tangenziale*. Se il campione contiene particelle in sospensione, va prima chiarificato mediante centrifugazione a

≅ 3.000 r.p.m. per ≅ 30 min. in centrifuga refrigerata (≅ +4°C) per fare sedimentare i detriti, quindi si procede con l'ultrafiltrazione tangenziale. Il processo di ultrafiltrazione consta di tre fasi.

N.B.: Prefiltrazione: se il campione è particolarmente torbido/sporco deve essere prefiltrato ortogonalmente, con l'utilizzo di una pompa da vuoto, su membrana in polipropilene con porosità 10 µm. Tale membrana viene, quindi, immersa in ≅ 30 ml di Soluzione Estratto di Carne al 3% a pH 9,5 e sottoposta ad agitazione lenta per ≅ 30 min. a ≅ +4°C, mediante un agitatore basculante, per eluire le eventuali particelle virali adsorbite ad essa. Successivamente, il tutto viene centrifugato a ≅ 3.000 r.p.m. per ≅ 30 min. in centrifuga refrigerata a ≅ +4°C. Viene raccolto il surnatante, controllato il suo pH con una cartina tornasole, eventualmente portato al valore di ≅ 7,2 con HCl ed aggiunto al campione prefiltrato. Il campione processato (acqua prefiltrata + eluato della membrana) viene, infine, sottoposto ad ultrafiltrazione tangenziale.

3.5.1 Campioni di MEL: Metodo *Glicina-PEG₈₀₀₀* (Metodo A)

Tale metodo consente di ottenere un estratto di MEL con effetto citotossico lieve, di piccolo volume e ad elevato contenuto virale, che è idoneo sia per l'isolamento in colture cellulari che per le metodiche di biologia molecolare. Limite di tale protocollo è la notevole durata, infatti esso prevede tre giorni per la preparazione dell'estratto del campione.

1° GIORNO

- 1) Rimuovere fango o altre impurità eventualmente presenti sulle valve.
- 2) Aprire le valve dei MEL con l'aiuto di pinze e forbici/bisturi sterili (*Figura 3.2*).
- 3) Prelevare ≅ **25 g** di epatopancreas (*Figura 1.2*) dai molluschi, porli in un contenitore sterile e pesarli.

N.B.: è possibile lavorare anche con un volume doppio di campione, raddoppiando quindi il volume degli altri reagenti.

- 4) Trasferirli in un sacchetto presto-chiuso contrassegnato con l'Identificativo Campione e sottoporli ad omogeneizzazione mediante stomacher per $\cong 2$ min. a $\cong 230$ r.p.m. (**Figura 3.3**)
 - 5) Aggiungere il Tampone Glicina (**APPENDICE E**) in rapporto 1:1 (25 g di epatopancreas + 25 ml di Tampone Glicina).
 - 6) Sottoporre il campione ad agitazione lenta per $\cong 30$ min. a $\cong +4^{\circ}\text{C}$, mediante un agitatore basculante.
 - 7) Trasferirlo in una provetta da centrifuga contrassegnata con l'Identificativo Campione.
 - 8) Centrifugare a $\cong 8.000$ r.p.m. ($\cong 10.000$ g) per $\cong 20$ min. in centrifuga refrigerata a $\cong +4^{\circ}\text{C}$.
 - 9) Recuperare il surnatante ed aggiungere Soluzione PEG₈₀₀₀ al 50% (**APPENDICE E**) in rapporto 1:4 v/v (1 parte di PEG₈₀₀₀ e 3 parti di campione; *ad es.* se ho 30 ml di surnatante, aggiungo 10 ml di Soluzione PEG₈₀₀₀).
- N.B.:** in tale modo la concentrazione finale del PEG₈₀₀₀ è 12,5%.
- 10) Agitare energicamente la provetta contenente il campione in modo da distribuire uniformemente il PEG₈₀₀₀ nella soluzione.
 - 11) Precipitare il campione *overnight* (durante la notte) a $\cong +4^{\circ}\text{C}$ in agitazione lenta.

Figura 3.2. Prelievo dell'epatopancreas dai MEL

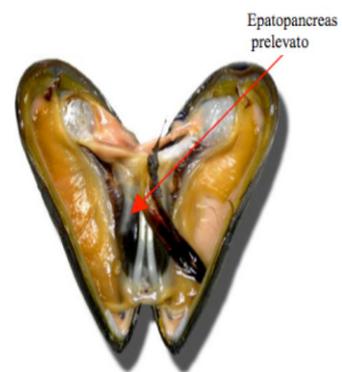


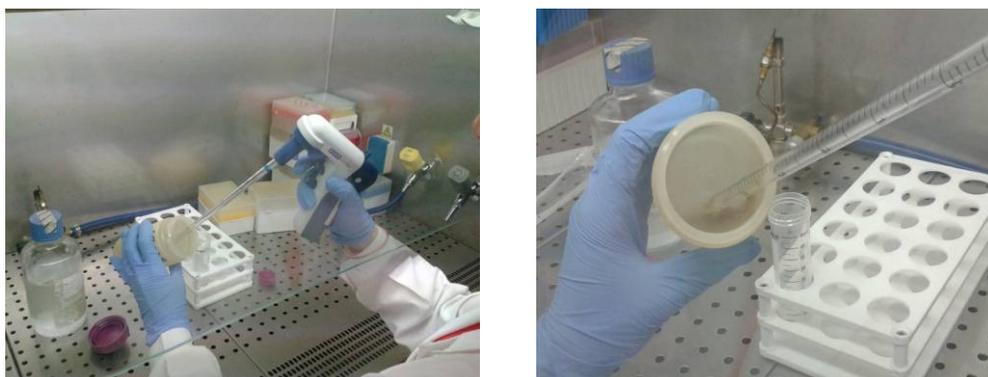
Figura 3.3. Omogeneizzazione mediante stomacher



2° GIORNO

- 1) Centrifugare a $\cong 8.000$ r.p.m. ($\cong 10.000$ g) per $\cong 60$ min. in centrifuga refrigerata a $\cong +4^{\circ}\text{C}$.
- 2) Eliminare il surnatante e risospendere il pellet in $\cong 10$ ml di PBS antibiotato 10X (**APPENDICE E**), avendo cura di sciogliere gli eventuali agglomerati (**Figura 3.4**).
- 3) Centrifugare a $\cong 8.000$ r.p.m. ($\cong 10.000$ g) per $\cong 20$ min. in centrifuga refrigerata a $\cong +4^{\circ}\text{C}$.
- 4) Recuperare il surnatante ed aggiungere Soluzione PEG₈₀₀₀ al 50% in rapporto 1:4 v/v (1 parte di PEG₈₀₀₀ e 3 parti di campione).
- 5) Agitare energicamente la provetta contenente il campione in modo da distribuire uniformemente il PEG₈₀₀₀ nella soluzione.
- 6) Precipitare il campione *overnight* (durante la notte) a $\cong +4^{\circ}\text{C}$ in agitazione lenta.

Figura 3.4. Fasi di recupero preparazione del campione



3° GIORNO

- 1) Centrifugare a $\cong 8.000$ r.p.m. ($\cong 10.000$ g) per $\cong 60$ min. in centrifuga refrigerata a $\cong +4^{\circ}\text{C}$.
- 2) Eliminare il surnatante e risospendere il pellet in $\cong 3$ ml di PBS antibiotata 10X (**APPENDICE E**), avendo cura di sciogliere gli eventuali agglomerati.
- 3) Centrifugare a $\cong 8.000$ r.p.m. ($\cong 10.000$ g) per $\cong 20$ min. in centrifuga refrigerata a $\cong +4^{\circ}\text{C}$.
- 4) Raccogliere il surnatante e trasferirlo in un bijoux contrassegnato dall'Identificativo Campione.
- 5) Decontaminare il campione incubandolo *overnight* (durante la notte) a $\cong +4^{\circ}\text{C}$.
N.B.: è possibile, in alternativa, incubare a $\cong +4^{\circ}\text{C}$ per $\cong 2$ h o a $\cong +37^{\circ}\text{C}$ per $\cong 1$ h.
- 6) Qualora non si procedesse subito all'esecuzione della prova, congelare a $\cong -80^{\circ}\text{C}$.

3.5.2 Campioni di MEL: Metodo *Proteinasi K* (Metodo B)

Tale metodo è di breve durata, infatti può essere eseguito nell'arco di poche ore. In questo caso il campione non è però idoneo per un eventuale isolamento del virus in colture cellulari.

- 1) Rimuovere fango o altre impurità eventualmente presenti sulle valve.
- 2) Aprire le valve dei MEL con l'aiuto di pinze e forbici/bisturi sterili (o uno strumento equivalente).
- 3) Prelevare $\cong 2$ g (non inferiore a $2,0 \pm 0,2$ g) di epatopancreas (**Figura I.2**) dai molluschi, porli in un contenitore sterile (piastra Petri) e pesarli.
N.B.: Selezionare un minimo di 6 individui per le specie più grandi (come le ostriche), 10 individui per i mitili, 30 individui per le vongole e le specie più piccole.
- 4) Sminuzzare finemente il tessuto con l'aiuto di pinze e forbici/bisturi sterili (o strumenti equivalenti).

- 5) Trasferire il tessuto sminuzzato in una provetta da centrifuga contrassegnata dall'Identificativo Campione, aggiungere $\cong 2$ ml di Soluzione di Proteinasi K (**APPENDICE E**) e mescolare bene.
- 6) Incubare la provetta a $\cong +37^{\circ}\text{C}$ per $\cong 60$ min. in leggera agitazione (assicurandosi un movimento continuo e delicato della miscela epatopancreas-enzima).
- 7) Incubare in bagno termostatico (bagnomaria) a $+60^{\circ}\text{C} \pm +2^{\circ}\text{C}$ per $\cong 15$ min.
- 8) Centrifugare a $\cong 4.300$ r.p.m. ($\cong 3.000 \times g$) per $\cong 5$ min.
- 9) Raccogliere il surnatante, trasferirlo in un bijoux (o altro contenitore sterile idoneo) contrassegnato dall'Identificativo Campione, misurare il volume ottenuto e portare il campione al volume finale di $\cong 3$ ml aggiungendo PBS sterile (**APPENDICE E**).

3.5.3 Campioni di Acque

PREPARAZIONE DEL SISTEMA FILTRANTE

- 1) Prelevare dal frigorifero n. 2 membrane filtranti (cassette in cellulosa rigenerata Hydrosart dal taglio molecolare di 10 Kd) conservate in NaOH 0,1 N, farle scolare su carta assorbente e montarle nella "Cassette Holder" secondo le istruzioni della Ditta Costruttrice del sistema per Ultrafiltrazione Tangenziale, stringendo accuratamente i dadi posti nella parte posteriore della Holder con la chiave regolatrice.
- 2) Assemblare i vari componenti dell'apparecchio e collegare opportunamente i 3 tubicini con i 3 sensori di pressione P1, P2, P3.
- 3) Fare un prelavaggio del circuito facendo ricircolare nel sistema circa 2 litri di acqua distillata/deionizzata sterile al fine di allontanare il liquido conservante dalle membrane ultrafiltranti (**Figura 3.5**).
- 4) Scaricare i tubi.
- 5) *Condizionare* le membrane filtranti riempiendo il serbatoio dell'apparecchio con $\cong 300$ ml di Soluzione Estratto di Carne al 3% a pH 7,2 (**APPENDICE E**) e facendola ricircolare per $\cong 10$ min. nel sistema, a pressione non superiore a 1,30 bar.

- 6) Scaricare i tubi (**I scarto**).

Figura 3.5. Sistema di Ultrafiltrazione Tangenziale per il recupero dei virus enterici dalle acque



CONCENTRAZIONE DEL CAMPIONE

- 1) Porre un'aliquota ($\cong 500$ ml) del campione di acqua in esame nel serbatoio e avviare il processo di ultrafiltrazione.
- 2) Aggiungere man mano la rimanente parte del campione d'acqua in un contenitore sterile collegato al serbatoio dell'apparecchio tramite un tubicino munito di valvola di chiusura.
- 3) Operare l'ultrafiltrazione fino a ridurre il volume iniziale dell'acqua nel serbatoio a $\cong 50$ ml.
- 4) Scaricare completamente i tubi nel serbatoio e raccogliere il campione (**I ultraconcentrato**).
- 5) Lavare (*fase di eluizione*) le membrane facendo ricircolare $\cong 200$ ml di Soluzione Estratto di Carne al 3% a pH 9,5 (**APPENDICE E**) fino a ridurre il volume iniziale a $\cong 50$ ml (**II ultraconcentrato**).
- 6) Riunire il **I ultraconcentrato** con il **II ultraconcentrato** e ripetere l'ultrafiltrazione fino a ridurre il volume iniziale a $\cong 10-15$ ml.
- 7) Controllare con una cartina tornasole il pH ed eventualmente portarlo al valore di $\cong 7,2$ con HCl (**concentrato finale**).

- 8) Recuperare il **concentrato finale** dal serbatoio e porlo in una fiasca per colture cellulari (o altro contenitore idoneo sterile), contrassegnata con l'Identificativo Campione e l'indicazione **CONCENTRATO**.
- 9) Prima di procedere con la prova di isolamento, decontaminare il campione con l'aggiunta del 10% di Soluzione Antibiotica/Antimicotica 100X (concentrazione finale della Soluzione Antibiotica/Antimicotica 10X: quantità tale da avere per ogni ml di campione 1.000 unità di penicillina, 1 mg di streptomina, 2,5 µg di anfotericina).
- 10) Decontaminare il campione incubandolo *overnight* (durante la notte) a $\cong +4^{\circ}\text{C}$.
N.B.: è possibile, in alternativa, incubare a $\cong +4^{\circ}\text{C}$ per $\cong 2$ h o a $\cong +37^{\circ}\text{C}$ per $\cong 1$ h.
- 11) Qualora non si procedesse subito all'esecuzione della prova, congelare a $\cong -80^{\circ}\text{C}$.

MANUTENZIONE FINALE SISTEMA FILTRANTE

- 1) Staccare tutti e 3 i sensori di pressione e rimettere i tappi nei raccordi dei tubicini.
- 2) Disinfettare il sistema con $\cong 200$ ml di NaOH 1 N.
- 3) Lavare con $\cong 2$ litri circa di H₂O distillata/deionizzata.
- 4) Smontare le membrane dall'Holder e conservarle in NaOH 0,1 N in frigorifero a $\cong +4^{\circ}\text{C}$.
- 5) Svitare delicatamente tutti i tubicini e rubinetti di raccordo lavarli ulteriormente con H₂O distillata/deionizzata e lasciarli ad asciugare.
- 6) Smontare il serbatoio e lavarlo con alcool etilico al 70% e poi con H₂O e lasciarlo ad asciugare.

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- **Aulicino F.A., Volterra L., Patti A. M., Muscillo M., Orsini P. (1993). Concentrazione e recupero di enterovirus da campioni di acqua di mare: ultrafiltrazione a flusso tangenziale. *L'Igiene Moderna*, 100: 1416-1432.**⁽¹⁵⁾

- Cannella V., Purpari G., Ferrari A., Migliazzo A., Di Marco P., Guercio A. (2010) Detection of human enteric viruses in shellfish, vegetables, waters and environmental samples: a preliminary study. *Atti del 14th International Congress on Infectious Diseases (ICID). International Journal of Infectious Diseases (2010): 14S1, e63-e64: 26.006.* (Miami, Florida, USA 9/12 marzo 2010). ⁽⁴⁷⁾
- Croci L., De Medici D. (2000). Epatite A trasmessa con gli alimenti. *Rapporti ISTISAN 00/2.* Istituto Superiore di Sanità, 1999: 1-53. ⁽⁷⁵⁾
- Croci L., Losio N. – Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante RT-PCR convenzionale e Real Time PCR. Procedura Istituto Superiore di Sanità e Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Brescia. ⁽⁷⁸⁾
- Gabrieli R., Maccari F., Ruta A., Panà A., Divizia M. (2009). Norovirus detection in groundwater. *Food Environ. Virol.*, 1: 92-96. ⁽¹²⁹⁾
- Giammanco G.M., Di Bartolo I., Purpari G., Costantino C., Rotolo V., Spoto V., Geraci G., Bosco G., Petralia A., Guercio A., Macaluso G., Calamusa G., De Grazia S., Ruggeri F.M., Vitale F., Maida C.M., Mammina C. (2014). Investigation and control of a Norovirus outbreak of probable waterborne transmission through a municipal groundwater system. *Journal of Water and Health*, 452-464. ⁽¹³⁴⁾
- Iaconelli M., Purpari G., Della Libera S., Petricca S., Guercio A., Ciccaglione A.R., Bruni R., Taffon S., Equestre M., Fratini M., Muscillo M., La Rosa G. (M. Iaconelli and G. Purpari have contributed equally to this work). (2015). Hepatitis A and E Viruses in Wastewaters, in River Waters, and in Bivalve Molluscs in Italy. *Food Environ. Virol.* 06/2015; DOI:10.1007/s12560-015-9207-3 – ISSN 1867-0334 - 1.98 Impact Factor. ⁽¹⁶⁸⁾
- ISO/TS 15216-2:2013: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection. ⁽¹⁷⁴⁾

- La Rosa G., Fratini M., Spuri Vennarucci V., Guercio A., Purpari G., Muscillo M. (2012). GIV noroviruses and other enteric viruses in bivalves: a preliminary study. *New Microbiologica*, 35: 27-34. ⁽²¹⁸⁾
- Metodo qualitativo “Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante Real Time PCR” - *Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali nei molluschi bivalvi - Istituto Superiore di Sanità.* ⁽²⁸⁰⁾
- Mira F., Di Bella S., Cannella V., De Gregorio V., Purpari G., Guercio A. (2008). Ottimizzazione di un metodo di estrazione e concentrazione del virus dell’HAV da campioni di cozze (*Mitylus galloprovincialis*). *Atti del X Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.*, 248-249. (Alghero 22/24 ottobre 2008). ⁽²⁸²⁾
- MP 09/180 Rev.0 del 24.05.2013: Metodo di prova interno per la ricerca del virus dell’Epatite A in alimenti, acqua e campioni biologici mediante PCR. I.Z.S.L.E.R. ⁽²⁸⁵⁾
- Ottaviani M., Bonadonna L. (2000). Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano. Volume secondo. Parte 2. Rapporti ISTISAN 00/14 Pt.2: 309-327. ⁽³⁰²⁾
- POMIAC01.002 Rev.2 del 28.02.2012: Metodo per la ricerca di Epatite A e Norovirus in alimenti mediante Real-Time PCR. ⁽³¹⁹⁾

APPENDICE E

Tampone Glicina:

Composizione per litro

Glycin ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$)	3,75 g
Acqua deionizzata o distillata	1L

Preparazione

- 1) Predisporre il foglio di lavoro “*Preparazione Soluzioni*”.
- 2) Pesare la glicina e scioglierla in acqua deionizzata o distillata mediante agitazione (è possibile avvalersi dell’impiego di un agitatore magnetico) in pallone tarato.
- 3) Portare ad 1 litro con aggiunta di altra acqua deionizzata.
- 4) Controllare il pH e portarlo a $9,4 \pm 0,2$ con idrossido di sodio.
- 5) Aliquotare in bottiglie di vetro autoclavabili.
- 6) Sterilizzare in autoclave ($\cong 121\text{ }^\circ\text{C}$ per $\cong 15 - 20$ min.).
- 7) Lasciare raffreddare le bottiglie a temperatura ambiente, identificarle con numero di lotto compilando il relativo foglio di lavoro.
- 8) Stoccare in frigorifero a $\cong +4^\circ\text{C}$. I flaconi non aperti possono essere conservati in frigorifero alla temperatura di $\cong +4^\circ\text{C}$ per 1 anno.
- 9) Al momento dell’uso siglare il flacone con la data di apertura e prelevare l’aliquota necessaria per la prova. Il flacone aperto può essere conservato massimo per 3 mesi a $\cong +4^\circ\text{C}$.

Soluzione PEG₈₀₀₀ al 50%:*Composizione per litro*

PEG ₈₀₀₀	500 g
NaCl	87 g
Acqua deionizzata o distillata	1L

Preparazione

- 1) Predisporre il foglio di lavoro “*Preparazione Soluzioni*”.
- 2) Pesare i reagenti.
- 3) Sciogliere i costituenti in acqua deionizzata o distillata mediante agitazione (è possibile avvalersi dell’impiego di un agitatore magnetico) e calore (si può anche portarlo ad ebollizione) in pallone tarato.
- 4) Portare ad 1 litro con aggiunta di altra acqua deionizzata.
- 5) Aliquotare in bottiglie di vetro autoclavabili.
- 6) Sterilizzare in autoclave ($\cong 121\text{ }^{\circ}\text{C}$ per $\cong 15 - 20\text{ min.}$).
- 7) Lasciare raffreddare sotto agitazione le bottiglie a temperatura ambiente, identificarle con numero di lotto compilando il relativo foglio di lavoro.
- 8) Stoccare in frigorifero a $\cong +4^{\circ}\text{C}$. I flaconi non aperti possono essere conservati in frigorifero alla temperatura di $\cong +4^{\circ}\text{C}$ per 1 anno.
- 9) Al momento dell’uso siglare il flacone con la data di apertura e prelevare l’aliquota necessaria per la prova. Il flacone aperto può essere conservato massimo per 3 mesi a $\cong +4^{\circ}\text{C}$.

PBS:*Composizione per litro*

NaCl	8 g.		
KCl	0,2 g.		
Na ₂ HPO ₄	1,15 g	oppure →	⎧ Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O 2,9 g ⎫
		oppure	
KH ₂ PO ₄	0,2 g		
Acqua deionizzata	1 L		

Preparazione

- 1) Predisporre il foglio di lavoro “*Preparazione Soluzioni*”.
- 2) Sciogliere i costituenti in acqua deionizzata mediante agitazione (è possibile avvalersi dell’impiego di un agitatore magnetico).
- 3) Portare ad 1 L con aggiunta di altra acqua deionizzata in pallone tarato.
- 4) Controllare il pH ($7,4 \pm 0,2$).
- 5) Aliquotare in bottiglie di vetro autoclavabili.
- 6) Sterilizzare in autoclave ($\cong 121\text{ }^{\circ}\text{C}$ per $\cong 15 - 20$ min.).
- 7) Lasciare raffreddare le bottiglie a temperatura ambiente, identificarle con numero di lotto e numero progressivo.
- 8) Stoccare in frigorifero a $\cong +4^{\circ}\text{C}$. I flaconi non aperti possono essere conservati in frigorifero alla temperatura di $\cong +4^{\circ}\text{C}$ per 1 anno.

PBS per estratti 10X (PBS antibiotata 10X):

PBS con aggiunta di soluzione antibiotata sterile in quantità tale da avere per ogni ml 1.000 unità di penicillina, 1 mg di streptomina, 2,5 µg di anfotericina B. Per ottenere tale concentrazione di antibiotici occorre aggiungere il 10% di Soluzione Antibiotica/Antimicotica 100X al PBS.

Soluzione di Proteinasi K (0,1 mg/ml):

Composizione

Proteinasi K (\cong 30U/mg)	$20 \pm 0,1$ mg
Acqua Nuclease free	200 ± 2 ml

Preparazione

Dissolvere la Proteinasi K in acqua Nuclease free mediante agitazione. Mescolare accuratamente.

Preparare aliquote in volumi adatti al consumo (\cong 2 ml) e conservare a $\cong -20^{\circ}\text{C}$ per un massimo di 2 anni (o secondo quanto previsto dalla ditta produttrice della proteinasi K, in genere minimo 6 mesi). Una volta scongelata è possibile conservarla a $\cong +4^{\circ}\text{C}$ per un massimo di una settimana.

Soluzione Estratto di Carne al 3% a pH 7,2 e a pH 9,5:

Composizione per litro

Estratto di carne	30 g
Acqua deionizzata o distillata	1L

Preparazione

- 1) Predisporre il foglio di lavoro "*Preparazione Soluzioni*".
- 2) Pesare l'estratto di carne e scioglierlo in acqua deionizzata o distillata mediante agitazione (è possibile avvalersi dell'impiego di un agitatore magnetico) in pallone tarato.
- 3) Portare ad 1 litro con aggiunta di altra acqua deionizzata.
- 4) Controllare il pH e portarlo a $7,2 \pm 0,2$ (***Soluzione Estratto di Carne 3% pH 7,2***) o a $9,4 \pm 0,2$ (***Soluzione Estratto di Carne 3% pH 9,5***) con idrossido di sodio e/o acido cloridrico.
- 5) Aliquotare in bottiglie di vetro autoclavabili.
- 6) Sterilizzare in autoclave ($\cong 121$ °C per $\cong 15 - 20$ min.).
- 7) Lasciare raffreddare le bottiglie a temperatura ambiente e identificarle con numero di lotto.
- 8) Stoccare in frigorifero a $\cong +4$ °C. I flaconi non aperti possono essere conservati in frigorifero alla temperatura di $\cong +4$ °C per 1 anno.
- 9) Al momento dell'uso siglare il flacone con la data di apertura e prelevare l'aliquota necessaria per la prova. Il flacone aperto può essere conservato massimo per 3 mesi a $\cong +4$ °C.

3.6 METODOLOGIE DI ESTRAZIONE GENOMICA

Per andare a verificare ed eventualmente implementare la sensibilità diagnostica, il progetto è stato condotto utilizzando in parallelo due differenti metodiche di estrazione dei genomi virali (RNA e DNA) che sfruttano principi tecnici diversi:

1) **uso di colonnine di affinità**: sono stati impiegati due kits del commercio (rispettivamente per RNA e DNA), selezionati fra quelli di più comune impiego, sulla base di una provata maggiore affidabilità ed idoneità per l'analisi dei campioni oggetto del progetto.

- **RNA** – QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit – QIAGEN (Germany);

Nell'utilizzo del kit per l'estrazione dell'RNA si è reso necessario apportare delle modifiche nelle modalità di esecuzione della prova, variando il volume iniziale del campione da estrarre ed il volume dell'eluato. Sono state, infatti, allestite 4 repliche per ciascun campione (trattate con un quantitativo proporzionato di "buffer – carrier") che sono state caricate tutte in una stessa colonnina di estrazione, procedendo quindi con le opportune centrifugazioni/lavaggi previsti dalla metodica. In questo modo vengono filtrati in totale 560 µl di campione. L'eluizione viene eseguita con 2 x 50 µl di buffer (*Buffer AVE*), per un totale di 100 µl di eluato finale.

- **DNA** – DNeasy[®] Blood & Tissue Kit– QIAGEN (Germany).

Anche nell'utilizzo del kit per l'estrazione del DNA si è reso necessario apportare delle modifiche al protocollo suggerito dal produttore, variando il volume iniziale del campione da estrarre (200 µl) ed il volume di eluato finale. Volendo mantenere le proporzioni previste dei reagenti e avvicinarsi al volume prefissato di 500 µl di campione, sono state allestite 2 repliche da 250 µl per ciascun campione (trattandole con un quantitativo proporzionato di reagenti). Le 2 aliquote sono state poi caricate tutte in una stessa colonnina di estrazione e si è proceduto con le centrifugazioni/lavaggi previsti dalla metodica. In questo modo si riescono a filtrare in totale 500 µl di campione. L'eluizione viene eseguita con 100 µl di buffer (*Buffer AE*).

2) **estrazione magnetica basata sulla tecnologia di Boom**: tale metodo utilizza particelle di silice magnetica e consente di estrarre contemporaneamente RNA e DNA. La metodica di Boom è una tecnica che riduce notevolmente il problema dei fattori di inibizione. Essa utilizza le proprietà di lisi e di inibizione delle nucleasi dell'agente caotropico guanidina tiocianato (GuSCN) in combinazione con le proprietà degli acidi nucleici di legarsi alle particelle di silice magnetica.

Il sistema di estrazione magnetica utilizzato è stato:

- BioMérieux NucliSENS[®] System composto da: NucliSENS[®] miniMAG instrument, NucliSENS Lysis Buffer, NucliSENS Magnetic Extraction Reagents (BioMérieux, Italia S.p.A., Rome, Italy).

In questo caso sono stati analizzati 500 µl di campione. L'eluizione è stata eseguita ottenendo 100 µl di eluato finale.

Tutte le operazioni di estrazione genomica devono essere eseguite sotto cappa a flusso laminare e/o in ambienti appositamente dedicati.

Si riportano di seguito i dettagli tecnici dei processi estrattivi.

3.6.1 Colonnine di affinità: QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

Composizione del Kit (Figura 3.6):

- **QIAamp Mini Spin columns:** 50 o 250.
- **Provette Collettore:** 200 o 1000.
- **Buffer AVL:** (31 ml o 5 x 31 ml) pronto all'uso.
- **Buffer AW1:** (19 ml o 95 ml) concentrato, aggiungere il volume appropriato di etanolo 96-100% a seconda del formato del kit.
- **Buffer AW2:** (13 ml o 66 ml) concentrato, aggiungere il volume appropriato di etanolo 96-100% a seconda del formato del kit.
- **Buffer AVE:** (3 x 2 ml o 8 x 2 ml) pronto all'uso.
- **Carrier RNA (Poly A):** (310 µg o 5 x 310 µg).

Figura 3.6



Preparazione dei reagenti:

- **Carrier RNA (Poly A):** aggiungere 310 µl di **Buffer AVE** (Fiala tappo viola) alla fiala contenente 310 µg di Carrier RNA (Poly A), in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 1 µg/µl, e miscelare accuratamente. Preparare 10 aliquote da $\cong 31$ µl ciascuna e conservare a $\cong -20^{\circ}\text{C}$.
- **Buffer AVL – Carrier RNA Solution:** scongelare 1 aliquota da $\cong 31$ µl di **Carrier RNA (Poly A)** ricostituito. Per ogni campione prelevare $\cong 5,6$ µl di **Carrier RNA (Poly A)** e $\cong 560$ µl di **Buffer AVL** e miscelare accuratamente (preferibilmente a mano, invertendo la provetta 10 volte). È preferibile preparare tale soluzione prima dell'uso, in alternativa è possibile impiegare una soluzione preparata al massimo 48 h prima e conservata a +2 / +8°C. Per un numero più elevato di campioni, calcolare i volumi dei due reagenti applicando le seguenti formule:

$$n \times 560 (\mu\text{l}) = Y (\mu\text{l})$$

$$Y (\mu\text{l}) \times 0,01 = Z (\mu\text{l})$$

dove:

n = numero di campioni da esaminare.

Y = volume di *Buffer AVL*.

Z = volume di *Carrier RNA – Buffer AVE*.

- **Buffer AW1:** aggiungere al *Buffer AW1* concentrato il volume appropriato di etanolo 96-100% a seconda del formato del kit. **Kit da 50 reazioni** (Cod. 52904): aggiungere a \cong 19 ml di *Buffer AW1* concentrato \cong 25 ml di etanolo 96-100% e miscelare accuratamente, volume finale 44 ml. **Kit da 250 reazioni** (Cod. 52906): aggiungere a \cong 95 ml di *Buffer AW1* concentrato \cong 125 ml di etanolo 96-100% e miscelare accuratamente, volume finale 220 ml. Conservare a temperatura ambiente (\cong +15 / +25°C).
- **Buffer AW2:** aggiungere al *Buffer AW2* concentrato il volume appropriato di etanolo 96-100% a seconda del formato del kit. **Kit da 50 reazioni** (Cod. 52904): aggiungere a \cong 13 ml di *Buffer AW2* concentrato \cong 30 ml di etanolo 96-100% e miscelare accuratamente, volume finale 43 ml. **Kit da 250 reazioni** (Cod. 52906): aggiungere a \cong 66 ml di *Buffer AW2* concentrato \cong 160 ml di etanolo 96-100% e miscelare accuratamente, volume finale 226 ml. Conservare a temperatura ambiente (\cong +15 / +25°C).

Si riporta di seguito lo Schema dei volumi di *Buffer AVL* e *Carrier RNA – Buffer AVE* necessari per l'esecuzione della procedura di estrazione in funzione del numero di campioni da processare.

Schema dei volumi di *Buffer AVL* e *Carrier RNA – Buffer AVE* necessari.

<i>N° Campioni</i>	<i>Volume Buffer AVL (ml)</i>	<i>Volume Carrier RNA – Buffer AVE (µl)</i>
1	0,56	5,6
2	1,12	11,2
3	1,68	16,8
4	2,24	22,4
5	2,80	28,0
6	3,36	33,6
7	3,92	39,2
8	4,48	44,8
9	5,04	50,4
10	5,60	56,0
11	6,16	61,6
12	6,72	67,2
13	7,28	72,8
14	7,84	78,4
15	8,40	84,0
16	8,96	89,6
17	9,52	95,2
18	10,08	100,8
19	10,64	106,4
20	11,20	112,0
21	11,76	117,6
22	12,32	123,2
23	12,88	128,8
24	13,44	134,4

Procedimento:

- Preparare tante provette Nuclease free da 1,5-2,0 ml in funzione dei campioni in esame, tenendo conto anche del Bianco, e contrassegnarle sul tappo con un numero progressivo che corrisponde all'identificativo campione, secondo quanto riportato nel foglio di lavoro.
- Ricostituire, se necessario, il “**Carrier RNA (Poly A)**” come descritto nella preparazione dei reagenti. Qualora tale passaggio sia

stato precedentemente eseguito scongelare l'aliquota conservata e procedere con la prova.

- Preparare, se necessario, la “**Buffer AVL – Carrier RNA Solution**” come descritto nella preparazione dei reagenti. Qualora tale passaggio sia stato precedentemente eseguito scongelare l'aliquota conservata e procedere con la prova.

- *Criolisato cellulare, ceppo virale, Bianco*: dispensare in ogni provetta $\cong 560 \mu\text{l}$ di “**Buffer AVL – Carrier RNA Solution**”.

N.B.: se si vuole processare un volume di campione multiplo di $\cong 140 \mu\text{l}$ (fino a $\cong 560 \mu\text{l}$), aumentare proporzionalmente il volume di “**Buffer AVL – Carrier RNA Solution**” (*Es.* un campione di $\cong 280 \mu\text{l}$ richiede $\cong 1.120 \mu\text{l}$ di **Buffer AVL – Carrier RNA Solution**).

Acque, MEL: occorre lavorare con un volume pari a $560 \mu\text{l}$ di campione. Pertanto, prepararsi 4 diverse provette Nuclease free da $1,5 - 2,0 \text{ ml}$ per ciascun campione e dispensare in ogni provetta $\cong 560 \mu\text{l}$ di “**Buffer AVL – Carrier RNA Solution**”.

- Aggiungere $\cong 140 \mu\text{l}$ di campione o di Bianco alle rispettive provette (4 per ciascun campione di *acque, MEL*).
- Chiudere il tappo e miscelare accuratamente con il vortex per $\cong 15 \text{ sec}$.
- Incubare a temperatura ambiente ($+15 / +25^\circ\text{C}$) per $\cong 10 \text{ min}$.
- Porre le provette in centrifuga e centrifugare brevemente alla massima velocità (short spin), $\cong 12.000 \text{ r.p.m.} - 13.000 \text{ r.p.m.}$, per rimuovere eventuali gocce dalla superficie interna del tappo.
- Aggiungere $\cong 560 \mu\text{l}$ di etanolo 96-100% alle rispettive provette (4 per ciascun campione di *acque, MEL*) del campione.

N.B.: se si vuole processare un volume di campione multiplo di $\cong 140 \mu\text{l}$ (fino a $\cong 560 \mu\text{l}$), aumentare proporzionalmente il volume di etanolo (*Es.* un campione di $\cong 280 \mu\text{l}$ richiede $\cong 1.120 \mu\text{l}$ di etanolo).

- Chiudere il tappo e miscelare accuratamente con il vortex per $\cong 15 \text{ sec}$.

- Porre le provette in centrifuga e centrifugare brevemente alla massima velocità (short spin), $\cong 12.000$ r.p.m. - 13.000 r.p.m., per rimuovere eventuali gocce dalla superficie interna del tappo.
- Preparare tante colonnine e relative provette collettore quanti sono i campioni in esame, tenendo conto anche del Bianco, e contrassegnarle sul tappo con il numero progressivo che corrisponde all'identificativo campione. Nel caso in cui si stia lavorando con *acque, MEL* preparare una sola colonnina per tutte e 4 le aliquote (provette) di un campione.
- Trasferire in ogni colonnina, fornita di una provetta collettore, $\cong 630$ μ l del campione processato, senza bagnare il bordo.
- Chiudere il tappo della colonnina e centrifugare a $\cong 8.000$ r.p.m. ($\cong 6.000 \times g$) per $\cong 1$ min.
- Eliminare le provette collettore con il liquido di scarto e porre ogni colonnina in una nuova provetta collettore.
- Aprire con cautela il tappo della colonnina e trasferirvi i rimanenti $\cong 630$ μ l del campione processato, senza bagnare il bordo.
N.B.: in caso di volumi più elevati di campione ripetere la procedura su menzionata fino al suo esaurimento. Nel caso in cui si stia lavorando con *acque, MEL* ripetere il procedimento altre 6 volte, per un totale di 8 volte.
- Chiudere il tappo della colonnina e centrifugare a $\cong 8.000$ r.p.m. ($\cong 6.000 \times g$) per $\cong 1$ min.
- Eliminare le provette collettore con il liquido di scarto e porre ogni colonnina in una nuova provetta collettore.
- Aprire con cautela il tappo della colonnina e aggiungere $\cong 500$ μ l di "*Buffer AWI*".
N.B.: anche in caso di volumi più elevati di campione non è necessario aumentare il volume del *Buffer AWI*.
- Chiudere il tappo della colonnina e centrifugare a $\cong 8.000$ r.p.m. ($\cong 6.000 \times g$) per $\cong 1$ min.
- Eliminare le provette collettore con il liquido di scarto e porre ogni colonnina in una nuova provetta collettore.

- Aprire con cautela il tappo della colonnina e aggiungere $\cong 500 \mu\text{l}$ di “*Buffer AW2*”.
- Chiudere il tappo della colonnina e centrifugare a $\cong 12.000 \text{ r.p.m.}$ - 13.000 r.p.m. per $\cong 3 \text{ min.}$
- Eliminare le provette collettore con il liquido di scarto e porre ogni colonnina in una nuova provetta collettore.
- Centrifugare alla massima velocità, $\cong 12.000 \text{ r.p.m.}$ - 13.000 r.p.m. , per $\cong 1 \text{ min.}$
- Preparare tante provette Nuclease free da 1,5-2,0 ml quanti sono i campioni in esame, tenendo conto anche del Bianco, e contrassegnarle sul tappo con un numero progressivo che corrisponde all’identificativo campione, secondo quanto riportato nel foglio di lavoro.
- Eliminare le provette collettore con il liquido di scarto e porre ogni colonnina in una nuova provetta Nuclease free.
- Aprire con cautela il tappo della colonnina e aggiungere $\cong 60 \mu\text{l}$ di “*Buffer AVE*” equilibrato a temperatura ambiente ($+15 / +25^\circ\text{C}$).
N.B.: nel caso in cui si stia lavorando con *acque, MEL* per incrementare la resa di estrazione effettuare una doppia eluizione utilizzando due aliquote di $\cong 50 \mu\text{l}$ di “*Buffer AVE*” in due passaggi successivi di incubazione/centrifugazione, ottenendo complessivamente $\cong 100 \mu\text{l}$ di eluato finale.
- Chiudere il tappo e incubare a temperatura ambiente ($+15 / +25^\circ\text{C}$) per $\cong 1 \text{ min.}$
- Centrifugare a $\cong 8.000 \text{ r.p.m.}$ ($\cong 6.000 \times g$) per $\cong 1 \text{ min.}$
- Conservare l’RNA estratto in ghiaccio fino al momento dell’amplificazione, se deve essere amplificato subito, o a $\cong -80^\circ\text{C}$ (fino ad 1 anno).

3.6.2 Colonnine di affinità: DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN)

Composizione del Kit:

- **QIAamp Mini Spin columns:** 50 o 250.
- **Provette Collettore:** 100 o 500.
- **Buffer ATL:** (10 ml o 50 ml) pronto all'uso.
- **Buffer AL:** (12 ml o 54 ml) pronto all'uso.
- **Buffer AW1:** (19 ml o 95 ml) concentrato, aggiungere il volume appropriato di etanolo 96-100% a seconda del formato del kit.
- **Buffer AW2:** (13 ml o 66 ml) concentrato, aggiungere il volume appropriato di etanolo 96-100% a seconda del formato del kit.
- **Buffer AE:** (22 ml o 2 x 60 ml) pronto all'uso.
- **Proteinase K:** (1,25 ml o 6 ml).

Preparazione dei reagenti:

- **Buffer AW1:** aggiungere al buffer l'appropriato volume di etanolo 96-100% indicato nella bottiglia, agitare accuratamente e conservare a temperatura ambiente (+15 / +25° C).
- **Buffer AW2:** aggiungere al buffer l'appropriato volume di etanolo 96-100% indicato nella bottiglia, agitare accuratamente e conservare a temperatura ambiente (+15 / +25° C).

Procedimento:

- Preparare tante provette Nuclease free da 1,5-2,0 ml quanti sono i campioni in esame, tenendo conto anche del Bianco, e contrassegnarle sul tappo con un numero progressivo che corrisponde all'identificativo campione, secondo quanto riportato nel foglio di lavoro "*PCR Nested Adenovirus (AdVs)*".
- Preparare tante colonnine e relative provette collettore quanti sono i campioni in esame, tenendo conto anche del Bianco, e contrassegnarle sul tappo con il numero progressivo che corrisponde all'identificativo campione.

- **Criolisato cellulare, ceppo virale, Bianco:** dispensare in ogni provetta $\cong 200 \mu\text{l}$ di campione in una provetta Nuclease free da 1,5-2,0 ml.
Acque, MEL: occorre lavorare con un volume pari a $500 \mu\text{l}$ di campione. Pertanto, prepararsi 2 diverse provette Nuclease free da 1,5 – 2,0 ml per ciascun campione e dispensare in ogni provetta $\cong 250 \mu\text{l}$ di campione.
- **Acque, MEL:** aggiungere $\cong 270 \mu\text{l}$ di *Buffer ATL* a ciascuna delle 2 provette campione.
N.B.: questa fase non è necessaria per **Criolisato cellulare, ceppo virale, Bianco**.
- **Criolisato cellulare, ceppo virale, Bianco:** aggiungere $\cong 20 \mu\text{l}$ di *Proteinase K*.
Acque, MEL: aggiungere $\cong 30 \mu\text{l}$ di *Proteinase K*.
- Agitare accuratamente con il vortex ed incubare a $+56^\circ\text{C}$ nel termoshaker per 1 h.
- **Criolisato cellulare, ceppo virale, Bianco:** agitare con il vortex per $\cong 15 \text{ sec.}$, aggiungere $\cong 200 \mu\text{l}$ di *Buffer AL* ed agitare accuratamente con il vortex.
Acque, MEL: agitare con il vortex per $\cong 15 \text{ sec.}$, aggiungere $\cong 300 \mu\text{l}$ di *Buffer AL* ed agitare accuratamente con il vortex.
- **Criolisato cellulare, ceppo virale, Bianco:** aggiungere $\cong 200 \mu\text{l}$ di *etanolo 96-100%* e mescolare accuratamente con il vortex.
Acque, MEL: aggiungere $\cong 300 \mu\text{l}$ di *etanolo 96-100%* e mescolare accuratamente con il vortex.
N.B.: Se i campioni da processare sono numerosi, è possibile preparare prima la miscela di *Buffer AL* ed *etanolo*.
- Centrifugare brevemente a $\cong 12.000\text{-}13.000 \text{ r.p.m.}$ (short spin).
- Prelevare il surnatante e trasferire in ogni colonnina, fornita di una provetta collettore, i lisati ottenuti dal pretrattamento del criolisato cellulare/ceppo virale/Bianco ($\cong 620 \mu\text{l}$) o del campione (due aliquote di $\cong 1.150 \mu\text{l}$).
Nel caso in cui si stia lavorando con **acque, MEL** preparare una sola colonnina per tutte e 2 le aliquote (provette) di un campione.

- Centrifugare a $\cong 8.000$ rpm ($\geq 6000 \times g$) per 1 min.
N.B.: nel caso in cui si stia lavorando con *acque, MEL* ripetere la procedura su menzionata fino ad esaurimento del campione, ossia in totale 4 volte, trasferendo e centrifugando ogni volta $\cong 575$ μ l di campione.
- Eliminare le provette collettore con il liquido di scarto e porre ogni colonnina in una nuova provetta collettore.
- Dispensare 500 μ l di “Buffer AW1” in ogni colonnina.
- Centrifugare a $\cong 8.000$ rpm ($\geq 6000 \times g$) per 1 min.
- Eliminare i tubi collettori con il liquido di scarto e porre ogni colonnina in un nuovo tubo collettore.
- Dispensare in ciascuna colonnina 500 μ l di “Buffer AW2”.
- Centrifugare a $\cong 14.000$ rpm ($20.000 \times g$) per 3 min, per asciugare la membrana della colonnina, poiché eventuali residui di etanolo possono interferire con la successiva fase di eluizione.
- Preparare tante provette Nuclease free da 1,5-2,0 ml quanti sono i campioni e contrassegnarle sul tappo con il numero progressivo che corrisponde all’identificativo campione.
- Eliminare i tubi collettori con il liquido di scarto e porre ogni colonnina nella nuova provetta preparata.
N.B.: Se la colonnina viene a contatto con l’etanolo dello scarto, svuotare il tubo collettore, riposizionarlo sotto la colonnina ed effettuare una ulteriore centrifugazione a $\cong 14.000$ rpm ($20.000 \times g$) per 1 min. prima di trasferirla nella provetta preparata.
- Dispensare in ogni colonnina 100 μ l di “Buffer AE”.
- Incubare a temperatura ambiente per 1 min.
- Centrifugare a $\cong 8.000$ rpm ($\geq 6000 \times g$) per 1 min, per eluire il DNA
- Eliminare la colonnina e conservare il DNA estratto in ghiaccio, se deve essere amplificato subito, o a $\cong -80^\circ$ C.

3.6.3 Estrazione magnetica: NucliSENS Magnetic Extraction Kit (BioMérieux)

Il Kit che viene utilizzato per l'estrazione magnetica dell'RNA è composto da due differenti prodotti della Ditta BioMérieux:

- **NucliSENS Lysis Buffer.**
- **NucliSENS Magnetic Extraction Reagents.**

Composizione del Kit:

- **NucliSENS Lysis Buffer:** (48 x 2 ml ml) tampone di lisi contenente guanidina tiocianato, pronto all'uso.
- **NucliSENS Magnetic Extraction Reagents** composto da:
 - **SIL:** (6 x 0,6 ml) soluzione di particelle di silice magnetica, pronta all'uso.
 - **WashBuf 1:** (6 x 9 ml) tampone di lavaggio contenente guanidina tiocianato, pronto all'uso.
 - **WashBuf 2:** (6 x 11 ml) tampone di lavaggio organico contenente soluzione biocida, pronto all'uso.
 - **WashBuf 3:** (12 x 6 ml) tampone di lavaggio inorganico, pronto all'uso.
 - **EluBuf:** (12 x 1 ml) tampone di eluizione inorganico, pronto all'uso.

Procedimento:

FASE DI LISI

- Preparare tanti tubi di **Lysis Buffer** da 2,0 ml in funzione dei campioni in esame, tenendo conto anche del Bianco, e contrassegnarli con un numero progressivo che corrisponde all'identificativo campione, secondo quanto riportato nel foglio di lavoro.

N.B.: rimuovere, se presenti, i cristalli dal **Lysis Buffer** mettendo il tubo a $\cong +37^{\circ}\text{C}$ per qualche minuto.

- Centrifugare il **Lysis Buffer** per $\cong 10$ secondi a $\cong 1.500$ g ($\cong 3.000$ r.p.m.).

N.B.: tale centrifugata può essere evitata se non sono presenti gocce di liquido sulla parete del tubo o sotto il tappo.

- Aggiungere $\cong 500$ μl di campione al Lysis Buffer e miscelare accuratamente con la micropipetta o agitare con il vortex.
- Incubare per $\cong 10$ min. a temperatura ambiente ($+15 / +25^{\circ}\text{C}$).
- Portare tutti gli altri reagenti a temperatura ambiente e rimuovere, se presenti, i cristalli dai vari Buffer mettendoli per qualche minuto a $\cong +37^{\circ}\text{C}$.
- Accendere il **NucliSENS miniMAG** (Figura 3.7).
- Accendere il **Thermoshaker** e selezionare la temperatura a $\cong +60^{\circ}\text{C}$.

Figura 3.7

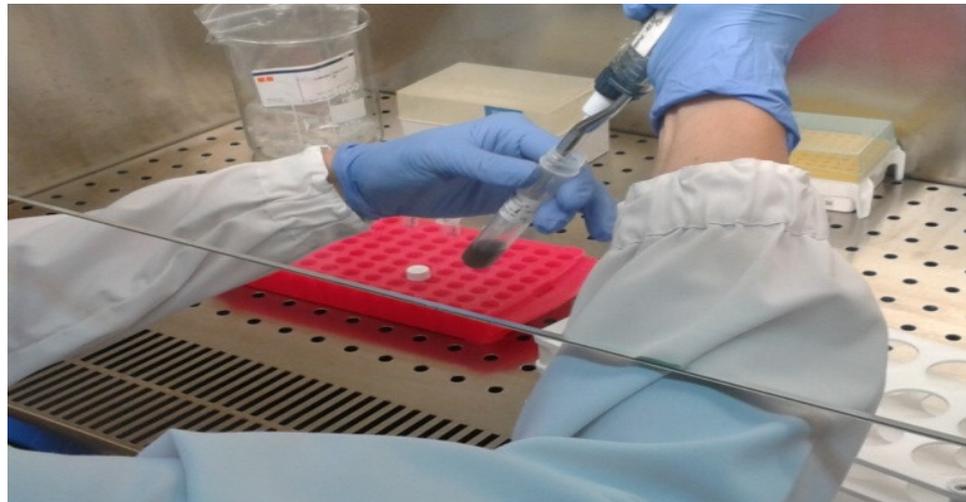


LEGAME ACIDI NUCLEICI ALLA SILICE

- Dopo i 10 min. di incubazione, centrifugare la miscela campione-Lysis Buffer per $\cong 10$ secondi a $\cong 1.500$ g ($\cong 3.000$ r.p.m.).

- Miscelare bene con la micropipetta (o brevemente con il vortex) la **Soluzione di Silice Magnetica (SIL)** senza fare bolle e metterne $\cong 50$ μ l nel primo tubo destinato ai campioni in esame (**Figura 3.8**). Procedere alla stessa maniera per gli altri tubi.
N.B.: prima di aggiungerla agli altri tubi bisogna miscelarla bene nuovamente (NON bisogna fare bolle), si consiglia di miscelare la **Soluzione di Silice Magnetica (SIL)** frequentemente (massimo ogni 6 campioni).
- Incubare per $\cong 10$ min. a temperatura ambiente (+15 / +25°C).

Figura 3.8



FASE LAVAGGI

- Centrifugare i tubi contenenti i campioni per $\cong 2-3$ min. a $\cong 1.500$ g ($\cong 3.000$ r.p.m.).
- Rimuovere delicatamente il sovrnatante mediante aspirazione con la micro pipetta o la pompa da vuoto (sul fondo c'è la silice con adesi DNA ed RNA). Si può anche decantare.
- Posizionare il magnete del **NucliSENS miniMAG** in **posizione orizzontale** (**Figura 3.9**).

- Aggiungere ad ogni tubo contenente $\cong 400 \mu\text{l}$ di **Wash Buffer 1** (**WashBuf 1**) e risospendere il pellet spipettando delicatamente senza fare bolle (1° lavaggio). A partire dal seguente step non è più necessario eseguire tutte le operazioni sotto cappa a flusso laminare.

Figura 3.9

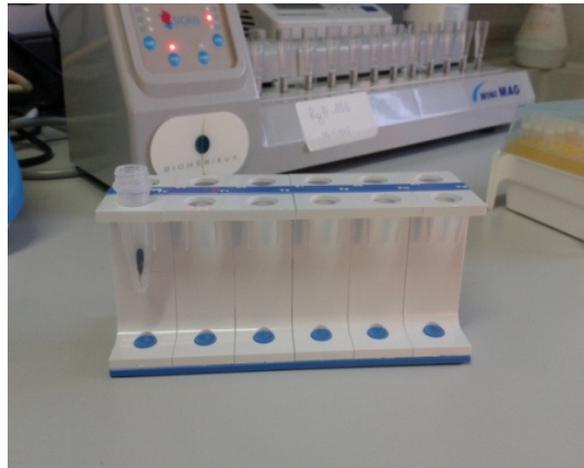


- Preparare tanti provette apposite per il **NucliSENS miniMAG** da 1,5 ml in funzione dei campioni in esame, tenendo conto anche del Bianco, e contrassegnarle con un numero progressivo che corrisponde all'identificativo campione, secondo quanto riportato nel foglio di lavoro.
- Trasferire ciascuna sospensione (campione) nelle rispettive provette da 1.5 ml, lasciando le provette aperte.
- Mettere le provette (senza tappo) nel **NucliSENS miniMAG**.
- Posizionare il magnete del **NucliSENS miniMAG** in *posizione verticale* e lavare per $\cong 30$ secondi con il programma di lavaggio automatico del sistema di estrazione, premendo **STEP 1** \rightarrow **START**. Dopo $\cong 30$ secondi esatti premere **STOP**.
- Rimuovere il sovranatante delicatamente mediante aspirazione, senza toccare la silice. Il magnete rimane in posizione verticale.

- Posizionare il magnete in *posizione orizzontale*, aggiungere $\cong 400 \mu\text{l}$ di **Wash Buffer 1 (WashBuf 1)** e risospendere il pellet senza fare bolle (2° lavaggio).
- Posizionare il magnete del **NucliSENS miniMAG** in *posizione verticale* e lavare per $\cong 30$ secondi con il programma di lavaggio automatico del sistema di estrazione, premendo *STEP 1* \rightarrow *START*. Dopo $\cong 30$ secondi esatti premere *STOP*.
- Rimuovere il sovranatante delicatamente mediante aspirazione, senza toccare la silice. Il magnete rimane in posizione verticale.
- Posizionare il magnete in *posizione orizzontale*, aggiungere $\cong 500 \mu\text{l}$ di **Wash Buffer 2 (WashBuf 2)** e risospendere il pellet senza fare bolle (1° lavaggio).
- Posizionare il magnete del **NucliSENS miniMAG** in *posizione verticale* e lavare per $\cong 30$ secondi con il programma di lavaggio automatico del sistema di estrazione, premendo *STEP 1* \rightarrow *START*. Dopo $\cong 30$ secondi esatti premere *STOP*.
- Rimuovere il sovranatante delicatamente mediante aspirazione, senza toccare la silice. Il magnete rimane in posizione verticale.
- Posizionare il magnete in *posizione orizzontale*, aggiungere $\cong 500 \mu\text{l}$ di **Wash Buffer 2 (WashBuf 2)** e risospendere il pellet senza fare bolle (2° lavaggio).
- Posizionare il magnete del **NucliSENS miniMAG** in *posizione verticale* e lavare per $\cong 30$ secondi con il programma di lavaggio automatico del sistema di estrazione, premendo *STEP 1* \rightarrow *START*. Dopo $\cong 30$ secondi esatti premere *STOP*.
- Rimuovere il sovranatante delicatamente mediante aspirazione, senza toccare la silice. Il magnete rimane in posizione verticale.
- Posizionare il magnete in *posizione orizzontale*, aggiungere $\cong 500 \mu\text{l}$ di **Wash Buffer 3 (WashBuf 3)** e risospendere il pellet senza fare bolle (i campioni non dovrebbero essere lasciati nel **WashBuf 3** più del necessario).

- Lavare per \cong 15 secondi con il programma di lavaggio automatico del sistema di estrazione, premendo **START**. Quando sono passati \cong 15 secondi premere **STOP**.
- Rimuovere il sovrantante delicatamente mediante aspirazione, senza toccare la silice. Il magnete rimane in posizione verticale.
- Posizionare il magnete in **posizione orizzontale**, aggiungere \cong 100 μ l di **Elution Buffer (EluBuf)**.
- Chiudere le provette, trasferirle nel **Thermoshaker** e incubare per \cong 5 min. a \cong +60°C, con agitazione a \cong 1.400 r.p.m.
- Trasferire le provette nel **Magnetic Rack 12 holes** (*Figura 3.10*) e attendere la sedimentazione della silice.

Figura 3.10



- Preparare tante provette Nuclease free da 1,5-2,0 ml in funzione dei campioni in esame, tenendo conto anche del Bianco, e contrassegnarle con un numero progressivo che corrisponde all'identificativo campione, secondo quanto riportato nel foglio di lavoro.
- Aprire le provette del **NucliSENS miniMAG** e trasferire ciascun eluato nelle corrispondenti provette Nuclease free preparate.

- Conservare l'RNA estratto in ghiaccio, se deve essere amplificato subito, o a $\cong -80^{\circ}\text{C}$ (fino a 2 mesi). Non conservare piccoli volumi (Es. NO 5 μl).

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- **Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.M., Wertheim-van Dillen P.M., van der Nordaa J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (3): 495-503.** ⁽³²⁾
- **ISO/TS 15216-2:2013: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection.** ⁽¹⁷⁴⁾
- Metodica allegata al kit QIAGEN – QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit. ⁽²⁷⁶⁾
- Metodica allegata ai reagenti BioMérieux – NucliSENS Lysis Buffer. ⁽²⁷⁸⁾
- Metodica allegata ai reagenti BioMérieux – NucliSENS Magnetic Extraction Reagents. ⁽²⁷⁹⁾
- **POMIAC01.002 Rev.2 del 28.02.2012: Metodo per la ricerca di Epatite A e Norovirus in alimenti mediante Real-Time PCR.** ⁽³¹⁹⁾
- Protocollo del kit BioMérieux – NucliSENS Magnetic Extraction Kit.

3.7 METODI BIOMOLECOLARI

Al fine di ottenere dei metodi più sensibili e specifici per la ricerca dei virus enterici nei MEL e nelle acque, in linea con le indicazioni fornite da network nazionali e/o comunitari, sono stati messi a punto e standardizzati diversi protocolli di lavoro. In fase preliminare sono stati effettuati degli approfondimenti della Letteratura Nazionale ed Internazionale, effettuando una accurata ricerca bibliografica, quindi sono stati selezionati i riferimenti bibliografici più significativi e sono stati sviluppati i metodi di lavoro con cui analizzare tutti i campioni.

In particolare 6 protocolli sono stati adottati nel **2013**:

- **SEMI-NESTED RT-PCR PER LA RICERCA DELL'HAV (METODO A);**
- **REAL TIME RT-PCR PER LA RICERCA DELL'HAV;**
- **RT-PCR BOOSTER PER LA RICERCA DEI NOV S;**
- **REAL TIME RT-PCR PER LA RICERCA DEL NOV GI;**
- **REAL TIME RT-PCR PER LA RICERCA DEL NOV GII;**
- **NESTED PCR PER LA RICERCA DEGLI ADENOVIRUS (METODO A).**

Altri ulteriori 7 protocolli sono stati adottati nel **2014**:

- **NESTED RT-PCR PER LA RICERCA DELL'HAV (METODO B);**
- **SEMI-NESTED RT-PCR PER LA RICERCA DEL NOV GI;**
- **SEMI-NESTED RT-PCR PER LA RICERCA DEL NOV GII;**
- **NESTED RT-PCR PER LA RICERCA DEL NOV GIV;**
- **NESTED RT-PCR PER LA RICERCA DEGLI ENTEROVIRUS;**
- **NESTED RT-PCR PER LA RICERCA DELL'HEV;**
- **NESTED PCR PER LA RICERCA DEGLI ADENOVIRUS (METODO B).**

Si riportano di seguito i 13 diversi protocolli di amplificazione che sono stati utilizzati nell'esecuzione del presente progetto di ricerca, così suddivisi: tre protocolli per la ricerca dell'HAV (due di RT-PCR tradizionale "end point" ed uno Real Time); 6 protocolli per la ricerca dei NoVs (4 di RT-PCR tradizionale "end point" e due Real Time); due per la ricerca degli AdVs (PCR tradizionale); uno per la ricerca degli EVs ed uno per la ricerca dell'HEV (RT-PCR tradizionale).

3.7.1 SEMI-NESTED RT-PCR PER LA RICERCA DELL'HAV (METODO A)

La presente procedura, messa a punto nel 2013, ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la ricerca dell'RNA del virus responsabile dell'epatite A (HAV) in campioni biologici (acque, Molluschi Eduli Lamellibranchi) e in lisati di colture cellulari, mediante una RT-PCR *Semi-Nested* specifica per il gene che codifica per la **regione VP1 del capsido virale**. Può, inoltre, essere impiegata per l'identificazione di ceppi virali isolati.

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

La RT-PCR *Semi-Nested* per HAV prevede 1 reazione di Retrotrascrizione (RT) con **Random Hexamers** seguita da 2 reazioni di amplificazione a catena della polimerasi, ciascuna con una coppia di primers, uno dei primer è comune in entrambe le reazioni. La prima PCR o **FIRST** viene effettuata con i primers **“AV1 (Reverse)”** e **“AV2 (Forward)”**, la seconda PCR o **SEMI-NESTED** viene effettuata con i primers **“AV2 (Forward)”** e **“AV3 (Reverse)”**.

Per la **RT** dell'RNA virale, la **FIRST PCR** e la **Semi-Nested PCR** si impiega un apposito kit disponibile in commercio (Applied Biosystems - GeneAmp[®] RNA PCR Core Kit), contenente i reagenti necessari per le master mix.

Prima di procedere con la prova di RT-PCR *Semi-Nested* per HAV, il campione opportunamente preparato, come descritto al punto 3.5, viene sottoposto ad estrazione dell'RNA come descritto al punto 3.6. Anche il controllo positivo viene opportunamente preparato, procedendo all'estrazione del suo RNA e alla sua diluizione, se necessario, come descritto al punto 3.6.

1 Reazione di Retrotrascrizione (RT)

La **RT PCR** prevede le seguenti **3 fasi**:

1.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix RT

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "*RT-PCR Semi-Nested Virus Epatite A (HAV)*".

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da retrotrascrivere, del Controllo Positivo (RNA di HAV), del Controllo Negativo RT (acqua Nuclease free) e del Bianco (controllo dell'estrazione).
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix RT seguendo le indicazioni del kit di amplificazione in uso, riportate nell'**APPENDICE F** (a).
- Dispensare la Master Mix RT in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE F** (a).
- Aggiungere 5 µl di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo RT (**APPENDICE F-a**).

1.2 Trasferimento dell'RNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 5 µl di RNA di ciascun campione (**APPENDICE F-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 5 µl di RNA Controllo Positivo (**APPENDICE F-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 5 µl di Bianco (**APPENDICE F-a**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

1.3 Reazione di Retrotrascrizione dell'RNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “RETROSCRIZIONE HAV AV” (*Tabella 3.2*) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.2. Programma “RETROSCRIZIONE HAV AV”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Retrotrascrizione	60 min.	+42°C	1
2	Denaturazione	5 min	+94°C	1

2 Reazione di Amplificazione FIRST del cDNA – Prima Amplificazione (FIRST PCR)

La **FIRST** PCR prevede le seguenti **3 fasi**:

2.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix FIRST

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro “*RT-PCR Semi-Nested Virus Epatite A (HAV)*”.

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (cDNA retrotrascritto di HAV), del Controllo Negativo RT, del Controllo Negativo FIRST (acqua Nuclease free) e del Bianco.
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix FIRST seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE F** (b).

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (200 μ M e 50 μ M) dei primers (“AV1” e “AV2”) secondo quanto riportato nell’**APPENDICE G**. Se sono già pronte, prelevare un’aliquota della soluzione di lavoro (50 μ M) di ciascun primer.

- Dispensare la Master Mix in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell’**APPENDICE F (b)**.
- Aggiungere 5 μ l di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo FIRST (**APPENDICE F-b**).

2.2 Trasferimento del cDNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un’area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 5 μ l di cDNA di ciascun campione (**APPENDICE F-b**).
- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 5 μ l di cDNA del Controllo Negativo RT (**APPENDICE F-b**).
- Aggiungere nell’apposita provetta 5 μ l di cDNA del Controllo Positivo (**APPENDICE F-b**).
- Aggiungere nell’apposita provetta 5 μ l del Bianco retrotrascritto (**APPENDICE F-b**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

2.3 Reazione di Amplificazione FIRST del cDNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “FIRST HAV AV” (**Tabella 3.3**) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.3. Programma “FIRST HAV AV”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Denaturazione	5 min.	+94°C	1
2	Denaturazione	35 sec.	+94°C	40
3	Annealing	1 min.	+55°C	
4	Polimerizzazione	1 min. e 15 sec.	+72°C	
5	Polimerizzazione finale	5 min.	+72°C	1
6	Mantenimento	∞	+8°C	1

3 Reazione di Amplificazione Semi-Nested del DNA – Seconda Amplificazione (Semi-Nested PCR)

La **SEMI-NESTED** PCR prevede le seguenti **3 fasi**:

3.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix SEMI-NESTED

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro “*RT-PCR Semi-Nested Virus Epatite A (HAV)*”.

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (cDNA retrotrascritto di HAV), del Controllo Negativo RT, del Controllo Negativo FIRST, del Controllo Negativo SEMI-NESTED (acqua Nuclease free) e del Bianco.
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix Semi-Nested seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE F** (c).

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (200 μ M e 50 μ M) dei primers (“AV2” e “AV3”) secondo quanto riportato

nell'**APPENDICE G**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (50 µM) di ciascun primer.

- Dispensare la Master Mix in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE F (c)**.
- Aggiungere 10 µl di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo SEMI-NESTED (**APPENDICE F**).

3.2 Trasferimento del DNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 10 µl di DNA di ciascun campione (**APPENDICE F-c**).
- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 10 µl di DNA del Controllo Negativo RT (**APPENDICE F-c**).
- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 10 µl di DNA del Controllo Negativo FIRST (**APPENDICE F-c**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 10 µl di DNA del Controllo Positivo (**APPENDICE F-c**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 10 µl dell'amplificato del Bianco (**APPENDICE F-c**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

3.3 Reazione di Amplificazione Semi-Nested del cDNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come "SEMI-NESTED HAV AV" (**Tabella 3.4**) e dare lo "RUN/START".

Tabella 3.4. Programma “SEMI-NESTED HAV AV”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Denaturazione	5 min.	+94°C	1
2	Denaturazione	30 sec.	+94°C	30
3	Annealing	30 sec.	+50°C	
4	Polimerizzazione	30 sec.	+72°C	
5	Polimerizzazione finale	5 min.	+72°C	1
6	Mantenimento	∞	+8°C	1

4 Rivelazione del prodotto di amplificazione

Elettroforesi

- Allestire il gel di agarosio al 2% (**APPENDICE H**) con un numero di pozzetti uguale al numero complessivo degli amplificati (campioni in esame, Bianco, Controllo Negativo RT, Controllo Negativo FIRST, Controllo Negativo SEMI-NESTED, Controllo Positivo) più un pozzetto per il Ladder.

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà preso in considerazione nell’allestire il gel.

- Posizionare il gel nella cella elettroforetica in modo che sia completamente ricoperto da TBE 1X (**APPENDICE H**).
- Dispensare in una micropiastra a 96 pozzetti con fondo ad U 10 µl di ogni amplificato e aggiungere 2 µl di loading buffer.
- Preparare la “miscela Ladder” mescolando: 2 µl di Ladder 50/100 bp, 3 µl di loading buffer e 9 µl di TBE.

N.B.: si può impiegare anche un ladder già colorato (per l’utilizzo seguire le istruzioni del produttore).

- Caricare nei pozzetti del gel 10 µl di ciascun amplificato preparato con il loading buffer (un amplificato per pozzetto), disponendoli da sinistra verso destra nel seguente ordine: campioni, Bianco, Controllo Negativo RT, Controllo Negativo FIRST, Controllo Negativo SEMI-NESTED, Ladder, Controllo Positivo.

N.B.: se si utilizza un ordine diverso nel disporre i campioni ed i controlli, indicarlo nel foglio di lavoro e/o nel file della corsa elettroforetica.

N.B.B: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà presente nel foglio di lavoro.

- Caricare in un pozzetto del gel 10 µl della “miscela Ladder” preparata o 7 µl del Ladder già colorato.
- Applicare alla cella elettroforetica una corrente di circa 120 V (nel caso in cui si utilizza un gel grande) o di circa 100 V (nel caso in cui si utilizza un gel piccolo).
- Interrompere la corsa elettroforetica quando il loading buffer ha percorso almeno 5 cm. (in genere sono sufficienti 45 min. circa).
- Porre il gel sul transilluminatore a raggi UV ed analizzare l’immagine; si può quindi procedere alla sua acquisizione.
- Riportare l’esito della prova nell’apposito foglio di lavoro “*RT-PCR Semi-Nested Virus Epatite A (HAV)*”.

RACCOLTA ED ELABORAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati viene effettuata verificando la presenza/assenza di una banda elettroforetica derivante dal frammento di DNA prodotto dall’amplificazione. La dimensione di tale banda viene determinata confrontandola con il Ladder (**APPENDICE I**).

La prova è considerata valida se:

- il controllo positivo dà una banda di **210 bp** alla SEMI-NESTED (**APPENDICE I**).

N.B.: la banda attesa del controllo positivo alla FIRST è di 247 bp.

- il controllo negativo non presenta nessuna banda (**APPENDICE I**).

I campioni sono considerati **positivi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, si evince la presenza di una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo SEMI-NESTED (210 bp).

I campioni sono considerati **negativi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, non presentano una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo (210 bp).

Nel caso in cui il risultato sia di incerta interpretazione è bene ripetere la prova a partire dalla Retrotrascrizione (punto 1). Se il problema si ripresenta, ripartire dall'estrazione del campione (punto 3.6).

I campioni positivi possono essere sottoposti ad analisi di sequenza utilizzando primers specifici e le sequenze confrontate con quelle depositate in banche dati internazionali.

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- **Croci L., Losio N. – Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante RT-PCR convenzionale e Real Time PCR. Procedura Istituto Superiore di Sanità e Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Brescia.** ⁽⁷⁸⁾
- **Le Guyader F., Dubois E., Menard D., Pommepuy M. (1994). Detection of Hepatitis A Virus, Rotavirus and Enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by Reverse Transcription-Seminested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3665-3671.** ⁽²²³⁾
- **Metodica allegata al kit Applied Biosystems - GeneAmp® RNA PCR Core Kit.** ⁽²⁷²⁾
- **Metodo qualitativo “Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante Real Time PCR” - Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali nei molluschi bivalvi - Istituto Superiore di Sanità.** ⁽²⁸⁰⁾
- **MP 09/180 Rev.0 del 24.05.2013: Metodo di prova interno per la ricerca del virus dell'Epatite A in alimenti, acqua e campioni biologici mediante PCR. I.Z.S.L.E.R.** ⁽²⁸⁵⁾

APPENDICE F

La preparazione delle Master Mix per la RETROTRASCRIZIONE (a), la FIRST PCR (b) e la SEMI-NESTED PCR (c) deve essere effettuata in un'area appositamente dedicata.

a) Kit di RETROTRASCRIZIONE usato: GeneAmp[®] RNA PCR Core Kit.
Ditta: Applied Biosystem.

Composizione del Kit:

- **MuLV Reverse Transcriptase:** 50 U/ μ l.
- **RNase Inhibitor:** 20 U/ μ l.
- **AmpliTa[®]q DNA Polymerase:** 5 U/ μ l.
- **dATP:** 10 mM.
- **dCTP:** 10 mM.
- **dGTP:** 10 mM.
- **dTTP:** 10 mM.
- **10X PCR Buffer II:** contenente 150 mM Tris HCl e 100 mM KCl.
- **Soluzione di MgCl₂:** 25 mM.
- **Random Esameri:** 50 μ .
- **Oligo d(T)₁₆:** 50 μ M primer con coda poly dT, non utilizzato nella prova.

Master Mix Retrotrascrizione

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	μ l per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	1 μ l
10X PCR Buffer II	10X	1X	4 μ l
dNTP Mix (costituita miscelando i singoli dNTP del kit)	10 mM	4 mM	16 μ l
MgCl ₂	25 mM	5 mM	8 μ l
Random Hexamers	50 μ M	2,5 μ M	2 μ l
RNase Inhibitor	20 U/ μ l	1 U	2 μ l
MuLV Reverse Transcriptase	50 U/ μ l	2,5 U/ μ l	2 μ l
RNA	/	/	5 μ l
Volume totale	/	/	40 μ l

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una provetta da 1,5-2,0 ml Nuclease free per costituire la miscela dei dNTP (**dNTP Mix**), una o più provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo e del controllo negativo retroscrizione (**RT**).
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare, se non è già pronta, la **dNTP Mix** miscelando in proporzioni eguali i singoli dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) nella apposita provetta (ad *Es.* 100 µl di ciascun dNTP).
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 35 µl nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 5 µl di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo RT.
- In una stanza separata caricare 5 µl di RNA di ciascun campione, 5 µl di RNA del controllo positivo e 5 µl di bianco nelle rispettive provette.

b) Kit di AMPLIFICAZIONE FIRST usato: GeneAmp[®] RNA PCR Core Kit.
Ditta: Applied Biosystem.

Composizione del Kit: vedi kit di RETROTRASCRIZIONE.

ATTENZIONE: per ottenere il **Buffer di Reazione 5X** diluire 1:2 il “**10X PCR Buffer II**” con **Acqua Nuclease free**.

Master Mix FIRST

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	12,375 µl
Buffer di Reazione 5X	5X	1X	5 µl
dNTP Mix (costituita miscelando i singoli dNTP del kit)	10 mM	0,4 mM	1 µl
MgCl ₂	25 mM	1 mM	1 µl
Primer AV1 (Reverse)	50 µM	0,5 µM	0,25 µl
Primer AV2 (Forward)	50 µM	0,5 µM	0,25 µl
AmpliAq [®] DNA Polymerase	5U/µl	0,025 U/µl	0,125 µl
DNA	/	/	5 µl
Volume Totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una provetta da 1,5-2,0 ml Nuclease free per costituire la miscela dei dNTP (**dNTP Mix**), una o più provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free per la Master Mix e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo, del controllo negativo **RT** e del controllo negativo **FIRST**.
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare, se non è già pronta, la **dNTP Mix** miscelando in proporzioni eguali i singoli dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) nella apposita provetta (ad *Es.* 100 µl di ciascun dNTP).

- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 20 μ l nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 5 μ l di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo FIRST.
- In una stanza separata caricare 5 μ l di retrotrascritto (cDNA) di ciascun campione, 5 μ l di cDNA del controllo negativo RT, 5 μ l di cDNA del controllo positivo e 5 μ l del retrotrascritto del bianco nelle rispettive provette.

c) Kit di AMPLIFICAZIONE SEMI-NESTED usato: GeneAmp® RNA PCR Core Kit.
Ditta: Applied Biosystem

Composizione del Kit: vedi kit di RETROTRASCRIZIONE.

ATTENZIONE: per ottenere il **Buffer di Reazione 5X** diluire 1:2 il “**10X PCR Buffer II**” con **Acqua Nuclease free**.

Master Mix Semi-Nested

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	24,75 µl
Buffer di Reazione 5X	5X	1X	10 µl
dNTP Mix (costituita miscelando i singoli dNTP del kit)	10 mM	0,4 mM	2 µl
MgCl ₂	25 mM	1 mM	2 µl
Primer AV2 (Forward)	50 µM	0,5 µM	0,5 µl
Primer AV3 (Reverse)	50 µM	0,5 µM	0,5 µl
AmpliAq® DNA Polymerase	5U/µl	0,025 U/µl	0,25 µl
DNA	/	/	10 µl
Volume Totale	/	/	50 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una provetta da 1,5-2,0 ml Nuclease free per costituire la miscela dei dNTP (**dNTP Mix**), una o più provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo, del controllo negativo **RT**, del controllo negativo **FIRST** e del controllo negativo **SEMI-NESTED**.
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare, se non è già pronta, la **dNTP Mix** miscelando in proporzioni eguali i singoli dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) nella apposita provetta (ad *Es.* 100 µl di ciascun dNTP).

- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 40 μ l nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 10 μ l di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo SEMI-NESTED.
- In una stanza separata caricare 10 μ l di DNA di ciascun campione, 10 μ l di DNA del controllo negativo RT, 10 μ l di DNA di controllo negativo FIRST, 10 μ l di DNA del controllo positivo e 10 μ l del bianco precedentemente amplificato nelle rispettive provette.

APPENDICE G

Preparazione dei primers

Prima di procedere con la preparazione dei primers, compilare foglio di lavoro “*Preparazione Stock Solution Primers*”.

I primers utilizzati per tale procedura sono quelli indicati di seguito.

Primers *Semi-Nested RT-PCR HAV*

PRIMERS	SEQUENZA
AV1 (Reverse)	5'-GGA AAT GTC TCA GGT ACT TTC TTT G-3'
AV2 (Forward)	5'-GTT TTG CTC CTC TTT ATC ATG CTA TG-3'
AV3 (Reverse)	5'-TCC TCA ATT GTT GTG ATA GC-3'

Soluzione Stock Madre Primers 200 μ M:

I Primers vengono acquistati da ditte specializzate che li inviano nella forma liofilizzata, con allegato un documento indicante:

- Caratteristiche fisico-chimiche.
- Quantità assoluta in μ g.
- Numero di nmoli.
- Tipo di purificazione.

Prima del loro, impiego essi devono essere opportunamente reidratati con acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 200 μ M. Per calcolare la quantità di acqua da aggiungere al liofilizzato applicare la seguente formula:

$$\text{N}^\circ \text{ nmoli ricevute}/200 = \mu\text{l di acqua da aggiungere}$$

Sulla provetta della Soluzione Stock Madre deve essere indicato il nome del primer e la concentrazione di 200 μM .

N.B.: La soluzione stock va conservata a $\cong -20^\circ\text{C}$ e impiegata come base di partenza per realizzare la Soluzioni di Lavoro 50 μM . Essa va scongelata solo per il tempo strettamente necessario.

Soluzioni di Lavoro Primers 50 μM :

- Scongellare la Soluzione Stock Madre (200 μM) di ciascun primer (AV1, AV2, AV3).
- Preparare un numero opportuno di provette Nuclease free da 0.2 μl ed etichettarle rispettivamente con la dicitura “AV1”, “AV2”, “AV3”, indicando la concentrazione di 50 μM .
- Dispensare in ciascuna provetta 75 μl di acqua acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free.
- Aggiungere alle corrispondenti provette 25 μl di ciascun primer (AV1, AV2, AV3) alla concentrazione di 200 μM .

APPENDICE H

Preparazione del TBE 1X:

- Diluire 100 ml di TBE 10X in 900 ml di acqua distillata o deionizzata.
- Conservare a temperatura ambiente (+15 / +25°C).

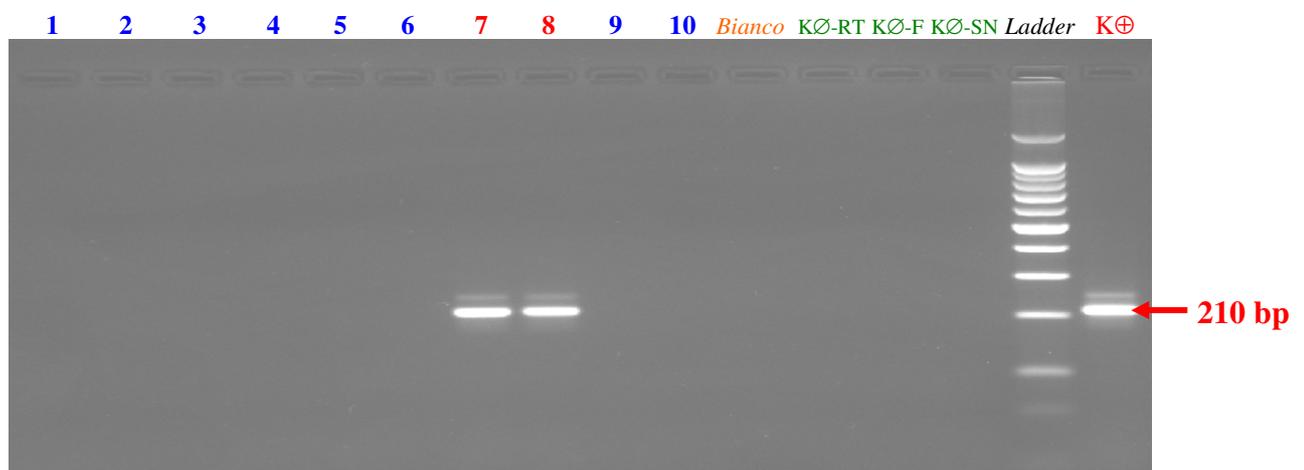
Preparazione del gel di agarosio al 2%:

- Pesare 2 g di agarosio e porli dentro una beuta di vetro.
- Aggiungervi 100 ml di TBE 1X.
- Fare sciogliere l'agarosio in forno a microonde alla massima potenza per \cong 1 min e 30 sec.
- Aggiungere, sotto cappa chimica, 5 μ l di Etidio Bromuro (conservato a \cong +4°C).
- Mescolare accuratamente.
- Posizionare il lettino nell'apposito supporto per la preparazione del gel ed inserire il/i pettine/pettini con un numero di pozzetti adeguato alla dimensione del lettino e/o al numero di campioni in esame, tenendo anche conto dei controlli e del Ladder.
- Versare il gel nel lettino evitando la formazione di bolle.
- Lasciare solidificare a temperatura ambiente per \cong 15-20 min. (deve diventare opaco), togliere il/i pettine/pettini e utilizzare.

N.B.: le quantità relative di agarosio e TBE 1X possono variare in funzione delle esigenze, avendo cura di mantenere costante il rapporto del 2%.

APPENDICE I

Letture di una corsa elettroforetica di Semi-Nested RT-PCR per HAV



Semi-Nested RT-PCR HAV: Linea 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 e 10, **campioni negativi**; Linea 7 e 8, **campioni positivi**; Linea 11, **Bianco**; Linea 12, **K- Retrotrascrizione (RT)**; Linea 13, **KØ FIRST (F)**; Linea 14, **KØ Semi-Nested (SN)**; Linea 15, **Ladder (100 bp)**; Linea 16, **K⊕**.

3.7.2 REAL TIME RT-PCR PER LA RICERCA DELL'HAV

La presente procedura, messa a punto nel 2013, ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la ricerca dell'RNA del virus responsabile dell'epatite A (HAV) in campioni biologici (acque, Molluschi Eduli Lamellibranchi) e in lisati di colture cellulari, mediante una Real Time RT-PCR *One-Step*, che utilizza due coppie di primers e le relative sonde (probes) idrolitiche di tipo TaqMan (estremità 5' "*reporter*" marcato con FAM, estremità 3' "*quencher*" marcato con MGB) specifici rispettivamente per il gene che codifica per la **5'-NTR (non codificante)** dell'HAV e per il virus Controllo di Processo della prova (il Mengovirus). Può, inoltre, essere impiegata per l'identificazione di ceppi virali isolati.

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

La Real Time RT-PCR per la ricerca dell'HAV prevede una reazione *One-Step* di retrotrascrizione e amplificazione a catena della polimerasi di tipo Real Time, con la coppia di primers "**HAV68 (FW)**" e "**HAV240 (REW)**" e la sonda TaqMan "**HAV150p**" marcata FAM-MGB per l'HAV. Questo set di primers dà origine ad un amplificato di **173 bp**.

Nella prova sono, inoltre, utilizzati la coppia di primers "**Mengo110 (FW)**" e "**Mengo209 (REV)**" e la sonda TaqMan "**Mengo147p**" marcata FAM-MGB per il **Mengovirus**. Questo set di primers dà origine ad un amplificato di **100 bp**.

Nella Real Time RT-PCR *One-Step* la Retrotrascrizione e l'Amplificazione avvengono nella stessa provetta/pozzetto di reazione.

Per la **Real Time RT-PCR** si impiega un apposito kit disponibile in commercio (Invitrogen - RNA UltraSense™ *One-Step* (Quantitative) qRT-PCR System), contenente i reagenti necessari per le master mix.

Prima di procedere con la prova di Real Time RT-PCR *One-Step* per HAV, il campione opportunamente preparato, come descritto al punto 3.5, viene sottoposto ad estrazione dell'RNA come descritto al punto 3.6. Anche il

controllo positivo viene opportunamente preparato, procedendo all'estrazione del suo RNA e alla sua diluizione, se necessario, come descritto al punto 3.6.

Per tenere sotto controllo l'eventuale perdita del virus target durante la fase di estrazione, prima di procedere con l'estrazione, i campioni sono addizionati con una quantità nota di un virus che funge da **Controllo di Processo (CP)**. Affinché costituisca un buon modello genetico, morfologico e fisico-chimico, il virus selezionato come controllo di processo dovrebbe essere un virus coltivabile, privo di envelope (come l'HAV), ad RNA a singolo filamento positivo e di dimensioni simili a quelle del virus target. Il virus controllo di processo dovrebbe, inoltre, avere una persistenza nell'ambiente simile a quella del virus target ed essere sufficientemente distinto geneticamente da esso in modo da non cross-reagire, deve inoltre non essere comunemente presente nelle matrici da analizzare. Virus con tali caratteristiche che sia utilizzabile come controllo di processo nella ricerca dell'HAV e dei NoVs è il Mengovirus (Famiglia: *Picornaviridae*). Tale controllo va utilizzato per verificare l'efficienza di estrazione.

Il CP va opportunamente preparato prima dell'esecuzione della prova diluendolo:

- 10^{-1}
- 10^{-2}
- 10^{-3}

per costruire la Curva Standard.

Nella prova viene inserito anche un **Controllo Esterno (EC)** costituito da RNA del virus target a concentrazione nota e tale da non inibire la reazione di amplificazione. Tale controllo va utilizzato per verificare l'efficienza di amplificazione della prova.

Il EC va opportunamente preparato prima dell'esecuzione della prova alla concentrazione:

- Tal Quale
- 10^{-1}
- 10^{-2}

per costruire la Curva Standard.

La **Real Time RT-PCR** prevede le seguenti **4 fasi**:

1 Preparazione e distribuzione delle Master Mix per la Real Time

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Per eseguire questa Real Time è necessario preparare due Mix di reazione differenti: una ***Master Mix Real Time per il Target (HAV)*** e una ***Master Mix Real Time per il Controllo di Processo (Mengovirus)***.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "*Real Time RT-PCR Virus Epatite A (HAV)*".

Quindi:

- Predisporre una piastra per Real Time PCR tenendo conto del numero di campioni da amplificare in due repliche, del Bianco in due repliche, del Controllo Negativo (NTC) in due repliche e del Controllo Positivo (PTC) in singolo/doppio pozzetto per ciascuna delle tre concentrazioni previste (RNA estratto da ceppo di HAV).

La **Curva Standard del Controllo Positivo o Controllo Esterno (EC)**, deve essere, infatti, prevista disponendo in singolo o doppio l'RNA (5 µl H₂O + 1 µl EC) del virus target (HAV) alle seguenti tre concentrazioni: Tal Quale (TQ), diluito 1:10 (10⁻¹) e diluito 1:100 (10⁻²). Nella prova i campioni devono essere esaminati anche con aggiunta del Controllo Esterno (in singolo pozzetto/provetta).

Nel predisporre la piastra tenere conto, inoltre, dei pozzetti da utilizzare per i campioni con la ***Master Mix Real Time per il Controllo di Processo*** (in singolo pozzetto/provetta).

Infine, in piastra deve essere inserita anche **la Curva Standard del CP**, che deve essere esaminato in singolo (5 µl) alle seguenti tre concentrazioni: diluito 1:10 (10⁻¹), diluito 1:100 (10⁻²) e diluito 1:1.000 (10⁻³).

N.B.: è possibile esaminare i campioni anche diluiti 1:10.

N.B.B.: è possibile utilizzare, al posto della piastra, delle provette (singole o in strip) idonee per Real Time PCR. Vista la complessità

della prova (elevato numero di controlli) è preferibile l'utilizzo della piastra.

- Se si effettua la prova in piastra, stabilire la disposizione dei campioni e dei controlli compilando l'apposito foglio di lavoro "*Real Time RT-PCR Virus Epatite A (HAV)*" (**APPENDICE J**).

N.B.: se si effettua la prova in provette, contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta (o le strip).

- Preparare la *Master Mix Real Time per il Target (HAV)* seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE K-a**, tenendo conto del fatto che sia i campioni che il controllo negativo devono essere esaminati in due repliche. La curva standard di EC (Controllo Positivo) può essere esaminata in singolo o in doppio. Inoltre, ogni campione deve essere esaminato anche con aggiunta di EC (in singolo).

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (125 μM e 12,5 μM) del primer **HAV68 (FW)**, le soluzioni (225 μM e 22,5 μM) del primer **HAV240 (REV)** e le soluzioni (62,5 μM e 6,25 μM) della sonda **HAV150p** secondo quanto riportato nell'**APPENDICE L**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro di ciascun primer/sonda (rispettivamente 12,5 μM del primer **HAV68**, 22,5 μM del primer **HAV240** e 6,25 μM della sonda **HAV150p**).

- Preparare la *Master Mix Real Time per il Controllo di Processo* seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE K-b**, tenendo conto del fatto che sia i campioni che i controlli (controllo negativo e curva standard del CP) devono essere esaminati in singolo.

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (125 μM e 12,5 μM) del primer **Mengo 110 (FW)**, le soluzioni (225 μM e 22,5 μM) del primer **Mengo 209 (REV)** e le soluzioni (62,5 μM e 6,25 μM) della sonda **Mengo147p** secondo quanto riportato nell'**APPENDICE L**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro di ciascun primer/sonda (rispettivamente 12,5 μM del primer **Mengo 110**, 22,5 μM del primer **Mengo 209** e 6,25 μM della sonda **Mengo147p**).

- Dispensare la *Master Mix Real Time per il Target (HAV)* e la *Master Mix Real Time per il Controllo di Processo* in ciascun pozzetto della

piastra per Real Time PCR (o in ciascuna provetta) di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE K** (rispettivamente a e b).

- Aggiungere 5 µl di acqua distillata sterile Nuclease free nei pozzetti (provette) del Controllo Negativo (due repliche per la Mix del Target HAV, in singolo per la Mix del CP) (**APPENDICE K a e b**).

2 Trasferimento dell'RNA nelle provette/piastre della Master Mix Real Time per il Target (HAV)

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di RNA (in totale due repliche) di ciascun campione (**APPENDICE J e APPENDICE K-a**).
- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl (in totale due repliche) del Bianco (**APPENDICE J e APPENDICE K-a**).
- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di RNA (in singolo) di ciascun campione (o Bianco) + 1 µl di EC non diluito (**APPENDICE J e APPENDICE K-a**).
- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di acqua Nucleasi free + 1 µl di ciascuna concentrazione (TQ, 10^{-1} , 10^{-2}) di RNA-EC o Controllo Positivo (**APPENDICE J e APPENDICE K-a**) in singolo o in doppio (in totale tre pozzetti o sei pozzetti). Così si ottiene la Curva Standard del Controllo Positivo.

3 Trasferimento dell'RNA nelle provette/piastre della Master Mix Real Time per il Controllo di Processo

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di RNA (in singolo) di ciascun campione e del Bianco (**APPENDICE J e APPENDICE K-b**).

- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di RNA (in singolo) del Bianco (**APPENDICE J** e **APPENDICE K-b**).
- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di RNA del CP, che deve essere esaminato in singolo alle seguenti tre concentrazioni: diluito 1:10 (10^{-1}), diluito 1:100 (10^{-2}) e diluito 1:1.000 (10^{-3}) (**APPENDICE J** e **APPENDICE K-b**). Così si ottiene la Curva Standard del CP.
- Chiudere la piastra con apposito film adesivo ottico.
N.B.: se si effettua la prova in provette, chiudere ogni provetta (o le strip) con apposito tappo ottico.

4 *Reazione di TaqMan Real-Time RT-PCR*

Posizionare la/le piastra/provette nell'apposito alloggiamento dell'apparecchio per PCR Real-Time, selezionare il programma indicato come "Real Time HAV" (*Tabella 3.5*), impostare le caratteristiche principali della reazione, la posizione dei campioni e dei controlli e avviare l'analisi.

Tabella 3.5. Programma "Real-Time HAV"

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Retrotrascrizione	60 min.	+55°C	1
2	Denaturazione	5 min	+95°C	1
3	Denaturazione	15 sec.	+95°C	45
4	Annealing-Polimerizzazione	60 sec.	+60°C	
5	Annealing Polimerizzazione	60 sec.	+65°C	

RACCOLTA ED ELABORAZIONE DEI RISULTATI

Al termine della prova analizzare i risultati ottenuti operando sul software secondo l'approccio raccomandato dal produttore dell'apparecchio di Real-Time PCR utilizzato. Impostare il Threshold secondo le istruzioni del produttore dell'apparecchio. Il Threshold dovrebbe essere impostato in

maniera tale da attraversare l'area dove le curve di amplificazione (in rappresentazione logaritmica) sono parallele (fase esponenziale).

Tutte le curve di amplificazione devono essere verificate per identificare gli eventuali falsi positivi (reazioni con valori di **Ct** non associati con amplificazione) causati da segnali di background alti o irregolari. Quanto rilevato deve essere annotato sul foglio di lavoro "*Real-Time RT-PCR Virus Epatite A (HAV)*" ed i risultati di ogni reazione condizionata da tali segnali, alti o irregolari, devono essere considerati negativi.

Tutte le curve di amplificazione devono essere controllate per verificare che i valori di **Ct** generati dall'analisi del software corrispondano alla fase esponenziale dell'amplificazione (e che essa non sia distorta dal rumore di fondo alto o irregolare). Laddove i valori di **Ct** siano distorti, i valori corretti devono essere interpretati e registrati sul foglio di lavoro "*Real-Time RT-PCR Virus Epatite A (HAV)*". Non è necessario riportare sul foglio di lavoro il **Ct** ottenuto; se lo si ritiene sufficiente, riportare solo la sua interpretazione in termini qualitativi (positivo/negativo; +/-).

Controllare i valori di **Ct** di tutte le serie di diluizioni delle curve standard (Controllo di Processo; Controllo Positivo o EC). I valori non idonei vanno scartati, i restanti devono essere utilizzati per creare le Curve Standard. Curve del Controllo di Processo con $R^2 < 0,98$ non dovrebbero essere utilizzate per i calcoli.

Verificare i **Ct** del Controllo di Processo nei pozzetti con RNA dei campioni ed utilizzare questi valori per stimare il recupero (efficienza di estrazione del campione), facendo riferimento alla Curva Standard del CP. Si considera accettabile un'efficienza di estrazione $> 1\%$.

L'**efficienza di estrazione** del campione è calcolata confrontando il **Ct** ottenuto dal campione con il **Ct** del Controllo di Processo (Standard). La formula di calcolo è:

$$R = 2^{-\Delta Ct} \times 0.6$$

dove $\Delta Ct = Ct$ campione – Ct Standard CP alla diluizione 10^{-1}

Oppure

$$R = 2^{-\Delta Ct} \times 0.06$$

dove $\Delta Ct = Ct$ campione – Ct Standard CP alla diluizione 10^{-2}

Verificare i Ct del Controllo Esterno (EC) nei pozzetti con RNA dei campioni ed utilizzare questi valori per stimare l'efficienza di amplificazione del campione, facendo riferimento alla Curva Standard del EC. Si considera accettabile un'efficienza di amplificazione $> 50\%$.

L'**efficienza di amplificazione** del campione è calcolata valutando il Ct del target (HAV) nel pozzetto del campione + EC con il Ct del target da solo (alla stessa diluizione). La formula di calcolo è:

$$E = 2^{-\Delta Ct}$$

dove $\Delta = Ct$ campione- Ct standard

La valutazione dell'efficienza di estrazione e dell'efficienza di amplificazione sono parametri per assicurare la qualità della prova e non vanno utilizzati per il calcolo dei risultati analitici.

Affinché la prova sia ritenuta valida:

- il **Controllo Positivo** (PTC) deve essere positivo, ossia deve esprimere un $Ct \leq 44$ cicli (**APPENDICE M**). Nel caso in cui il Controllo Positivo non presenta la reattività attesa, ripetere la prova. Se il problema si ripresenta, estrarre nuovamente il Controllo Positivo.
- il **Controllo Negativo** (NTC) deve essere negativo, ossia deve esprimere un $Ct > 44$ cicli (**APPENDICE M**). Se non presenta la reattività attesa occorre ripetere la prova o, in ogni caso, riesaminare ogni campione che presenta risultati positivi.
- il **Bianco** deve essere negativo, ossia deve esprimere un $Ct > 44$ cicli. Se non presenta la reattività attesa occorre ripetere la prova o, in ogni caso, riesaminare ogni campione che presenta risultati positivi.

Ogni controllo (CP o EC) possiede un proprio valore atteso valido o un range di valori. Se i valori osservati per i controlli differiscono da quelli attesi, occorre ripetere la prova.

La quantità minima teorica di target (HAV) rilevabile con questa procedura è 10 copie di genoma.

Un campione è considerato **positivo** se presenta un $Ct \leq 44$ cicli (**APPENDICE M**); indice della presenza di RNA riferibile a HAV.

Un campione è considerato **negativo** se presenta un $Ct > 44$ cicli (**APPENDICE M**); indice dell'assenza di RNA riferibile a HAV.

Nel caso in cui il risultato sia di incerta interpretazione è bene ripetere la prova a partire dalla **amplificazione** (punto 1). Se il problema si ripresenta ripartire dall'estrazione del campione (punto 3.6).

Se non si ottiene un risultato valido, il campione viene esitato come “non eseguibile”, specificando, se lo si ritiene opportuno, la motivazione di tale esito.

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- **Costafreda M.I., Bosch A., Pintò R.M. (2006). Development, evaluation, and standardization of real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol.*, 72(6): 3846-55. ⁽⁶⁷⁾**
- **Croci L., Losio N. – Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante RT-PCR convenzionale e Real Time PCR. Procedura Istituto Superiore di Sanità e Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna – Brescia. ⁽⁷⁸⁾**
- **ISO/TS 15216-2:2013: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection. ⁽¹⁷⁴⁾**
- **Martin L.R., Duke G.M., Osorio J.E., Hall D.J., Palmenberg A.C. (1996). Mutational analysis of the Mengovirus poly© tract and surrounding heteropolymeric sequences. *J. Virol.*, 70(3): 2027-2031. ⁽²⁵¹⁾**
- **Metodica allegata al kit Invitrogen - RNA UltraSense™ One-Step (Quantitative) qRT-PCR System. ⁽²⁷⁵⁾**
- **Metodo qualitativo “Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante Real Time PCR” - *Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali nei molluschi bivalvi - Istituto Superiore di Sanità.* ⁽²⁸⁰⁾**
- **Pintò R.M., Costafreda M.I., Ribes E., Bosch A. (2009). From quantitative risk-assessment to risk management in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. Manuscript submitted to *Appl. Environ. Microbiol.* ⁽³¹⁸⁾**
- **POMIAC01.002 Rev.2 del 28.02.2012: Metodo per la ricerca di Epatite A e Norovirus in alimenti mediante Real-Time PCR. ⁽³¹⁹⁾**

APPENDICE J

Esempio Disposizione dei Campioni e dei Controlli

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 5 µl campione	2 5 µl campione	3 5 µl campione	4 5 µl campione	5 5 µl campione	6 5 µl campione	7 5 µl campione	8 5 µl campione	9 5 µl campione	etc.	K∅ 5 µl H ₂ O	
B	1 5 µl campione	2 5 µl campione	3 5 µl campione	4 5 µl campione	5 5 µl campione	6 5 µl campione	7 5 µl campione	8 5 µl campione	9 5 µl campione	etc.	K∅ 5 µl H ₂ O	
C	1 5 µl campione + 1 µl EC	2 5 µl campione + 1 µl EC	3 5 µl campione + 1 µl EC	4 5 µl campione + 1 µl EC	5 5 µl campione + 1 µl EC	6 5 µl campione + 1 µl EC	7 5 µl campione + 1 µl EC	8 5 µl campione + 1 µl EC	9 5 µl campione + 1 µl EC	etc.		
D										K⊕ 5 µl H ₂ O + 1 µl EC	K⊕ 5 µl H ₂ O + 1 µl EC 1:10	K⊕ 5 µl H ₂ O + 1 µl EC 1:100
E										K⊕ 5 µl H ₂ O + 1 µl EC	K⊕ 5 µl H ₂ O + 1 µl EC 1:10	K⊕ 5 µl H ₂ O + 1 µl EC 1:100
F	1 5 µl campione	2 5 µl campione	3 5 µl campione	4 5 µl campione	5 5 µl campione	6 5 µl campione	7 5 µl campione	8 5 µl campione	9 5 µl campione	etc.	K∅ 5 µl H ₂ O	
G										K⊕ 5 µl CP 1:10	K⊕ 5 µl CP 1:100	K⊕ 5 µl CP 1:1.000
H												

HAV

NoV
GI

NoV
GH

CP

Legenda:

K⊕ = Controllo positivo.

K∅ = Controllo negativo.

1, 2, 3, 4, etc. = Campioni (il Bianco è trattato come tutti gli altri campioni).

APPENDICE K

La preparazione delle due Mix di reazione: (a) *Master Mix Real Time per il Target (HAV)* e (b) *Master Mix Real Time per il Controllo di Processo* deve essere effettuata in un'area appositamente dedicata.

Kit di Real Time usato: RNA UltraSense™ One-Step (Quantitative) qRT-PCR System.
Ditta: Invitrogen.

Composizione del Kit:

- **RNA UltraSense™ Enzyme Mix:** (includes RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor) 250 µl.
- **RNA UltraSense™ 5X Reaction Mix:** (contains 1 mM of each dNTP) 1 ml.
- **20X Bovine Serum Albumin (BSA):** UltraPure, non-acetylated (1 mg/ml) 300 µl.
- **50-mM Magnesium Sulfate (MgSO₄):** 1 ml
- **ROX Reference Dye:** 100 µl.

a) *Master Mix Real Time per il Target (HAV)*

Master Mix Real Time per il Target (HAV)

Reagenti	Conc. iniziale	Conc. finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease Free	/	/	10,25 µl
RNA UltraSense™ One-Step qRT-PCR 5X Reaction Mix	5X	1X	5 µl
Primer HAV68 (FW)	12,5 µM	500 nM	1 µl
Primer HAV240 (REV)	22,5 µM	900 nM	1 µl
Sonda HAV150 (FAM-MGB)	6,25 µM	250 nM	1 µl
RNA UltraSense™ One-Step qRT-PCR Enzyme Mix	/	/	1,25 µl
Rox Reference Dye	/	/	0,5 µl
RNA	/	/	5 µl
Volume totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una o due provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) ed una piastra di reazione Real-Time o le strips delle provette di reazione.
- Determinare il numero di reazioni da effettuare (N), tenendo conto del numero dei campioni senza (in doppio) e con (in singolo) EC, del bianco in doppia replica, del Controllo Positivo/Esterno (PTC/EC) in una/due repliche per ogni diluizione, del Controllo Negativo (NTC) in due repliche. Preparare un volume in eccesso di miscela di reazione per compensare le eventuali perdite di master mix dovute all'adesione della miscela alle pareti della microprovetta e/o puntali.
 - Se il numero di campioni (n), compresi i controlli, è tra 1 e 14, allora $N = n + 1$.
 - Se il numero di campioni (n), compresi i controlli, è > 15 , allora $N = n + 2$.
- Preparare, nella/e provetta/e da 1,5-2,0 ml Nuclease free, la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati.
- Dopo aver preparato la Master Mix, miscelarla gentilmente per pipettamento o per inversione, evitando la formazione di bolle.
- Centrifugare brevemente la master mix per raccoglierne il contenuto sul fondo e mantenerla in ghiaccio.
- Posizionare in ghiaccio la piastra di reazione Real-Time o le strips delle provette di reazione.
- Dispensare $20\ \mu$ della Master Mix preparata, negli appositi pozzetti della piastra o nelle strips.
- Aggiungere $5\ \mu\text{l}$ di acqua Nuclease free nei pozzetti/provette del controllo negativo e del controllo positivo.
- In una stanza separata, caricare $5\ \mu\text{l}$ di ciascun campione in esame, $5\ \mu\text{l}$ del bianco, $1\ \mu\text{l}$ di controllo positivo (EC) TQ (non diluito) ai pozzetti del Controllo di Amplificazione di ciascun campione e $1\ \mu\text{l}$ di controllo positivo (EC) alle tre diverse concentrazioni (aggiungerlo ai $5\ \mu\text{l}$ di acqua in un pozzetto o due pozzetti per concentrazione) della Curva Standard del Controllo Positivo nei rispettivi pozzetti/provette (come indicato nella tabella “Disposizione dei campioni e dei controlli”, **APPENDICE J**).

b) Master Mix Real Time per il Controllo di Processo**Master Mix Real Time per il Controllo di Processo**

Reagenti	Conc. iniziale	Conc. finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease Free	/	/	10,25 µl
RNA UltraSense™ One-Step qRT-PCR 5X Reaction Mix	5X	1X	5 µl
Primer Mengo 110 (FW)	12,5 µM	500 nM	1 µl
Primer Mengo 209 (REV)	22,5 µM	900 nM	1 µl
Sonda Mengo147p (FAM-MGB)	6,25 µM	250 nM	1 µl
RNA UltraSense™ One-Step qRT-PCR Enzyme Mix	/	/	1,25 µl
Rox Reference Dye	/	/	0,5 µl
RNA	/	/	5 µl
Volume totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una o due provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) ed una piastra di reazione Real-Time o le strips delle provette di reazione.
- Determinare il numero di reazioni da effettuare (N), tenendo conto del numero dei campioni in singolo, del bianco in singolo, del Controllo Negativo (NTC) in due repliche, del Controllo di Processo (CP) in singolo per ogni diluizione. Preparare un volume in eccesso di miscela di reazione per compensare le eventuali perdite di master mix dovute all'adesione della miscela alle pareti della microprovetta e/o puntali.
 - Se il numero di campioni (n), compresi i controlli, è tra 1 e 14, allora $N = n + 1$.
 - Se il numero di campioni (n), compresi i controlli, è > 15, allora $N = n + 2$.
- Preparare, nella/e provetta/e da 1,5-2,0 ml Nuclease free, la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati.
- Dopo aver preparato la Master Mix, miscelarla gentilmente per pipettamento o per inversione, evitando la formazione di bolle.

- Centrifugare brevemente la master mix per raccoglierne il contenuto sul fondo e mantenerla in ghiaccio.
- Posizionare in ghiaccio la piastra di reazione Real-Time o le strips delle provette di reazione.
- Dispensare 20 μ della Master Mix preparata, negli appositi pozzetti della piastra o nelle strips.
- Aggiungere 5 μ l di acqua Nuclease free nei pozzetti/provette del controllo negativo.
- In una stanza separata, caricare 5 μ l di ciascun campione in esame, 5 μ l del bianco e 5 μ l di controllo positivo (CP) alle tre diverse concentrazioni nei rispettivi pozzetti/provette (come indicato nella tabella “Disposizione dei campioni e dei controlli”, **APPENDICE J**).
- Chiudere la piastra con apposito film adesivo ottico.
N.B.: se si effettua la prova in provette, chiudere ogni provetta (o le strip) con apposito tappo ottico.
- Inserire la piastra/strip nell'apparecchio Real-Time.
- Selezionare il programma “**Real Time HAV**” e avviarlo.

APPENDICE L

Preparazione dei primers e dei Probes

Prima di procedere con la preparazione dei primers/Probe, compilare foglio di lavoro “*Preparazione Stock Solution Primers/Probos*”.

I primers utilizzati per tale procedura sono quelli indicati di seguito.

Primers e Probe *Real Time RT-PCR HAV*

PRIMERS	SEQUENZA
HAV68 (FW)	5' - TCACCGCCGTTTGCCTAG -3'
HAV240 (REV)	5' - GGAGAGCCCTGGAAGAAAG -3'
HAV150p (Probe)	FAM 5' -CCTGAACCTGCAGGAATTAA-3' MGB

Primers e Probe *Real Time RT-PCR Mengovirus*

PRIMERS	SEQUENZA
Mengo110 (FW)	5' - GCGGGTCCTGCCGAAAGT -3'
Mengo209 (REV)	5' - GAAGTAACATATAGACAGACGCACAC -3'
Mengo147p (Probe)	FAM 5' -ATCACATTACTGGCCGAAGC-3' MGB

Soluzione Stock Madre Primers/Probes 225 μ M / 125 μ M / 62,5 μ M:

I Primers vengono acquistati da ditte specializzate che li inviano nella forma liofilizzata, con allegato un documento indicante:

- Caratteristiche fisico-chimiche.
- Quantità assoluta in μ g.
- Numero di nmoli.
- Tipo di purificazione.

Prima del loro, impiego essi devono essere opportunamente reidratati con acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 225 μM (**Primer HAV240 e Primer Mengo 209**), 125 μM (**Primer HAV68 e Primer Mengo 110**) e 62,5 μM (**Sonda HAV150 e Sonda Mengo 147**). Per calcolare la quantità di acqua da aggiungere al liofilizzato applicare la seguente formula:

$$\text{N}^\circ \text{ nmoli ricevute} / 225 \text{ (125 o 62,5)} = \mu\text{l di acqua da aggiungere}$$

Sulla provetta della Soluzione Stock Madre deve essere indicato il nome del primer e la concentrazione di in μM .

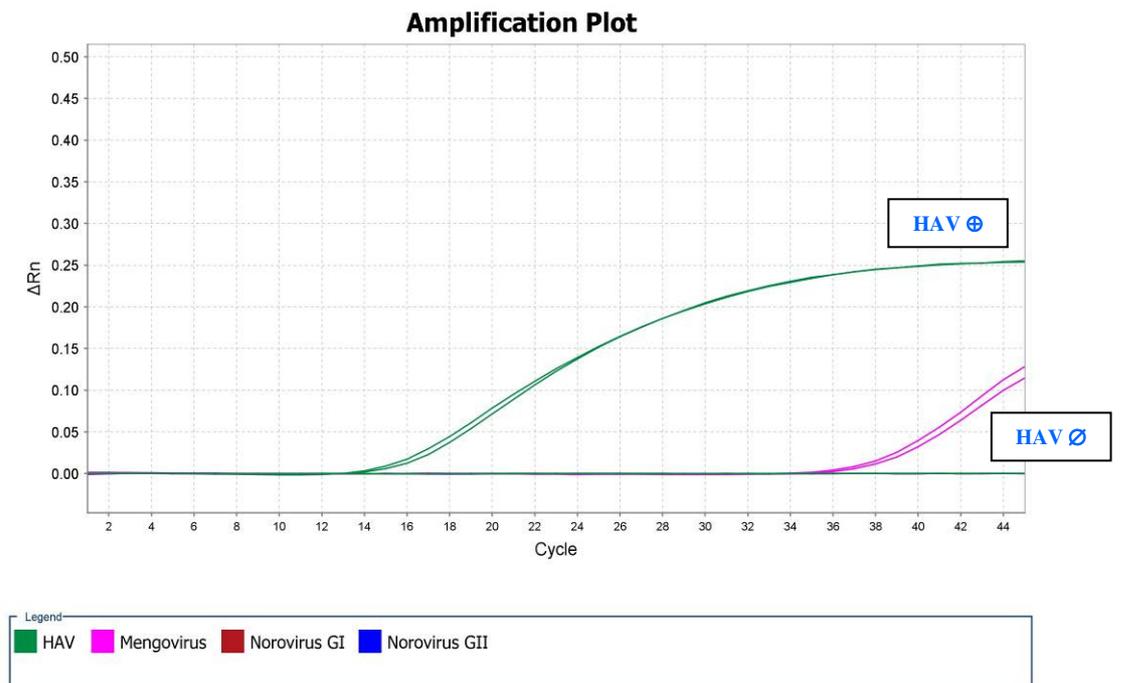
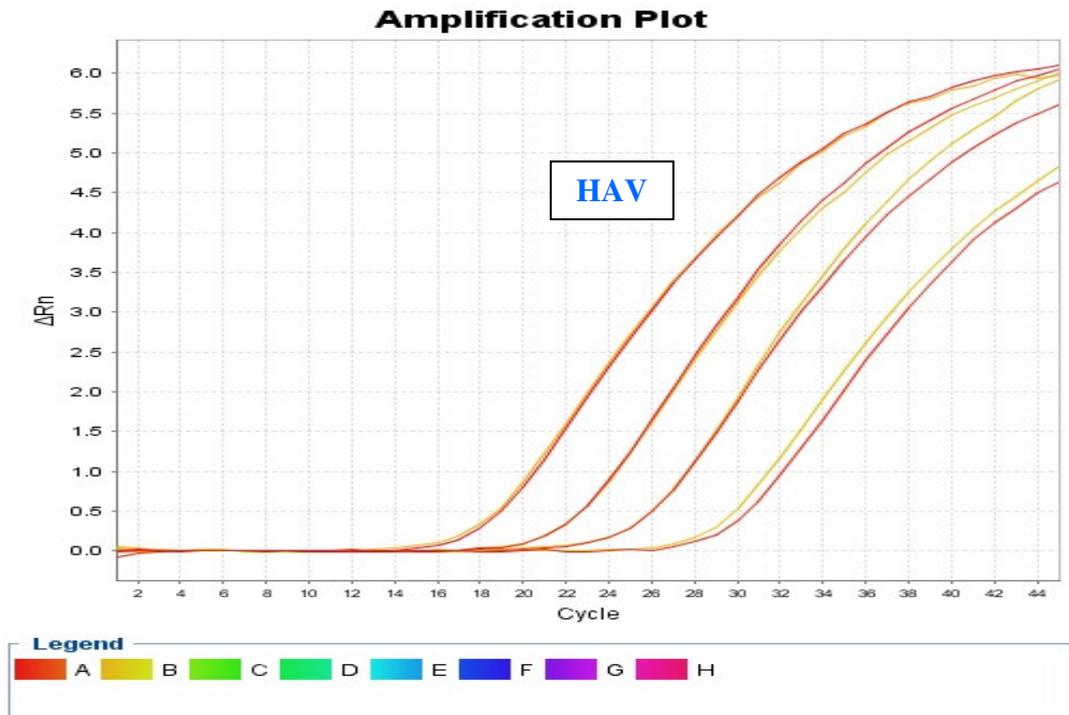
N.B.: La soluzione stock va conservata a $\cong -20^\circ\text{C}$ e impiegata come base di partenza per realizzare la Soluzioni di Lavoro **22,5 μM / 12,5 μM / 6,25 μM** . Essa va scongelata solo per il tempo strettamente necessario.

Soluzioni di Lavoro Primers/Probes 22,5 μM / 12,5 μM / 6,25 μM :

- Scongela la Soluzione Stock Madre (**225 μM / 125 μM / 62,5 μM**) di ciascun primer/sonda, rispettivamente: 225 μM (**Primer HAV240 e Primer Mengo209**), 125 μM (**Primer HAV68 e Primer Mengo110**) e 62,5 μM (**Sonda HAV150 e Sonda Mengo147**).
- Preparare un numero opportuno di provette Nuclease free da 0.2 μl ed etichettarle rispettivamente con il nome del primer/sonda, indicando la concentrazione in μM .
- Dispensare in ciascuna provetta 90 μl di acqua acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free.
- Aggiungere alle corrispondenti provette 10 μl di ciascun primer/sonda alla concentrazione iniziale.

APPENDICE M

Curve di amplificazione della Real Time RT-PCR per HAV



3.7.3 RT-PCR BOOSTER PER LA RICERCA DEI NOVS

La presente procedura, messa a punto nel 2013, ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la ricerca dell'RNA dei *Norovirus* in campioni biologici (acque, Molluschi Eduli Lamellibranchi) e in lisati di colture cellulari, mediante una RT-PCR *Booster* specifica per il gene che codifica per la regione altamente conservata della **RNA Polimerasi RNA-dipendente** (RdRp) nella **ORF1** del genoma virale. Può, inoltre, essere impiegata per l'identificazione di ceppi virali isolati.

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

La RT-PCR *Booster* per NoVs prevede 1 reazione di Retrotrascrizione (RT) con **Random Hexamers** seguita da 2 reazioni di amplificazione a catena della polimerasi (prima PCR o **FIRST** e seconda PCR o **Booster**), ciascuna con la stessa coppia di primers, “**JV12Y (Forward)**” e “**JV13I (Reverse)**”.

Per la **RT** dell'RNA virale, la **FIRST PCR** e la **Booster PCR** si impiega un apposito kit disponibile in commercio (Applied Biosystems - GeneAmp[®] RNA PCR Core Kit), contenente i reagenti necessari per le master mix.

Prima di procedere con la prova di RT-PCR *Booster* per NoVs, il campione opportunamente preparato, come descritto al punto 3.5, viene sottoposto ad estrazione dell'RNA come descritto al punto 3.6. Anche il controllo positivo viene opportunamente preparato, procedendo all'estrazione del suo RNA e alla sua diluizione, se necessario, come descritto al punto 3.6.

1 Reazione di Retrotrascrizione (RT)

La **RT PCR** prevede le seguenti **3 fasi**:

1.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix RT

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "RT-PCR Booster Norovirus (NoVs)".

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da retrotrascrivere, del Controllo Positivo (RNA di NoV), del Controllo Negativo RT (acqua Nuclease free) e del Bianco (controllo dell'estrazione).
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix RT seguendo le indicazioni del kit di amplificazione in uso, riportate nell' **APPENDICE N** (a).
- Dispensare la Master Mix RT in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE N** (a).
- Aggiungere 5 µl di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo **RT** (**APPENDICE N**).

1.2 Trasferimento dell'RNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 5 µl di RNA di ciascun campione (**APPENDICE N-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 5 µl di RNA Controllo Positivo (**APPENDICE N-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 5 µl di Bianco (**APPENDICE N-a**).

1.3 Reazione di Retrotrascrizione dell'RNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come "RETROSCRIZIONE" (**Tabella 3.6**) e dare lo "RUN/START".

Tabella 3.6. Programma “RETROSCRIZIONE”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Retrotrascrizione	60 min.	+42°C	1
2	Denaturazione	5 min	+94°C	1

2 Reazione di Amplificazione FIRST del cDNA – Prima Amplificazione (FIRST PCR)

La **FIRST** PCR prevede le seguenti **3 fasi**:

2.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix FIRST

Tale operazione va eseguita in un’area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l’apposito foglio di lavoro “*RT-PCR Booster Norovirus (NoVs)*”.

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (cDNA retrotrascritto di NoV), del Controllo Negativo RT, del Controllo Negativo FIRST (acqua Nuclease free) e del Bianco.
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix FIRST seguendo le indicazioni riportate nell’**APPENDICE N** (b).

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (200 μ M e 50 μ M) dei primers (“JV12Y” e “JV13I”) secondo quanto riportato nell’**APPENDICE O**. Se sono già pronte, prelevare un’aliquota della soluzione di lavoro (50 μ M) di ciascun primer.

- Dispensare la Master Mix in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell’**APPENDICE N** (b).

- Aggiungere 5 µl di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo FIRST (**APPENDICE N-b**).

2.2 Trasferimento del cDNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 5 µl di cDNA di ciascun campione (**APPENDICE N-b**).
- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 5 µl di cDNA del Controllo Negativo RT (**APPENDICE N-b**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 5 µl di cDNA del Controllo Positivo (**APPENDICE N-b**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 5 µl del Bianco retrotrascritto (**APPENDICE N-b**).

2.3 Reazione di Amplificazione FIRST del cDNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “NORO FIRST-BOOSTER” (**Tabella 3.7**) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.7. Programma “NORO FIRST-BOOSTER”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Denaturazione	5 min.	+94°C	1
2	Denaturazione	30 sec.	+94°C	40
3	Annealing	1 min. e 30 sec.	+37°C	
4	Polimerizzazione	1 min.	+72°C	
5	Polimerizzazione finale	5 min.	+72°C	1
6	Mantenimento	∞	+8°C	1

3 Reazione di Amplificazione Booster del DNA – Seconda Amplificazione (Booster PCR)

La **BOOSTER** PCR prevede le seguenti **3 fasi**:

3.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix BOOSTER

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "*RT-PCR Booster Norovirus (NoVs)*".

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (cDNA retrotrascritto di NoV), del Controllo Negativo RT, del Controllo Negativo FIRST, del Controllo Negativo BOOSTER (acqua Nuclease free) e del Bianco.
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix BOOSTER seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE N** (c).

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (200 μ M e 50 μ M) dei primers ("JV12Y" e "JV13I") secondo quanto riportato nell'**APPENDICE O**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (50 μ M) di ciascun primer.

- Dispensare la Master Mix in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE N** (c).
- Aggiungere 10 μ l di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo BOOSTER (**APPENDICE N-c**).

3.2 Trasferimento del DNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 10 µl di DNA di ciascun campione (**APPENDICE N-c**).
- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 10 µl di DNA del Controllo Negativo RT **APPENDICE N-c**.
- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 10 µl di DNA del Controllo Negativo FIRST (**APPENDICE N-c**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 10 µl di DNA del Controllo Positivo (**APPENDICE N-c**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 10 µl dell'amplificato del Bianco (**APPENDICE N-c**).

3.3 Reazione di Amplificazione Booster del cDNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “NORO FIRST-BOOSTER” (*Tabella 3.8*) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.8. Programma “NORO FIRST-BOOSTER”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Denaturazione	5 min.	+94°C	1
2	Denaturazione	30 sec.	+94°C	40
3	Annealing	1 min. e 30 sec.	+37°C	
4	Polimerizzazione	1 min.	+72°C	
5	Polimerizzazione finale	5 min.	+72°C	1
6	Mantenimento	∞	+8°C	1

4 Rivelazione del prodotto di amplificazione

Elettroforesi

- Allestire il gel di agarosio al 2% (**APPENDICE H**) con un numero di pozzetti uguale al numero complessivo degli amplificati (campioni in esame, Bianco, Controllo Negativo RT, Controllo Negativo FIRST, Controllo Negativo BOOSTER, Controllo Positivo) più un pozzetto per il Ladder.
- Posizionare il gel nella cella elettroforetica in modo che sia completamente ricoperto da TBE 1X (**APPENDICE H**).
- Dispensare in una micropiastra a 96 pozzetti con fondo ad U 10 µl di ogni amplificato e aggiungere 2 µl di loading buffer.
- Preparare la “miscela Ladder” mescolando: 2 µl di Ladder 50/100 bp, 3 µl di loading buffer e 9 µl di TBE.
N.B.: si può impiegare anche un ladder già colorato (per l’utilizzo seguire le istruzioni del produttore).
- Caricare nei pozzetti del gel 10 µl di ciascun amplificato preparato con il loading buffer (un amplificato per pozzetto), disponendoli da sinistra verso destra nel seguente ordine: campioni, Bianco, Controllo Negativo RT, Controllo Negativo FIRST, Controllo Negativo BOOSTER, Ladder, Controllo Positivo.
N.B.: se si utilizza un ordine diverso nel disporre i campioni ed i controlli, indicarlo nel foglio di lavoro e/o nel file della corsa elettroforetica.
- Caricare in un pozzetto del gel 10 µl della “miscela Ladder” preparata o 7 µl del Ladder già colorato.
- Applicare alla cella elettroforetica una corrente di circa 120 V (nel caso in cui si utilizza un gel grande) o di circa 100 V (nel caso in cui si utilizza un gel piccolo).
- Interrompere la corsa elettroforetica quando il loading buffer ha percorso almeno 5 cm. (in genere sono sufficienti 45 min. circa).
- Porre il gel sul transilluminatore a raggi UV ed analizzare l’immagine; si può quindi procedere alla sua acquisizione.

- Riportare l'esito della prova nell'apposito foglio di lavoro "*RT-PCR Booster Norovirus (NoVs)*".

RACCOLTA ED ELABORAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati viene effettuata verificando la presenza/assenza di una banda elettroforetica derivante dal frammento di DNA prodotto dall'amplificazione. La dimensione di tale banda viene determinata confrontandola con il Ladder (**APPENDICE P**).

La prova è considerata valida se:

- il controllo positivo dà una banda di **326-327 bp** alla BOOSTER (**APPENDICE P**);
- il controllo negativo non presenta nessuna banda (**APPENDICE P**).

I campioni sono considerati **positivi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, si evince la presenza di una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo BOOSTER (326-327 bp).

I campioni sono considerati **negativi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, non presentano una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo (326-327 bp).

Nel caso in cui il risultato sia di incerta interpretazione è bene ripetere la prova a partire dalla Retrotrascrizione (punto 1). Se il problema si ripresenta, ripartire dall'estrazione del campione (punto 3.6).

I campioni positivi possono essere sottoposti ad analisi di sequenza utilizzando primers specifici e le sequenze confrontate con quelle depositate in banche dati internazionali.

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- **Croci L., Losio N. – Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante RT-PCR convenzionale e Real Time PCR. Procedura Istituto Superiore di Sanità e Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna – Brescia.** ⁽⁷⁸⁾
- **De Medici D., Croci L., Suffredini E., Toti L. (2004). Reverse Transcription-Booster PCR for detection of Noroviruses in Shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*: 6329-6332.** ⁽⁹⁷⁾
- **Metodica allegata al kit Applied Biosystems - GeneAmp[®] RNA PCR Core Kit.** ⁽²⁷²⁾
- **Metodo qualitativo “Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante Real Time PCR” - *Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali nei molluschi bivalvi - Istituto Superiore di Sanità.*** ⁽²⁸⁰⁾
- **Suffredini E., Auricchio B. (2005) - Determinazione di Norovirus in Molluschi Eduli Lamellibranchi. *Rapporti ISTISAN 05/24*: 73-81.** ⁽³⁶⁹⁾
- **Vinje J., Koopmans MP (1996). Molecular detection and epidemiology of small round- structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.*; 174 (3): 610-615.** ⁽³⁹⁶⁾

APPENDICE N

La preparazione delle Master Mix per la RETROTRASCRIZIONE (a), la FIRST PCR (b) e la BOOSTER PCR (c) deve essere effettuata in un'area appositamente dedicata.

**a) Kit di RETROTRASCRIZIONE usato: GeneAmp[®] RNA PCR Core Kit.
Ditta: Applied Biosystem.**

Composizione del Kit:

- **MuLV Reverse Transcriptase:** 50 U/ μ l.
- **RNase Inhibitor:** 20 U/ μ l.
- **AmpliTaq[®] DNA Polymerase:** 5 U/ μ l.
- **dATP:** 10 mM.
- **dCTP:** 10 mM.
- **dGTP:** 10 mM.
- **dTTP:** 10 mM.
- **10X PCR Buffer II:** contenente 150 mM Tris HCl e 100 mM KCl.
- **Soluzione di MgCl₂:** 25 mM.
- **Random Esameri:** 50 μ .
- **Oligo d(T)₁₆:** 50 μ M primer con coda poly dT, non utilizzato nella prova.

Master Mix Retrotrascrizione

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	μ l per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	1 μ l
10X PCR Buffer II	10X	1X	4 μ l
dNTP Mix (costituita miscelando i singoli dNTP del kit)	10 mM	4 mM	16 μ l
MgCl ₂	25 mM	5 mM	8 μ l
Random Hexamers	50 μ M	2,5 μ M	2 μ l
RNase Inhibitor	20 U/ μ l	1 U	2 μ l
MuLV Reverse Transcriptase	50 U/ μ l	2,5 U/ μ l	2 μ l
RNA	/	/	5 μ l
Volume totale	/	/	40 μ l

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una provetta da 1,5-2,0 ml Nuclease free per costituire la miscela dei dNTP (**dNTP Mix**), una o più provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo e del controllo negativo retrotrascrizione (**RT**).
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare, se non è già pronta, la **dNTP Mix** miscelando in proporzioni eguali i singoli dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) nella apposita provetta (ad *Es.* 100 µl di ciascun dNTP).
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 35 µl nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 5 µl di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo RT.
- In una stanza separata caricare 5 µl di RNA di ciascun campione, 5 µl di RNA del controllo positivo e 5 µl di bianco nelle rispettive provette.

b) Kit di AMPLIFICAZIONE FIRST usato: GeneAmp® RNA PCR Core Kit.
Ditta: Applied Biosystem.

Composizione del Kit: vedi kit di RETROTRASCRIZIONE.

ATTENZIONE: per ottenere il **Buffer di Reazione 5X** diluire 1:2 il “**10X PCR Buffer II**” con **Acqua Nuclease free**.

Master Mix FIRST

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	12,375 µl
Buffer di Reazione 5X	5X	1X	5 µl
dNTP Mix (costituita miscelando i singoli dNTP del kit)	10 mM	0,4 mM	1 µl
MgCl ₂	25 mM	1 mM	1 µl
Primer JV12Y (Forward)	50 µM	0,5 µM	0,25 µl
Primer JV13I2 (Reverse)	50 µM	0,5 µM	0,25 µl
AmpliTaq® DNA Polymerase	5U/µl	0,025 U/µl	0,125 µl
DNA	/	/	5 µl
Volume Totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una provetta da 1,5-2,0 ml Nuclease free per costituire la miscela dei dNTP (**dNTP Mix**), una o più provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free per la Master Mix e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo, del controllo negativo **RT** e del controllo negativo **FIRST**.
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare, se non è già pronta, la **dNTP Mix** miscelando in proporzioni eguali i singoli dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) nella apposita provetta (ad *Es.* 100 µl di ciascun dNTP).

- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 20 μ l nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 5 μ l di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo FIRST.
- In una stanza separata caricare 5 μ l di retrotrascritto (cDNA) di ciascun campione, 5 μ l di cDNA del controllo negativo RT, 5 μ l di cDNA del controllo positivo e 5 μ l del retrotrascritto del bianco nelle rispettive provette.

c) **Kit di AMPLIFICAZIONE BOOSTER usato:** GeneAmp® RNA PCR Core Kit.
Ditta: Applied Biosystem

Composizione del Kit: vedi kit di RETROTRASCRIZIONE.

ATTENZIONE: per ottenere il **Buffer di Reazione 5X** diluire 1:2 il “**10X PCR Buffer II**” con **Acqua Nuclease free**.

Master Mix Booster

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	24,75 µl
Buffer di Reazione 5X	5X	1X	10 µl
dNTP Mix (costituita miscelando i singoli dNTP del kit)	10 mM	0,4 mM	2 µl
MgCl ₂	25 mM	1 mM	2 µl
Primer JV12Y (Forward)	50 µM	0,5 µM	0,5 µl
Primer JV13I2 (Reverse)	50 µM	0,5 µM	0,5 µl
AmpliAq® DNA Polymerase	5U/µl	0,025 U/µl	0,25 µl
DNA	/	/	10 µl
Volume Totale	/	/	50 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una provetta da 1,5-2,0 ml Nuclease free per costituire la miscela dei dNTP (**dNTP Mix**), una o più provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo, del controllo negativo **RT**, del controllo negativo **FIRST** e del controllo negativo **BOOSTER**.
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare, se non è già pronta, la **dNTP Mix** miscelando in proporzioni eguali i singoli dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) nella apposita provetta (ad *Es.* 100 µl di ciascun dNTP).

- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 40 μ l nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 10 μ l di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo BOOSTER.
- In una stanza separata caricare 10 μ l di DNA di ciascun campione, 10 μ l di DNA del controllo negativo RT, 10 μ l di DNA di controllo negativo FIRST, 10 μ l di DNA del controllo positivo e 10 μ l del bianco precedentemente amplificato nelle rispettive provette.

APPENDICE O

Preparazione dei primers

Prima di procedere con la preparazione dei primers, compilare foglio di lavoro “*Preparazione Stock Solution Primers*”.

I primers utilizzati per tale procedura sono quelli indicati di seguito.

Primers *Booster RT-PCR NoVs*

PRIMERS	SEQUENZA
Primer JV12Y (Forward)	5'-ATA CCA CTA TGA TGC AGA YTA-3'
Primer JV13I2 (Reverse)	5'-TCA TCA TCA CCA TAG AAI GAG-3'

Soluzione Stock Madre Primers 200 μ M:

I Primers vengono acquistati da ditte specializzate che li inviano nella forma liofilizzata, con allegato un documento indicante:

- Caratteristiche fisico-chimiche.
- Quantità assoluta in μ g.
- Numero di nmoli.
- Tipo di purificazione.

Prima del loro, impiego essi devono essere opportunamente reidratati con acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 200 μ M. Per calcolare la quantità di acqua da aggiungere al liofilizzato applicare la seguente formula:

$$\mathbf{N^{\circ} \text{ nmoli ricevute}/200 = \mu\text{l di acqua da aggiungere}}$$

Sulla provetta della Soluzione Stock Madre deve essere indicato il nome del primer e la concentrazione di 200 μM .

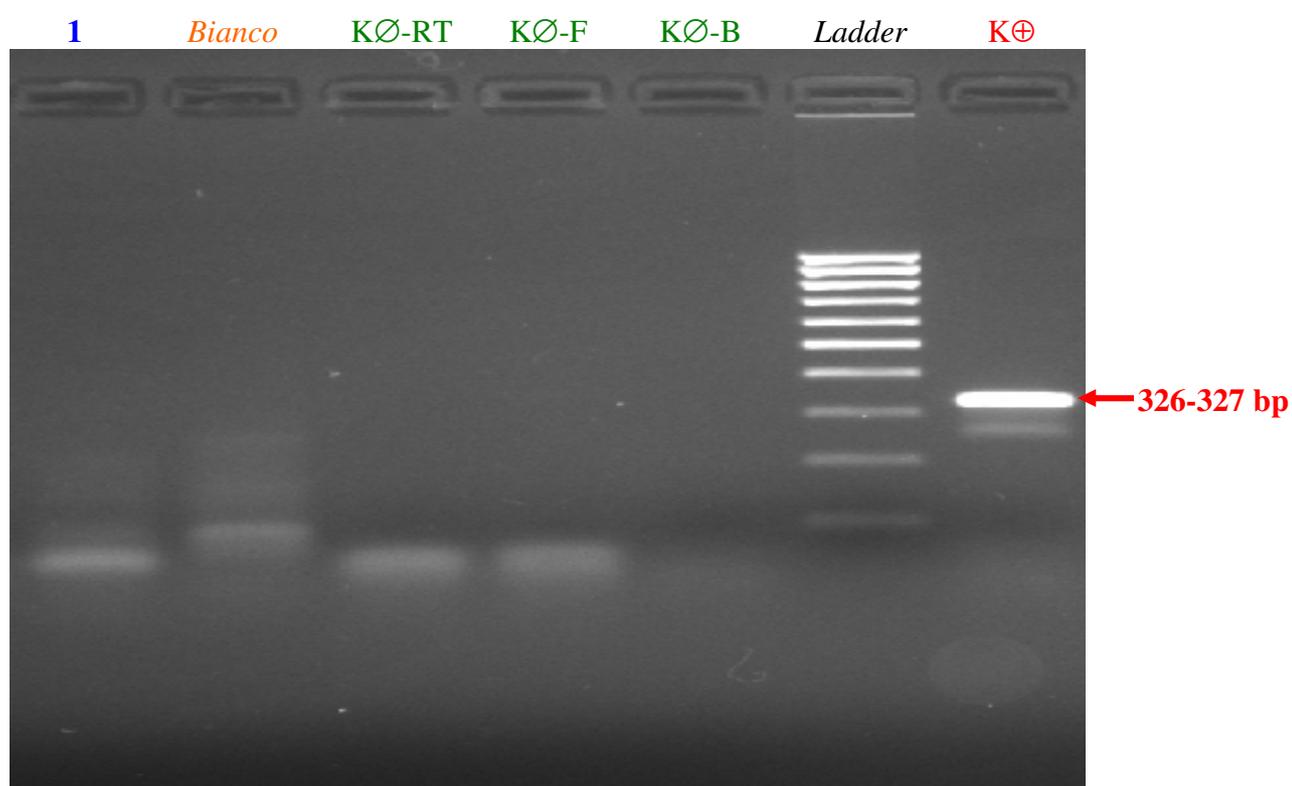
N.B.: La soluzione stock va conservata a $\cong -20^\circ\text{C}$ e impiegata come base di partenza per realizzare la Soluzioni di Lavoro 50 μM . Essa va scongelata solo per il tempo strettamente necessario.

Soluzioni di Lavoro Primers 50 μM :

- Scongela la Soluzione Stock Madre (200 μM) di ciascun primer (AV1, AV2, AV3).
- Preparare un numero opportuno di provette Nuclease free da 0.2 μl ed etichettarle rispettivamente con la dicitura “**JV12Y**”, “**JV13I**” indicando la concentrazione di 50 μM .
- Dispensare in ciascuna provetta 75 μl di acqua acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free.
- Aggiungere alle corrispondenti provette 25 μl di ciascun primer (JV12Y, JV13I) alla concentrazione di 200 μM .

APPENDICE P

Letture di una corsa elettroforetica di Booster RT-PCR per NoVs



Booster RT-PCR NoVs: Linea 1, campione negativo; Linea 2, Bianco; Linea 3, KØ Retrotrascrizione (RT); Linea 4, KØ FIRST (F); Linea 5, KØ Booster (B); Linea 6, Ladder (100 bp); Linea 7, K⊕.

3.7.4 REAL TIME RT-PCR PER LA RICERCA DEL NOV GI E DEL NOV GII

La presente procedura, messa a punto nel 2013, ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la ricerca dell'RNA del Norovirus GI e del Norovirus GII in campioni biologici (acque, Molluschi Eduli Lamellibranchi) e in lisati di colture cellulari, mediante una Real Time RT-PCR *One-Step*, che utilizza due coppie di primers e le relative sonde (probes) idrolitiche di tipo TaqMan (estremità 5' "reporter" marcato con FAM, estremità 3' "quencher" marcato con TAMRA) specifiche per la regione altamente conservata all'estremità 5' della **ORF2** contenente il gene che codifica per la **proteina capsidica VP1** rispettivamente del **NoV GI** e del **NoV GII**. Inoltre, utilizza una coppia di primers e la relativa sonda (probe) idrolitica di tipo TaqMan (estremità 5' "reporter" marcato con FAM, estremità 3' "quencher" marcato con MGB) specifici per il virus Controllo di Processo della prova (il Mengovirus). Può, inoltre, essere impiegata per l'identificazione di ceppi virali isolati.

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

La Real Time RT-PCR per la ricerca del **NoV GI** prevede una reazione *One-Step* di retrotrascrizione e amplificazione a catena della polimerasi di tipo Real Time, con la coppia di primers "QNIF4 (FW)" e "NV1LCR (REV)" e la sonda TaqMan "NVGG1p" marcata FAM-TAMRA per il **NoV GI**. Questo set di primers dà origine ad un amplificato di **86 bp**.

La Real Time RT-PCR per la ricerca del **NoV GII** prevede una reazione *One-Step* di retrotrascrizione e amplificazione a catena della polimerasi di tipo Real Time, con la coppia di primers "QNIF2 (FW)" e "COG2R (REV)" e la sonda TaqMan "QNIFSp" marcata FAM-TAMRA per il **NoV GII**. Questo set di primers dà origine ad un amplificato di **89 bp**.

Nella prova sono, inoltre, utilizzati la coppia di primers **Mengo110 (FW)** e **Mengo209 (REV)** e la sonda TaqMan **Mengo147p** marcata FAM-MGB per il **Mengovirus**. Questo set di primers dà origine ad un amplificato di **100 bp**.

Nella Real Time RT-PCR *One-Step* la Retrotrascrizione e l'Amplificazione avvengono nella stessa provetta/pozzetto di reazione.

Per la **Real Time RT-PCR** si impiega un apposito kit disponibile in commercio (Invitrogen - RNA UltraSense™ One-Step (Quantitative) qRT-PCR System), contenente i reagenti necessari per le master mix.

Prima di procedere con la prova di Real Time RT-PCR One-Step per NoV GI, il campione opportunamente preparato, come descritto al punto 3.5, viene sottoposto ad estrazione dell'RNA come descritto al punto 3.6. Anche il controllo positivo viene opportunamente preparato, procedendo all'estrazione del suo RNA e alla sua diluizione, se necessario, come descritto al punto 3.6.

Per tenere sotto controllo l'eventuale perdita del virus target durante la fase di estrazione, prima di procedere con l'estrazione, i campioni sono addizionati con una quantità nota di un virus che funge da **Controllo di Processo (CP)**. Affinché costituisca un buon modello genetico, morfologico e fisico-chimico, il virus selezionato come controllo di processo dovrebbe essere un virus coltivabile, privo di envelope (come i NoVs), ad RNA a singolo filamento positivo e di dimensioni simili a quelle del virus target. Il virus controllo di processo dovrebbe, inoltre, avere una persistenza nell'ambiente simile a quella del virus target ed essere sufficientemente distinto geneticamente da esso in modo da non cross-reagire, deve inoltre non essere comunemente presente nelle matrici da analizzare. Virus con tali caratteristiche che sia utilizzabile come controllo di processo nella ricerca dell'HAV e dei NoVs è il Mengovirus (Famiglia: *Picornaviridae*). Tale controllo va utilizzato per verificare l'efficienza di estrazione.

Il CP va opportunamente preparato prima dell'esecuzione della prova diluendolo:

- 10^{-1}
- 10^{-2}
- 10^{-3}

per costruire la Curva Standard.

Nella prova viene inserito anche un **Controllo Esterno (EC)** costituito da RNA del virus target a concentrazione nota e tale da non inibire la reazione di

amplificazione. Tale controllo va utilizzato per verificare l'efficienza di amplificazione della prova.

Il EC va opportunamente preparato prima dell'esecuzione della prova alla concentrazione:

- Tal Quale
- 10^{-1}
- 10^{-2}

per costruire la Curva Standard.

La **Real Time RT-PCR** prevede le seguenti **5 fasi**:

1 Preparazione e distribuzione delle Master Mix per la Real Time

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Per eseguire questa Real Time è necessario preparare tre Mix di reazione differenti: una ***Master Mix Real Time per il Target NoV GI***, una ***Master Mix Real Time per il Target NoV GII*** e una ***Master Mix Real Time per il Controllo di Processo (Mengovirus)***.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "***Real Time RT-PCR Norovirus GI - GII***".

Quindi:

- Predisporre una piastra per Real Time PCR tenendo conto per ciascun virus Target (NoV GI e NoV GII) del numero di campioni da amplificare in due repliche, del Bianco in due repliche, del Controllo Negativo (NTC) in due repliche e del Controllo Positivo (PTC) in singolo/doppio pozzetto per ciascuna delle tre concentrazioni previste (RNA estratto da ceppo di NoV GI e da ceppo di NoV GII).

La **Curva Standard del Controllo Positivo o Controllo Esterno (EC)**, deve essere, infatti, prevista disponendo in singolo o doppio l'RNA (5 μ l H₂O + 1 μ l EC) del virus target (NoV GI e NoV GII) alle seguenti tre concentrazioni: Tal Quale (TQ), diluito 1:10 (10^{-1}) e diluito

1:100 (10^{-2}). Nella prova i campioni devono essere esaminati anche con aggiunta del Controllo Esterno (in singolo pozzetto/provetta).

Nel predisporre la piastra tenere conto, inoltre, dei pozzetti da utilizzare per i campioni con la **Master Mix Real Time per il Controllo di Processo Mengovirus** (in singolo pozzetto/provetta).

Infine, in piastra deve essere inserita anche la **Curva Standard del CP**, che deve essere esaminato in singolo (5 μ l) alle seguenti tre concentrazioni: diluito 1:10 (10^{-1}), diluito 1:100 (10^{-2}) e diluito 1:1.000 (10^{-3}).

N.B.: è possibile esaminare i campioni anche diluiti 1:10.

N.B.B.: è possibile utilizzare, al posto della piastra, delle provette (singole o in strip) idonee per Real Time PCR. Vista la complessità della prova (elevato numero di controlli) è preferibile l'utilizzo della piastra.

- Se si effettua la prova in piastra, stabilire la disposizione dei campioni e dei controlli compilando l'apposito foglio di lavoro "*Real Time RT-PCR Norovirus GI - GII*" (**APPENDICE J**).

N.B.: se si effettua la prova in provette, contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta (o le strip).

- Preparare la **Master Mix Real Time per il Target (NoV GI)** seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE Q-a**, tenendo conto del fatto che sia i campioni che il controllo negativo devono essere esaminati in due repliche. La curva standard di EC (Controllo Positivo) può essere esaminata in singolo o in doppio. Inoltre, ogni campione deve essere esaminato anche con aggiunta di EC (in singolo).

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (125 μ M e 12,5 μ M) del primer **QNIF4 (FW)**, le soluzioni (225 μ M e 22,5 μ M) del primer **NVILCR (REV)** e le soluzioni (62,5 μ M e 6,25 μ M) della sonda **NVGG1p** secondo quanto riportato nell'**APPENDICE Q**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro di ciascun primer/sonda (rispettivamente 12,5 μ M del primer **QNIF4**, 22,5 μ M del primer **NVILCR** e 6,25 μ M della sonda **NVGG1p**).

- Preparare la **Master Mix Real Time per il Target (NoV GII)** seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE Q-b**, tenendo conto del fatto

che sia i campioni che il controllo negativo devono essere esaminati in due repliche. La curva standard di EC (Controllo Positivo) può essere esaminata in singolo o in doppio. Inoltre, ogni campione deve essere esaminato anche con aggiunta di EC (in singolo).

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (125 μM e 12,5 μM) del primer **QNIF2 (FW)**, le soluzioni (225 μM e 22,5 μM) del primer **COG2R (REV)** e le soluzioni (62,5 μM e 6,25 μM) della sonda **QNIFSp** secondo quanto riportato nell'**APPENDICE Q**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro di ciascun primer (rispettivamente 12,5 μM del primer **QNIF2**, 22,5 μM del primer **COG2R** e 6,25 μM della sonda **QNIFSp**).

- Preparare la **Master Mix Real Time per il Controllo di Processo** seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE Q-c**, tenendo conto del fatto che sia i campioni che i controlli (controllo negativo e curva standard del CP) devono essere esaminati in singolo.

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (125 μM e 12,5 μM) del primer **Mengo 110 (FW)**, le soluzioni (225 μM e 22,5 μM) del primer **Mengo 209 (REV)** e le soluzioni (62,5 μM e 6,25 μM) della sonda **Mengo147p** secondo quanto riportato nell'**APPENDICE L**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro di ciascun primer/sonda (rispettivamente 12,5 μM del primer **Mengo 110**, 22,5 μM del primer **Mengo 209** e 6,25 μM della sonda **Mengo147p**).

- Dispensare la **Master Mix Real Time per il Target NoV GI**, la **Master Mix Real Time per il Target NoV GII** e la **Master Mix Real Time per il Controllo di Processo** in ciascun pozzetto della piastra per Real Time PCR (o in ciascuna provetta) di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE Q** (a, b, c).
- Aggiungere 5 μl di acqua distillata sterile Nuclease free nei pozzetti (provette) del Controllo Negativo (due repliche per le Mix dei Target GI e GII, in singolo per la Mix del CP) (**APPENDICE Q-a-b-c**).

2 Trasferimento dell'RNA nelle provette/piastre della Master Mix Real Time per il Target (NoV GI)

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di RNA (in totale due repliche) di ciascun campione (**APPENDICE J** e **APPENDICE Q-a**).
- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl (in totale due repliche) del Bianco (**APPENDICE J** e **APPENDICE Q-a**).
- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di RNA (in singolo) di ciascun campione (o Bianco) + 1 µl di EC non diluito (**APPENDICE J** e **APPENDICE Q-a**).
- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di acqua Nucleasi free + 1 µl di ciascuna concentrazione (TQ, 10^{-1} , 10^{-2}) di RNA-EC o Controllo Positivo (**APPENDICE J** e **APPENDICE Q-a**) in singolo o in doppio (in totale tre pozzetti o sei pozzetti). Così si ottiene la Curva Standard del Controllo Positivo.

3 Trasferimento dell'RNA nelle provette/piastre della Master Mix Real Time per il Target (NoV GII)

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di RNA (in totale due repliche) di ciascun campione (**APPENDICE J** e **APPENDICE Q-b**).
- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl (in totale due repliche) del Bianco (**APPENDICE J** e **APPENDICE Q-b**).
- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di RNA (in singolo) di ciascun campione (o Bianco) + 1 µl di EC non diluito (**APPENDICE J** e **APPENDICE Q-b**).

- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di acqua Nucleasi free + 1 µl di ciascuna concentrazione (TQ, 10^{-1} , 10^{-2}) di RNA-EC o Controllo Positivo (**APPENDICE J** e **APPENDICE Q-b**) in singolo o in doppio (in totale tre pozzetti o sei pozzetti). Così si ottiene la Curva Standard del Controllo Positivo.

4 Trasferimento dell'RNA nelle provette/piastre della Master Mix Real Time per il Controllo di Processo

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di RNA (in singolo) di ciascun campione (**APPENDICE J** e **APPENDICE Q-c**).
- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di RNA (in singolo) del Bianco (**APPENDICE J** e **APPENDICE Q-c**).
- Aggiungere nei rispettivi pozzetti (nelle rispettive provette) di reazione 5 µl di RNA del CP, che deve essere esaminato in singolo alle seguenti tre concentrazioni: diluito 1:10 (10^{-1}), diluito 1:100 (10^{-2}) e diluito 1:1.000 (10^{-3}) (**APPENDICE J** e **APPENDICE Q-c**). Così si ottiene la Curva Standard del CP.
- Chiudere la piastra con apposito film adesivo ottico.
N.B.: se si effettua la prova in provette, chiudere ogni provetta (o le strip) con apposito tappo ottico.

5 Reazione di TaqMan Real-Time RT-PCR

Posizionare la/le piastra/provette nell'apposito alloggiamento dell'apparecchio per PCR Real-Time, selezionare il programma indicato come "Real Time Norovirus GI e GII" (**Tabella 3.9**), impostare le caratteristiche principali della reazione, la posizione dei campioni e dei controlli e avviare l'analisi.

Tabella 3.9. Programma “Real-Time Norovirus GI e GII”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Retrotrascrizione	60 min.	+55°C	1
2	Denaturazione	5 min	+95°C	1
3	Denaturazione	15 sec.	+95°C	45
4	Annealing-Polimerizzazione	60 sec.	+60°C	
5	Annealing Polimerizzazione	60 sec.	+65°C	

RACCOLTA ED ELABORAZIONE DEI RISULTATI

Al termine della prova analizzare i risultati ottenuti operando sul software secondo l’approccio raccomandato dal produttore dell’apparecchio di Real-Time PCR utilizzato. Impostare il Threshold secondo le istruzioni del produttore dell’apparecchio. Il Threshold dovrebbe essere impostato in maniera tale da attraversare l’area dove le curve di amplificazione (in rappresentazione logaritmica) sono parallele (fase esponenziale).

Tutte le curve di amplificazione devono essere verificate per identificare gli eventuali falsi positivi (reazioni con valori di **Ct** non associati con amplificazione) causati da segnali di background alti o irregolari. Quanto rilevato deve essere annotato sul foglio di lavoro “*Real-Time RT-PCR Norovirus GI e GII*” ed i risultati di ogni reazione condizionata da tali segnali, alti o irregolari, devono essere considerati negativi.

Tutte le curve di amplificazione devono essere controllate per verificare che i valori di **Ct** generati dall’analisi del software corrispondano alla fase esponenziale dell’amplificazione (e che essa non sia distorta dal rumore di fondo alto o irregolare). Laddove i valori di **Ct** siano distorti, i valori corretti devono essere interpretati e registrati sul foglio di lavoro “*Real-Time RT-PCR Norovirus GI e GII*”. Non è necessario riportare sul foglio di lavoro il **Ct** ottenuto; se lo si ritiene sufficiente, riportare solo la sua interpretazione in termini qualitativi (positivo/negativo; +/-).

Controllare i valori di **Ct** di tutte le serie di diluizioni delle curve standard (Controllo di Processo; Controllo Positivo o EC). I valori non idonei vanno scartati, i restanti devono essere utilizzati per creare le Curve Standard. Curve del Controllo di Processo con $R^2 < 0,98$ non dovrebbero essere utilizzate per i calcoli.

Verificare i **Ct** del Controllo di Processo nei pozzetti con RNA dei campioni ed utilizzare questi valori per stimare il recupero (efficienza di estrazione del campione), facendo riferimento alla Curva Standard del CP. Si considera accettabile un'efficienza di estrazione $> 1\%$.

L'**efficienza di estrazione** del campione è calcolata confrontando il **Ct** ottenuto dal campione con il **Ct** del Controllo di Processo (Standard). La formula di calcolo è:

$$R = 2^{-\Delta Ct} \times 0.6$$

dove $\Delta Ct = Ct \text{ campione} - Ct \text{ Standard CP alla diluizione } 10^{-1}$

Oppure

$$R = 2^{-\Delta Ct} \times 0.06$$

dove $\Delta Ct = Ct \text{ campione} - Ct \text{ Standard CP alla diluizione } 10^{-2}$

Verificare i **Ct** del Controllo Esterno (EC) nei pozzetti con RNA dei campioni ed utilizzare questi valori per stimare l'efficienza di amplificazione del campione, facendo riferimento alla Curva Standard del EC. Si considera accettabile un'efficienza di amplificazione $> 50\%$.

L'**efficienza di amplificazione** del campione è calcolata valutando il **Ct** del target (NoV GI e NoV GII) nel pozzetto del campione + EC con il **Ct** del target da solo (alla stessa diluizione). La formula di calcolo è:

$$E = 2^{-\Delta Ct}$$

dove $\Delta = Ct$ campione- Ct standard

La valutazione dell'efficienza di estrazione e dell'efficienza di amplificazione sono parametri per assicurare la qualità della prova e non vanno utilizzati per il calcolo dei risultati analitici.

Per ciascun Target, NoV GI e NoV GII, affinché la prova sia ritenuta valida:

- il **Controllo Positivo** (PTC) del **NoV GI / NoV GII** deve essere positivo, ossia deve esprimere un **Ct** ≤ 44 cicli (**APPENDICE S**). Nel caso in cui il Controllo Positivo non presenta la reattività attesa, ripetere la prova. Se il problema si ripresenta, estrarre nuovamente il Controllo Positivo.
- il **Controllo Negativo** (NTC) del **NoV GI / NoV GII** deve essere negativo, ossia deve esprimere un **Ct** > 44 cicli (**APPENDICE S**). Se non presenta la reattività attesa occorre ripetere la prova o, in ogni caso, riesaminare ogni campione che presenta risultati positivi.
- il **Bianco** del **NoV GI / NoV GII** deve essere negativo, ossia deve esprimere un **Ct** > 44 cicli. Se non presenta la reattività attesa occorre ripetere la prova o, in ogni caso, riesaminare ogni campione che presenta risultati positivi.

Ogni controllo (CP o EC) possiede un proprio valore atteso valido o un range di valori. Se i valori osservati per i controlli differiscono da quelli attesi, occorre ripetere la prova.

La quantità minima teorica di target (NoV GI e NoV GII) rilevabile con questa procedura è 10 copie di genoma.

Un campione è considerato **positivo** per **NoV GI / NoV GII** se presenta un **Ct** ≤ 44 cicli (**APPENDICE S**); indice della presenza di RNA riferibile a NoV GI / NoV GII.

Un campione è considerato **negativo** per **NoV GI / NoV GII** se presenta un **Ct > 44** cicli (**APPENDICE S**); indice dell'assenza di RNA riferibile a NoV GI / NoV GII.

Nel caso in cui il risultato sia di incerta interpretazione è bene ripetere la prova a partire dalla **amplificazione** (punto 1). Se il problema si ripresenta ripartire dall'estrazione del campione (punto 3.6).

Se non si ottiene un risultato valido, il campione viene esitato come “non eseguibile”, specificando, se lo si ritiene opportuno, la motivazione di tale esito.

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- **Croci L., Losio N. – Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante RT-PCR convenzionale e Real Time PCR. Procedura Istituto Superiore di Sanità e Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Brescia.** ⁽⁷⁸⁾
- **da Silva A.K., Le Saux J.C., Parnaudeau S., Pommepuy M., Elimelech M., Le Guyander F.S. (2007). Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using Real-Time Reverse Transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(24): 7891-7897.** ⁽⁸⁶⁾
- **ISO/TS 15216-2:2013: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection.** ⁽¹⁷⁴⁾
- **Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B., Takeda N., Katayama K. (2003). Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 41(4): 1548-1557.** ⁽¹⁸³⁾

- Le Guyander F.S., Parnaudeau S., Schaeffer J., Bosch A., Loisy F., Pommeputy M., Atmar R.L. (2009). Detection and quantification of norovirus in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 618-624. ⁽²²⁴⁾
- Loisy F., Atmar R.L., Guillon P., Le Cann P., Pommeputy M., Le Guyander F.S. (2005). Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Methods*, 123(1): 1-7. ⁽²³⁵⁾
- Lowther J.A., Henshilwood K., Lees D.N. (2008). Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. *J. Food Prot.*, 71 (7): 3846-55. ⁽²³⁹⁾
- Martin L.R., Duke G.M., Osorio J.E., Hall D.J., Palmenberg A.C. (1996). Mutational analysis of the Mengovirus poly© tract and surrounding heteropolymeric sequences. *J. Virol.*, 70(3): 2027-2031. ⁽²⁵¹⁾
- Metodica allegata al kit Invitrogen - RNA UltraSense™ One-Step (Quantitative) qRT-PCR System. ⁽²⁷⁵⁾
- Metodo qualitativo “Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante Real Time PCR” - *Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali nei molluschi bivalvi - Istituto Superiore di Sanità.* ⁽²⁸⁰⁾
- Pintò R.M., Costafreda M.I., Ribes E., Bosch A. (2009). From quantitative risk-assessment to risk management in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. Manuscript submitted to *Appl. Environ. Microbiol.* ⁽³¹⁸⁾
- POMIAC01.002 Rev.2 del 28.02.2012: Metodo per la ricerca di Epatite A e Norovirus in alimenti mediante Real-Time PCR. ⁽³¹⁹⁾
- Svraka S., Duizer E., Vennema H., de Bruin E., van der Veer B., Dorresteyn B., Koopmans M. (2007). Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol.*, 45(5): 1389-1394. ⁽³⁷¹⁾

APPENDICE Q

La preparazione delle tre Mix di reazione: (a) *Master Mix Real Time per il Target NoV GI*; (b) *Master Mix Real Time per il Target NoV GII* e (c) *Master Mix Real Time per il Controllo di Processo* deve essere effettuata in un'area appositamente dedicata.

Kit di Real Time usato: RNA UltraSense™ One-Step (Quantitative) qRT-PCR System.
Ditta: Invitrogen.

Composizione del Kit:

- **RNA UltraSense™ Enzyme Mix:** (includes RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor) 250 µl.
- **RNA UltraSense™ 5X Reaction Mix:** (contains 1 mM of each dNTP) 1 ml.
- **20X Bovine Serum Albumin (BSA):** UltraPure, non-acetylated (1 mg/ml) 300 µl.
- **50-mM Magnesium Sulfate (MgSO₄):** 1 ml
- **ROX Reference Dye:** 100 µl.

a) *Master Mix Real Time per il Target NoV GI*

Master Mix Real Time per il Target (NoV GI)

Reagenti	Conc. iniziale	Conc. finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease Free	/	/	10,25 µl
RNA UltraSense™ One-Step qRT-PCR 5X Reaction Mix	5X	1X	5 µl
Primer QNIF 4 (FW)	12,5 µM	500 nM	1 µl
Primer NV1LCR (REV)	22,5 µM	900 nM	1 µl
Sonda NVGG1p (FAM-TAMRA)	6,25 µM	250 nM	1 µl
RNA UltraSense™ One-Step qRT-PCR Enzyme Mix	/	/	1,25 µl
Rox Reference Dye	/	/	0,5 µl
RNA	/	/	5 µl
Volume totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una o due provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) ed una piastra di reazione Real-Time o le strips delle provette di reazione.
- Determinare il numero di reazioni da effettuare (N), tenendo conto del numero dei campioni senza (in doppio) e con (in singolo) EC, del bianco in doppia replica, del Controllo Positivo/Esterno (PTC/EC) in una/due repliche per ogni diluizione, del Controllo Negativo (NTC) in due repliche. Preparare un volume in eccesso di miscela di reazione per compensare le eventuali perdite di master mix dovute all'adesione della miscela alle pareti della microprovetta e/o puntali.
 - Se il numero di campioni (n), compresi i controlli, è tra 1 e 14, allora $N = n + 1$.
 - Se il numero di campioni (n), compresi i controlli, è > 15 , allora $N = n + 2$.
- Preparare, nella/e provetta/e da 1,5-2,0 ml Nuclease free, la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati.
- Dopo aver preparato la Master Mix, miscelarla gentilmente per pipettamento o per inversione, evitando la formazione di bolle.
- Centrifugare brevemente la master mix per raccoglierne il contenuto sul fondo e mantenerla in ghiaccio.
- Posizionare in ghiaccio la piastra di reazione Real-Time o le strips delle provette di reazione.
- Dispensare $20\ \mu$ della Master Mix preparata, negli appositi pozzetti della piastra o nelle strips.
- Aggiungere $5\ \mu\text{l}$ di acqua Nuclease free nei pozzetti/provette del controllo negativo e del controllo positivo.
- In una stanza separata, caricare $5\ \mu\text{l}$ di ciascun campione in esame, $5\ \mu\text{l}$ del bianco, $1\ \mu\text{l}$ di controllo positivo (EC) TQ (non diluito) ai pozzetti del Controllo di Amplificazione di ciascun campione e $1\ \mu\text{l}$ di controllo positivo (EC) alle tre diverse concentrazioni (aggiungerlo ai $5\ \mu\text{l}$ di acqua in un pozzetto o due pozzetti per concentrazione) della Curva Standard del Controllo Positivo nei rispettivi pozzetti/provette (come indicato nella tabella "Disposizione dei campioni e dei controlli", **APPENDICE J**).

b) Master Mix Real Time per il Target NoV GII**Master Mix Real Time per il Target (NoV GII)**

Reagenti	Conc. iniziale	Conc. finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease Free	/	/	10,25 µl
RNA UltraSense™ One-Step qRT-PCR 5X Reaction Mix	5X	1X	5 µl
Primer QNIF 2 (FW)	12,5 µM	500 nM	1 µl
Primer COG2R (REV)	22,5 µM	900 nM	1 µl
Sonda QNIFSp (FAM-TAMRA)	6,25 µM	250 nM	1 µl
RNA UltraSense™ One-Step qRT-PCR Enzyme Mix	/	/	1,25 µl
Rox Reference Dye	/	/	0,5 µl
RNA	/	/	5 µl
Volume totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una o due provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) ed una piastra di reazione Real-Time o le strips delle provette di reazione.
- Determinare il numero di reazioni da effettuare (N), tenendo conto del numero dei campioni senza (in doppio) e con (in singolo) EC, del bianco in doppia replica, del Controllo Positivo/Esterno (PTC/EC) in una/due repliche per ogni diluizione, del Controllo Negativo (NTC) in due repliche. Preparare un volume in eccesso di miscela di reazione per compensare le eventuali perdite di master mix dovute all'adesione della miscela alle pareti della microprovetta e/o puntali.
 - Se il numero di campioni (n), compresi i controlli, è tra 1 e 14, allora $N = n + 1$.
 - Se il numero di campioni (n), compresi i controlli, è > 15 , allora $N = n + 2$.
- Preparare, nella/e provetta/e da 1,5-2,0 ml Nuclease free, la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati.
- Dopo aver preparato la Master Mix, miscelarla gentilmente per pipettamento o per inversione, evitando la formazione di bolle.

- Centrifugare brevemente la master mix per raccoglierne il contenuto sul fondo e mantenerla in ghiaccio.
- Posizionare in ghiaccio la piastra di reazione Real-Time o le strips delle provette di reazione.
- Dispensare 20 μ della Master Mix preparata, negli appositi pozzetti della piastra o nelle strips.
- Aggiungere 5 μ l di acqua Nuclease free nei pozzetti/provette del controllo negativo e del controllo positivo.
- In una stanza separata, caricare 5 μ l di ciascun campione in esame, 5 μ l del bianco, 1 μ l di controllo positivo (EC) TQ (non diluito) ai pozzetti del Controllo di Amplificazione di ciascun campione e 1 μ l di controllo positivo (EC) alle tre diverse concentrazioni (aggiungerlo ai 5 μ l di acqua in un pozzetto o due pozzetti per concentrazione) della Curva Standard del Controllo Positivo nei rispettivi pozzetti/provette (come indicato nella tabella “Disposizione dei campioni e dei controlli”, **APPENDICE J**).

c) Master Mix Real Time per il Controllo di Processo

Master Mix Real Time per il Controllo di Processo

Reagenti	Conc. iniziale	Conc. finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease Free	/	/	10,25 µl
RNA UltraSense™ One-Step qRT-PCR 5X Reaction Mix	5X	1X	5 µl
Primer Mengo 110 (FW)	12,5 µM	500 nM	1 µl
Primer Mengo 209 (REV)	22,5 µM	900 nM	1 µl
Sonda Mengo 147 (FAM-MGB)	6,25 µM	250 nM	1 µl
RNA UltraSense™ One-Step qRT-PCR Enzyme Mix	/	/	1,25 µl
Rox Reference Dye	/	/	0,5 µl
RNA	/	/	5 µl
Volume totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una o due provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) ed una piastra di reazione Real-Time o le strips delle provette di reazione.
- Determinare il numero di reazioni da effettuare (N), tenendo conto del numero dei campioni in singolo, del bianco in singolo, del Controllo Negativo (NTC) in due repliche, del Controllo di Processo (CP) in singolo per ogni diluizione. Preparare un volume in eccesso di miscela di reazione per compensare le eventuali perdite di master mix dovute all'adesione della miscela alle pareti della microprovetta e/o puntali.
 - Se il numero di campioni (n), compresi i controlli, è tra 1 e 14, allora $N = n + 1$.
 - Se il numero di campioni (n), compresi i controlli, è > 15, allora $N = n + 2$.
- Preparare, nella/e provetta/e da 1,5-2,0 ml Nuclease free, la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati.
- Dopo aver preparato la Master Mix, miscelarla gentilmente per pipettamento o per inversione, evitando la formazione di bolle.

- Centrifugare brevemente la master mix per raccoglierne il contenuto sul fondo e mantenerla in ghiaccio.
- Posizionare in ghiaccio la piastra di reazione Real-Time o le strips delle provette di reazione.
- Dispensare 20 μ della Master Mix preparata, negli appositi pozzetti della piastra o nelle strips.
- Aggiungere 5 μ l di acqua Nuclease free nei pozzetti/provette del controllo negativo.
- In una stanza separata, caricare 5 μ l di ciascun campione in esame, 5 μ l del bianco e 5 μ l di controllo positivo alle tre diverse concentrazioni nei rispettivi pozzetti/provette (come indicato nella tabella “Disposizione dei campioni e dei controlli”, **APPENDICE J**).
- Chiudere la piastra con apposito film adesivo ottico.
N.B.: se si effettua la prova in provette, chiudere ogni provetta (o le strip) con apposito tappo ottico.
- Inserire la piastra/strip nell'apparecchio Real-Time.
- Selezionare il programma “**Real Time Norovirus GI - GII**” e avviarlo.

APPENDICE R

Preparazione dei primers e dei Probes

Prima di procedere con la preparazione dei primers/Probe, compilare foglio di lavoro “Preparazione Stock Solution Primers/Probos”.

I primers/probes utilizzati per tale procedura sono quelli indicati di seguito.

Primers e Probe *Real Time RT-PCR Norovirus GI*

PRIMERS	SEQUENZA
QNIF4 (FW)	5'-CGCTGGATGCGNTTCCAT-3'
NVILCR (REV)	5'-CCTTAGACGCCATCATCATTTAC-3'
NVGG1p (Probe)	FAM 5'-TGGACAGGAGAYCGCRATCT-3' TAMRA

Primers e Probe *Real Time RT-PCR Norovirus GII*

PRIMERS	SEQUENZA
QNIF2 (FW)	5'-ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA-3'
COG2R (REV)	5'-TCGACGCCATCTTCATTCACA-3'
QNIFSp (Probe)	FAM 5'-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-3' TAMRA

Primers e Probe *Real Time RT-PCR Mengovirus*

PRIMERS	SEQUENZA
Mengo110 (FW)	5'- GCGGGTCCTGCCGAAAGT -3'
Mengo209 (REV)	5'- GAAGTAACATATAGACAGACGCACAC -3'
Mengo147p (Probe)	FAM 5'-ATCACATTACTGGCCGAAGC-3' MGB

Soluzione Stock Madre Primers/Probes 225 μ M / 125 μ M / 62,5 μ M:

I Primers vengono acquistati da ditte specializzate che li inviano nella forma liofilizzata, con allegato un documento indicante:

- Caratteristiche fisico-chimiche.
- Quantità assoluta in μ g.
- Numero di nmoli.
- Tipo di purificazione.

Prima del loro, impiego essi devono essere opportunamente reidratati con acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 225 μ M (**Primer NV1LCR, Primer COG2R e Primer Mengo209**), 125 μ M (**Primer QNIF4, Primer QNIF2 e Primer Mengo110**) e 62,5 μ M (**Sonda NVGG1p, Sonda QNIFSp e Sonda Mengo147p**). Per calcolare la quantità di acqua da aggiungere al liofilizzato applicare la seguente formula:

$$\mathbf{N^{\circ} \text{ nmoli ricevute} / 225 \text{ (125 o 62,5)} = \mu\text{l di acqua da aggiungere}}$$

Sulla provetta della Soluzione Stock Madre deve essere indicato il nome del primer e la concentrazione di in μ M.

N.B.: La soluzione stock va conservata a $\cong -20^{\circ}\text{C}$ e impiegata come base di partenza per realizzare la Soluzioni di Lavoro **22,5 μ M / 12,5 μ M / 6,25 μ M**. Essa va scongelata solo per il tempo strettamente necessario.

Soluzioni di Lavoro Primers/Probes 22,5 μ M / 12,5 μ M / 6,25 μ M:

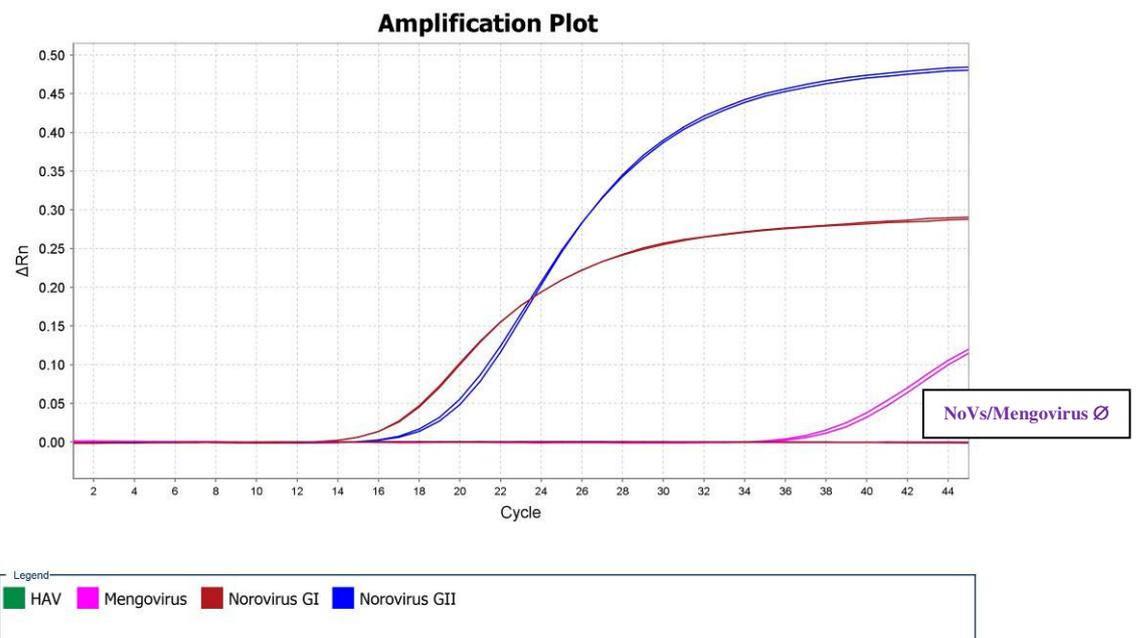
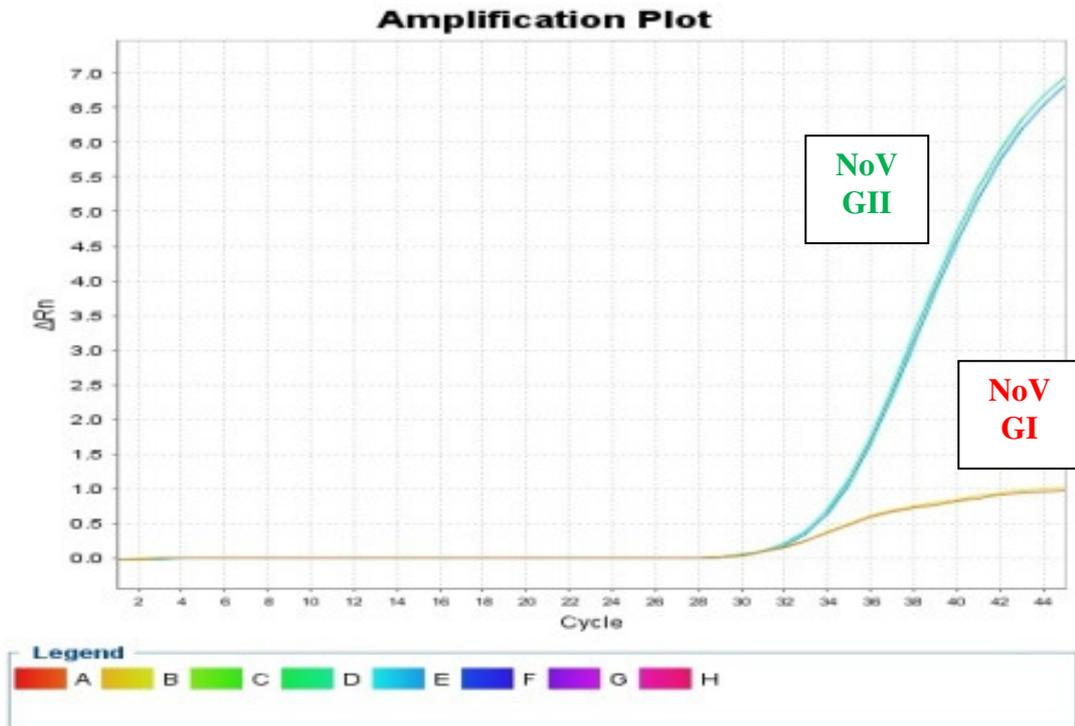
- Scongellare la Soluzione Stock Madre (**225 μ M / 125 μ M / 62,5 μ M**) di ciascun primer/sonda, rispettivamente: 225 μ M (**Primer NV1LCR, Primer COG2R e**

Primer Mengo209), 125 μM (**Primer QNIF4, QNIF2 e Primer Mengo110**) e 62,5 μM (**Sonda NVGG1p, Sonda QNIFSp e Sonda Mengo147p**).

- Preparare un numero opportuno di provette Nuclease free da 0.2 μl ed etichettarle rispettivamente con il nome del primer/sonda, indicando la concentrazione in μM .
- Dispensare in ciascuna provetta 90 μl di acqua acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free.
- Aggiungere alle corrispondenti provette 10 μl di ciascun primer/sonda alla concentrazione iniziale.

APPENDICE S

Curve di amplificazione della Real Time RT-PCR per NoV GI e NoV GII



3.7.5 NESTED PCR PER LA RICERCA DEGLI ADENOVIRUS (METODO A)

La presente procedura, messa a punto nel 2013, ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la ricerca del DNA di *Adenovirus* di provenienza enterica (genere *Mastadenovirus*) in campioni biologici (acque, Molluschi Eduli Lamellibranchi) e in lisati di colture cellulari, mediante una *Nested PCR* specifica per l'**hexon gene** degli *Adenovirus*. Può, inoltre, essere impiegata per l'identificazione di ceppi virali isolati.

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

La *Nested PCR* per *Adenovirus* prevede 2 reazioni di amplificazione a catena della polimerasi, ciascuna con una specifica coppia di primers. La prima PCR o *FIRST* viene effettuata con i primers “**ADE1–hexAA1885 (Forward)**” e “**ADE2–hexAA1913 (Reverse)**”, la seconda PCR o *NESTED* viene effettuata con i primers “**ADE3–nehexAA1893 (Forward)**” e “**ADE4–nehexAA1905 (Reverse)**”.

Per la la *FIRST PCR* e la *Nested PCR* si impiega un apposito kit disponibile in commercio (QIAGEN – Taq PCR Core Kit), contenente i reagenti necessari per le master mix.

Prima di procedere con la prova di *Nested PCR* per *Adenovirus* (AdVs), il campione opportunamente preparato, come descritto al punto 3.5, viene sottoposto ad estrazione del DNA come descritto al punto 3.6. Anche il controllo positivo viene opportunamente preparato, procedendo all'estrazione del suo DNA e alla sua diluizione, se necessario, come descritto al punto 3.6.

1. Reazione di Amplificazione FIRST del DNA (FIRST PCR)

La *FIRST PCR* prevede le seguenti **3 fasi**:

1.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix FIRST

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "*PCR Nested Adenovirus (AdVs) (Metodo A)*".

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (es. DNA di AdV-2), del Controllo Negativo (acqua Nuclease free) e del Bianco (controllo dell'estrazione).
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix FIRST seguendo le indicazioni del kit di amplificazione in uso, riportate nell'**APPENDICE T**.
N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (200 µM e 50 µM) dei primers secondo quanto riportato nell'**APPENDICE U**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (50 µM) di ciascun primer.
- Dispensare la Master Mix in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE T**.
- Aggiungere 10 µl di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo FIRST (**APPENDICE T**).

1.2 Trasferimento del DNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 10 µl di **DNA di** ciascun campione (**APPENDICE T**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 10 µl di DNA Controllo Positivo (**APPENDICE T**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 10 µl di Bianco (**APPENDICE T**).

1.3 Reazione di Amplificazione FIRST del DNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “Adenovirus FIRST (Metodo A)” (*Tabella 3.10*) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.10. Programma “Adenovirus FIRST (Metodo A)”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Denaturazione iniziale DNA	3 min.	+94°C	1
2	Denaturazione DNA	30 sec	+94°C	35
3	Annealing	30 sec	+55°C	
4	Polimerizzazione	1 min	+72°C	
5	Polimerizzazione finale	5 min.	+72°C	1
6	Mantenimento	∞	+8°C	1

2 Reazione di Amplificazione Nested del DNA (Nested PCR)

La NESTED PCR prevede le seguenti **3 fasi**:

2.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix NESTED

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro “PCR Nested Adenovirus (AdVs) (Metodo A)”.

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (es. DNA amplificato FIRST di AdV-2), del

Controllo Negativo FIRST, del Controllo Negativo NESTED (acqua Nuclease free) e del Bianco.

- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix Nested seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE T**.

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (200 μ M e 50 μ M) dei primers secondo quanto riportato nell'**APPENDICE U**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (50 μ M) di ciascun primer.

- Dispensare la Master Mix in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE T**.
- Aggiungere 1 μ l di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo NESTED (**APPENDICE T**).

2.2 Trasferimento del DNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 μ l di DNA amplificato FIRST di ciascun campione (**APPENDICE T**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 1 μ l di DNA amplificato FIRST del Controllo Positivo (**APPENDICE T**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 1 μ l di amplificato FIRST del Bianco (**APPENDICE T**).

2.3 Reazione di Amplificazione Nested del DNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come "Adenovirus NESTED (Metodo A)" (**Tabella 3.11**) e dare lo "RUN/START".

Tabella 3.11. Programma “Adenovirus NESTED (Metodo A)”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Denaturazione iniziale DNA	3 min.	+94° C	1
2	Denaturazione DNA	30 sec	+94° C	35
3	Annealing	30 sec	+55° C	
4	Polimerizzazione	1 min	+72° C	
5	Polimerizzazione finale	5 min.	+72° C	1
6	Mantenimento	∞	+8° C	1

3 Rivelazione del prodotto di amplificazione

Elettroforesi

- Allestire il gel di agarosio al 2% (**APPENDICE H**) con un numero di pozzetti uguale al numero complessivo degli amplificati (campioni in esame, Bianco, Controllo Negativo FIRST, Controllo Negativo NESTED, Controllo Positivo) più un pozzetto per il Ladder.
- Posizionare il gel nella cella elettroforetica in modo che sia completamente ricoperto da TBE 1X (**APPENDICE H**).
- Dispensare in una micropiastra a 96 pozzetti con fondo ad U 10 µl di ogni amplificato e aggiungere 2 µl di loading buffer.
- Preparare la “miscela Ladder” mescolando: 2 µl di Ladder 50/100 bp, 3 µl di loading buffer e 9 µl di TBE.

N.B.: si può impiegare anche un ladder già colorato (per l’utilizzo seguire le istruzioni del produttore).

- Caricare in un pozzetto del gel 10 µl della “miscela Ladder” preparata o 7 µl del Ladder già colorato, disponendoli da sinistra verso destra nel seguente ordine: campioni, Bianco, Controllo Negativo, Ladder, Controllo Positivo.

N.B.: se si utilizza un ordine diverso nel disporre i campioni ed i controlli, indicarlo nel foglio di lavoro e/o nel file della corsa elettroforetica.

- Applicare alla cella elettroforetica una corrente di circa 120 V (nel caso in cui si utilizza un gel grande) o di circa 100 V (nel caso in cui si utilizza un gel piccolo).
- Interrompere la corsa elettroforetica quando il loading buffer ha percorso almeno 5 cm. (in genere sono sufficienti 45 min. circa).
- Porre il gel sul transilluminatore a raggi UV ed analizzare l'immagine; si può quindi procedere alla sua acquisizione.
- Riportare l'esito della prova nell'apposito foglio di lavoro "*PCR Nested Adenovirus (AdVs) (Metodo A)*".

RACCOLTA ED ELABORAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati viene effettuata verificando la presenza/assenza di una banda elettroforetica derivante dal frammento di DNA prodotto dall'amplificazione. La dimensione di tale banda viene determinata confrontandola con il Ladder.

La prova è considerata valida se:

- il controllo positivo dà una banda di **142 bp** alla NESTED PCR (**APPENDICE V**);
N.B.: la banda attesa del controllo positivo alla FIRST è di 300 bp.
- il controllo negativo non presenta nessuna banda (**APPENDICE V**).

I campioni sono considerati **positivi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, presentano alla NESTED una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo (142 bp); indice della presenza di DNA riferibile ad *Adenovirus*.

I campioni sono considerati **negativi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, non presentano alla NESTED una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo; assenza di DNA riferibile ad *Adenovirus*.

Nel caso in cui il risultato sia di incerta interpretazione è bene ripetere la prova a partire dalla FIRST PCR (punto 1). Se il problema si ripresenta ripartire dall'estrazione del campione (punto 3.6).

I campioni positivi possono essere sottoposti ad analisi di sequenza utilizzando gli stessi primers indicati nella presente procedura e le sequenze confrontate con quelle depositate in banche dati internazionali.

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- **Allard A., Girones R., Juto P., Wadell G. (1990). Polymerase Chain Reaction for detection of adenovirus in stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2659-2667. ⁽¹⁰⁾**
- **Allard A., Albisson B., Wadell G. (1992). Detection of Adenovirus in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step Polymerase Chain Reaction. *J. Medical Virol.*, 37: 149-157. ⁽¹¹⁾**
- **Formiga-Cruz M., Hundesa A., Clemente-Casares P., Albiñana-Gimenez N., Allard A., Girones R. (2005). Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *J. Virol. Meth.*, 125: 111-118. ⁽¹²²⁾**
- **Metodica allegata al kit QIAGEN - Taq PCR Core Kit. ⁽²⁷⁷⁾**
- **Puig M., Jofre J., Lucena F., Allard A., Wadell G., Girones R. (1994). Detection of Adenovirus and Enterovirus in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (8): 2963-2970. ⁽³²²⁾**

APPENDICE T

Kits per amplificazione DNA

La preparazione della Master Mix deve essere effettuata in un'area appositamente dedicata.

Kit di amplificazione usato: Taq PCR Core Kit.
Ditta: QIAGEN

Composizione del Kit:

- *Taq* DNA Polymerase: 250 units o 1.000 units (4 x 250 units).
- QIAGEN PCR Buffer, 10X: 1,2 ml o 4 x 1,2 ml.
- CoralLoad PCR Buffer, 10X: 1,2 ml o 4 x 1,2 ml.
- Q-Solution, 5X: 2 ml o 4 x 2 ml.
- MgCl₂, 25 mM: 1,2 ml o 4 x 1,2 ml.
- dNTP Mix, 10 mM each: 200 µl o 4 x 200 µl.

FIRST PCR (Volume Finale 50 µl)

Master Mix FIRST

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
10X PCR Buffer*	10X	1X	5 µl
dNTP Mix	10 mM	0,25 mM	1,25 µl
Primer ADE1-hexAA1885	50 µM	0,5 µM	0,5 µl
Primer ADE2-hexAA1913	50 µM	0,5 µM	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase	/	2U	0,4 µl
Acqua Nuclease free	/	/	32,35 µl
DNA	/	/	10 µl
Volume Totale	/	/	50 µl

*(o 10X CoralLoad PCR Buffer)

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela.
- Preparare una provetta eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo e del controllo negativo.
- Preparare nella provetta eppendorf da 1,5-2,0 ml la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione della miscela alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 40 µl nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 10 µl di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo FIRST.
- In una stanza separata caricare 10 µl di ciascun campione, 10 µl di controllo positivo e 10 µl di bianco nelle rispettive provette.

NESTED PCR (Volume Finale 50 µl)***Master Mix NESTED***

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
10X PCR Buffer*	10X	1X	5 µl
dNTP Mix	10 mM	0,25 mM	1,25 µl
Primer ADE3–nehexAA1893	50 µM	0,5 µM	0,5 µl
Primer ADE4–nehexAA1905	50 µM	0,5 µM	0,5 µl
Taq DNA Polymerase	/	2U	0,4 µl
Acqua Nuclease free	/	/	41,35 µl
DNA prodotto FIRST PCR	/	/	1 µl
Volume Totale	/	/	50 µl

*(o 10X CoralLoad PCR Buffer)

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela.

- Preparare una provetta eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo e del controllo negativo.
- Preparare nella provetta eppendorf da 1,5-2,0 ml la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione della miscela alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 49 μ l nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 1 μ l di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo NESTED.
- In una stanza separata caricare 1 μ l di amplificato FIRST di ciascun campione, 1 μ l di amplificato FIRST del controllo positivo e 1 μ l di amplificato FIRST del bianco nelle rispettive provette.

APPENDICE U

Preparazione dei primers

Prima di procedere con la preparazione dei primers, compilare foglio di lavoro “*Preparazione Stock Solution Primers*”.

I primers utilizzati per tale procedura sono quelli indicati di seguito.

Primers *Nested PCR ADENOVIRUS*

PRIMERS FIRST	SEQUENZA
ADE1–hexAA1885 (Forward)	5'-GCC GCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C-3'
ADE2–hexAA1913 (Reverse)	5'-CAG CAC GCC GCG GAT GTC AAA GT-3'
PRIMERS NESTED	SEQUENZA
ADE3–nehexAA1893 (Forward)	5'-GCC ACC GAG ACG TAC TTC AGC CTG-3'
ADE4–nehexAA1905 (Reverse)	5'-TTG TAC GAG TAC GCG GTA TCC TCG CGG TC-3'

Soluzione Stock Madre Primers 200 μ M:

I Primers vengono acquistati da ditte specializzate che li inviano nella forma liofilizzata, con allegato un documento indicante:

- Caratteristiche fisico-chimiche.
- Quantità assoluta in μ g.
- Numero di nmoli.
- Tipo di purificazione.

Prima del loro impiego, essi devono essere opportunamente reidratati con acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 200 μ M. Per calcolare la quantità di acqua da aggiungere al liofilizzato applicare la seguente formula:

$$\text{N}^\circ \text{ nmoli ricevute} \times 1000/200 = \mu\text{l di acqua da aggiungere}$$

Sulla provetta della Soluzione Stock Madre deve essere indicato il nome del primer e la concentrazione di 200 μM .

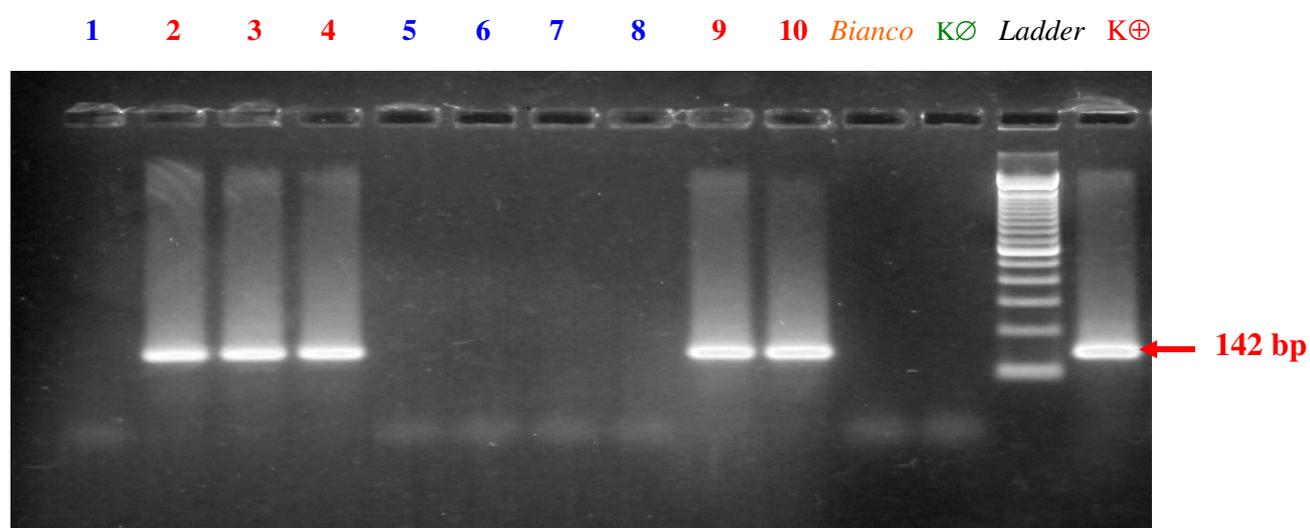
N.B.: La soluzione stock va conservata a $\cong -20^\circ \text{C}$ e impiegata come base di partenza per realizzare la Soluzioni di Lavoro 50 μM . Essa va scongelata solo per il tempo strettamente necessario.

Soluzione di Lavoro Primers 50 μM :

- Scongela la Soluzione Stock Madre (200 μM) di ciascun primer (ADE1, ADE2, ADE3, ADE4).
- Preparare un numero opportuno di provette Nuclease free ed etichettarle rispettivamente con la dicitura “ADE1”, “ADE2”, “ADE3”, “ADE4”, indicando la concentrazione di 50 μM .
- Dispensare in ciascuna provetta 75 μl di acqua acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free.
- Aggiungere alle corrispondenti provette 25 μl di ciascun primer alla concentrazione 200 μM .

APPENDICE V

Letture di una corsa elettroforetica di PCR per AdVs (Metodo A)



Nested PCR AdVs (Metodo A): Linea 2, 3, 4, 9 e 10, **campioni positivi**; Linea 1, 5, 6, 7 e 8, **campioni negativi**; Linea 11, **Bianco**; Linea 12, **KØ**; Linea 13, **Ladder (100 bp)**; Linea 14, **K⊕**.

3.7.6 NESTED RT-PCR PER LA RICERCA DELL'HAV (METODO B)

La presente procedura, messa a punto nel 2014, ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la ricerca dell'RNA del virus responsabile dell'epatite A (HAV) in campioni biologici (acque, Molluschi Eduli Lamellibranchi) e in lisati di colture cellulari, mediante una RT-PCR *Nested* specifica per la **regione di giunzione VP1/2A virale**. Può, inoltre, essere impiegata per l'identificazione di ceppi virali isolati.

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

La RT-PCR *Nested* per HAV prevede 1 reazione di Retrotrascrizione e amplificazione a catena della polimerasi One-Step, seguita da 1 reazione di amplificazione a catena della polimerasi, ciascuna con una coppia di primers diversa. La prima RT-PCR FIRST viene effettuata con i primers “**1852-f (Forward)**” e “**1853-r (Reverse)**”, la seconda PCR o NESTED viene effettuata con i primers “**1854-f (Forward)**” e “**1855-r (Reverse)**”.

Per la **RT-PCR FIRST One-Step** si impiega un apposito kit disponibile in commercio (Bioline - MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit), per la **Nested PCR** si impiega un altro kit commerciale (Bioline - MyTaq™ Red Mix Kit), entrambi contenenti i reagenti necessari per le master mix.

Prima di procedere con la prova di RT-PCR *Nested* per HAV, il campione opportunamente preparato, come descritto al punto 3.5, viene sottoposto ad estrazione dell'RNA come descritto al punto 3.6. Anche il controllo positivo viene opportunamente preparato, procedendo all'estrazione del suo RNA e alla sua diluizione, se necessario, come descritto al punto 3.6.

1 Reazione di Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST

La **RT-PCR FIRST** prevede le seguenti **3 fasi**:

1.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix RT-PCR FIRST One-Step

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "*RT-PCR Nested Virus Epatite A (HAV)*".

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da retrotrascrivere, del Controllo Positivo (RNA di HAV), del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (acqua Nuclease free) e del Bianco (controllo dell'estrazione).
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix RT-PCR FIRST seguendo le indicazioni del kit di amplificazione in uso, riportate nell'**APPENDICE W** (a). *N.B.:* preparare, se necessario, le soluzioni (100 μ M e 22 μ M) dei primers ("1852-f" e "1853-r") secondo quanto riportato nell'**APPENDICE X**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (22 μ M) di ciascun primer.
- Dispensare la Master Mix RT-PCR FIRST in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE W** (a).
- Aggiungere 2 μ l di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (**APPENDICE W-a**).

1.2 Trasferimento dell'RNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 2 µl di RNA di ciascun campione (**APPENDICE W-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 2 µl di RNA Controllo Positivo (**APPENDICE W-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 2 µl di Bianco (**APPENDICE W-a**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

1.3 Reazione di Retroscrittione-Amplificazione FIRST One-Step dell'RNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “Retroscrittione-Amplificazione FIRST One-Step HAV” (*Tabella 3.12*) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.12. Programma “Retroscrittione-Amplificazione FIRST One-Step HAV”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Retroscrittione	45 min.	+42°C	1
2	Denaturazione	4 min	+95°C	1
3	Denaturazione	30 sec.	+95°C	35
4	Annealing	30 sec.	+40°C	
5	Polimerizzazione	30 sec.	+72°C	
6	Polimerizzazione finale	10 min.	+72°C	1
7	Mantenimento	∞	+4°C	1

2 Reazione di Amplificazione Nested del DNA – Seconda Amplificazione (Nested PCR)

La **NESTED PCR** prevede le seguenti **3 fasi**:

2.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix NESTED

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "RT-PCR Nested Virus Epatite A (HAV)".

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (cDNA retrotrascritto di HAV), del Controllo Negativo RT-PCR FIRST, del Controllo Negativo NESTED (acqua Nuclease free) e del Bianco.
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix Nested seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE W (b)**.

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (100 μ M e 22 μ M) dei primers ("1854-f" e "1855-r") secondo quanto riportato nell'**APPENDICE X**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (22 μ M) di ciascun primer.

- Dispensare la Master Mix in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE W (b)**.
- Aggiungere 1 μ l di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo NESTED (**APPENDICE W-b**).

2.2 Trasferimento del DNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 μ l di DNA di ciascun campione (**APPENDICE W-b**).
- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 μ l di DNA del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (**APPENDICE W-b**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 1 μ l di DNA del Controllo Positivo (**APPENDICE W-b**).

- Aggiungere nell'apposita provetta 1 µl dell'amplificato del Bianco (**APPENDICE W-b**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

2.3 Reazione di Amplificazione Nested del cDNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come "NESTED HAV" (**Tabella 3.13**) e dare lo "RUN/START".

Tabella 3.13. Programma "NESTED HAV"

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Denaturazione	4 min.	+95°C	1
2	Denaturazione	30 sec.	+95°C	35
3	Annealing	30 sec.	+48°C	
4	Polimerizzazione	30 sec.	+72°C	
5	Polimerizzazione finale	10 min.	+72°C	1
6	Mantenimento	∞	+4°C	1

3 Rivelazione del prodotto di amplificazione

Elettroforesi

- Allestire il gel di agarosio al 2% (**APPENDICE H**) con un numero di pozzetti uguale al numero complessivo degli amplificati (campioni in esame, Bianco, Controllo Negativo RT-PCR FIRST, Controllo Negativo NESTED, Controllo Positivo) più un pozzetto per il Ladder.
N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà preso in considerazione nell'allestire il gel.
- Posizionare il gel nella cella elettroforetica in modo che sia completamente ricoperto da TBE 1X (**APPENDICE H**).
- Dispensare in una micropiastra a 96 pozzetti con fondo ad U 10 µl di ogni amplificato e aggiungere 2 µl di loading buffer.

- Preparare la “miscela Ladder” mescolando: 2 µl di Ladder 50/100 bp, 3 µl di loading buffer e 9 µl di TBE.
N.B.: si può impiegare anche un ladder già colorato (per l’utilizzo seguire le istruzioni del produttore).
- Caricare nei pozzetti del gel 10 µl di ciascun amplificato preparato con il loading buffer (un amplificato per pozzetto), disponendoli da sinistra verso destra nel seguente ordine: campioni, Bianco, Controllo Negativo RT-PCR FIRST, Controllo Negativo NESTED, Ladder, Controllo Positivo.
N.B.: se si utilizza un ordine diverso nel disporre i campioni ed i controlli, indicarlo nel foglio di lavoro e/o nel file della corsa elettroforetica.
N.B.B: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà presente nel foglio di lavoro.
- Caricare in un pozzetto del gel 10 µl della “miscela Ladder” preparata o 7 µl del Ladder già colorato.
- Applicare alla cella elettroforetica una corrente di circa 120 V (nel caso in cui si utilizza un gel grande) o di circa 100 V (nel caso in cui si utilizza un gel piccolo).
- Interrompere la corsa elettroforetica quando il loading buffer ha percorso almeno 5 cm. (in genere sono sufficienti 45 min. circa).
- Porre il gel sul transilluminatore a raggi UV ed analizzare l’immagine; si può quindi procedere alla sua acquisizione.
- Riportare l’esito della prova nell’apposito foglio di lavoro “*RT-PCR Nested Virus Epatite A (HAV)*”.

RACCOLTA ED ELABORAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati viene effettuata verificando la presenza/assenza di una banda elettroforetica derivante dal frammento di DNA prodotto dall’amplificazione. La dimensione di tale banda viene determinata confrontandola con il Ladder (**APPENDICE Y**).

La prova è considerata valida se:

- il controllo positivo dà una banda di **267 bp** alla NESTED (**APPENDICE Y**).

N.B.: la banda attesa del controllo positivo alla RT-PCR FIRST è di 393 bp.

- il controllo negativo non presenta nessuna banda (**APPENDICE Y**).

I campioni sono considerati **positivi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, si evince la presenza di una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo NESTED (267 bp).

I campioni sono considerati **negativi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, non presentano una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo (267 bp).

Nel caso in cui il risultato sia di incerta interpretazione è bene ripetere la prova a partire dalla Retrotrascrizione-Amplificazione One-Step (punto 1). Se il problema si ripresenta, ripartire dall'estrazione del campione (punto 3.6).

I campioni positivi possono essere sottoposti ad analisi di sequenza utilizzando gli stessi primers indicati nella presente procedura e le sequenze confrontate con quelle depositate in banche dati internazionali.

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- La Rosa G., Della Libera S., Iaconelli M., Ciccaglione A.R., Bruni R., Taffon S., Equestre M., Alfonsi V., Rizzo C., Tosti M.E., Chironna M., Romanò L., Zanetti A.R., Muscillo M. (2014a). Surveillance of hepatitis A virus in urban sewages and comparison with cases notified in the course of an outbreak, Italy 2013. *BMC Infectious Diseases*, 14: 419 <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/419> ⁽²¹⁹⁾
- Metodica allegata al kit Bioline - MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit. ⁽²⁷³⁾
- Metodica allegata al kit Bioline - MyTaq™ Red Mix Kit. ⁽²⁷⁴⁾

- **Taffon S., Bidini G., Vichi F., Corti G., Genovese D., Kondili L.A., Bindi R., Armellini F., Leoncini F., Bartoloni A., Mazzotta F., Rapicetta M. (2011). A unique HAV strain circulated in patients with acute HAV infection with different risk exposures in Tuscany, Italy. *Journal of Clinical Virology*, 50: 142–147. ⁽³⁷²⁾**

APPENDICE W

La preparazione delle Master Mix per la Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step PCR (a) e la NESTED PCR (b) deve essere effettuata in un'area appositamente dedicata.

**a) Kit di Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step usato: MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit.
Ditta: Bioline.**

Composizione del Kit:

- **MyTaq One-Step Mix (2X):** 625 µl (25 Reactions) o 2 x 1,25 ml (100 Reactions).
- **RiboSafe RNase Inhibitor (10 U/µl):** 25 µl (25 Reactions) o 100 µl (100 Reactions).
- **Reverse Transcriptase:** 12,5 µl (25 Reactions) o 50 µl (100 Reactions).
- **DEPC-treated Water:** 1,8 ml.

Master Mix Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	7,75 µl
MyTaq One-Step Mix (2X)	2X	1X	12,5 µl
Primer 1852-f (Forward)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Primer 1853-r (Reverse)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Reverse Transcriptase	/	/	0,25 µl
RiboSafe RNase Inhibitor (10 U/µl)	10 U/µl	0.5 U/µl	0,5 µl
RNA	/	/	2 µl
Volume totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una o più provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo e del controllo negativo RT-PCR FIRST.

- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 23 μ l nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 2 μ l di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo RT-PCR FIRST.
- In una stanza separata caricare 2 μ l di RNA di ciascun campione, 2 μ l di RNA del controllo positivo e 2 μ l di bianco nelle rispettive provette.

b) Kit di Amplificazione NESTED usato: MyTaq™ Red Mix Kit.
Ditta: Bioline.

Composizione del Kit:

- **MyTaq Red Mix (2X):** 4 x 1,25 ml (200 Reactions) o 20 x 1,25 ml (1.000 Reactions).

Master Mix NESTED

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	9,5 µl
Primer 1854-f (Forward)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Primer 1855-r (Reverse)	22 µM	0,88 µM	1 µl
MyTaq Red Mix (2X)	2X	1X	12,5 µl
DNA	/	/	1 µl
Volume Totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 24 µl nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 1 µl di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo NESTED.
- In una stanza separata caricare 1 µl di retrotrascritto (cDNA) di ciascun campione, 1 µl di cDNA del controllo negativo RT-PCR FIRST, 1 µl di cDNA del controllo positivo e 1 µl del retrotrascritto-amplificato del bianco nelle rispettive provette.

APPENDICE X

Preparazione dei primers

Prima di procedere con la preparazione dei primers, compilare foglio di lavoro “*Preparazione Stock Solution Primers*”.

I primers utilizzati per tale procedura sono quelli indicati di seguito.

Primers *Nested RT-PCR HAV*

PRIMERS RT-PCR FIRST	SEQUENZA
1852-f (Forward)	5'-TATTCAGATTGCAAATTAYAAT-3'
1853-r (Reverse)	5'-AAYTTCATYATTTTCATGCTCCT-3'
PRIMERS NESTED	SEQUENZA
1854-f (Forward)	5'-TATTTGTCTGTYACAGAACAATCAG-3'
1855-r (Reverse)	5'-AGGRGGTGGAAGYACTTCATTTGA-3'

Soluzione Stock Madre Primers 100 μ M:

I Primers vengono acquistati da ditte specializzate che li inviano nella forma liofilizzata, con allegato un documento indicante:

- Caratteristiche fisico-chimiche.
- Quantità assoluta in μ g.
- Numero di nmoli.
- Tipo di purificazione.

Prima del loro, impiego essi devono essere opportunamente reidratati con acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 100 μ M. Per calcolare la quantità di acqua da aggiungere al liofilizzato applicare la seguente formula:

$$\mathbf{N^{\circ} \text{ nmoli ricevute}/100 = \mu\text{l di acqua da aggiungere}}$$

Sulla provetta della Soluzione Stock Madre deve essere indicato il nome del primer e la concentrazione di 100 μM .

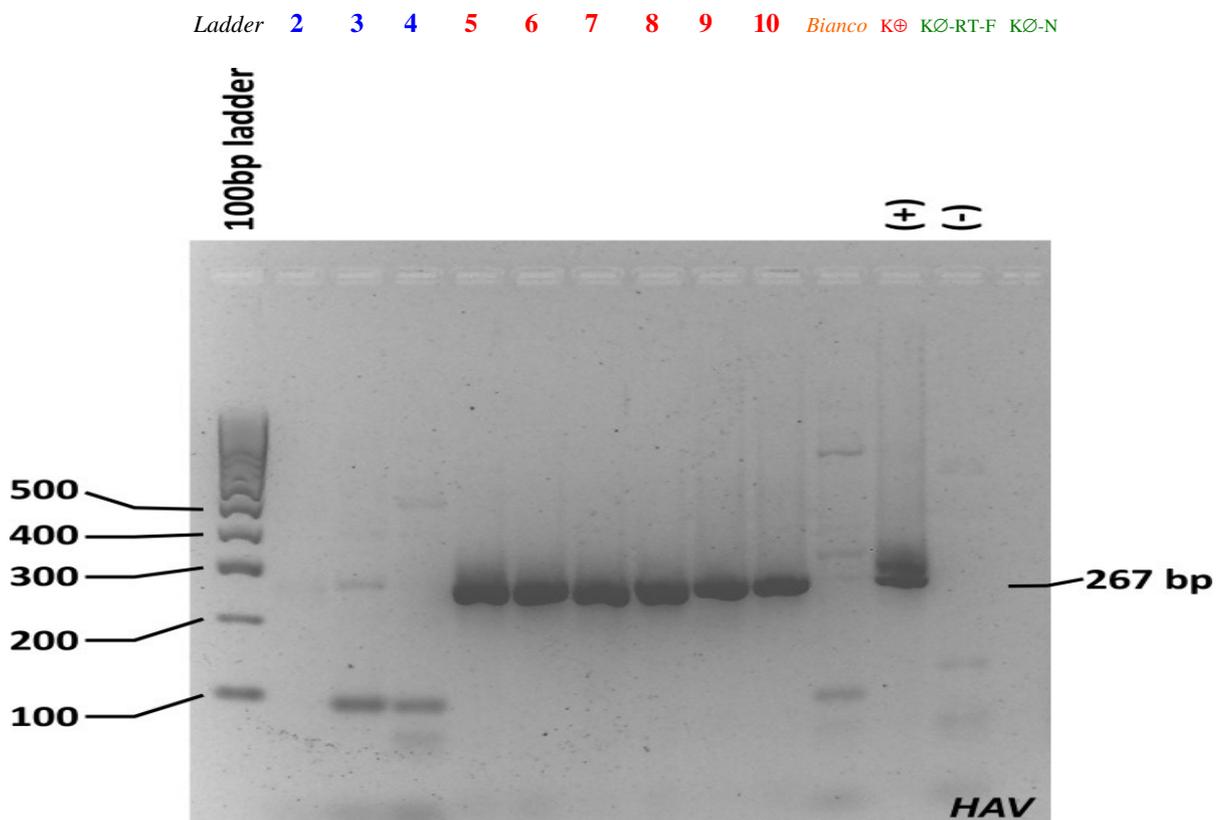
N.B.: La soluzione stock va conservata a $\cong -20^{\circ}\text{C}$ e impiegata come base di partenza per realizzare la Soluzioni di Lavoro 22 μM . Essa va scongelata solo per il tempo strettamente necessario.

Soluzioni di Lavoro Primers 22 μM :

- Scongela la Soluzione Stock Madre (100 μM) di ciascun primer (1852-f, 1853-r, 1854-f, 1855-r).
- Preparare un numero opportuno di provette Nuclease free da 0.2 μl ed etichettarle rispettivamente con la dicitura “**1852-f**”, “**1853-r**”, “**1854-f**”, “**1855-r**”, indicando la concentrazione di 22 μM .
- Dispensare in ciascuna provetta 78 μl di acqua acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free.
- Aggiungere alle corrispondenti provette 22 μl di ciascun primer (1852-f, 1853-r, 1854-f, 1855-r) alla concentrazione di 100 μM .

APPENDICE Y

Letture di una corsa elettroforetica di Nested RT-PCR per HAV



Nested RT-PCR HAV: Linea 1, Ladder (100 bp); Linea 2, 3 e 4, campioni negativi; Linea 5, 6, 7, 8, 9 e 10, campioni positivi; Linea 11, Bianco; Linea 12, K \oplus ; Linea 13, K \emptyset RT-PCR FIRST (F); Linea 14, K \emptyset Nested.

3.7.7 SEMI-NESTED RT-PCR PER LA RICERCA DEL NOV GI E DEL NOV GII

La presente procedura, messa a punto nel 2014, ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la ricerca dell'RNA del Norovirus (NoV) GI e del NoV GII in campioni biologici (acque, Molluschi Eduli Lamellibranchi) e in lisati di colture cellulari, mediante una RT-PCR *Semi-Nested* specifica per il gene che codifica per la regione altamente conservata della **RNA Polimerasi RNA-dipendente** (RdRp) nella **ORF1** del genoma virale rispettivamente del **NoV GI** e del **NoV GII**. Può, inoltre, essere impiegata per l'identificazione di ceppi virali isolati.

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

La RT-PCR *Semi-Nested* per **NoV GI** prevede 1 reazione di Retrotrascrizione e amplificazione a catena della polimerasi One-Step, seguita da 1 reazione di amplificazione a catena della polimerasi, ciascuna con una coppia di primers diversa. La prima RT-PCR **FIRST** viene effettuata con i primers “**JV12Y-1421-f (Forward)**” e “**JV13I-1422-r (Reverse)**”, la seconda PCR o **SEMI-NESTED** viene effettuata con i primers “**GI^c-1423-f (Forward)**” e “**JV13I-1422-r (Reverse)**”. Questi sets di primers danno origine ad un amplificato di **188 bp**.

La RT-PCR *Semi-Nested* per **NoV GII** prevede 1 reazione di Retrotrascrizione e amplificazione a catena della polimerasi One-Step, seguita da 1 reazione di amplificazione a catena della polimerasi, ciascuna con una coppia di primers diversa. La prima RT-PCR **FIRST** viene effettuata con i primers “**JV12Y-1421-f (Forward)**” e “**JV13I-1422-r (Reverse)**” (comuni al NoV GI), la seconda PCR o **SEMI-NESTED** viene effettuata con i primers “**JV12Y-1421-f (Forward)**” e “**NoroII-R^c-1424-r (Reverse)**”. Questi sets di primers danno origine ad un amplificato di **237 bp**.

Per la **RT-PCR FIRST One-Step** si impiega un apposito kit disponibile in commercio (Bioline - MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit), per la **Semi-Nested PCR** si impiega un altro kit commerciale (Bioline - MyTaq™ Red Mix Kit), entrambi contenenti i reagenti necessari per le master mix.

Prima di procedere con la prova di RT-PCR Semi-Nested per NoV GI o NoV GII, il campione opportunamente preparato, come descritto al punto 3.5, viene sottoposto ad estrazione dell'RNA come descritto al punto 3.6. Anche il controllo positivo viene opportunamente preparato, procedendo all'estrazione del suo RNA e alla sua diluizione, se necessario, come descritto al punto 3.6.

1 Reazione di Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST NoV GI e NoV GII One-Step (Reazione Comune per GI e GII)

La **RT-PCR FIRST** prevede le seguenti **3 fasi**:

1.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix RT-PCR FIRST One-Step per NoV GI e NoV GII

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "*RT-PCR Semi-Nested Norovirus (NoV) GI e GII*".

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da retrotrascrivere, del Controllo Positivo (RNA di NoV GI e NoV GII), del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (acqua Nuclease free) e del Bianco (controllo dell'estrazione).
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix RT-PCR FIRST seguendo le indicazioni del kit di amplificazione in uso, riportate nell'**APPENDICE Z** (a).
N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (100 µM e 22 µM) dei primers ("JV12Y-1421-f" e "JV13I-1422-r") secondo quanto riportato nell'**APPENDICE A1**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (22 µM) di ciascun primer.

- Dispensare la Master Mix RT-PCR FIRST in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE Z** (a).
- Aggiungere 2 µl di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (**APPENDICE Z-a**).

1.2 Trasferimento dell'RNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 2 µl di RNA di ciascun campione (**APPENDICE Z-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 2 µl di RNA Controllo Positivo NoV GI e NoV GII (**APPENDICE Z-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 2 µl di Bianco (**APPENDICE Z-a**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

1.3 Reazione di Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step dell'RNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “Retroscrizione-Amplificazione FIRST One-Step NoV GI e NoV GII” (*Tabella 3.14*) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.14. Programma “Retroscrizione-Amplificazione FIRST One-Step NoV GI e NoV GII”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Retrotrascrizione	45 min.	+42°C	1
2	Denaturazione	4 min	+95°C	1
3	Denaturazione	30 sec.	+95°C	35
4	Annealing	30 sec.	+45°C	
5	Polimerizzazione	30 sec.	+72°C	
6	Polimerizzazione finale	10 min.	+72°C	1
7	Mantenimento	∞	+4°C	1

2 Reazione di Amplificazione Semi-Nested del DNA – Seconda Amplificazione (Semi-Nested PCR) per NoV GI

La **SEMI-NESTED** PCR prevede le seguenti **3 fasi**:

2.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix SEMI-NESTED NoV GI

Tale operazione va eseguita in un’area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l’apposito foglio di lavoro “*RT-PCR Semi-Nested Norovirus (NoV) GI e NoV GII*”.

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (cDNA retrotrascritto di NoV GI), del Controllo Negativo RT-PCR FIRST, del Controllo Negativo SEMI-NESTED NoV GI (acqua Nuclease free) e del Bianco.
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix Nested seguendo le indicazioni riportate nell’**APPENDICE Z** (b).

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (100 µM e 22 µM) dei primers (“GI^c-1423-f” e “JV13I-1422-r”) secondo quanto riportato

nell'**APPENDICE A1**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (22 µM) di ciascun primer.

- Dispensare la Master Mix in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE Z (b)**.
- Aggiungere 1 µl di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo SEMI-NESTED NoV GI (**APPENDICE Z-b**).

2.2 Trasferimento del DNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 µl di DNA di ciascun campione (**APPENDICE Z-b**).
- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 µl di DNA del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (**APPENDICE Z-b**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 1 µl di DNA del Controllo Positivo NoV GI (**APPENDICE Z-b**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 1 µl dell'amplificato del Bianco (**APPENDICE Z-b**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

2.3 Reazione di Amplificazione Semi-Nested del cDNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come "SEMI-NESTED NoV GI e NoV GII" (**Tabella 3.15**) e dare lo "RUN/START".

Tabella 3.15. Programma “SEMI-NESTED NoV GI e NoV GII”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Denaturazione	4 min.	+95°C	1
2	Denaturazione	30 sec.	+95°C	35
3	Annealing	30 sec.	+45°C	
4	Polimerizzazione	30 sec.	+72°C	
5	Polimerizzazione finale	10 min.	+72°C	1
6	Mantenimento	∞	+4°C	1

3 Reazione di Amplificazione Semi-Nested del DNA – Seconda Amplificazione (Semi-Nested PCR) per NoV GII

La SEMI-NESTED PCR prevede le seguenti **3 fasi**:

3.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix NESTED NoV GII

Tale operazione va eseguita in un’area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l’apposito foglio di lavoro “*RT-PCR Semi-Nested Norovirus (NoV) GI e NoV GII*”.

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (cDNA retrotrascritto di NoV GII), del Controllo Negativo RT-PCR FIRST, del Controllo Negativo SEMI-NESTED NoV GII (acqua Nuclease free) e del Bianco.
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix Nested seguendo le indicazioni riportate nell’**APPENDICE Z** (c).

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (100 µM e 22 µM) dei primers (“JV12Y-1421-f” e “NoroII-R^c-1424-r”) secondo quanto riportato nell’**APPENDICE A1**. Se sono già pronte, prelevare un’aliquota della soluzione di lavoro (22 µM) di ciascun primer.

- Dispensare la Master Mix in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE Z (c)**.
- Aggiungere 1 µl di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo SEMI-NESTED NoV GII (**APPENDICE Z-c**).

3.2 Trasferimento del DNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 µl di DNA di ciascun campione (**APPENDICE Z-c**).
- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 µl di DNA del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (**APPENDICE Z-c**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 1 µl di DNA del Controllo Positivo NoV GII (**APPENDICE Z-c**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 1 µl dell'amplificato del Bianco (**APPENDICE Z-c**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

3.3 Reazione di Amplificazione Semi-Nested del cDNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come "SEMI-NESTED NoV GI e NoV GII" (**Tabella 3.15**) e dare lo "RUN/START".

4 Rivelazione del prodotto di amplificazione

Elettroforesi

- Allestire il gel di agarosio al 2% (**APPENDICE H**) con un numero di pozzetti uguale al numero complessivo degli amplificati (campioni in esame, Bianco, Controllo Negativo RT-PCR FIRST, Controllo

Negativo SEMI-NESTED NoV GI o NoV GII, Controllo Positivo) più un pozzetto per il Ladder.

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà preso in considerazione nell'allestire il gel.

- Posizionare il gel nella cella elettroforetica in modo che sia completamente ricoperto da TBE 1X (**APPENDICE H**).
- Dispensare in una micropiastre a 96 pozzetti con fondo ad U 10 µl di ogni amplificato e aggiungere 2 µl di loading buffer.
- Preparare la “miscela Ladder” mescolando: 2 µl di Ladder 50/100 bp, 3 µl di loading buffer e 9 µl di TBE.

N.B.: si può impiegare anche un ladder già colorato (per l'utilizzo seguire le istruzioni del produttore).

- Caricare nei pozzetti del gel 10 µl di ciascun amplificato preparato con il loading buffer (un amplificato per pozzetto), disponendoli da sinistra verso destra nel seguente ordine: campioni, Bianco, Controllo Negativo RT-PCR FIRST, Controllo Negativo SEMI-NESTED NoV GI o NoV GII, Ladder, Controllo Positivo.

N.B.: se si utilizza un ordine diverso nel disporre i campioni ed i controlli, indicarlo nel foglio di lavoro e/o nel file della corsa elettroforetica.

N.B.B: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà presente nel foglio di lavoro.

- Caricare in un pozzetto del gel 10 µl della “miscela Ladder” preparata o 7 µl del Ladder già colorato.
- Applicare alla cella elettroforetica una corrente di circa 120 V (nel caso in cui si utilizza un gel grande) o di circa 100 V (nel caso in cui si utilizza un gel piccolo).
- Interrompere la corsa elettroforetica quando il loading buffer ha percorso almeno 5 cm. (in genere sono sufficienti 45 min. circa).
- Porre il gel sul transilluminatore a raggi UV ed analizzare l'immagine; si può quindi procedere alla sua acquisizione.
- Riportare l'esito della prova nell'apposito foglio di lavoro “*RT-PCR Semi-Nested Norovirus (NoV) GI e NoV GII*”.

RACCOLTA ED ELABORAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati viene effettuata verificando la presenza/assenza di una banda elettroforetica derivante dal frammento di DNA prodotto dall'amplificazione. La dimensione di tale banda viene determinata confrontandola con il Ladder (**APPENDICE B1**).

Interpretazione dei risultati per NoV GI:

La prova per **NoV GI** è considerata valida se:

- il **controllo positivo NoV GI** dà una banda di **188 bp** alla SEMI-NESTED (**APPENDICE B1**).

N.B.: la banda attesa del controllo positivo alla RT-PCR FIRST è di 326-327 bp.

- il **controllo negativo NoV GI** non presenta nessuna banda (**APPENDICE B1**).

I campioni sono considerati **positivi per NoV GI** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, si evince la presenza di una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo SEMI-NESTED (188 bp).

I campioni sono considerati **negativi per NoV GI** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, non presentano una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo (188 bp).

Interpretazione dei risultati per NoV GII:

La prova per **NoV GII** è considerata valida se:

- il **controllo positivo NoV GII** dà una banda di **237 bp** alla SEMI-NESTED (**APPENDICE B1**).

N.B.: la banda attesa del controllo positivo alla RT-PCR FIRST è di 326-327 bp.

- il **controllo negativo NoV GII** non presenta nessuna banda (**APPENDICE B1**).

I campioni sono considerati **positivi per NoV GII** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, si evince la presenza di una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo SEMI-NESTED (237 bp).

I campioni sono considerati **negativi per NoV GII** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, non presentano una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo (237 bp).

Nel caso in cui il risultato sia di incerta interpretazione per NoV GI e/o NoV GII è bene ripetere la prova a partire dalla Retrotrascrizione-Amplificazione One-Step (punto 1). Se il problema si ripresenta, ripartire dall'estrazione del campione (punto 3.6).

I campioni positivi possono essere sottoposti ad analisi di sequenza utilizzando primers specifici e le sequenze confrontate con quelle depositate in banche dati internazionali.

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- **Boxman I.L.A, Tilburg J.H.C., te Loeke A.J.M., Vannema H., Jonker K., de Boer E., Koopmans M. (2006). Detection od Norovirus in shelfish in Netherland. *International Journal of Food Microbiology.*, 108: 391-396.** ⁽³⁶⁾
- **Green J., Henshilwood K., Gallimore C.I. (1998). A Nested Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Small Round-Structured Viruses in Environmentally Contaminated Molluscan Shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 858–863.** ⁽¹⁴¹⁾
- Metodica allegata al kit Bioline - MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit. ⁽²⁷³⁾
- Metodica allegata al kit Bioline - MyTaq™ Red Mix Kit. ⁽²⁷⁴⁾

- **Vennema H., de Bruin E., Koopmans M. (2002). Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Virology*, 25: 233 - 235. ⁽³⁹²⁾**
- **Vinje J., Koopmans MP (1996). Molecular detection and epidemiology of small round- structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.*; 174 (3): 610-615. ⁽³⁹⁶⁾**

APPENDICE Z

La preparazione delle Master Mix per la Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step PCR (a) e la NESTED PCR (b) deve essere effettuata in un'area appositamente dedicata.

a) Kit di Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step usato: MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit.
Ditta: Bionline.

Composizione del Kit:

- **MyTaq One-Step Mix (2X):** 625 µl (25 Reactions) o 2 x 1,25 ml (100 Reactions).
- **RiboSafe RNase Inhibitor (10 U/µl):** 25 µl (25 Reactions) o 100 µl (100 Reactions).
- **Reverse Transcriptase:** 12,5 µl (25 Reactions) o 50 µl (100 Reactions).
- **DEPC-treated Water:** 1,8 ml.

Master Mix Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	7,75 µl
MyTaq One-Step Mix (2X)	2X	1X	12,5 µl
Primer JV12Y-1421-f (Forward)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Primer JV13I-1422-r (Reverse)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Reverse Transcriptase	/	/	0,25 µl
RiboSafe RNase Inhibitor (10 U/µl)	10 U/µl	0,5 U/µl	0,5 µl
RNA	/	/	2 µl
Volume totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una o più provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo e del controllo negativo RT-PCR FIRST.

- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 23 μ l nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 2 μ l di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo RT-PCR FIRST.
- In una stanza separata caricare 2 μ l di RNA di ciascun campione, 2 μ l di RNA del controllo positivo e 2 μ l di bianco nelle rispettive provette.

**b) Kit di Amplificazione SEMI-NESTED NoV GI usato: MyTaq™ Red Mix Kit.
Ditta: Bioline.**

Composizione del Kit:

- **MyTaq Red Mix (2X):** 4 x 1,25 ml (200 Reactions) o 20 x 1,25 ml (1.000 Reactions).

Master Mix SEMI-NESTED NoV GI

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	9,5 µl
Primer GI ^c -1423-f (Forward)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Primer JV13I-1422-r (Reverse)	22 µM	0,88 µM	1 µl
MyTaq Red Mix (2X)	2X	1X	12,5 µl
DNA	/	/	1 µl
Volume Totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 24 µl nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 1 µl di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo NESTED NoV GI.
- In una stanza separata caricare 1 µl di retrotrascritto (cDNA) di ciascun campione, 1 µl di cDNA del controllo negativo RT-PCR FIRST, 1 µl di cDNA del controllo positivo e 1 µl del retrotrascritto-amplificato del bianco nelle rispettive provette.

**b) Kit di Amplificazione SEMI-NESTED NoV GII usato: MyTaq™ Red Mix Kit.
Ditta: Bioline.**

Composizione del Kit:

- **MyTaq Red Mix (2X):** 4 x 1,25 ml (200 Reactions) o 20 x 1,25 ml (1.000 Reactions).

Master Mix SEMI-NESTED NoV GII

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	9,5 µl
Primer JV12Y-1421-f (Forward)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Primer NoroII-R ^c -1424-r (Reverse)	22 µM	0,88 µM	1 µl
MyTaq Red Mix (2X)	2X	1X	12,5 µl
DNA	/	/	1 µl
Volume Totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 24 µl nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 1 µl di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo SEMI-NESTED NoV GII.

- In una stanza separata caricare 1 μ l di retrotrascritto (cDNA) di ciascun campione, 1 μ l di cDNA del controllo negativo RT-PCR FIRST, 1 μ l di cDNA del controllo positivo e 1 μ l del retrotrascritto-amplificato del bianco nelle rispettive provette.

APPENDICE A1

Preparazione dei primers

Prima di procedere con la preparazione dei primers, compilare foglio di lavoro “*Preparazione Stock Solution Primers*”.

I primers utilizzati per tale procedura sono quelli indicati di seguito.

Primers *Semi-Nested RT-PCR NoV GI*

PRIMERS RT-PCR FIRST	SEQUENZA
JV12Y-1421-f (Forward)	5'-ATACCACTATGATGCAGAYTA-3'
JV13I-1422-r (Reverse)	5'-TCATCATCACCATAGAAIGAG-3'
PRIMERS SEMI-NESTED	SEQUENZA
GI^c-1423-f (Forward)	5'-TCNGAAATGGATGTTGG-3'
JV13I-1422-r (Reverse)	5'-TCATCATCACCATAGAAIGAG-3'

Primers *Semi-Nested RT-PCR NoV GII*

PRIMERS RT-PCR FIRST	SEQUENZA
JV12Y-1421-f (Forward)	5'-ATACCACTATGATGCAGAYTA-3'
JV13I-1422-r (Reverse)	5'-TCATCATCACCATAGAAIGAG-3'
PRIMERS SEMI-NESTED	SEQUENZA
JV12Y-1421-f (Forward)	5'-ATACCACTATGATGCAGAYTA-3'
NoroII-R^c-1424-r (Reverse)	5'-AGCCAGTGGGCGATGGAATTC-3'

Soluzione Stock Madre Primers 100 µM:

I Primers vengono acquistati da ditte specializzate che li inviano nella forma liofilizzata, con allegato un documento indicante:

- Caratteristiche fisico-chimiche.

- Quantità assoluta in μg .
- Numero di nmoli.
- Tipo di purificazione.

Prima del loro impiego essi devono essere opportunamente reidratati con acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di $100 \mu\text{M}$. Per calcolare la quantità di acqua da aggiungere al liofilizzato applicare la seguente formula:

$$\mathbf{N^{\circ} \text{ nmoli ricevute}/100 = \mu\text{l di acqua da aggiungere}}$$

Sulla provetta della Soluzione Stock Madre deve essere indicato il nome del primer e la concentrazione di $100 \mu\text{M}$.

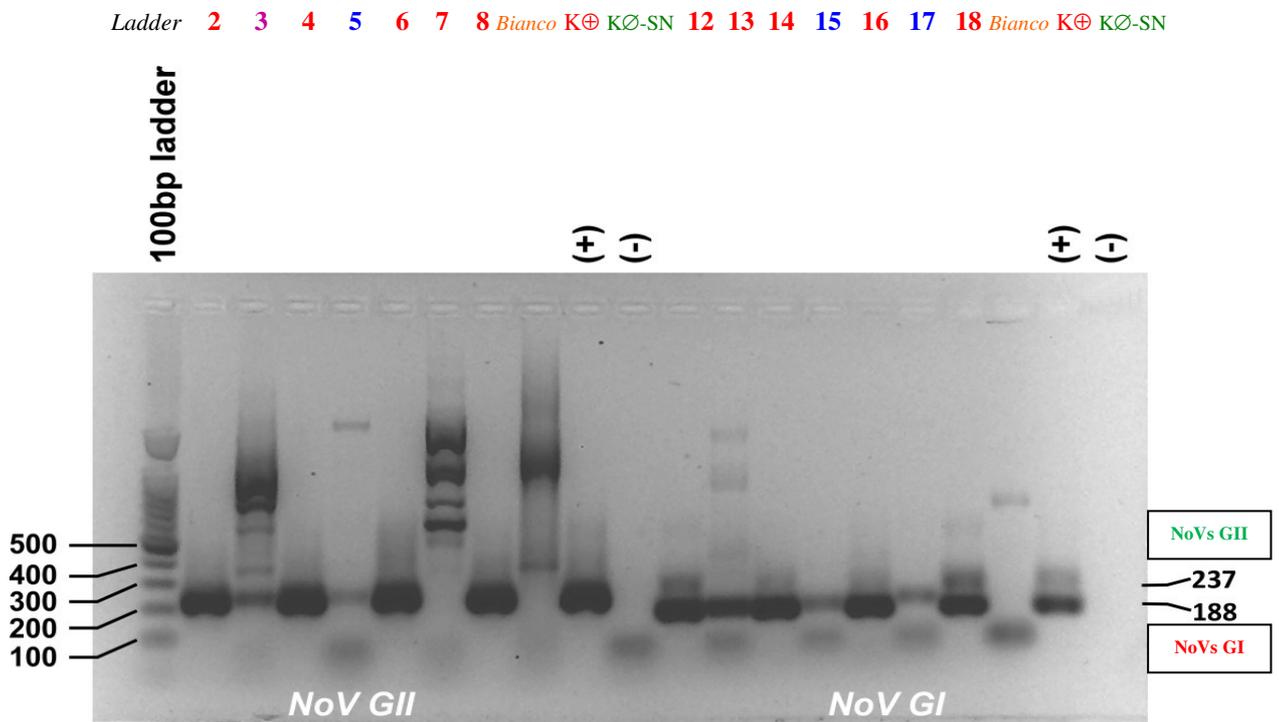
N.B.: La soluzione stock va conservata a $\cong -20^{\circ}\text{C}$ e impiegata come base di partenza per realizzare le Soluzioni di Lavoro $22 \mu\text{M}$. Essa va scongelata solo per il tempo strettamente necessario.

Soluzioni di Lavoro Primers $22 \mu\text{M}$:

- Scongela la Soluzione Stock Madre ($100 \mu\text{M}$) di ciascun primer (JV12Y-1421-f, JV13I-1422-r, GI^c-1423-f, NoroII-R^c-1424-r).
- Preparare un numero opportuno di provette Nuclease free da $0.2 \mu\text{l}$ ed etichettarle rispettivamente con la dicitura “JV12Y-1421-f”, “JV13I-1422-r”, “GI^c-1423-f”, “NoroII-R^c-1424-r”, indicando la concentrazione di $22 \mu\text{M}$.
- Dispensare in ciascuna provetta $78 \mu\text{l}$ di acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free.
- Aggiungere alle corrispondenti provette $22 \mu\text{l}$ di ciascun primer (JV12Y-1421-f, JV13I-1422-r, GI^c-1423-f, NoroII-R^c-1424-r) alla concentrazione di $100 \mu\text{M}$.

APPENDICE B1

Letture di una corsa elettroforetica di Semi-Nested RT-PCR per NoV GI e GII



Semi-Nested RT-PCR NoV GI e NoV GII: Linea 1, Ladder (100 bp); Linea 2, 4, 6 e 8, **campioni positivi NoV GII**; Linea 5, 7, 15 e 17, **campioni negativi** per NoV GI e NoV GII; Linea 12, 13, 14, 16 e 18, **campioni positivi NoV GI**; Linea 3, **campione dubbio da ripetere**; Linea 9 e 19, **Bianco rispettivamente; NoV GI e NoV GII**; Linea 10, **K \oplus NoV GII**; Linea 20, **K \oplus NoV GI**; Linea 11, **K \emptyset Semi-Nested NoV GII**; Linea 21, **K \emptyset Semi-Nested NoV GI**.

3.7.8 NESTED RT-PCR PER LA RICERCA DEL NOV GIV

La presente procedura, messa a punto nel 2014, ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la ricerca dell'RNA del Norovirus (NoV) GIV in campioni biologici (acque, Molluschi Eduli Lamellibranchi) e in lisati di colture cellulari, mediante una RT-PCR *Nested* specifica per il gene che codifica per la **regione di giunzione ORF1/ORF2** del NoV GIV. Può, inoltre, essere impiegata per l'identificazione di ceppi virali isolati.

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

La RT-PCR *Nested* per NoV GIV prevede 1 reazione di Retrotrascrizione e amplificazione a catena della polimerasi One-Step, seguita da 1 reazione di amplificazione a catena della polimerasi, ciascuna con una coppia di primers diversa. La prima RT-PCR **FIRST** viene effettuata con i primers “**1531-f (Forward)**” e “**1532-r (Reverse)**”, la seconda PCR o **NESTED** viene effettuata con i primers “**1698-f (Forward)**” e “**1699-r (Reverse)**”.

Per la **RT-PCR FIRST One-Step** si impiega un apposito kit disponibile in commercio (Bioline - MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit), per la **Nested PCR** si impiega un altro kit commerciale (Bioline - MyTaq™ Red Mix Kit), entrambi contenenti i reagenti necessari per le master mix.

Prima di procedere con la prova di RT-PCR *Nested* per NoV GIV, il campione opportunamente preparato, come descritto al punto 3.5, viene sottoposto ad estrazione dell'RNA come descritto al punto 3.6. Anche il controllo positivo viene opportunamente preparato, procedendo all'estrazione del suo RNA e alla sua diluizione, se necessario, come descritto al punto 3.6.

1 Reazione di Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST

La **RT-PCR FIRST** prevede le seguenti **3 fasi**:

1.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix RT-PCR FIRST One-Step

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "RT-PCR Nested Norovirus (NoV) GIV".

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da retrotrascrivere, del Controllo Positivo (RNA di NoV GIV), del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (acqua Nuclease free) e del Bianco (controllo dell'estrazione).
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix RT-PCR FIRST seguendo le indicazioni del kit di amplificazione in uso, riportate nell'**APPENDICE C1 (a)**.
N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (100 µM e 22 µM) dei primers ("1531-f" e "1532-r") secondo quanto riportato nell'**APPENDICE D1**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (22 µM) di ciascun primer.
- Dispensare la Master Mix RT-PCR FIRST in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE C1 (a)**.
- Aggiungere 2 µl di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (**APPENDICE C1-a**).

1.2 Trasferimento dell'RNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 2 µl di RNA di ciascun campione (**APPENDICE C1-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 2 µl di RNA Controllo Positivo (**APPENDICE C1-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 2 µl di Bianco (**APPENDICE C1-a**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

1.3 Reazione di Retroscrizione-Amplificazione FIRST One-Step dell'RNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “Retroscrizione-Amplificazione FIRST One-Step NoV GIV” (**Tabella 3.16**) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.16. Programma “Retroscrizione-Amplificazione FIRST One-Step NoV GIV”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Retroscrizione	45 min.	+42°C	1
2	Denaturazione	4 min	+95°C	1
3	Denaturazione	30 sec.	+95°C	35
4	Annealing	30 sec.	+54°C	
5	Polimerizzazione	30 sec.	+72°C	
6	Polimerizzazione finale	10 min.	+72°C	1
7	Mantenimento	∞	+4°C	1

2 Reazione di Amplificazione Nested del DNA – Seconda Amplificazione (Nested PCR)

La NESTED PCR prevede le seguenti **3 fasi**:

2.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix NESTED

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "RT-PCR Nested Norovirus (NoV) GIV".

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (cDNA retrotrascritto di NoV GIV), del Controllo Negativo RT-PCR FIRST, del Controllo Negativo NESTED (acqua Nuclease free) e del Bianco.
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix Nested seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE C1 (b)**.

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (100 μ M e 22 μ M) dei primers ("1698-f" e "1699-r") secondo quanto riportato nell'**APPENDICE D1**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (22 μ M) di ciascun primer.

- Dispensare la Master Mix in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE C1 (b)**.
- Aggiungere 1 μ l di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo NESTED (**APPENDICE C1-b**).

2.2 Trasferimento del DNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 μ l di DNA di ciascun campione (**APPENDICE C1-b**).
- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 μ l di DNA del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (**APPENDICE C1-b**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 1 μ l di DNA del Controllo Positivo (**APPENDICE C1-b**).

- Aggiungere nell'apposita provetta 1 µl dell'amplificato del Bianco (**APPENDICE C1-b**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

2.3 Reazione di Amplificazione Nested del cDNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “NESTED NoV GIV” (**Tabella 3.17**) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.17. Programma “NESTED NoV GIV”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Denaturazione	4 min.	+95°C	1
2	Denaturazione	30 sec.	+95°C	35
3	Annealing	30 sec.	+55°C	
4	Polimerizzazione	30 sec.	+72°C	
5	Polimerizzazione finale	10 min.	+72°C	1
6	Mantenimento	∞	+4°C	1

3 Rivelazione del prodotto di amplificazione

Elettroforesi

- Allestire il gel di agarosio al 2% (**APPENDICE H**) con un numero di pozzetti uguale al numero complessivo degli amplificati (campioni in esame, Bianco, Controllo Negativo RT-PCR FIRST, Controllo Negativo NESTED, Controllo Positivo) più un pozzetto per il Ladder.
N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà preso in considerazione nell'allestire il gel.
- Posizionare il gel nella cella elettroforetica in modo che sia completamente ricoperto da TBE 1X (**APPENDICE H**).
- Dispensare in una micropiastra a 96 pozzetti con fondo ad U 10 µl di ogni amplificato e aggiungere 2 µl di loading buffer.

- Preparare la “miscela Ladder” mescolando: 2 μ l di Ladder 50/100 bp, 3 μ l di loading buffer e 9 μ l di TBE.
N.B.: si può impiegare anche un ladder già colorato (per l’utilizzo seguire le istruzioni del produttore).
- Caricare nei pozzetti del gel 10 μ l di ciascun amplificato preparato con il loading buffer (un amplificato per pozzetto), disponendoli da sinistra verso destra nel seguente ordine: campioni, Bianco, Controllo Negativo RT-PCR FIRST, Controllo Negativo NESTED, Ladder, Controllo Positivo.
N.B.: se si utilizza un ordine diverso nel disporre i campioni ed i controlli, indicarlo nel foglio di lavoro e/o nel file della corsa elettroforetica.
N.B.B: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà presente nel foglio di lavoro.
- Caricare in un pozzetto del gel 10 μ l della “miscela Ladder” preparata o 7 μ l del Ladder già colorato.
- Applicare alla cella elettroforetica una corrente di circa 120 V (nel caso in cui si utilizza un gel grande) o di circa 100 V (nel caso in cui si utilizza un gel piccolo).
- Interrompere la corsa elettroforetica quando il loading buffer ha percorso almeno 5 cm. (in genere sono sufficienti 45 min. circa).
- Porre il gel sul transilluminatore a raggi UV ed analizzare l’immagine; si può quindi procedere alla sua acquisizione.
- Riportare l’esito della prova nell’apposito foglio di lavoro “*RT-PCR Nested Norovirus (NoV) GIV*”.

RACCOLTA ED ELABORAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati viene effettuata verificando la presenza/assenza di una banda elettroforetica derivante dal frammento di DNA prodotto dall’amplificazione. La dimensione di tale banda viene determinata confrontandola con il Ladder (**APPENDICE E1**).

La prova è considerata valida se:

- il controllo positivo dà una banda di **323 bp** alla NESTED (**APPENDICE E1**).

N.B.: la banda attesa del controllo positivo alla RT-PCR FIRST è di 995 bp.

- il controllo negativo non presenta nessuna banda (**APPENDICE E1**).

I campioni sono considerati **positivi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, si evince la presenza di una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo NESTED (323 bp).

I campioni sono considerati **negativi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, non presentano una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo (323 bp).

Nel caso in cui il risultato sia di incerta interpretazione è bene ripetere la prova a partire dalla Retrotrascrizione-Amplificazione One-Step (punto 1). Se il problema si ripresenta, ripartire dall'estrazione del campione (punto 3.6).

I campioni positivi possono essere sottoposti ad analisi di sequenza utilizzando gli stessi primers indicati nella presente procedura e le sequenze confrontate con quelle depositate in banche dati internazionali.

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- Metodica allegata al kit Bioline - MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit. ⁽²⁷³⁾
- Metodica allegata al kit Bioline - MyTaq™ Red Mix Kit. ⁽²⁷⁴⁾
- **Muscillo M., Fratini M., Graffeo R., Sanguinetti M., Martella V., Green K.Y., Della Libera S., La Rosa G. (2013). GIV Noroviruses in Wastewaters and in Stool Specimens from Hospitalized Patients. *Food Environ Virol.*, 5: 194–202. DOI 10.1007/s12560-013-9121-5 ⁽²⁸⁶⁾**

APPENDICE C1

La preparazione delle Master Mix per la Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step PCR (a) e la NESTED PCR (b) deve essere effettuata in un'area appositamente dedicata.

**a) Kit di Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step usato: MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit.
Ditta: Bioline.**

Composizione del Kit:

- **MyTaq One-Step Mix (2X):** 625 µl (25 Reactions) o 2 x 1,25 ml (100 Reactions).
- **RiboSafe RNase Inhibitor (10 U/µl):** 25 µl (25 Reactions) o 100 µl (100 Reactions).
- **Reverse Transcriptase:** 12,5 µl (25 Reactions) o 50 µl (100 Reactions).
- **DEPC-treated Water:** 1,8 ml.

Master Mix Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	7,75 µl
MyTaq One-Step Mix (2X)	2X	1X	12,5 µl
Primer 1531-f (Forward)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Primer 1532-r (Reverse)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Reverse Transcriptase	/	/	0,25 µl
RiboSafe RNase Inhibitor (10 U/µl)	10 U/µl	0,5 U/µl	0,5 µl
RNA	/	/	2 µl
Volume totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una o più provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo e del controllo negativo RT-PCR FIRST.

- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 23 μ l nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 2 μ l di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo RT-PCR FIRST.
- In una stanza separata caricare 2 μ l di RNA di ciascun campione, 2 μ l di RNA del controllo positivo e 2 μ l di bianco nelle rispettive provette.

b) Kit di Amplificazione NESTED usato: MyTaq™ Red Mix Kit.
Ditta: Bioline.

Composizione del Kit:

- **MyTaq Red Mix (2X):** 4 x 1,25 ml (200 Reactions) o 20 x 1,25 ml (1.000 Reactions).

Master Mix NESTED

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	9,5 µl
Primer 1698-f (Forward)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Primer 1699-r (Reverse)	22 µM	0,88 µM	1 µl
MyTaq Red Mix (2X)	2X	1X	12,5 µl
DNA	/	/	1 µl
Volume Totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 24 µl nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 1 µl di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo NESTED.
- In una stanza separata caricare 1 µl di retrotrascritto (cDNA) di ciascun campione, 1 µl di cDNA del controllo negativo RT-PCR FIRST, 1 µl di cDNA del controllo positivo e 1 µl del r retrotrascritto-amplificato del bianco nelle rispettive provette.

APPENDICE D1

Preparazione dei primers

Prima di procedere con la preparazione dei primers, compilare foglio di lavoro “*Preparazione Stock Solution Primers*”.

I primers utilizzati per tale procedura sono quelli indicati di seguito.

Primers *Nested RT-PCR NoV GIV*

PRIMERS RT-PCR FIRST	SEQUENZA
1531-f (Forward)	5'-GCACTCGGCATCATGACAAAATTCA-3'
1532-r (Reverse)	5'-GTTTGGGTCCCAATTCCAA-3'
PRIMERS NESTED	SEQUENZA
1698-f (Forward)	5'-GTACTGGACCAAGGGCCCGA-3'
1699-r (Reverse)	5'-GAGGTTGCCCGCACCATCCG-3'

Soluzione Stock Madre Primers 100 μ M:

I Primers vengono acquistati da ditte specializzate che li inviano nella forma liofilizzata, con allegato un documento indicante:

- Caratteristiche fisico-chimiche.
- Quantità assoluta in μ g.
- Numero di nmoli.
- Tipo di purificazione.

Prima del loro, impiego essi devono essere opportunamente reidratati con acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 100 μ M. Per calcolare la quantità di acqua da aggiungere al liofilizzato applicare la seguente formula:

$$\mathbf{N^{\circ} \text{ nmoli ricevute}/100 = \mu\text{l di acqua da aggiungere}}$$

Sulla provetta della Soluzione Stock Madre deve essere indicato il nome del primer e la concentrazione di 100 μM .

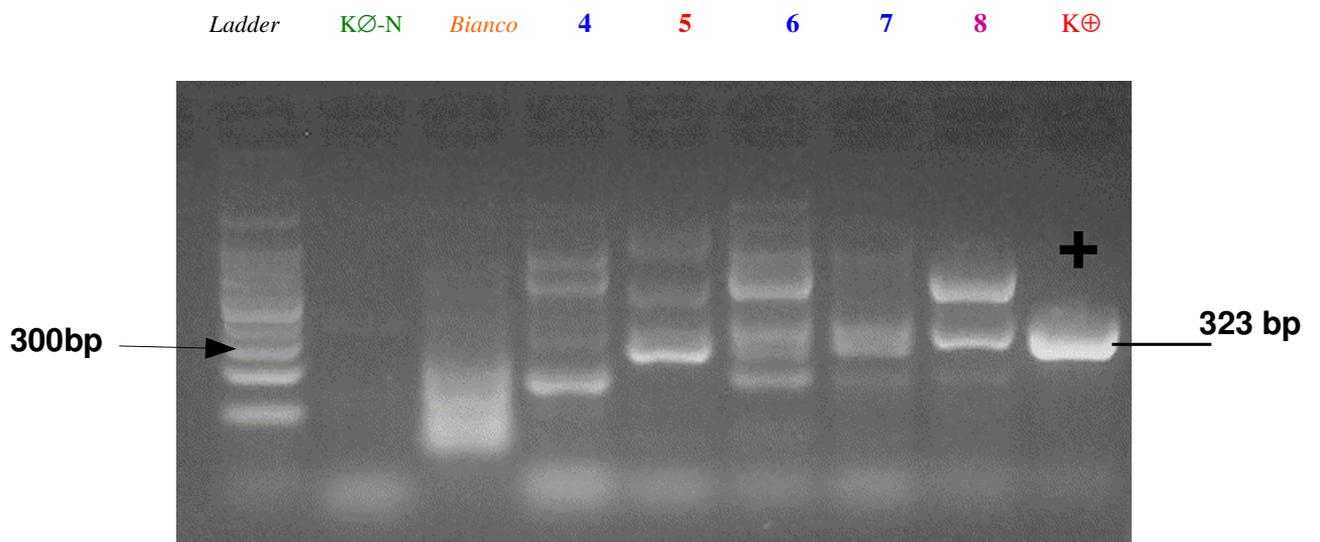
N.B.: La soluzione stock va conservata a $\cong -20^{\circ}\text{C}$ e impiegata come base di partenza per realizzare la Soluzioni di Lavoro 22 μM . Essa va scongelata solo per il tempo strettamente necessario.

Soluzioni di Lavoro Primers 22 μM :

- Scongela la Soluzione Stock Madre (100 μM) di ciascun primer (1531-f, 1532-r, 1698-f, 1699-r).
- Preparare un numero opportuno di provette Nuclease free da 0.2 μl ed etichettarle rispettivamente con la dicitura “**1531-f**”, “**1532-r**”, “**1698-f**”, “**1699-r**”, indicando la concentrazione di 22 μM .
- Dispensare in ciascuna provetta 78 μl di acqua acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free.
- Aggiungere alle corrispondenti provette 22 μl di ciascun primer (1531-f, 1532-r, 1698-f, 1699-r) alla concentrazione di 100 μM .

APPENDICE E1

Letture di una corsa elettroforetica di Nested RT-PCR per NoV GIV



Nested RT-PCR NoV GIV: Linea 1, Ladder (100 bp); Linea 2, KØ Nested; Linea 3, Bianco; Linea 4, 6 e 7, campioni negativi; Linea 5, campione positivo; Linea 8, campione dubbio da ripetere; Linea 9, K⊕.

3.7.9 NESTED RT-PCR PER LA RICERCA DEGLI ENTEROVIRUS

La presente procedura, messa a punto nel 2014, ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la ricerca dell'RNA degli Enterovirus in campioni biologici (acque, Molluschi Eduli Lamellibranchi) e in lisati di colture cellulari, mediante una RT-PCR *Nested* specifica per il gene che codifica per la **regione non codificante 5'NTR**. Può, inoltre, essere impiegata per l'identificazione di ceppi virali isolati.

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

La RT-PCR *Nested* per Enterovirus prevede 1 reazione di Retrotrascrizione e amplificazione a catena della polimerasi One-Step, seguita da 1 reazione di amplificazione a catena della polimerasi, ciascuna con una coppia di primers diversa. La prima RT-PCR FIRST viene effettuata con i primers “**Ent 1-1246 (Forward)**” e “**Ent 2-1247 (Reverse)**”, la seconda PCR o NESTED viene effettuata con i primers “**neEnt 1-1248 (Forward)**” e “**neEnt 2-1249 (Reverse)**”.

Per la **RT-PCR FIRST One-Step** si impiega un apposito kit disponibile in commercio (Bioline - MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit), per la **Nested PCR** si impiega un altro kit commerciale (Bioline - MyTaq™ Red Mix Kit), entrambi contenenti i reagenti necessari per le master mix.

Prima di procedere con la prova di RT-PCR *Nested* per Enterovirus, il campione opportunamente preparato, come descritto al punto 3.5, viene sottoposto ad estrazione dell'RNA come descritto al punto 3.6. Anche il controllo positivo viene opportunamente preparato, procedendo all'estrazione del suo RNA e alla sua diluizione, se necessario, come descritto al punto 3.6.

1 Reazione di Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST

La **RT-PCR FIRST** prevede le seguenti **3 fasi**:

1.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix RT-PCR FIRST One-Step

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "*RT-PCR Nested Enterovirus*".

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da retrotrascrivere, del Controllo Positivo (RNA di Echovirus 30), del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (acqua Nuclease free) e del Bianco (controllo dell'estrazione).
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix RT-PCR FIRST seguendo le indicazioni del kit di amplificazione in uso, riportate nell'**APPENDICE F1** (a).
N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (100 μ M e 22 μ M) dei primers ("Ent 1-1246" e "Ent 2-1247") secondo quanto riportato nell'**APPENDICE G1**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (22 μ M) di ciascun primer.
- Dispensare la Master Mix RT-PCR FIRST in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE F1** (a).
- Aggiungere 2 μ l di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (**APPENDICE F1-a**).

1.2 Trasferimento dell'RNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 2 µl di RNA di ciascun campione (**APPENDICE F1-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 2 µl di RNA Controllo Positivo (**APPENDICE F1-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 2 µl di Bianco (**APPENDICE F1-a**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

1.3 Reazione di Retroscrizione-Amplificazione FIRST One-Step dell'RNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “Retroscrizione-Amplificazione FIRST One-Step Enterovirus” (**Tabella 3.18**) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.18. Programma “Retroscrizione-Amplificazione FIRST One-Step Enterovirus”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Retroscrizione	45 min.	+42°C	1
2	Denaturazione	4 min	+95°C	1
3	Denaturazione	30 sec.	+95°C	35
4	Annealing	30 sec.	+55°C	
5	Polimerizzazione	30 sec.	+72°C	
6	Polimerizzazione finale	10 min.	+72°C	1
7	Mantenimento	∞	+4°C	1

2 Reazione di Amplificazione Nested del DNA – Seconda Amplificazione (Nested PCR)

La NESTED PCR prevede le seguenti **3 fasi**:

2.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix NESTED

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "RT-PCR Nested Enterovirus".

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (cDNA retrotrascritto di Echovirus 30), del Controllo Negativo RT-PCR FIRST, del Controllo Negativo NESTED (acqua Nuclease free) e del Bianco.
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix Nested seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE F1 (b)**.

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (100 μ M e 22 μ M) dei primers ("neEnt 1-1248" e "neEnt 2-1249") secondo quanto riportato nell'**APPENDICE G1**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (22 μ M) di ciascun primer.

- Dispensare la Master Mix in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE F1 (b)**.
- Aggiungere 1 μ l di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo NESTED (**APPENDICE F1-b**).

2.2 Trasferimento del DNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 μ l di DNA di ciascun campione (**APPENDICE F1-b**).
- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 μ l di DNA del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (**APPENDICE F1-b**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 1 μ l di DNA del Controllo Positivo (**APPENDICE F1-b**).

- Aggiungere nell'apposita provetta 1 µl dell'amplificato del Bianco (**APPENDICE F1-b**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

2.3 Reazione di Amplificazione Nested del cDNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “NESTED Enterovirus” (**Tabella 3.19**) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.19. Programma “NESTED Enterovirus”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Denaturazione	4 min.	+95°C	1
2	Denaturazione	30 sec.	+95°C	35
3	Annealing	30 sec.	+55°C	
4	Polimerizzazione	30 sec.	+72°C	
5	Polimerizzazione finale	10 min.	+72°C	1
6	Mantenimento	∞	+4°C	1

3 Rivelazione del prodotto di amplificazione

Elettroforesi

- Allestire il gel di agarosio al 2% (**APPENDICE H**) con un numero di pozzetti uguale al numero complessivo degli amplificati (campioni in esame, Bianco, Controllo Negativo RT-PCR FIRST, Controllo Negativo NESTED, Controllo Positivo) più un pozzetto per il Ladder.
N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà preso in considerazione nell'allestire il gel.
- Posizionare il gel nella cella elettroforetica in modo che sia completamente ricoperto da TBE 1X (**APPENDICE H**).
- Dispensare in una micropiastra a 96 pozzetti con fondo ad U 10 µl di ogni amplificato e aggiungere 2 µl di loading buffer.

- Preparare la “miscela Ladder” mescolando: 2 µl di Ladder 50/100 bp, 3 µl di loading buffer e 9 µl di TBE.
N.B.: si può impiegare anche un ladder già colorato (per l’utilizzo seguire le istruzioni del produttore).
- Caricare nei pozzetti del gel 10 µl di ciascun amplificato preparato con il loading buffer (un amplificato per pozzetto), disponendoli da sinistra verso destra nel seguente ordine: campioni, Bianco, Controllo Negativo RT-PCR FIRST, Controllo Negativo NESTED, Ladder, Controllo Positivo.
N.B.: se si utilizza un ordine diverso nel disporre i campioni ed i controlli, indicarlo nel foglio di lavoro e/o nel file della corsa elettroforetica.
N.B.B: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà presente nel foglio di lavoro.
- Caricare in un pozzetto del gel 10 µl della “miscela Ladder” preparata o 7 µl del Ladder già colorato.
- Applicare alla cella elettroforetica una corrente di circa 120 V (nel caso in cui si utilizza un gel grande) o di circa 100 V (nel caso in cui si utilizza un gel piccolo).
- Interrompere la corsa elettroforetica quando il loading buffer ha percorso almeno 5 cm. (in genere sono sufficienti 45 min. circa).
- Porre il gel sul transilluminatore a raggi UV ed analizzare l’immagine; si può quindi procedere alla sua acquisizione.
- Riportare l’esito della prova nell’apposito foglio di lavoro “*RT-PCR Nested Enterovirus*”.

RACCOLTA ED ELABORAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati viene effettuata verificando la presenza/assenza di una banda elettroforetica derivante dal frammento di DNA prodotto dall’amplificazione. La dimensione di tale banda viene determinata confrontandola con il Ladder (**APPENDICE H1**).

La prova è considerata valida se:

- il controllo positivo dà una banda di **117-123 bp** alla NESTED (**APPENDICE H1**).

N.B.: la banda attesa del controllo positivo alla RT-PCR FIRST è di 540 bp.

- il controllo negativo non presenta nessuna banda (**APPENDICE H1**).

I campioni sono considerati **positivi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, si evince la presenza di una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo NESTED (117-123 bp).

I campioni sono considerati **negativi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, non presentano una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo (117-123 bp).

Nel caso in cui il risultato sia di incerta interpretazione è bene ripetere la prova a partire dalla Retrotrascrizione-Amplificazione One-Step (punto 1). Se il problema si ripresenta, ripartire dall'estrazione del campione (punto 3.6).

I campioni positivi possono essere sottoposti ad analisi di sequenza utilizzando gli stessi primers indicati nella presente procedura e le sequenze confrontate con quelle depositate in banche dati internazionali.

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- Metodica allegata al kit Bioline - MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit. ⁽²⁷³⁾
- Metodica allegata al kit Bioline - MyTaq™ Red Mix Kit. ⁽²⁷⁴⁾
- **Pina S., Puig M., Lucena F., Jofre J., Girones R. (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(9): 3376-82.**
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106735/> ⁽³¹⁶⁾

APPENDICE F1

La preparazione delle Master Mix per la Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step PCR (a) e la NESTED PCR (b) deve essere effettuata in un'area appositamente dedicata.

**a) Kit di Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step usato: MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit.
Ditta: Bioline.**

Composizione del Kit:

- **MyTaq One-Step Mix (2X):** 625 µl (25 Reactions) o 2 x 1,25 ml (100 Reactions).
- **RiboSafe RNase Inhibitor (10 U/µl):** 25 µl (25 Reactions) o 100 µl (100 Reactions).
- **Reverse Transcriptase:** 12,5 µl (25 Reactions) o 50 µl (100 Reactions).
- **DEPC-treated Water:** 1,8 ml.

Master Mix Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	7,75 µl
MyTaq One-Step Mix (2X)	2X	1X	12,5 µl
Primer Ent 1-1246 (Forward)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Primer Ent 2-1247 (Reverse)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Reverse Transcriptase	/	/	0,25 µl
RiboSafe RNase Inhibitor (10 U/µl)	10 U/µl	0.5 U/µl	0,5 µl
RNA	/	/	2 µl
Volume totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una o più provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo e del controllo negativo RT-PCR FIRST.

- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 23 μ l nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 2 μ l di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo RT-PCR FIRST.
- In una stanza separata caricare 2 μ l di RNA di ciascun campione, 2 μ l di RNA del controllo positivo e 2 μ l di bianco nelle rispettive provette.

b) Kit di Amplificazione NESTED usato: MyTaq™ Red Mix Kit.
Ditta: Bioline.

Composizione del Kit:

- **MyTaq Red Mix (2X):** 4 x 1,25 ml (200 Reactions) o 20 x 1,25 ml (1.000 Reactions).

Master Mix NESTED

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	9,5 µl
Primer neEnt 1-1248 (Forward)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Primer neEnt 2-1249 (Reverse)	22 µM	0,88 µM	1 µl
MyTaq Red Mix (2X)	2X	1X	12,5 µl
DNA	/	/	1 µl
Volume Totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 24 µl nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 1 µl di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo NESTED.
- In una stanza separata caricare 1 µl di retrotrascritto (cDNA) di ciascun campione, 1 µl di cDNA del controllo negativo RT-PCR FIRST, 1 µl di cDNA del controllo positivo e 1 µl del retrotrascritto-amplificato del bianco nelle rispettive provette.

APPENDICE G1

Preparazione dei primers

Prima di procedere con la preparazione dei primers, compilare foglio di lavoro “*Preparazione Stock Solution Primers*”.

I primers utilizzati per tale procedura sono quelli indicati di seguito.

Primers *Nested RT-PCR Enterovirus*

PRIMERS RT-PCR FIRST	SEQUENZA
Ent 1-1246 (Forward)	5'-CGGTACCTTTGTACGCCTGT-3'
Ent 2-1247 (Reverse)	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'
PRIMERS NESTED	SEQUENZA
neEnt 1-1248 (Forward)	5'-TCCGGCCCCTGAATGCGGCTA-3'
neEnt 2-1249 (Reverse)	5'-GAAACACGGACACCCAAAGTA-3'

Soluzione Stock Madre Primers 100 μ M:

I Primers vengono acquistati da ditte specializzate che li inviano nella forma liofilizzata, con allegato un documento indicante:

- Caratteristiche fisico-chimiche.
- Quantità assoluta in μ g.
- Numero di nmoli.
- Tipo di purificazione.

Prima del loro, impiego essi devono essere opportunamente reidratati con acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 100 μ M. Per calcolare la quantità di acqua da aggiungere al liofilizzato applicare la seguente formula:

$$\mathbf{N^{\circ} \text{ nmoli ricevute}/100 = \mu\text{l di acqua da aggiungere}}$$

Sulla provetta della Soluzione Stock Madre deve essere indicato il nome del primer e la concentrazione di 100 μM .

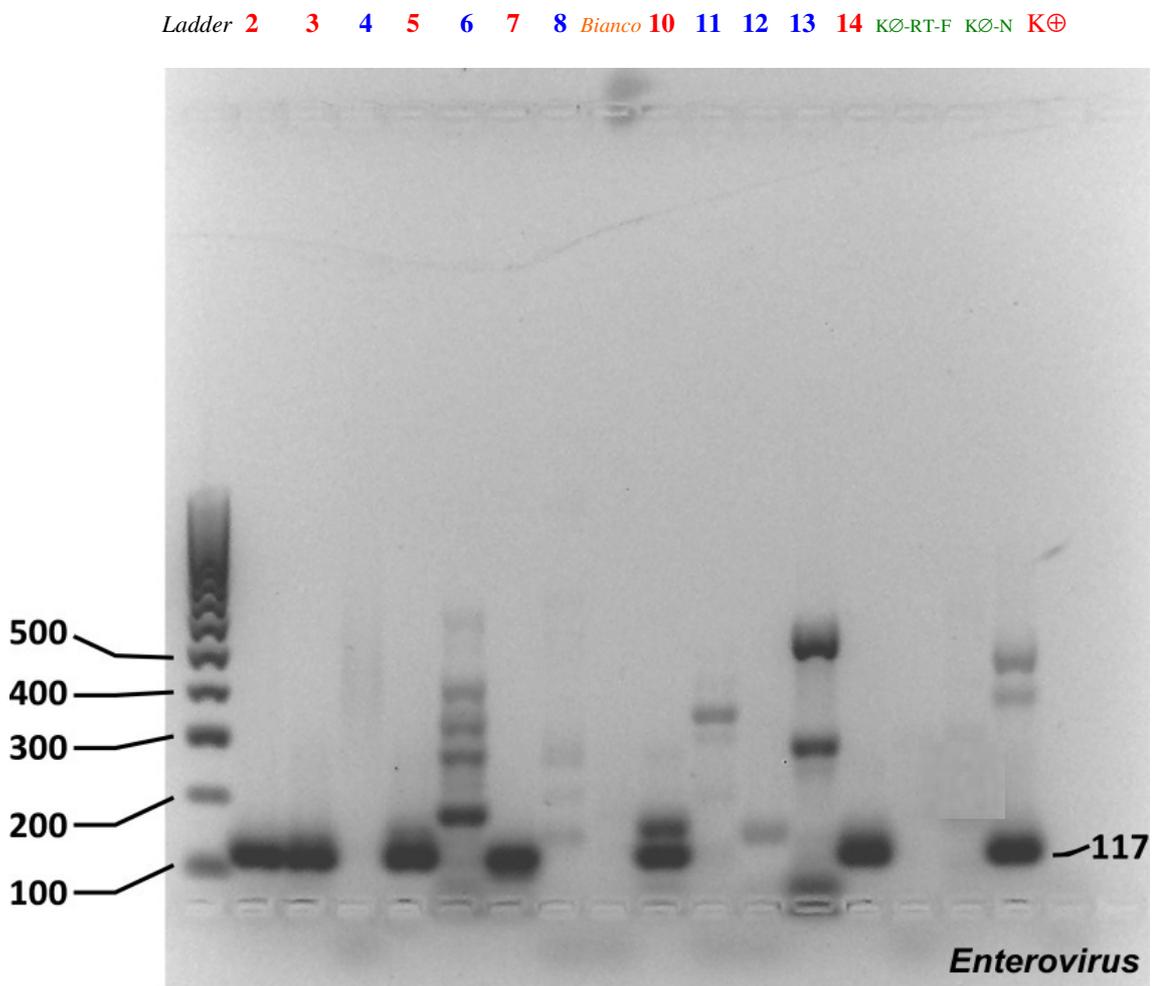
N.B.: La soluzione stock va conservata a $\cong -20^{\circ}\text{C}$ e impiegata come base di partenza per realizzare la Soluzioni di Lavoro 22 μM . Essa va scongelata solo per il tempo strettamente necessario.

Soluzioni di Lavoro Primers 22 μM :

- Scongela la Soluzione Stock Madre (100 μM) di ciascun primer (Ent 1-1246, Ent 2-1247, neEnt 1-1248, neEnt 2-1249).
- Preparare un numero opportuno di provette Nuclease free da 0.2 μl ed etichettarle rispettivamente con la dicitura “**Ent 1-1246**”, “**Ent 2-1247**”, “**neEnt 1-1248**”, “**neEnt 2-1249**”, indicando la concentrazione di 22 μM .
- Dispensare in ciascuna provetta 78 μl di acqua acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free.
- Aggiungere alle corrispondenti provette 22 μl di ciascun primer (Ent 1-1246, Ent 2-1247, neEnt 1-1248, neEnt 2-1249) alla concentrazione di 100 μM .

APPENDICE H1

Letture di una corsa elettroforetica di Nested RT-PCR per Enterovirus



Nested RT-PCR Enterovirus: Linea 1, Ladder (100 bp); Linea 2, 3, 5, 7, 10 e 14, **campioni positivi**; Linea 4, 6, 8, 11, 12 e 13, **campioni negativi**; Linea 9, **Bianco**; Linea 15, **KØ RT-PCR FIRST (F)**; Linea 16, **KØNested**; Linea 17, **K⊕**.

3.7.10 NESTED RT-PCR PER LA RICERCA DELL'HEV

La presente procedura, messa a punto nel 2014, ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la ricerca dell'RNA del virus responsabile dell'epatite E (HEV) in campioni biologici (acque, Molluschi Eduli Lamellibranchi) e in lisati di colture cellulari, mediante una RT-PCR *Nested* specifica per la **ORF1 virale**. Può, inoltre, essere impiegata per l'identificazione di ceppi virali isolati.

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

La RT-PCR *Nested* per HEV prevede 1 reazione di Retrotrascrizione e amplificazione a catena della polimerasi One-Step, seguita da 1 reazione di amplificazione a catena della polimerasi, ciascuna con una coppia di primers diversa. La prima RT-PCR FIRST viene effettuata con i primers “**ORF1F-1679-f (Forward)**” e “**ORF1R-1680-r (Reverse)**”, la seconda PCR o NESTED viene effettuata con i primers “**ORF1FN-1681-f (Forward)**” e “**ORF1RN-1682-r (Reverse)**”.

Per la **RT-PCR FIRST One-Step** si impiega un apposito kit disponibile in commercio (Bioline - MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit), per la **Nested PCR** si impiega un altro kit commerciale (Bioline - MyTaq™ Red Mix Kit), entrambi contenenti i reagenti necessari per le master mix.

Prima di procedere con la prova di RT-PCR Nested per HEV, il campione opportunamente preparato, come descritto al punto 3.5, viene sottoposto ad estrazione dell'RNA come descritto al punto 3.6. Anche il controllo positivo viene opportunamente preparato, procedendo all'estrazione del suo RNA e alla sua diluizione, se necessario, come descritto al punto 3.6.

1 Reazione di Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST

La **RT-PCR FIRST** prevede le seguenti **3 fasi**:

1.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix RT-PCR FIRST One-Step

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro "*RT-PCR Nested Virus Epatite E (HEV)*".

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da retrotrascrivere, del Controllo Positivo (RNA di HEV), del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (acqua Nuclease free) e del Bianco (controllo dell'estrazione).
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix RT-PCR FIRST seguendo le indicazioni del kit di amplificazione in uso, riportate nell'**APPENDICE I1** (a).
N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (100 μ M e 22 μ M) dei primers ("ORF1F-1679-f" e "ORF1R-1680-r") secondo quanto riportato nell'**APPENDICE J1**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (22 μ M) di ciascun primer.
- Dispensare la Master Mix RT-PCR FIRST in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE I1** (a).
- Aggiungere 2 μ l di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (**APPENDICE I1-a**).

1.2 Trasferimento dell'RNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 2 µl di RNA di ciascun campione (**APPENDICE I1-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 2 µl di RNA Controllo Positivo (**APPENDICE I1-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 2 µl di Bianco (**APPENDICE I1-a**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

1.3 Reazione di Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step dell'RNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “Retroscrizione-Amplificazione FIRST One-Step HEV” (*Tabella 3.20*) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.20. Programma “Retroscrizione-Amplificazione FIRST One-Step HEV”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Retrotrascrizione	45 min.	+42°C	1
2	Denaturazione	4 min	+95°C	1
3	Denaturazione	30 sec.	+95°C	35
4	Annealing	30 sec.	+55°C	
5	Polimerizzazione	30 sec.	+72°C	
6	Polimerizzazione finale	10 min.	+72°C	1
7	Mantenimento	∞	+4°C	1

2 Reazione di Amplificazione Nested del DNA – Seconda Amplificazione (Nested PCR)

La **NESTED** PCR prevede le seguenti **3 fasi**:

2.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix NESTED

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro “*RT-PCR Nested Virus Epatite E (HEV)*”.

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (cDNA retrotrascritto di HEV), del Controllo Negativo RT-PCR FIRST, del Controllo Negativo NESTED (acqua Nuclease free) e del Bianco.
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix Nested seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE I1** (b).

N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (100 μ M e 22 μ M) dei primers (“ORF1FN-1681-f” e “ORF1RN-1682-r”) secondo quanto riportato nell'**APPENDICE J1**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (22 μ M) di ciascun primer.

- Dispensare la Master Mix in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE I1** (b).
- Aggiungere 1 μ l di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo NESTED (**APPENDICE I1-b**).

2.2 Trasferimento del DNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 μ l di DNA di ciascun campione (**APPENDICE I1-b**).
- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 μ l di DNA del Controllo Negativo RT-PCR FIRST (**APPENDICE I1-b**).

- Aggiungere nell'apposita provetta 1 µl di DNA del Controllo Positivo (**APPENDICE II-b**).
 - Aggiungere nell'apposita provetta 1 µl dell'amplificato del Bianco (**APPENDICE II-b**).
- N.B.:* qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

2.3 Reazione di Amplificazione Nested del cDNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “NESTED HEV” (*Tabella 3.21*) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.21. Programma “NESTED HEV”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Denaturazione	4 min.	+95°C	1
2	Denaturazione	30 sec.	+95°C	35
3	Annealing	30 sec.	+55°C	
4	Polimerizzazione	30 sec.	+72°C	
5	Polimerizzazione finale	10 min.	+72°C	1
6	Mantenimento	∞	+4°C	1

3 Rivelazione del prodotto di amplificazione

Elettroforesi

- Allestire il gel di agarosio al 2% (**APPENDICE H**) con un numero di pozzetti uguale al numero complessivo degli amplificati (campioni in esame, Bianco, Controllo Negativo RT-PCR FIRST, Controllo Negativo NESTED, Controllo Positivo) più un pozzetto per il Ladder.
- N.B.:* qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà preso in considerazione nell'allestire il gel.
- Posizionare il gel nella cella elettroforetica in modo che sia completamente ricoperto da TBE 1X (**APPENDICE H**).

- Dispensare in una micropiastra a 96 pozzetti con fondo ad U 10 μ l di ogni amplificato e aggiungere 2 μ l di loading buffer.
- Preparare la “miscela Ladder” mescolando: 2 μ l di Ladder 50/100 bp, 3 μ l di loading buffer e 9 μ l di TBE.
N.B.: si può impiegare anche un ladder già colorato (per l’utilizzo seguire le istruzioni del produttore).
- Caricare nei pozzetti del gel 10 μ l di ciascun amplificato preparato con il loading buffer (un amplificato per pozzetto), disponendoli da sinistra verso destra nel seguente ordine: campioni, Bianco, Controllo Negativo RT-PCR FIRST, Controllo Negativo NESTED, Ladder, Controllo Positivo.
N.B.: se si utilizza un ordine diverso nel disporre i campioni ed i controlli, indicarlo nel foglio di lavoro e/o nel file della corsa elettroforetica.
N.B.B: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà presente nel foglio di lavoro.
- Caricare in un pozzetto del gel 10 μ l della “miscela Ladder” preparata o 7 μ l del Ladder già colorato.
- Applicare alla cella elettroforetica una corrente di circa 120 V (nel caso in cui si utilizza un gel grande) o di circa 100 V (nel caso in cui si utilizza un gel piccolo).
- Interrompere la corsa elettroforetica quando il loading buffer ha percorso almeno 5 cm. (in genere sono sufficienti 45 min. circa).
- Porre il gel sul transilluminatore a raggi UV ed analizzare l’immagine; si può quindi procedere alla sua acquisizione.
- Riportare l’esito della prova nell’apposito foglio di lavoro “*RT-PCR Nested Virus Epatite E (HEV)*”.

RACCOLTA ED ELABORAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati viene effettuata verificando la presenza/assenza di una banda elettroforetica derivante dal frammento di DNA prodotto

dall'amplificazione. La dimensione di tale banda viene determinata confrontandola con il Ladder (**APPENDICE K1**).

La prova è considerata valida se:

- il controllo positivo dà una banda di **172 bp** alla NESTED (**APPENDICE K1**).

N.B.: la banda attesa del controllo positivo alla RT-PCR FIRST è di 348 bp.

- il controllo negativo non presenta nessuna banda (**APPENDICE K1**).

I campioni sono considerati **positivi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, si evince la presenza di una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo NESTED (172 bp).

I campioni sono considerati **negativi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, non presentano una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo (172 bp).

Nel caso in cui il risultato sia di incerta interpretazione è bene ripetere la prova a partire dalla Retrotrascrizione-Amplificazione One-Step (punto 1). Se il problema si ripresenta, ripartire dall'estrazione del campione (punto 3.6).

I campioni positivi possono essere sottoposti ad analisi di sequenza utilizzando gli stessi primers indicati nella presente procedura e le sequenze confrontate con quelle depositate in banche dati internazionali.

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- **Fogeda M., Avellò A., Cilla C.G., Echevarria J.M. (2009). Imported and Autochthonous Hepatitis E Virus Strains in Spain. *Journal of Medical Virology* 81: 1743–1749.** ⁽¹²¹⁾
- Metodica allegata al kit Bioline - MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit. ⁽²⁷³⁾
- Metodica allegata al kit Bioline - MyTaq™ Red Mix Kit. ⁽²⁷⁴⁾

APPENDICE II

La preparazione delle Master Mix per la Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step PCR (a) e la NESTED PCR (b) deve essere effettuata in un'area appositamente dedicata.

a) Kit di Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step usato: MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit.
Ditta: Bioline.

Composizione del Kit:

- **MyTaq One-Step Mix (2X):** 625 µl (25 Reactions) o 2 x 1,25 ml (100 Reactions).
- **RiboSafe RNase Inhibitor (10 U/µl):** 25 µl (25 Reactions) o 100 µl (100 Reactions).
- **Reverse Transcriptase:** 12,5 µl (25 Reactions) o 50 µl (100 Reactions).
- **DEPC-treated Water:** 1,8 ml.

Master Mix Retrotrascrizione-Amplificazione FIRST One-Step

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	7,75 µl
MyTaq One-Step Mix (2X)	2X	1X	12,5 µl
Primer ORF1F-1679-f (Forward)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Primer ORF1R-1680-r (Reverse)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Reverse Transcriptase	/	/	0,25 µl
RiboSafe RNase Inhibitor (10 U/µl)	10 U/µl	0.5 U/µl	0,5 µl
RNA	/	/	2 µl
Volume totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una o più provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo e del controllo negativo RT-PCR FIRST.

- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 23 μ l nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 2 μ l di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo RT-PCR FIRST.
- In una stanza separata caricare 2 μ l di RNA di ciascun campione, 2 μ l di RNA del controllo positivo e 2 μ l di bianco nelle rispettive provette.

b) Kit di Amplificazione NESTED usato: MyTaq™ Red Mix Kit.
Ditta: Bioline.

Composizione del Kit:

- **MyTaq Red Mix (2X):** 4 x 1,25 ml (200 Reactions) o 20 x 1,25 ml (1.000 Reactions).

Master Mix NESTED

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	9,5 µl
Primer ORF1FN-1681-f (Forward)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Primer ORF1RN-1682-r (Reverse)	22 µM	0,88 µM	1 µl
MyTaq Red Mix (2X)	2X	1X	12,5 µl
DNA	/	/	1 µl
Volume Totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 24 µl nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 1 µl di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo NESTED.
- In una stanza separata caricare 1 µl di retrotrascritto (cDNA) di ciascun campione, 1 µl di cDNA del controllo negativo RT-PCR FIRST, 1 µl di cDNA del controllo positivo e 1 µl del retrotrascritto-amplificato del bianco nelle rispettive provette.

APPENDICE J1

Preparazione dei primers

Prima di procedere con la preparazione dei primers, compilare foglio di lavoro “*Preparazione Stock Solution Primers*”.

I primers utilizzati per tale procedura sono quelli indicati di seguito.

Primers *Nested RT-PCR HEV*

PRIMERS RT-PCR FIRST	SEQUENZA
ORF1F-1679-f (Forward)	5'-CCAYCAGTTYATHAAGGCTCC-3'
ORF1R-1680-r (Reverse)	5'-TACCAVCGCTGRACRTC-3'
PRIMERS NESTED	SEQUENZA
ORF1FN-1681-f (Forward)	5'-CTCCTGGCRTYACWACTGC-3'
ORF1RN-1682-r (Reverse)	5'-GGRTGRTTCCAIARVACYTC-3'

Soluzione Stock Madre Primers 100 μ M:

I Primers vengono acquistati da ditte specializzate che li inviano nella forma liofilizzata, con allegato un documento indicante:

- Caratteristiche fisico-chimiche.
- Quantità assoluta in μ g.
- Numero di nmoli.
- Tipo di purificazione.

Prima del loro, impiego essi devono essere opportunamente reidratati con acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 100 μ M. Per calcolare la quantità di acqua da aggiungere al liofilizzato applicare la seguente formula:

$$\mathbf{N^{\circ} \text{ nmoli ricevute}/100 = \mu\text{l di acqua da aggiungere}}$$

Sulla provetta della Soluzione Stock Madre deve essere indicato il nome del primer e la concentrazione di 100 μM .

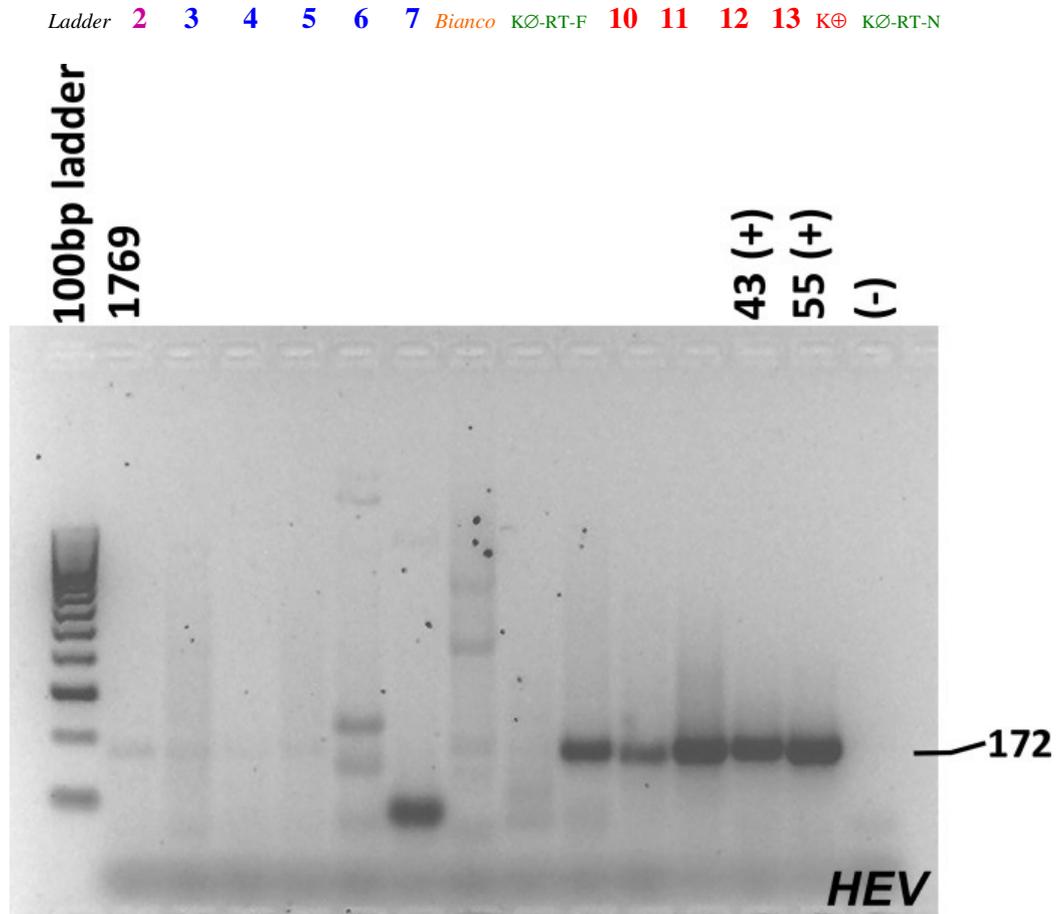
N.B.: La soluzione stock va conservata a $\cong -20^{\circ}\text{C}$ e impiegata come base di partenza per realizzare la Soluzioni di Lavoro 22 μM . Essa va scongelata solo per il tempo strettamente necessario.

Soluzioni di Lavoro Primers 22 μM :

- Scongela la Soluzione Stock Madre (100 μM) di ciascun primer (ORF1F-1679-f, ORF1R-1680-r, ORF1FN-1681-f, ORF1RN-1682-r).
- Preparare un numero opportuno di provette Nuclease free da 0.2 μl ed etichettarle rispettivamente con la dicitura “**ORF1F-1679-f**”, “**ORF1R-1680-r**”, “**ORF1FN-1681-f**”, “**ORF1RN-1682-r**”, indicando la concentrazione di 22 μM .
- Dispensare in ciascuna provetta 78 μl di acqua acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free.
- Aggiungere alle corrispondenti provette 22 μl di ciascun primer (ORF1F-1679-f, ORF1R-1680-r, ORF1FN-1681-f, ORF1RN-1682-r) alla concentrazione di 100 μM .

APPENDICE K1

Letture di una corsa elettroforetica di Nested RT-PCR per HEV



Nested RT-PCR HEV: Linea 1, Ladder (100 bp); Linea 2, campione dubbio da ripetere; Linea 3, 4, 5, 6 e 7, campioni negativi; Linea 10, 11, 12 e 13, campioni positivi; Linea 8, Bianco; Linea 9, KØ RT-PCR FIRST (F); Linea 14, K⊕; Linea 15, KØ Nested.

3.7.11 NESTED PCR PER LA RICERCA DEGLI ADENOVIRUS (METODO B)

La presente procedura, messa a punto nel 2014, ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la ricerca del DNA di Adenovirus di provenienza enterica (genere *Mastadenovirus*) in campioni biologici (acque, Molluschi Eduli Lamellibranchi) e in lisati di colture cellulari, mediante una *Nested* PCR specifica per le regioni ipervariabili 1–6 (HVR₁₋₆) dell'**hexon gene** degli *Adenovirus*. Può, inoltre, essere impiegata per l'identificazione di ceppi virali isolati.

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

La *Nested* PCR per adenovirus prevede 2 reazioni di amplificazione a catena della polimerasi, ciascuna con una specifica coppia di primers. La prima PCR o *FIRST* viene effettuata con i primers “**AdhexF1-1551-f (Forward)**” e “**AdhexR1-1553-r (Reverse)**”, la seconda PCR o *NESTED* viene effettuata con i primers “**AdhexF2-1554-f (Forward)**” e “**AdhexR1-1555-r (Reverse)**”.

Per la la *FIRST PCR* e la *Nested PCR* si impiega un apposito kit disponibile in commercio commerciale (Bioline - MyTaq™ Red Mix Kit), contenente i reagenti necessari per le master mix.

Prima di procedere con la prova di RT-PCR *Nested* per HEV, il campione opportunamente preparato, come descritto al punto 3.5, viene sottoposto ad estrazione dell'RNA come descritto al punto 3.6. Anche il controllo positivo viene opportunamente preparato, procedendo all'estrazione del suo RNA e alla sua diluizione, se necessario, come descritto al punto 3.6.

1 Reazione di Amplificazione FIRST del DNA (FIRST PCR)

La **FIRST** PCR prevede le seguenti **3 fasi**:

1.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix FIRST

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro “*PCR Nested Adenovirus (AdvS) (Metodo B)*”.

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (es. DNA di Adv-2), del Controllo Negativo FIRST (acqua Nuclease free) e del Bianco (controllo dell'estrazione).
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix FIRST seguendo le indicazioni del kit di amplificazione in uso, riportate nell'**APPENDICE L1 (a)**.
N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (100 µM e 22 µM) dei primers (“AdhexF1-1551-f” e “AdhexR1-1553-r”) secondo quanto riportato nell'**APPENDICE M1**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (22 µM) di ciascun primer.
- Dispensare la Master Mix FIRST in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE L1 (a)**.
- Aggiungere 2 µl di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo FIRST (**APPENDICE L1-a**).

1.2 Trasferimento del DNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 2 µl di DNA di ciascun campione (**APPENDICE L1-a**).

- Aggiungere nell'apposita provetta 2 µl di DNA Controllo Positivo (**APPENDICE L1-a**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 2 µl di Bianco (**APPENDICE L1-a**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

1.3 Reazione di Amplificazione FIRST del DNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “Adenovirus FIRST (Metodo B)” (**Tabella 3.22**) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.22. Programma “Adenovirus FIRST (Metodo B)”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Retrotrascrizione	45 min.	+42°C	1
2	Denaturazione	4 min	+95°C	1
3	Denaturazione	30 sec.	+95°C	35
4	Annealing	60 sec.	+45°C	
5	Polimerizzazione	30 sec.	+72°C	
6	Polimerizzazione finale	10 min.	+72°C	1
7	Mantenimento	∞	+4°C	1

2 Reazione di Amplificazione Nested del DNA (Nested PCR)

La NESTED PCR prevede le seguenti **3 fasi**:

2.1 Preparazione e distribuzione della Master Mix NESTED

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata.

Prima di procedere con la preparazione della miscela di reazione, compilare l'apposito foglio di lavoro “PCR Nested Adenovirus (AdvS) (Metodo B).

Quindi:

- Disporre in un portaprovette le provette Nuclease free da 0,2 ml, tenendo conto del numero di campioni da amplificare, del Controllo Positivo (es. DNA amplificato FIRST di AdV-2), del Controllo Negativo FIRST, del Controllo Negativo NESTED (acqua Nuclease free) e del Bianco.
- Contrassegnare con un numero progressivo ogni provetta.
- Preparare la Master Mix Nested seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE L1** (b).
N.B.: preparare, se necessario, le soluzioni (100 μ M e 22 μ M) dei primers (“AdhexF2-1554-f” e “AdhexR1-1555-r”) secondo quanto riportato nell'**APPENDICE M1**. Se sono già pronte, prelevare un'aliquota della soluzione di lavoro (22 μ M) di ciascun primer.
- Dispensare la Master Mix in ciascuna provetta di reazione preparata, seguendo le indicazioni riportate nell'**APPENDICE L1** (b).
- Aggiungere 1 μ l di acqua distillata sterile Nuclease free nella provetta del Controllo Negativo NESTED (**APPENDICE L1-b**).

2.2 Trasferimento del DNA nelle provette-test

Tale operazione va eseguita in un'area appositamente dedicata al caricamento dei campioni.

- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 μ l di DNA di ciascun campione (**APPENDICE L1-b**).
- Aggiungere nelle rispettive provette di reazione 1 μ l di DNA del Controllo Negativo FIRST (**APPENDICE L1-b**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 1 μ l di DNA del Controllo Positivo (**APPENDICE L1-b**).
- Aggiungere nell'apposita provetta 1 μ l dell'amplificato del Bianco (**APPENDICE L1-b**).

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, tale passaggio non viene eseguito.

2.3 Reazione di Amplificazione Nested del DNA

Inserire le provette-test negli alloggiamenti del termociclatore, selezionare il programma indicato come “Adenovirus NESTED (Metodo B)” (*Tabella 3.23*) e dare lo “RUN/START”.

Tabella 3.23. Programma “ Adenovirus NESTED (Metodo B)”

Step	FASE	Tempo	Temperatura	N° cicli
1	Denaturazione	4 min.	+95°C	1
2	Denaturazione	30 sec.	+95°C	35
3	Annealing	60 sec.	+45°C	
4	Polimerizzazione	30 sec.	+72°C	
5	Polimerizzazione finale	10 min.	+72°C	1
6	Mantenimento	∞	+4°C	1

3 Rivelazione del prodotto di amplificazione

Elettroforesi

- Allestire il gel di agarosio al 2% (**APPENDICE H**) con un numero di pozzetti uguale al numero complessivo degli amplificati (campioni in esame, Bianco, Controllo Negativo FIRST, Controllo Negativo NESTED, Controllo Positivo) più un pozzetto per il Ladder.

N.B.: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà preso in considerazione nell’allestire il gel.

- Posizionare il gel nella cella elettroforetica in modo che sia completamente ricoperto da TBE 1X (**APPENDICE H**).
- Dispensare in una micropiastra a 96 pozzetti con fondo ad U 10 µl di ogni amplificato e aggiungere 2 µl di loading buffer.
- Preparare la “miscela Ladder” mescolando: 2 µl di Ladder 50/100 bp, 3 µl di loading buffer e 9 µl di TBE.

N.B.: si può impiegare anche un ladder già colorato (per l'utilizzo seguire le istruzioni del produttore).

- Caricare nei pozzetti del gel 10 µl di ciascun amplificato preparato con il loading buffer (un amplificato per pozzetto), disponendoli da sinistra verso destra nel seguente ordine: campioni, Bianco, Controllo Negativo FIRST, Controllo Negativo NESTED, Ladder, Controllo Positivo.

N.B.: se si utilizza un ordine diverso nel disporre i campioni ed i controlli, indicarlo nel foglio di lavoro e/o nel file della corsa elettroforetica.

N.B.B: qualora non è stato inserito il Bianco nella prova, esso non sarà presente nel foglio di lavoro.

- Caricare in un pozzetto del gel 10 µl della “miscela Ladder” preparata o 7 µl del Ladder già colorato.
- Applicare alla cella elettroforetica una corrente di circa 120 V (nel caso in cui si utilizza un gel grande) o di circa 100 V (nel caso in cui si utilizza un gel piccolo).
- Interrompere la corsa elettroforetica quando il loading buffer ha percorso almeno 5 cm. (in genere sono sufficienti 45 min. circa).
- Porre il gel sul transilluminatore a raggi UV ed analizzare l'immagine; si può quindi procedere alla sua acquisizione.
- Riportare l'esito della prova nell'apposito foglio di lavoro “*PCR Nested Adenovirus (AdVs) (Metodo B)*”.

RACCOLTA ED ELABORAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati viene effettuata verificando la presenza/assenza di una banda elettroforetica derivante dal frammento di DNA prodotto dall'amplificazione. La dimensione di tale banda viene determinata confrontandola con il Ladder (**APPENDICE N1**).

La prova è considerata valida se:

- il controllo positivo dà una banda di **688-821 bp** alla NESTED, a seconda della Specie e del sierotipo (**APPENDICE N1**).
N.B.: la banda attesa del controllo positivo alla FIRST è di 764-896 bp, a seconda della Specie e del sierotipo.
- il controllo negativo non presenta nessuna banda (**APPENDICE N1**).

I campioni sono considerati **positivi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, si evince la presenza di una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo NESTED (688-821 bp).

I campioni sono considerati **negativi** se, confrontandoli con il Controllo Positivo e con il Ladder, non presentano una banda di DNA uguale a quella del Controllo Positivo (688-821 bp).

Nel caso in cui il risultato sia di incerta interpretazione è bene ripetere la prova a partire dalla FIRST PCR (punto 1). Se il problema si ripresenta, ripartire dall'estrazione del campione (punto 3.6).

I campioni positivi possono essere sottoposti ad analisi di sequenza utilizzando gli stessi primers indicati nella presente procedura e le sequenze confrontate con quelle depositate in banche dati internazionali.

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- **Lu X., Erdman D.D. (2006b). Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. *Arch. Virol.*, 151: 1587–1602.** ⁽²⁴¹⁾
- Metodica allegata al kit Bioline - MyTaq™ Red Mix Kit. ⁽²⁷⁴⁾

APPENDICE L1

La preparazione delle Master Mix deve essere effettuata in un'area appositamente dedicata.

Kit di Amplificazione usato: MyTaq™ Red Mix Kit.
Ditta: Bioline.

Composizione del Kit:

- **MyTaq Red Mix (2X):** 4 x 1,25 ml (200 Reactions) o 20 x 1,25 ml (1.000 Reactions).

FIRST PCR (Volume Finale 25 µl)

Master Mix FIRST

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	8,5 µl
Primer AdhexF1- 1551-f (Forward)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Primer AdhexR1- 1553-r (Reverse)	22 µM	0,88 µM	1 µl
MyTaq Red Mix (2X)	2X	1X	12,5 µl
DNA	/	/	2 µl
Volume Totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Preparare una o più provette da 1,5-2,0 ml Nuclease free (per la master mix) e tante provette eppendorf da 0,2 ml Nuclease free quanti sono i campioni, tenendo conto anche del bianco, del controllo positivo e del controllo negativo FIRST.
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.

- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.
- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 23 µl nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 2 µl di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo FIRST.
- In una stanza separata caricare 2 µl di DNA di ciascun campione, 2 µl di DNA del controllo positivo e 2 µl di bianco nelle rispettive provette.

NESTED PCR (Volume Finale 25 µl)

Master Mix NESTED

Reagenti	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per 1 campione
Acqua Nuclease free	/	/	9,5 µl
Primer AdhexF2- 1554-f (Forward)	22 µM	0,88 µM	1 µl
Primer AdhexR1- 1555-r (Reverse)	22 µM	0,88 µM	1 µl
MyTaq Red Mix (2X)	2X	1X	12,5 µl
DNA	/	/	1 µl
Volume Totale	/	/	25 µl

Procedimento:

- Uscire dal congelatore -20°C i reagenti per la miscela e tenerli in ghiaccio o comunque adeguatamente refrigerati.
- Agitare con il vortex e centrifugare tutti i reagenti per pochi secondi prima di adoperarli.
- Preparare nella/e provetta/e eppendorf da 1,5-2,0 ml Nuclease free la miscela di reazione dispensando i reagenti nei volumi sopra indicati, tenendo conto del numero totale dei campioni in esame, dei controlli e di almeno un campione in eccesso (o di un fattore di correzione pari al 10% del totale del numero di reazioni), considerando

le perdite di master mix dovute all'adesione delle miscele alle pareti della microprovetta e/o puntali.

- Agitare con il vortex e centrifugare la miscela preparata per pochi secondi.
- Dopo aver preparato la miscela, dispensarne 24 μ l nelle provette eppendorf da 0,2 ml e aggiungere 1 μ l di acqua Nuclease free nella provetta del controllo negativo NESTED.
- In una stanza separata caricare 1 μ l di amplificato FIRST di ciascun campione, 1 μ l di amplificato FIRST del controllo positivo e 1 μ l di amplificato FIRST del bianco nelle rispettive provette.

APPENDICE M1

Preparazione dei primers

Prima di procedere con la preparazione dei primers, compilare foglio di lavoro “*Preparazione Stock Solution Primers*”.

I primers utilizzati per tale procedura sono quelli indicati di seguito.

Primers *Nested PCR Adenovirus*

PRIMERS FIRST	SEQUENZA
AdhexF1-1551-f (Forward)	5'-TICTTTGACATICGIGGIGTICTIGA-3'
AdhexR1-1553-r (Reverse)	5'-CTGTCIACIGCCTGRTTCCACA-3'
PRIMERS NESTED	SEQUENZA
AdhexF2-1554-f (Forward)	5'-GGYCCYAGYTTYAARCCCTAYTC-3'
AdhexR1-1555-r (Reverse)	5'-GGTTCTGTICCCAGAGARTCIAGCA-3'

Soluzione Stock Madre Primers 100 μ M:

I Primers vengono acquistati da ditte specializzate che li inviano nella forma liofilizzata, con allegato un documento indicante:

- Caratteristiche fisico-chimiche.
- Quantità assoluta in μ g.
- Numero di nmoli.
- Tipo di purificazione.

Prima del loro, impiego essi devono essere opportunamente reidratati con acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 100 μ M. Per calcolare la quantità di acqua da aggiungere al liofilizzato applicare la seguente formula:

$$\mathbf{N^{\circ} \text{ nmoli ricevute}/100 = \mu\text{l di acqua da aggiungere}}$$

Sulla provetta della Soluzione Stock Madre deve essere indicato il nome del primer e la concentrazione di 100 μM .

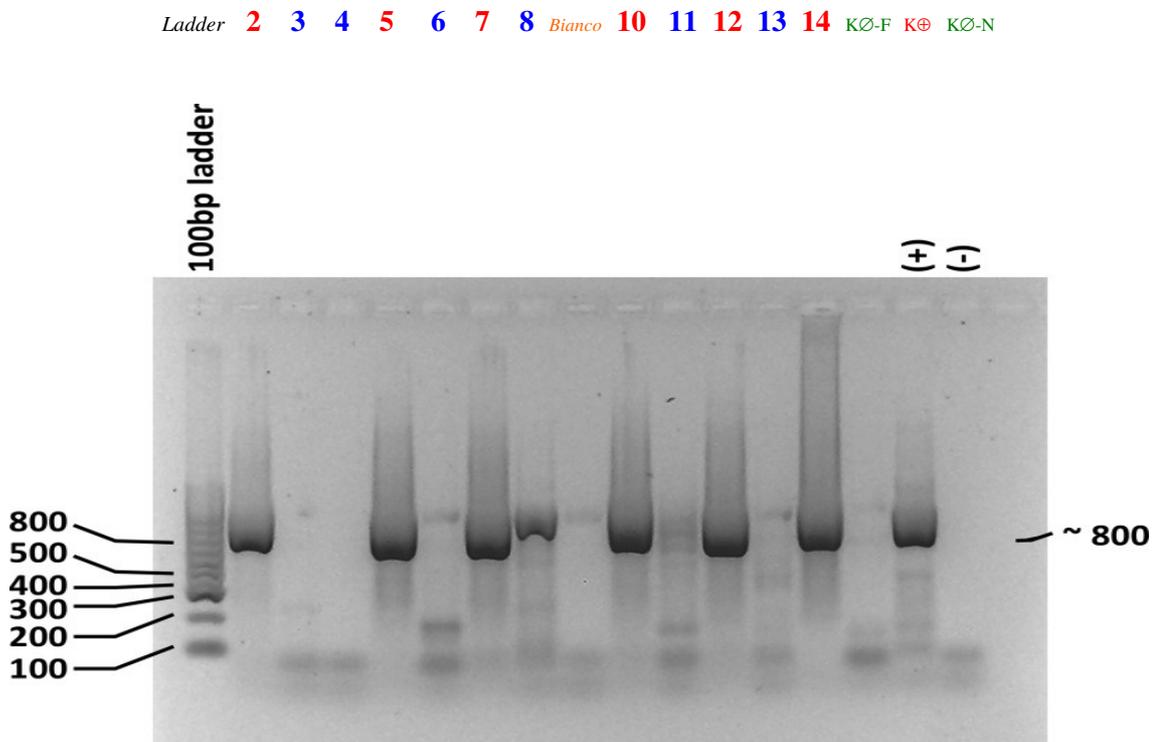
N.B.: La soluzione stock va conservata a $\cong -20^{\circ}\text{C}$ e impiegata come base di partenza per realizzare la Soluzioni di Lavoro 22 μM . Essa va scongelata solo per il tempo strettamente necessario.

Soluzioni di Lavoro Primers 22 μM :

- Scongela la Soluzione Stock Madre (100 μM) di ciascun primer (AdhexF1-1551-f, AdhexR1-1553-r, AdhexF2-1554-f, AdhexR1-1555-r).
- Preparare un numero opportuno di provette Nuclease free da 0.2 μl ed etichettarle rispettivamente con la dicitura “**AdhexF1-1551-f**”, “**AdhexR1-1553-r**”, “**AdhexF2-1554-f**”, “**AdhexR1-1555-r**”, indicando la concentrazione di 22 μM .
- Dispensare in ciascuna provetta 78 μl di acqua acqua distillata o deionizzata sterile Nuclease free.
- Aggiungere alle corrispondenti provette 22 μl di ciascun primer (AdhexF1-1551-f, AdhexR1-1553-r, AdhexF2-1554-f, AdhexR1-1555-r) alla concentrazione di 100 μM .

APPENDICE N1

Letture di una corsa elettroforetica di Nested PCR per AdVs (Metodo B)



Nested PCR AdVs (Metodo B): Linea 1, Ladder (100 bp); Linea 2, 5, 7, 10, 12 e 14, **campioni positivi**; Linea 3, 4, 6, 8, 11 e 13, **campioni negativi**; Linea 9, **Bianco**; Linea 15, **KØ FIRST (F)**; Linea 16, **KØ**; Linea 17, **KØ Nested**.

3.7.12 ANALISI DI SEQUENZA

I prodotti di RT-PCR/PCR positivi ottenuti applicando i *Protocolli 2014* (punto 3.7; da punto 3.7.6 a punto 3.7.11) sono stati purificati e inviati ad una ditta in grado di offrire un affidabile servizio di sequenziamento.

Le sequenze *forward* e *reverse* acquisite sono state confrontate, per la ricerca di omologie di sequenza, con sequenze depositate in banche dati pubbliche di acidi nucleici (GenBank) mediante il sistema di ricerca BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), attraverso il sito web NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Le relazioni filogenetiche sono state elaborate utilizzando il software MEGA versione 6.0 ⁽³⁷⁵⁾. La distanza genetica è stata calcolata utilizzando il modello Tamura 3-parameter e l'albero filogenetico è stato costruito con il metodo del neighbor-joining. I valori di bootstrap sono stati determinati mediante 1.000 ripetizioni dell'analisi, per valutare il livello di confidenza di ogni ramo del modello ottenuto. Sono stati considerati significativi e riportati solo i valori di bootstrap > 60%.

3.8 CIRCUITI INTERLABORATORIO

Per valutare le performance operative e la riproducibilità inter-laboratorio, durante il presente progetto si è stabilito di aderire ai tre Ring Tests annuali organizzati tra il 2013 ed il 2015 dal Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali dei molluschi bivalvi (LNR-virus), Istituto Superiore di Sanità (ISS) – Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare. L'ISS è stato designato quale LNR nel 2006 dal Ministero della Salute, in quanto Autorità Competente, in applicazione dell'Art.33 del Reg. (CE) n. 882/2004. ⁽³³²⁾

Tali Circuiti Interlaboratorio costituiscono un momento unico di confronto riconosciuto a livello Nazionale per tutti i laboratori operanti nel controllo virologico delle matrici alimentari e/o ambientali (Istituti Zooprofilattici Sperimentali, ISS, Aziende Regionali per la Protezione dell'Ambiente). Rappresentano, inoltre, un valido supporto al fine di valutare la riproducibilità inter-laboratorio nella diagnosi di campioni debolmente contaminati, cosa abbastanza frequente nella sorveglianza virologica degli alimenti. I Ring Tests sono, infatti, atti a valutare la capacità di evidenziare la presenza o meno del genoma di HAV e NoVs (GI e GII) nei Molluschi Eduli Lamellibranchi (MEL) in sospensioni acquose e nella matrice mollusco anche in caso di livelli di contaminazione estremamente bassi, utilizzando metodi Real Time.

I Ring Test effettuati sono stati:

- Ring Test Real Time RT-PCR per la determinazione di Norovirus (NoV) e Virus Epatite A (HAV) nei molluschi bivalvi **RT02 – 2013**;
- Ring Test Real Time RT-PCR per la determinazione di Norovirus (NoV) e Virus Epatite A (HAV) nei molluschi bivalvi **RT03 – 2014**;
- Ring Test Real Time RT-PCR per la determinazione di Norovirus (NoV) e Virus Epatite A (HAV) nei molluschi bivalvi **RT04 – 2015**.

Nel corso degli anni le modalità di esecuzione dei Ring Tests hanno subito delle variazioni al fine di valutare vari aspetti e varie fasi delle metodiche oggetto di verifica.

3.8.1 RING TEST REAL TIME RT-PCR PER LA DETERMINAZIONE DI NOROVIRUS (NOVs) E VIRUS EPATITE A (HAV) NEI MOLLUSCHI BIVALVI RT02 – 2013

Il **materiale inviato**, scortato da Nota di Accompagnamento ed Istruzioni per l'esecuzione e l'analisi dei dati, dal LNR-virus per lo svolgimento del Ring Test è stato il seguente:

- 3 provette Eppendorf contenenti il DNA target per ciascuna delle tre prove (HAV, NoV GI, NoV GII) da effettuare (standard a DNA);
- 6 provette Eppendorf identificate con un codice alfanumerico (L1, L2, L3, L4, L5, L6), contenenti sospensioni acquose, omogenee e stabili, da esaminare per la determinazione dei tre virus target (HAV, NoV GI, NoV GII); preparate a partire da estratti di molluschi naturalmente (NoV GI, NoV GII) o sperimentalmente (HAV) contaminati con i virus target e da estratti di MEL che non presentavano alcuna contaminazione;
- 2 Falcon identificate con un codice alfanumerico (S1 e S2), contenenti ciascuna 2.0 g di omogenato di epatopancreas di mollusco, da esaminare per la determinazione dei tre virus target (HAV, NoV GI, NoV GII); provenienti da molluschi naturalmente contaminati con i virus target (HAV, NoV GI, NoV GII) o che non presentavano alcuna contaminazione;
- 1 provetta Eppendorf contenente una sospensione di Mengovirus (controllo di processo);
- 3 provette Eppendorf contenenti RNA-EC rispettivamente di HAV, NoV GI e NoV GII (controllo esterno di inibizione).

I **Protocolli Analitici** utilizzati per l'esecuzione delle prove sono stati:

- quello validato ed accreditato dall'ISS – DSPVA – Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica (lab779) in uso presso il LNR-virus (POMIAC01.002 Rev.2 del 28.02.2012: Metodo per la ricerca di Epatite A e Norovirus in alimenti mediante Real-Time PCR)⁽³¹⁹⁾;
- quello redatto su richiesta del Ministero della Salute (Prot. 44518 del 11.09.2009: Metodo qualitativo “Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante Real Time PCR” - *Laboratorio Nazionale di*

Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali nei molluschi bivalvi - Istituto Superiore di Sanità ⁽²⁸⁰⁾.

Entrambi i protocolli sono stati distribuiti dal LNR-virus attraverso il sito dell'ISS.

Le **modalità di estrazione dell'RNA** adottate nell'esecuzione del Ring Test sono di seguito riportate:

1) **Kit estrazione usato:** “BioMérieux NucliSENS[®] System”.

Tutti i campioni (L1, L2, L3, L4, L5, L6, S1, S2) sono stati estratti con il “MiniMag – Nuclisens Magnetic Extraction Kit”, secondo le indicazioni fornite dalla Ditta produttrice e indicate anche nel protocollo distribuito dal LNR “POMIAC01.002 Rev.2: Metodo per la ricerca di Epatite A e Norovirus in alimenti mediante Real-Time PCR”. Per l'esecuzione del Ring Test è stato utilizzato un volume iniziale di **500 µl di campione**, come consigliato dal protocollo. L'eluizione è stata eseguita con un totale di **100 µl di eluato finale**.

2) **Kit estrazione usato:** “QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Germany).

I due campioni di omogenato di epatopancreas di mollusco (S1 e S2) sono stati estratti anche con il kit “QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit QIAGEN”.

Il protocollo del kit prevede la purificazione dell'RNA virale a partire da 140 µl di campione, da pretrattare con 560 µl di un “buffer – carrier” (*Buffer AVL – Carrier RNA Solution*). Per l'esecuzione del Ring Test, che consiglia un volume iniziale di 500 µl di campione, sono state allestite 4 repliche per ciascun campione (trattate con un quantitativo proporzionato di “buffer – carrier”) che sono state caricate tutte in una stessa colonnina di estrazione, procedendo quindi con le opportune centrifugazioni/lavaggi previsti dalla metodica. In questo modo sono stati filtrati in totale **560 µl di campione**. L'eluizione è stata eseguita con 2 x 50 µl di buffer (*Buffer AVE*), per un totale di **100 µl di eluato finale**.

Il **Controllo di Processo (CP)** impiegato è stato il Mengovirus fornito con il materiale da saggiare. Come indicato nelle istruzioni per l'esecuzione del Ring Test, sono stati aggiunti 10 µl di CP Tal Quale ai due campioni di omogenato di epatopancreas di mollusco (S1 e S2), prima di procedere al trattamento con la soluzione di proteinasi K.

L'**apparecchio di Real Time (rt) RT-PCR utilizzato** è stato lo StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Life Technologies). Qualora l'esito di un campione è negativo, lo strumento in dotazione non dà alcun valore di **Ct**, ma restituisce il dato come UNDETERMINED.

In questo Ring Trial, oltre agli standard ad RNA, sono stati inviati anche gli **standard a DNA**, per valutare le performance del laboratorio (riproducibilità, efficienza di amplificazione, ecc.).

3.8.2 RING TEST REAL TIME RT-PCR PER LA DETERMINAZIONE DI NOROVIRUS (NOVS) E VIRUS EPATITE A (HAV) NEI MOLLUSCHI BIVALVI RT03 – 2014

Il **materiale inviato**, scortato da Nota di Accompagnamento ed Istruzioni per l'esecuzione e l'analisi dei dati, dal LNR-virus per lo svolgimento del Ring Test è stato il seguente:

- 6 provette Eppendorf identificate con un codice alfanumerico (L1, L2, L3, L4, L5, L6), contenenti sospensioni acquose, omogenee e stabili, da esaminare per la determinazione dei tre virus target (HAV, NoV GI, NoV GII); preparate a partire da estratti di molluschi naturalmente (NoV GI, NoV GII) o sperimentalmente (HAV) contaminati con i virus target e da estratti di MEL che non presentavano alcuna contaminazione;
- 2 Falcon identificate con un codice alfanumerico (S1 e S2), contenenti ciascuna 2.0 g di omogenato di epatopancreas di mollusco, da esaminare per la determinazione dei tre virus target (HAV, NoV GI, NoV GII); provenienti da molluschi naturalmente contaminati con i virus target (HAV, NoV GI, NoV GII) o che non presentavano alcuna contaminazione;
- 1 provetta Eppendorf contenente una sospensione di Mengovirus (controllo di processo);
- 3 provette Eppendorf contenenti RNA-EC rispettivamente di HAV, NoV GI e NoV GII (controllo esterno di inibizione).

Il Ring Test è stato effettuato seguendo:

- il **protocollo** distribuito dal LNR-virus (POMIAC01.002 Rev.2 del 28.02.2012: Metodo per la ricerca di Epatite A e Norovirus in alimenti mediante Real-Time PCR) ⁽³¹⁹⁾;
- con le **integrazioni** previste dal Metodo ISO/TS 15216-2:2013: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection. ⁽¹⁷⁴⁾

Alla luce dei risultati del precedente Ring Test, tutti i campioni (S1, S2, L1, L2, L3, L4, L5, L6) sono stati **estratti** solo con il “BioMérieux NucliSENS® System”, secondo le indicazioni fornite dalla Ditta produttrice e indicate anche nel protocollo distribuito dal LNR-virus e nella ISO/TS 15216-2:2013.

Il **Controllo di Processo (CP)** impiegato è stato il Mengovirus fornito con il materiale da saggiare. Come indicato nelle istruzioni per l’esecuzione del Ring Test, sono stati aggiunti 10 µl di CP Tal Quale ai due campioni di omogenato di epatopaneas di mollusco (S1 e S2), prima di procedere al trattamento con la soluzione di proteinasi K.

L’**apparecchio di Real Time (rt) RT-PCR utilizzato** è stato lo StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Life Technologies). Qualora l’esito di un campione è negativo, lo strumento in dotazione non dà alcun valore di **Ct**, ma restituisce il dato come UNDETERMINED.

Applicando le **integrazioni** previste dal Metodo ISO/TS 15216-2:2013, i campioni sono stati esaminati sia non diluiti che diluiti 1:10. I campioni sono stati diluiti dopo l’estrazione con il “BioMérieux NucliSENS® System”.

3.8.3 RING TEST REAL TIME RT-PCR PER LA DETERMINAZIONE DI NOROVIRUS (NOVS) E VIRUS EPATITE A (HAV) NEI MOLLUSCHI BIVALVI RT04 – 2015

Il **materiale inviato**, scortato da Nota di Accompagnamento ed Istruzioni per l'esecuzione e l'analisi dei dati, dal LNR-virus per lo svolgimento del Ring Test è stato il seguente:

- 4 provette Eppendorf identificate con un codice alfanumerico (L1, L2, L3, L4), contenenti sospensioni acquose, omogenee e stabili, da esaminare per la determinazione dei tre virus target (HAV, NoV GI, NoV GII); preparate a partire da estratti di molluschi naturalmente (NoV GI, NoV GII) o sperimentalmente (HAV, ceppo HM 175) contaminati con i virus target e da estratti di MEL che non presentavano alcuna contaminazione;
- 2 confezioni con molluschi (*Mytilus galloprovincialis*) interi, identificate con un codice alfanumerico (S1 e S2), da esaminare per la determinazione dei tre virus target (HAV, NoV GI, NoV GII); provenienti da molluschi naturalmente contaminati con i virus target (HAV, NoV GI, NoV GII) o che non presentavano alcuna contaminazione;
- 1 provetta Eppendorf contenente una sospensione di Mengovirus (controllo di processo);
- 3 provette Eppendorf contenenti RNA-EC rispettivamente di HAV, NoV GI e NoV GII (controllo esterno di inibizione).

Il Ring Test è stato effettuato seguendo i seguenti **Protocolli Analitici**:

- protocollo distribuito dal LNR-virus (POMIAC01.002 Rev.2 del 28.02.2012: Metodo per la ricerca di Epatite A e Norovirus in alimenti mediante Real-Time PCR) ⁽³¹⁹⁾;
- Metodo ISO/TS 15216-2:2013: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection. ⁽¹⁷⁴⁾

Anche in questa edizione del Ring Trial, tutti i campioni (S1, S2, L1, L2, L3, L4) sono stati **estratti** solo con il “BioMérieux NucliSENS® System”, secondo le indicazioni fornite dalla Ditta produttrice e indicate anche nel protocollo distribuito dal LNR-virus e nella ISO/TS 15216-2:2013.

Il **Controllo di Processo (CP)** impiegato è stato il Mengovirus fornito con il materiale da saggiare. Come indicato nelle istruzioni per l’esecuzione del Ring Test, sono stati aggiunti 10 µl di CP Tal Quale ai due campioni di omogenato di epatopancreas di mollusco (S1 e S2), prima di procedere al trattamento con la soluzione di proteinasi K.

L’**apparecchio di Real Time (rt) RT-PCR utilizzato** è stato lo QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems by Life Technologies). Qualora l’esito di un campione è negativo, lo strumento in dotazione non dà alcun valore di **Ct**, ma restituisce il dato come UNDETERMINED.

A differenza di quanto suggerito dal Metodo ISO, i campioni sono stati esaminati solo non diluiti.

In questo Ring Trial vengono inviati per la prima volta dei ***campioni di mollusco interi***, al fine di valutare anche le competenze dei laboratori nel prelievo dell’epatopancreas secondo le modalità specificate nella norma ISO/TS 15216-2:2013.

3.9 ISOLAMENTO VIRALE IN COLTURE CELLULARI

I protocolli di isolamento di seguito riportati possono essere impegnati anche per moltiplicare un ceppo virale di riferimento o un isolato che si intende conservare ed eventualmente titolare per ulteriori applicazioni.

3.9.1 ISOLAMENTO DELL'HAV

L'isolamento del Virus dell'Epatite A viene effettuato mediante infezione in fiasca di un monostrato cellulare di FRhK-4 o FrP3 (punto 3.1).

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

- 1) Predisporre il foglio di lavoro di infezione campione in fiasca. Predisporre la relativa documentazione anche per il controllo cellule. Siglare la fiasca corrispondente indicando: Identificativo Campione o controllo cellule, numero foglio di lavoro, data di infezione, numero passaggio su cellule.
- 2) Togliere il terreno dai monostrati cellulari.
- 3) Inoculare per contatto con i campioni in esame i monostrati cellulari, tranne quelli destinati al controllo cellule. La quantità dell'inoculo è variabile in funzione delle dimensioni del substrato cellulare impiegato:
 - in fiasca da 12,5 cm²: \cong 500 μ l di inoculo;
 - in fiasca da 25 cm²: \cong 1.000 μ l di inoculo;
 - in fiasca da 75 cm²: \cong 3.000 μ l di inoculo;
 - in fiasca da 150 cm²: \cong 6.000 μ l di inoculo;
 - in fiasca da 175 cm²: \cong 7.000 μ l di inoculo.
- 4) Inoculare, seguendo le stesse modalità, i monostrati del controllo cellule con terreno di mantenimento (**APPENDICE A** e **APPENDICE B**).
- 5) Incubare per \cong 90 min. a \cong +37°C sottoponendo le piastre e le fiasche ad agitazione mediante un agitatore basculante.
- 6) Controllare al microscopio l'eventuale effetto citotossico ed in caso positivo, asportare l'inoculo.

- 7) Aggiungere il terreno di mantenimento (**APPENDICE A** e **APPENDICE B**) in differente quantità a seconda della modalità dell'infezione (rispettando il rapporto inoculo/terreno = 1/7):
- in fiasca da 12,5 cm²: 3.000 µl;
 - in fiasca da 25 cm²: 6.000 µl;
 - in fiasca da 75 cm²: 18.000 µl;
 - in fiasca da 150 cm²: 36.000 µl;
 - in fiasca da 175 cm²: 42.000 µl;
- 8) Incubare in termostato a $\cong +37^{\circ}\text{C}$ in atmosfera umida al $\cong 5\%$ di CO₂.
- 9) Esaminare le colture inoculate ogni 24 h per 10 - 12 giorni al fine di evidenziare l'effetto citopatico (ECP) del virus. Le colture cellulari di controllo non inoculate devono rimanere indenni per tutto il periodo di incubazione (**Figura 3.11**; **Figura 3.13**).
- 10) In caso di assenza di ECP nelle colture inoculate con il campione effettuare un ulteriore passaggio cieco procedendo nel seguente modo:
- Congelare (in congelatore a -20°C) e scongelare le colture per 3 volte;
 - Trasferire il criolisato in un tubo da centrifuga contrassegnato dall'Identificativo Campione;
 - Centrifugare a $\cong 3000$ r.p.m. per $\cong 10-15$ minuti a $\cong +4^{\circ}\text{C}$
 - Raccogliere il surnatante e trasferirlo in un bijoux contrassegnato dall'Identificativo Campione;
 - Inoculare nuovi monostrati cellulari come descritto a partire dal punto 1. Qualora non si procedesse subito all'esecuzione della prova, stoccare a $\cong -80^{\circ}\text{C}$.
- 11) Alla fine del secondo passaggio in linee cellulari, in caso di ECP (**Figura 3.12**; **Figura 3.14**), e anche in assenza di ECP, poiché è possibile che si tratti di ceppi di virus non citopatici, procedere all'identificazione del virus isolato attraverso metodi biomolecolari.

RACCOLTA DEI RISULTATI

I risultati dell'isolamento vengono registrati in base alla produzione di ECP nelle colture inoculate e riportati sul foglio di lavoro impiegato per la prova È

conveniente adottare un sistema numerico di registrazione nella lettura delle modificazioni manifestate nei monostrati inoculati. L'estensione dell'interessamento dell'ECP viene registrata con una scala da 0 a 4. Una coltura normale senza ECP viene registrata con 0, una coltura completamente degenerata viene indicata con 4. Diversi gradi di ECP vengono indicati con valori intermedi. La presenza di un solo focolaio di effetto citopatico è indice di positività del campione.

Figura 3.11. Monostrato confluyente di **FRhK-4**
(Archivio personale; 10X)

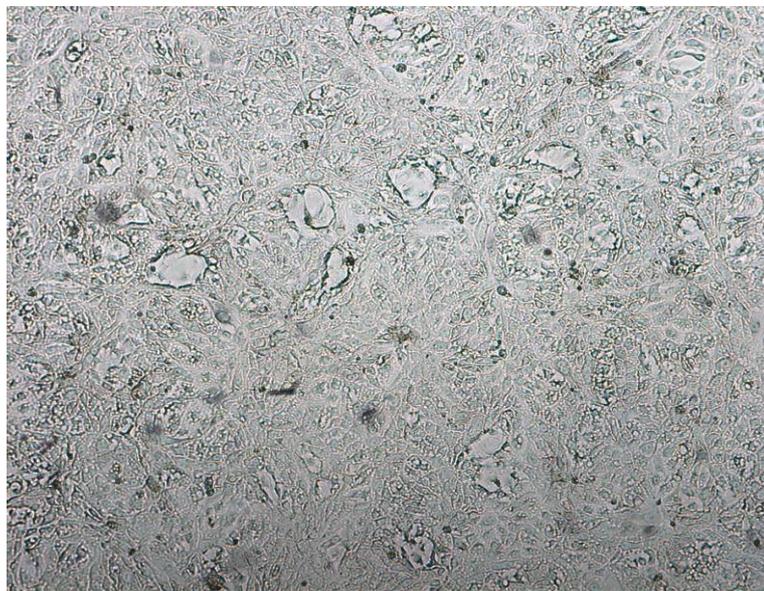


Figura 3.12. Effetto citopatico da **HAV** in **FRhK-4**
(Archivio personale; 10X)



Figura 3.13. Monostrato confluyente di **FrP3**
(Archivio personale; 10X)

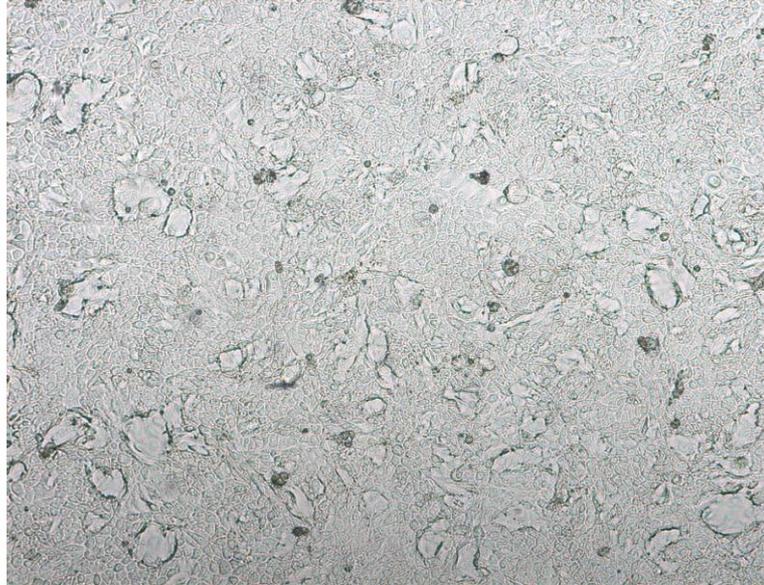
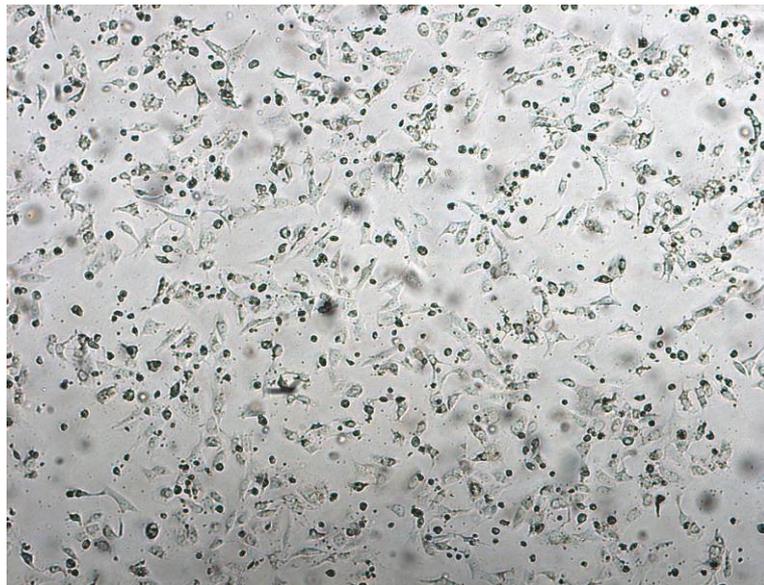


Figura 3.14. Effetto citopatico da **HAV** in **FrP3**
(Archivio personale; 10X)



3.9.2 ISOLAMENTO DEGLI ENTEROVIRUS

L'isolamento degli Enterovirus viene effettuato mediante infezione in fiasca di un monostrato cellulare di BGM (punto 3.1).

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

- 1) Predisporre il foglio di lavoro di infezione campione in fiasca. Predisporre la relativa documentazione anche per il controllo cellule. Siglare la fiasca corrispondente indicando: Identificativo Campione o controllo cellule, numero foglio di lavoro, data di infezione, numero passaggio su cellule.
- 2) Togliere il terreno dai monostrati cellulari.
- 3) Inoculare per contatto con i campioni in esame i monostrati cellulari, tranne quelli destinati al controllo cellule. La quantità dell'inoculo è variabile in funzione delle dimensioni del substrato cellulare impiegato:
 - in fiasca da 12,5 cm²: \cong 500 μ l di inoculo;
 - in fiasca da 25 cm²: \cong 1.000 μ l di inoculo;
 - in fiasca da 75 cm²: \cong 3.000 μ l di inoculo;
 - in fiasca da 150 cm²: \cong 6.000 μ l di inoculo;
 - in fiasca da 175 cm²: \cong 7.000 μ l di inoculo.
- 4) Inoculare, seguendo le stesse modalità, i monostrati del controllo cellule con terreno di mantenimento (**APPENDICE A** e **APPENDICE B**).
- 5) Incubare per \cong 90 min. a \cong +37°C sottoponendo le piastre e le fiasche ad agitazione mediante un agitatore basculante.
- 6) Controllare al microscopio l'eventuale effetto citotossico ed in caso positivo, asportare l'inoculo.
- 7) Aggiungere il terreno di mantenimento (**APPENDICE A** e **APPENDICE B**) in differente quantità a seconda della modalità dell'infezione (rispettando il rapporto inoculo/terreno = 1/7):
 - in fiasca da 12,5 cm²: 3.000 μ l;
 - in fiasca da 25 cm²: 6.000 μ l;
 - in fiasca da 75 cm²: 18.000 μ l;

- in fiasca da 150 cm²: 36.000 µl;
 - in fiasca da 175 cm²: 42.000 µl;
- 8) Incubare in termostato a $\cong +37^{\circ}\text{C}$ in atmosfera umida al $\cong 5\%$ di CO₂.
- 9) Esaminare le colture inoculate ogni 24 h per 7 giorni al fine di evidenziare l'ECP del virus. Le colture cellulari di controllo non inoculate devono rimanere indenni per tutto il periodo di incubazione (*Figura 3.15*).
- 10) In caso di assenza di ECP nelle colture inoculate con il campione, effettuare altri 2 passaggi ciechi procedendo nel seguente modo:
- Congelare (in congelatore a -20°C) e scongelare le colture per 3 volte;
 - Trasferire il criolisato in un tubo da centrifuga contrassegnato dall'Identificativo Campione;
 - Centrifugare a $\cong 3000$ r.p.m. per $\cong 10-15$ minuti a $\cong +4^{\circ}\text{C}$
 - Raccogliere il surnatante e trasferirlo in un bijoux contrassegnato dall'Identificativo Campione;
 - Inoculare nuovi monostrati cellulari. Qualora non si procedesse subito all'esecuzione della prova, stoccare a $\cong -80^{\circ}\text{C}$.
- 11) In caso di ECP (*Figura 3.16*), procedere all'identificazione del virus isolato attraverso metodi biomolecolari.

RACCOLTA DEI RISULTATI

I risultati dell'isolamento vengono registrati in base alla produzione di ECP nelle colture inoculate e riportati sul foglio di lavoro impiegato per la prova. È conveniente adottare un sistema numerico di registrazione nella lettura delle modificazioni manifestate nei monostrati inoculati. L'estensione dell'interessamento dell'ECP viene registrata con una scala da 0 a 4. Una coltura normale senza ECP viene registrata con 0, una coltura completamente degenerata viene indicata con 4. Diversi gradi di ECP vengono indicati con valori intermedi. La presenza di un solo focolaio di effetto citopatico è indice di positività del campione.

Figura 3.15. Monostrato confluyente di **BGM**
(Archivio personale; 10X)

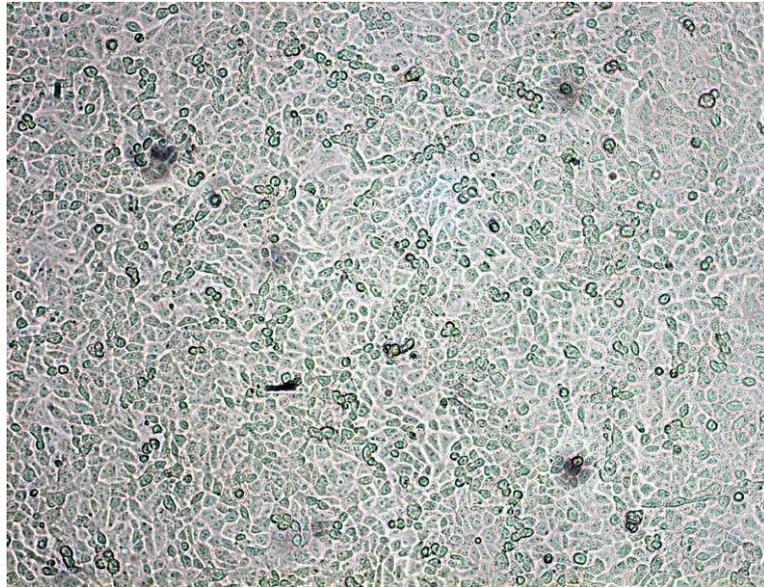
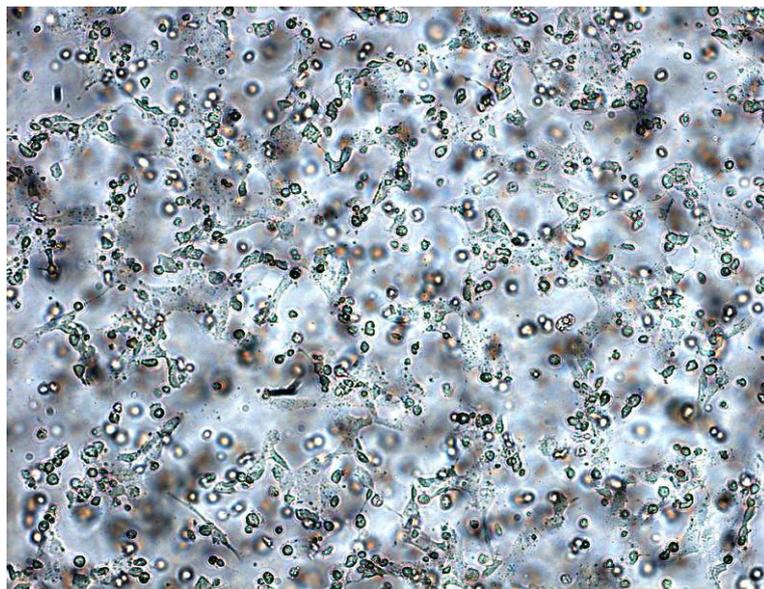


Figura 3.16. Effetto citopatico da **Echovirus 30** in **BGM**
(Archivio personale; 10X)



3.9.3 ISOLAMENTO DEGLI ADENOVIRUS

L'isolamento degli Adenovirus viene effettuato mediante infezione in fiasca di un monostrato cellulare di A549 o Hep 2 (punto 3.1).

MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLA PROVA

- 1) Predisporre il foglio di lavoro di infezione campione in fiasca. Predisporre la relativa documentazione anche per il controllo cellule. Siglare la fiasca corrispondente indicando: Identificativo Campione o controllo cellule, numero foglio di lavoro, data di infezione, numero passaggio su cellule.
- 2) Togliere il terreno dai monostrati cellulari
- 3) Inoculare per contatto con i campioni in esame i monostrati cellulari, tranne quelli destinati al controllo cellule. La quantità dell'inoculo è variabile in funzione delle dimensioni del substrato cellulare impiegato:
 - in fiasca da 12,5 cm²: \cong 500 μ l di inoculo;
 - in fiasca da 25 cm²: \cong 1.000 μ l di inoculo;
 - in fiasca da 75 cm²: \cong 3.000 μ l di inoculo;
 - in fiasca da 150 cm²: \cong 6.000 μ l di inoculo;
 - in fiasca da 175 cm²: \cong 7.000 μ l di inoculo.
- 4) Inoculare, seguendo le stesse modalità, i monostrati del controllo cellule con terreno di mantenimento (**APPENDICE A** e **APPENDICE B**).
- 5) Incubare per \cong 90 min. a \cong +37°C sottoponendo le piastre e le fiasche ad agitazione mediante un agitatore basculante.
- 6) Controllare al microscopio l'eventuale effetto citotossico ed in caso positivo, asportare l'inoculo.
- 7) Aggiungere il terreno di mantenimento (**APPENDICE A** e **APPENDICE B**) in differente quantità a seconda della modalità dell'infezione (rispettando il rapporto inoculo/terreno = 1/7):
 - in fiasca da 12,5 cm²: 3.000 μ l;
 - in fiasca da 25 cm²: 6.000 μ l;
 - in fiasca da 75 cm²: 18.000 μ l;

- in fiasca da 150 cm²: 36.000 µl;
 - in fiasca da 175 cm²: 42.000 µl;
- 8) Incubare in termostato a $\cong +37^{\circ}\text{C}$ in atmosfera umida al $\cong 5\%$ di CO₂.
- 9) Esaminare le colture inoculate ogni 24 h per 7 giorni al fine di evidenziare l'ECP del virus. Le colture cellulari di controllo non inoculate devono rimanere indenni per tutto il periodo di incubazione (*Figura 3.17*).
- 10) In caso di assenza di ECP nelle colture inoculate con il campione, effettuare altri 2 passaggi ciechi procedendo nel seguente modo:
- Congelare (in congelatore a -20°C) e scongelare le colture per 3 volte;
 - Trasferire il criolisato in un tubo da centrifuga contrassegnato dall'Identificativo Campione;
 - Centrifugare a $\cong 3000$ r.p.m. per $\cong 10-15$ minuti a $\cong +4^{\circ}\text{C}$
 - Raccogliere il surnatante e trasferirlo in un bijoux contrassegnato dall'Identificativo Campione;
 - Inoculare nuovi monostrati cellulari. Qualora non si procedesse subito all'esecuzione della prova, stoccare a $\cong -80^{\circ}\text{C}$.
- 11) Alla fine del terzo passaggio in linee cellulari, in caso di ECP (*Figura 3.18*), e anche in assenza di ECP, poiché è possibile che si tratti di ceppi di virus non citopatici, procedere all'identificazione del virus isolato attraverso metodi biomolecolari.

RACCOLTA DEI RISULTATI

I risultati dell'isolamento vengono registrati in base alla produzione di ECP nelle colture inoculate e riportati sul foglio di lavoro impiegato per la prova. È conveniente adottare un sistema numerico di registrazione nella lettura delle modificazioni manifestate nei monostrati inoculati. L'estensione dell'interessamento dell'ECP viene registrata con una scala da 0 a 4. Una coltura normale senza ECP viene registrata con 0, una coltura completamente degenerata viene indicata con 4. Diversi gradi di ECP vengono indicati con valori intermedi. La presenza di un solo focolaio di effetto citopatico è indice di positività del campione.

Figura 3.17. Monostrato confluyente di **A549**
(Archivio personale; 10X)

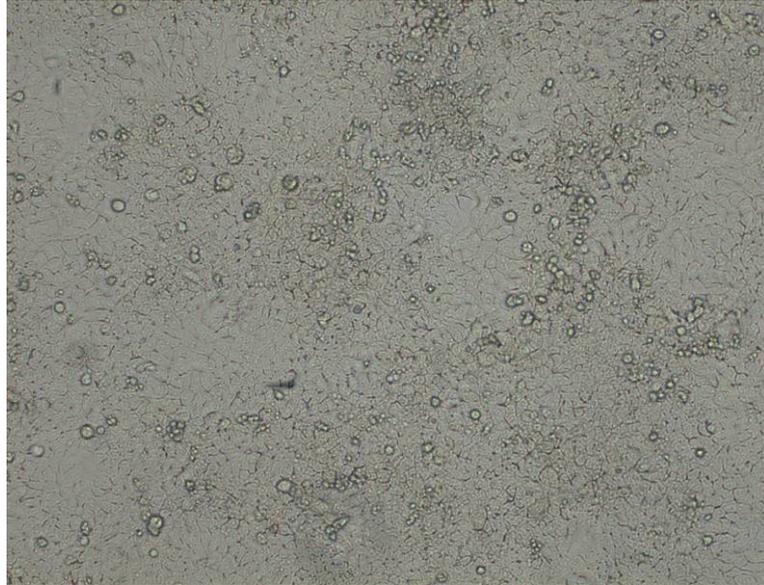
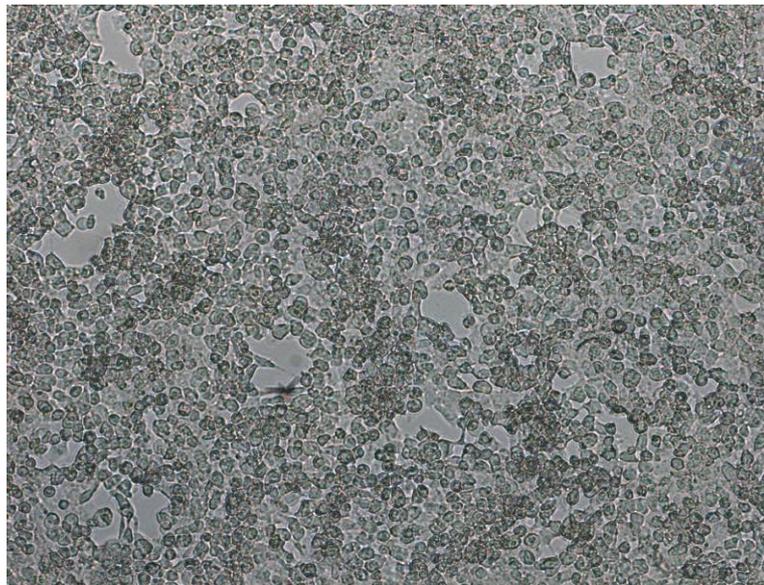


Figura 3.18. Effetto citopatico da **Adenovirus 2** in **A549**
(Archivio personale; 10X)



3.10 COLLEZIONE E ANALISI DEI CAMPIONI

Ai fini dell'attività di monitoraggio sono stati selezionati N° 2 centri di mitilicoltura in provincia di Siracusa che insistono sullo stesso specchio d'acqua, che sono sia CDM che CSM. Il terzo centro in provincia di Siracusa è in realtà facente parte di uno degli altri due, ma è in possesso di una autorizzazione ed un codice identificativo CDM/CSM differente. La scelta è ricaduta su di essi poiché si tratta di stabilimenti altamente produttivi e che nel periodo di studio dovevano essere sottoposti a riquilifica delle acque destinate alla mitilicoltura. Inoltre, i detentori avevano dato la propria disponibilità a sottoporsi a campionamenti e controlli aggiuntivi rispetto a quanto previsto per legge, quali la ricerca dei virus enterici, sia nei MEL che nelle acque di allevamento.

I due centri costituiscono un esempio di mitilicoltura in mare aperto, settore che nel corso degli anni si è evoluto moltissimo. Presentano impianti, costituiti da pali infissi nel fondale, ai quali viene steso in senso longitudinale il cavo atto a sorreggere le calze contenenti i mitili. In particolare la tecnica utilizzata è il sistema long-line (**Figura 3.19**), che strutturalmente ricorda un filare e prevede l'installazione di una fune rettilinea.

Figura 3.19. CDM/CSM di Siracusa



Il trave è ancorato al fondo tramite dei corpi morti di calcestruzzo e mantenuto ad una profondità di circa 2-3 metri rispetto alla superficie del mare, grazie ad una serie di galleggianti installati su di esso. I mitili vengono allevati in reste, costituite da reti tubolari in polipropilene chiamate “calze” all'interno delle quali vengono inseriti i molluschi. Le reste, caratterizzate da

una lunghezza compresa tra i 2 ed i 5 m, vengono fissate sul trave ad una distanza variabile le une dalle altre e la maglia della rete di contenimento viene dimensionata in funzione delle dimensioni dei molluschi presenti all'interno. Il ciclo di produzione completo, dalla semina alla raccolta, prevede un certo numero di operazioni di routine, tra le quali quella del reicalzo degli esemplari. Questa fase consiste nella sostituzione delle reti per il contenimento degli animali, via via caratterizzate da maglie progressivamente sempre più larghe, in rapporto alla crescita dei molluschi. Il ciclo di allevamento, dalla semina al raggiungimento della taglia commerciale, dura in media 12 mesi anche se, in particolari zone la tempistica risulta nettamente inferiore. Negli impianti (*Figura 3.20*) di mitili in mare aperto, tutte le operazioni di routine quali la manutenzione delle strutture, il sollevamento delle reste, la sgranatura, il reicalzo degli esemplari, la fase di selezione e quella di raccolta, vengono portate avanti tramite l'utilizzo di imbarcazioni che consentono di adempiere alla totalità delle operazioni, le due strutture indagate posseggono 1 imbarcazione ciascuna. Come tipologia produttiva sono: incubatoio, ingrasso e vivaio. Costituiscono due dei tre centri di mitilicoltura riconosciuti e funzionanti in Sicilia, il terzo si trova in provincia di Trapani e si occupa solo di ingrasso. Le acque in cui ricadono tutti e tre i centri di mitilicoltura siciliani sono di Classe B.

Figura 3.20. Particolari degli impianti a terra e a mare



Per il primo anno (**2013**) del progetto si è stabilito di effettuare per ciascuno dei due centri di mitilicoltura selezionati un campionamento bimensile di MEL da maggio ad ottobre, ossia nel periodo di maggiore produzione per la

molluschicoltura. È stato programmato, inoltre, un campionamento mensile delle acque marine di allevamento in cui ricadono i due centri di mitilicoltura. Sono stati anche esaminati tutti i campioni di MEL pervenuti per accertamenti di routine da parte della Polizia Giudiziaria. Infine, sono stati analizzati dei campioni di acque condottate pervenute per controlli di routine a seguito di una epidemia da Norovirus, probabilmente di origine idrica, verificatasi nel 2011.

Durante il secondo anno (**2014**) del progetto si è stabilito di ridurre il numero dei prelievi da effettuare presso ciascuno dei due centri di mitilicoltura selezionati, programmando un campionamento mensile di MEL da maggio a dicembre e interrompendo il campionamento delle acque marine i cui gli allevamenti ricadono. Sono stati anche esaminati tutti i campioni di MEL pervenuti per accertamenti di routine da Posti d'Ispezione Frontaliera (PIF) e da punti di vendita all'ingrosso e al dettaglio, nonché un campione di acque prelevato nel corso di un procedimento penale. Infine, sono stati esaminati MEL e acque campionati a scopo conoscitivo da Tecnici della Prevenzione, a seguito di segnalazione di casi di Epatite Virale A, verificatisi nel luglio dello stesso anno.

Nel corso del **2015** sono state completate le analisi relative ai campioni raccolti durante il 2013 ed il 2014 e sono stati analizzati N. 2 campioni di MEL pervenuti per accertamenti di routine, uno da un Posto d'Ispezione Frontaliera (PIF) ed un'altro prelevato da un punto di vendita al dettaglio a seguito di segnalazione di un caso di Epatite Virale A, attribuibile ad alimenti. Si è pensato, inoltre, di andare ad analizzare dei campioni di MEL collezionati nel 2012. Complessivamente sono stati analizzati 64 campioni di MEL e 10 campioni di acque.

Capitolo 4

RISULTATI

4.1 CDM E CSM DELLA REGIONE SICILIA

Uno dei primi obiettivi del progetto era quello di acquisire informazioni in merito ai CDM e CSM della Regione Sicilia, tale attività è stata svolta all'inizio dello studio (nel 2013) e ripetuta alla fine dello stesso (nel 2015). I dati relativi ai CDM e CSM della Regione Sicilia sono stati reperiti presso l'Assessorato della Salute Regione Siciliana, Dipartimento Attività Sanitarie e Osservatorio Epidemiologico.

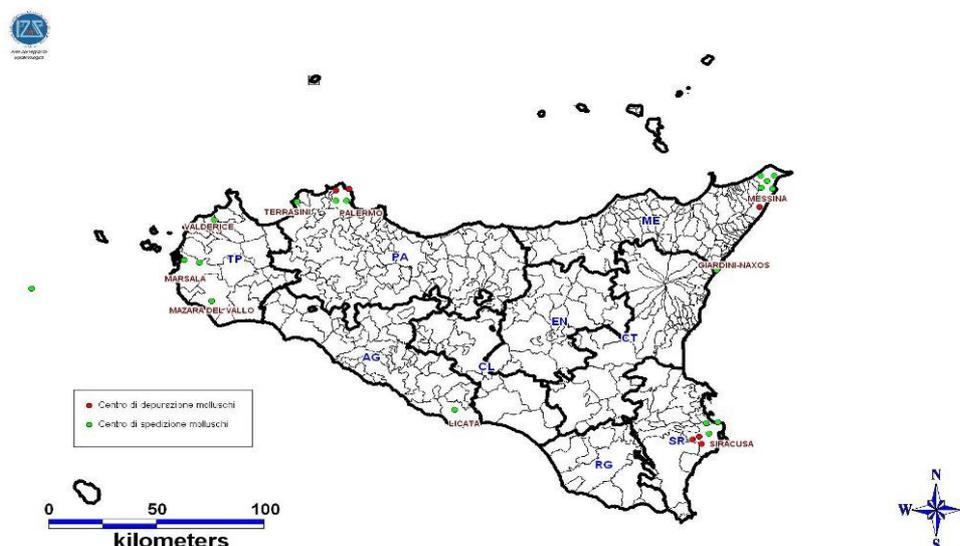
Come si può vedere in **Tabella 4.1**, nel **2013** i CDM riconosciuti in Sicilia dal Ministero della Salute, ai sensi dell'art. 4 del Regolamento (CE) N. 853/2004, erano complessivamente 6, mentre i CSM erano 17. I 6 CDM erano autorizzati ad operare anche come CSM. I CSM erano situati in 5 diverse province, che ne ospitavano un numero variabile, da un massimo di 6 (Messina) ad un minimo di 1 (Agrigento). I cinque CSM di Messina ricadevano tutti in una stessa località.

Tabella 4.1. CDM e CSM della Regione Sicilia - Anno 2013

Provincia	ASP	Comune	CSM	CDM
Agrigento	1	Licata	1	/
Messina	5	Giardini Naxos	1	/
		Messina	5	1
Palermo	6	Palermo	2	2
		Terrasini	1	/
Siracusa	7	Siracusa	3	3
Trapani	9	Marsala	2	/
		Mazara del Vallo	1	/
		Valderice	1	/
<i>Totale</i>			<i>17</i>	<i>6</i>

Si riporta in **Figura 4.1** la distribuzione dei CDM e dei CSM nel territorio regionale siciliano nel 2013, momento in cui è stato avviato tale lavoro.

Figura 4.1. Distribuzione dei CDM e CSM nel territorio regionale nel 2013



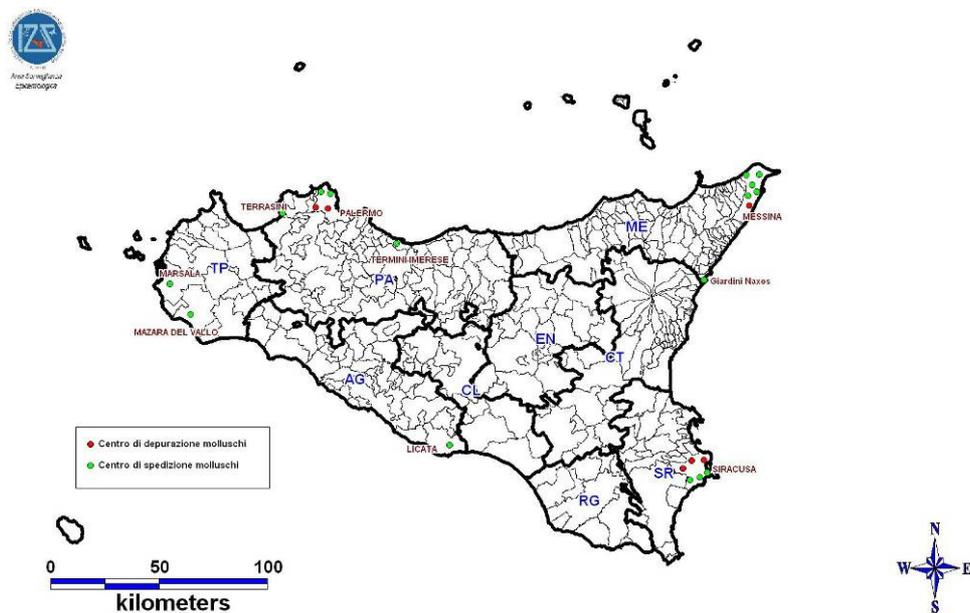
Nel corso dei tre anni di studio (2013-2015) l'elenco dei CDM e CSM regionali ha subito delle variazioni. Come si può vedere in **Tabella 4.2** i CDM attualmente (2015) riconosciuti in Sicilia ai sensi dell'art. 4 del Regolamento (CE) N. 853/2004 sono gli stessi 6 del 2013, mentre i CSM sono scesi a 16, con piccole variazioni anche in termini di distribuzione sul territorio regionale. I 6 CDM sono autorizzati ad operare anche come CSM. I CSM sono sempre situati in 5 diverse province, distribuiti in numero variabile; quelli di Messina ricadono tutti in una stessa località.

Tabella 4.2. CDM e CSM della Regione Sicilia - Anno 2015

Provincia	ASP	Comune	CSM	CDM
Agrigento	1	Licata	1	/
Messina	5	Giardini Naxos	1	/
		Messina	5	1
Palermo	6	Palermo	2	2
		Termini Imerese	1	/
		Terrasini	1	/
Siracusa	7	Siracusa	3	3
Trapani	9	Marsala	1	/
		Mazara del Vallo	1	/
<i>Totale</i>			<i>16</i>	<i>6</i>

Si riportano in **Figura 4.2** la distribuzione dei CDM e dei CSM nel territorio regionale siciliano nel 2015.

Figura 4.2. Distribuzione dei CDM e CSM nel territorio regionale nel 2015



4.2 METODOLOGIE DI ESTRAZIONE GENOMICA A CONFRONTO

Due metodologie di estrazione dei genomi virali (RNA e DNA), che sfruttano principi tecnici diversi, sono state messe a confronto nel corso del presente studio, con l'obiettivo di individuare la tecnologia in grado di garantire il maggior recupero virale e quindi la massima sensibilità diagnostica. È noto, infatti, che la fase di estrazione è uno dei momenti maggiormente critici nell'esecuzione di un protocollo di biologia molecolare. Il laboratorio aveva già validato la "Semi-Nested RT-PCR per la ricerca dell'HAV (Metodo A)" con il kit QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Germany), quando nel maggio del 2013 sono state emesse le Norme ISO/TS 15216-1:2013 e ISO/TS 15216-2:2013. Si è pensato, quindi, di provvedere alla rivalidazione del metodo inserendo anche la nuova tecnica di estrazione (BioMérieux NucliSENS[®] System) suggerita dalle ISO.

In particolare, è stata valutata la performance ottenuta dall'uso di:

- 1) **colonnine di affinità**, utilizzando QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), selezionato per la provata affidabilità ed idoneità nell'analisi di campioni di MEL e di acque;
- 2) **estrazione magnetica basata sulla tecnologia di Boom**, utilizzando il BioMérieux NucliSENS[®] System composto da: NucliSENS[®] miniMAG instrument, NucliSENS Lysis Buffer, NucliSENS Magnetic Extraction Reagents.

Poiché in campioni di MEL e di acque la carica virale può non essere elevata, è necessario aumentare il volume di campione da sottoporre ad analisi; basandosi su dati bibliografici si è stabilito di esaminare un volume pari a circa 500 µl di campione (volume peraltro consigliato anche dalle ISO).

Nell'utilizzo del kit QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) per l'estrazione dell'RNA, sono state, quindi, apportate delle modifiche al protocollo suggerito dal produttore, variando il volume iniziale del campione da estrarre (140 µl) ed il volume di eluato finale. Volendo mantenere le proporzioni previste dei reagenti e avvicinarsi al volume prefissato di 500 µl di campione, sono state allestite 4 repliche da 140 µl per ciascun campione (trattandole con un quantitativo proporzionato di "buffer – carrier"). Le 4 aliquote sono state poi caricate tutte in

una stessa colonnina di estrazione e si è proceduto con le centrifugazioni/lavaggi previsti dalla metodica. In questo modo si riescono a filtrare in totale 560 µl di campione. L'eluizione viene eseguita con 2 x 50 µl di buffer (*Buffer AVE*), per un totale di 100 µl di eluato finale.

Con il BioMérieux NucliSENS® System sono stati analizzati 500 µl di campione. L'eluizione è stata eseguita ottenendo 100 µl di eluato finale.

Nel **2013**, per valutare l'efficienza di estrazione dell'RNA dell'HAV con i due kits (QIAamp® Viral RNA Mini Kit – QIAGEN e BioMérieux NucliSENS® System), sono state effettuate, in H₂O Nuclease Free, 9 diluizioni scalari in base 10 (da 10⁻¹ a 10⁻⁹) di un ceppo positivo di riferimento (HAV HM 175/18F 2 FrP3 BS - 3 FrP3/ 3 FRhK-4, titolo 10^{5,86}), quindi è stata eseguita l'estrazione di ciascuna diluizione con le due differenti metodiche. Gli estratti genomici ottenuti sono stati sottoposti ad amplificazione mediante “Semi-Nested RT-PCR per la ricerca dell'HAV (Metodo A)” e “Real Time RT-PCR per la ricerca dell'HAV”; le metodiche utilizzate sono rispettivamente quelle di Le Guyader *et al.*, 1994 e Costafreda *et al.*, 2006 (cui si ispira anche la ISO/TS 15216-1:2013 e la ISO/TS 15216-2:2013) che sono state già descritte (punto 3.7.1 e punto 3.7.2). La prova è stata condotta su due repliche di ciascuna diluizione. I risultati medi ottenuti sono riportati in **Tabella 4.3**.

Tabella 4.3

Diluizione	QIAamp® Viral RNA Mini Kit		NucliSENS® System	
	RT-PCR	Real Time RT-PCR (t applicata = 0,10)	RT-PCR	Real Time RT-PCR (t applicata = 0,10)
-1	POS	POS (Ct = 16,22)	POS	POS (Ct = 22,14)
-2	POS	POS (Ct = 20,10)	POS	POS (Ct = 25,79)
-3	POS	POS (Ct = 23,09)	POS	POS (Ct = 29,48)
-4	POS	POS (Ct = 27,59)	POS	POS (Ct = 31,89)
-5	POS	POS (Ct = 30,08)	<i>Neg</i>	POS (Ct = 36,42)
-6	POS	POS (Ct = 34,21)	<i>Neg</i>	POS (Ct = 39,41)
-7	<i>Neg</i>	POS (Ct = 37,20)	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>
-8	<i>Neg</i>	POS (Ct = 38,05)	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>
-9	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>

Tale prova ha messo in evidenza differenze sia in relazione al kit di estrazione impiegato che alla metodica di amplificazione applicata. A parità di kit di estrazione, si possono osservare infatti delle differenze pari a due logaritmi in base

10 fra i risultati ottenuti con la RT-PCR tradizionale “end point” e la Real Time RT-PCR, come era d'altronde prevedibile. Confrontando poi i risultati ottenuti con la stessa metodica di amplificazione, ma con differente metodo estrattivo si osserva una ulteriore differenza di due logaritmi in base 10 a favore del QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). L'estrazione mediante l'impiego del NucliSENS[®] System (BioMérieux) è quella suggerita dalla ISO/TS 15216-1:2013 e dalla ISO/TS 15216-2:2013. Visto i risultati discordanti ed il numero esiguo di prove condotte, si è stabilito di ripetere ulteriormente la prova portando a 10 il numero delle repliche da esaminare per ciascuna diluizione.

Poiché sono stati rilevati esiti differenti a seconda del metodo di estrazione, si riportano di seguito entrambi i LOD (Limite di Rivelabilità) ottenuti per ciascun protocollo di amplificazione.

Semi-Nested RT-PCR per la ricerca dell'HAV:

- **Estrazione BioMérieux NucliSENS[®] System:**
LOD = $10^{1,86}$ TCID₅₀/25 µl
- **Estrazione QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN):**
LOD = 0,72 TCID₅₀/25 µl

Real-Time RT-PCR per la ricerca dell'HAV:

- **Estrazione BioMérieux NucliSENS[®] System:**
LOD = 0,72 TCID₅₀/25 µl
- **Estrazione QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN):**
LOD = 0,0072 TCID₅₀/25 µl

Nel **2014**, per verificare se gli esiti ottenuti utilizzando le due differenti metodiche di estrazione fossero dovute o meno al caso si è deciso di ripetere la prova effettuando una vera e propria validazione del metodo tradizionale “end point” “Semi-Nested RT-PCR per la ricerca dell’HAV”, andando a calcolare, oltre che la sensibilità e la specificità, il **Limite di Rivelabilità** (LOD) dello stesso (**Tabella 4.4**). I risultati ottenuti con entrambi i metodi hanno dato positività fino alla diluizione 10^{-5} (LOD = 7,2 TCID₅₀/25 µl).

Tabella 4.4

Diluizione	QIAamp® Viral RNA Mini Kit	NucliSENS® System
	RT-PCR	RT-PCR
-1	POS	POS
-2	POS	POS
-3	POS	POS
-4	POS	POS
-5	POS	POS
-6	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>
-7	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>
-8	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>
-9	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>

Tale prova ha messo in evidenza che non vi sono differenze nella performance del metodo diagnostico correlate al kit di estrazione impiegato. L’ estrazione mediante l’impiego del NucliSENS® System (BioMérieux) è, come già detto, quella suggerita dalla ISO/TS 15216-1:2013 e dalla ISO/TS 15216-2:2013.

Si è stabilito, in ogni caso, di sottoporre tutti i campioni pervenuti ad entrambi i metodi di estrazione, in quanto lavorare con i campioni di campo presenta delle difficoltà (variabilità intrinseca del campione, anche in funzione della specie di MEL e del periodo di pesca; presenza di inibenti; modalità di conservazione e di trasporto; ecc.) che non si evidenziano, ovviamente, con un ceppo di riferimento. Inoltre, l’analisi di tutti i campioni con entrambi i metodi di estrazione ha contribuito alla validazione del metodo.

L’impiego dei due kits di estrazione suddetti è stato esteso anche a tutti gli altri protocolli diagnostici per i virus ad RNA oggetto del presente studio.

Il confronto fra i due metodi di estrazione è stato altresì applicato alla ricerca degli Adenovirus in tutti i campioni di MEL ed acque pervenuti. In questo caso il NucliSENS[®] System (BioMérieux) è stato affiancato dal DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany).

Anche nell'estrazione del DNA con il DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (QIAGEN), sono state apportate delle modifiche al protocollo suggerito dal produttore, variando il volume iniziale del campione da estrarre (200 µl) ed il volume di eluato finale. Volendo mantenere le proporzioni previste dei reagenti e avvicinarsi al volume prefissato di 500 µl di campione, sono state allestite 2 repliche da 250 µl per ciascun campione (trattandole con un quantitativo proporzionato di reagenti). Le 2 aliquote sono state poi caricate tutte in una stessa colonnina di estrazione e si è proceduto con le centrifugazioni/lavaggi previsti dalla metodica. In questo modo si riescono a filtrare in totale 500 µl di campione. L'eluizione viene eseguita con 100 µl di buffer (*Buffer AE*).

4.3 ESITI DEI CIRCUITI INTERLABORATORIO

4.3.1 ESITI RING TEST REAL TIME RT-PCR PER LA DETERMINAZIONE DI NOV5 E HAV NEI MOLLUSCHI BIVALVI RT02 – 2013

I **laboratori coinvolti** in questa edizione (2013) del circuito inter-laboratorio sono stati 11.

Il nostro laboratorio, identificato con il n° “01”, ha eseguito il Ring Test sia per HAV che per NoV GI e GII.

Estrazione RNA:

Il confronto fra i due metodi di estrazione (QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit – QIAGEN e BioMérieux NucliSENS[®] System) è stato applicato anche ai due campioni di omogenato di epatopancreas di mollusco (S1 e S2) del presente Ring Test. Non è stato applicato alle sospensioni acquose (L1, L2, L3, L4, L5, L6), poiché il materiale fornito era sufficiente per una sola estrazione e si è preferito effettuarla con il metodo (BioMérieux NucliSENS[®] System) previsto dai Protocolli Analitici consigliati e adottati per il Ring Test.

Nell'esecuzione del Ring Test si possono distinguere tre fasi:

- 1) **FASE 1:** analisi degli standard a DNA (HAV, NoV GI, NoV GII) forniti.
- 2) **FASE 2:** analisi dei campioni (L1, L2, L3, L4, L5, L6, S1, S2) forniti e valutazione degli esiti ottenuti per ciascuno dei target (HAV, NoV GI, NoV GII).
- 3) **FASE 3:** valutazione dell'efficienza di estrazione utilizzando i risultati ottenuti dal controllo di processo.

Si riportano di seguito i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni del Ring Test.

FASE 1

HAV – standard DNA

Campione	threshold applicata	Ct replica 1	Ct replica 2	commenti
10^{-1}	0,10	27,94	27,46	
10^{-2}	0,10	31,82	32,79	
10^{-3}	0,10	35,09	34,39	
10^{-4}	0,10	38,46	Undetermined	
10^{-5}	0,10	Undetermined	Undetermined	

slope curva standard: - 3,105
intercetta: 45,52
 R^2 : 0,949
Efficienza amplificazione: 109,919

NoV GI – standard DNA

Campione	threshold applicata	Ct replica 1	Ct replica 2	commenti
10^{-1}	0,10	28,99	29,30	
10^{-2}	0,10	32,55	31,7	
10^{-3}	0,10	36,9	36,12	
10^{-4}	0,10	37,96	Undetermined	
10^{-5}	0,10	Undetermined	Undetermined	

slope curva standard: - 2,384
intercetta: 42,90
 R^2 : 0,925
Efficienza amplificazione: 162,744

NoV GII – standard DNA

Campione	threshold applicata	Ct replica 1	Ct replica 2	commenti
<i>10⁻¹</i>	<i>0,10</i>	<i>27,63</i>	<i>28,75</i>	
<i>10⁻²</i>	<i>0,10</i>	<i>31,57</i>	<i>32,92</i>	
<i>10⁻³</i>	<i>0,10</i>	<i>Undetermined</i>	<i>34,83</i>	
<i>10⁻⁴</i>	<i>0,10</i>	<i>Undetermined</i>	<i>Undetermined</i>	
<i>10⁻⁵</i>	<i>0,10</i>	<i>Undetermined</i>	<i>Undetermined</i>	

slope curva standard: - 4.405

intercetta: 50,99

R²: 0,986

Efficienza amplificazione: 68,665

FASE 2

HAV

Campione	pos/neg	Ct campione	Ct campione + RNA-EC	Ct RNA-EC	efficienza amplificazione	commenti
L1	Neg	Undetermined	26,72	25,52	43,53 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L2	Pos	34,13	25,84	25,52	80,11 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L3	Neg	Undetermined	26,41	25,52	53,96 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L4	Pos	30,50	25,92	25,52	75,79 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L5	Neg	Undetermined	26,04	25,52	69,74 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L6	Pos	27,01	26,63	25,52	46,33 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
S1	Pos	38,63	25,997	25,52	71,70 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
S2	Neg	Undetermined	26,25	25,52	60,29 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10

NoV GI

Campione	pos/neg	Ct campione	Ct campione + RNA-EC	Ct RNA-EC	efficienza amplificazione	commenti
L1	Pos	36,38	25,06	26,11	207,05 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L2	Pos	35,32	25,69	26,11	133,79 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L3	Neg	Undetermined	25,98	26,11	109,43 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L4	Neg	Undetermined	25,67	26,11	135,66 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L5	Pos	38,82	25,93	26,11	113,29 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L6	Neg	Undetermined	25,81	26,11	123,11 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
S1	Pos	38,37	26,45	26,11	79 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
S2	Neg	Undetermined	26,23	26,11	92,02 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10

NoV GII

Campione	pos/neg	Ct campione	Ct campione + RNA-EC	Ct RNA-EC	efficienza amplificazione	commenti
L1	Pos	33,28	27,44	26,29	45,06 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L2	Pos	31,33	27,14	26,29	55,48 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L3	Neg	Undetermined	27,53	26,29	42,34 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L4	Neg	Undetermined	27,27	26,29	50,70 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L5	Pos	35,44	26,86	26,29	67,36 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L6	Neg	Undetermined	27,98	26,29	30,99 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
S1	Pos	33,18	29,42	26,29	11,42 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
S2	Neg	Undetermined	28,96	26,29	15,71 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10

FASE 3

Controllo di processo

Campione	Ct campione	Ct controllo processo	efficienza estrazione	commenti
S1	23,64	25,31	190,93 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di CP alla diluizione 1:10
S2	28,16	25,31	8,32 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di CP alla diluizione 1:10 Estrazione con "BioMérieux NucliSENS® System"
S2	23,86	25,31	163,92 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di CP alla diluizione 1:10 Estrazione con "QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)"

I risultati ottenuti con il kit di estrazione “QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)” relativamente a ciascuno dei tre virus target ricercati (HAV, Norovirus GI, Norovirus GII) sono stati simili (con differenze talvolta di 1 o 2 Ct) a quelli ottenuti estraendo i campioni con il metodo suggerito dai protocolli distribuiti dal LNR-virus dell’ISS (BioMérieux NucliSENS[®] System). *Pertanto tali esiti non sono stati presi in considerazione nell’elaborazione dei risultati del Ring Test e sono stati forniti al LNR-virus solo gli esiti ottenuti con il BioMérieux NucliSENS[®] System.*

I risultati ottenuti con il QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) relativamente al controllo di processo (Mengovirus) hanno presentato maggiore difformità (con differenze di 5 Ct) per il campione S2. Le efficienze di estrazione per tale campione con il “QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)” e con il “BioMérieux NucliSENS[®] System” sono state rispettivamente di 163,92% e 8,32%. *Pertanto, pur essendo troppo esigue le prove eseguite per trarre delle conclusioni significative, nella Tabella relativa al Controllo di Processo (CP) per il campione S2 sono stati riportati i risultati ottenuti con entrambi i metodi di estrazione.*

Tali difformità non sono state ritenute rilevanti ai fini del Report Finale del Circuito Interlaboratorio.

La relazione finale del Ring Test ha messo in evidenza che il nostro laboratorio ha dato: 8/8 (100%) risposte corrette per quanto riguarda il **target HAV**; 8/8 (100%) risposte corrette per quanto riguarda il **target NoV GI**; 8/8 (100%) risposte corrette per quanto riguarda il **target NoV GII**. Ottenendo, quindi, una *Sensibilità*, *Specificità* ed *Accuratezza* del 100%.

L’Accuratezza complessiva dei laboratori è stata 93,2% per HAV, 88,6% per NoV GI e 97,5% per NoV GII.

I risultati ottenuti sugli **standard a DNA HAV** e **NoV GI** forniti dal LNR-virus sono stati sovrapponibili ai valori di riferimento. Mentre per lo standard **NoV GII** si sono ottenuti degli esiti un leggermente più bassi del valore

atteso (con differenze di 1 logaritmo in base 10). I risultati ottenuti sugli standard possono essere utilizzati per valutare problemi di efficienza di amplificazione o di contaminazione delle reazioni. Gli scostamenti superiori alle due diluizioni decimali possono essere indicativi di problemi nella retrotrascrizione o nell'amplificazione. Il nostro laboratorio ha, quindi, ottenuto dei risultati che si sono sempre mantenuti all'interno del range di validità accettabile.

4.3.2 ESITI RING TEST REAL TIME RT-PCR PER LA DETERMINAZIONE DI NOVs E HAV NEI MOLLUSCHI BIVALVI RT03 – 2014

I **laboratori coinvolti** nel circuito inter-laboratorio 2014 sono stati 12.

Il nostro laboratorio, identificato con il n° “01”, ha eseguito il Ring Test sia per HAV che per NoV GI e GII.

Secondo indicazione della “ISO/TS 15216-2:2013: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection”, applicata integralmente nell’esecuzione di questo Ring Test, i campioni sono stati esaminati sia non diluiti che diluiti 1:10. *Pertanto sono stati forniti al LNR-virus gli esiti ottenuti da entrambe le concentrazioni dei campioni.*

Si riportano di seguito i risultati ottenuti dall’analisi dei campioni del Ring Test.

HAV (campione non diluito)

Campione	pos/neg	Ct campione	Ct campione + RNA-EC	Ct RNA-EC	efficienza amplificazione	commenti
L1	Pos	30,34	14,21	14,53	124,83 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
L2	Neg	Undetermined	14,95	14,53	74,74 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
L3	Neg	Undetermined	16,42	14,53	26,98 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
L4	Pos	35,15	14,66	14,53	91,38 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
L5	Neg	Undetermined	14,64	14,53	92,66 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
L6	Pos	35	14,41	14,53	108,67 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
S1	Neg	Undetermined	16,48	14,53	25,88 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
S2	Pos	32,33	14,79	14,53	83,51 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097

HAV (campione diluito 1:10)

Campione	pos/neg	Ct campione	Ct campione + RNA-EC	Ct RNA-EC	efficienza amplificazione	commenti
L1	Pos	33,74	14,65	14,53	92,02 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
L2	Neg	Undetermined	14,35	14,53	113,29 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
L3	Neg	Undetermined	15,10	14,53	67,36 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
L4	Pos	38,09	14,74	14,53	86,45 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
L5	Neg	Undetermined	14,77	14,53	84,67 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
L6	Pos	38,56	14,51	14,53	101,39 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
S1	Neg	Undetermined	15,08	14,53	68,30 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097
S2	Pos	34,73	14,62	14,53	93,95 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,097

NoV GI (campione non diluito)

Campione	pos/neg	Ct campione	Ct campione + RNA-EC	Ct RNA-EC	efficienza amplificazione	commenti
L1	Neg	Undetermined	14,65	14,89	118,09 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
L2	Neg	Undetermined	15,33	14,89	73,71 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
L3	Pos	26,94	16,11	14,89	42,93 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
L4	Pos	34,37	15,28	14,89	76,31 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
L5	Neg	Undetermined	15,21	14,89	80,11 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
L6	Pos	33,92	15,18	14,89	81,79 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
S1	Neg	Undetermined	16,14	14,89	42,04 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
S2	Pos	34,12	14,35	14,89	145,39 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02

NoV GI (campione diluito 1:10)

Campione	pos/neg	Ct campione	Ct campione + RNA-EC	Ct RNA-EC	efficienza amplificazione	commenti
L1	Neg	Undetermined	15,35	14,89	72,69 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
L2	Neg	Undetermined	14,97	14,89	94,61 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
L3	Pos	29,86	15,39	14,89	70,71 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
L4	Pos	39,84	15,11	14,89	85,86 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
L5	Neg	Undetermined	14,69	14,89	114,87 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
L6	Pos	37,92	15,21	14,89	80,11 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
S1	Neg	Undetermined	15,59	14,89	61,56 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02
S2	Pos	37,49	15,25	14,89	77,92 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,02

NoV GII (campione non diluito)

Campione	pos/neg	Ct campione	Ct campione + RNA-EC	Ct RNA-EC	efficienza amplificazione	commenti
L1	Neg	Undetermined	16,05	16,06	100,69 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L2	Neg	Undetermined	15,97	16,06	106,44 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L3	Pos	33,11	16,65	16,06	66,43 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L4	Pos	32,96	16,45	16,06	76,31 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L5	Neg	Undetermined	16,15	16,06	93,95 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L6	Pos	32,78	16,66	16,06	65,97 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
S1	Neg	Undetermined	18,04	16,06	25,35 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
S2	Pos	22,31	16,51	16,06	73,20 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10

NoV GII (campione diluito 1:10)

Campione	pos/neg	Ct campione	Ct campione + RNA-EC	Ct RNA-EC	efficienza amplificazione	commenti
L1	Neg	Undetermined	15,93	16,06	109,43 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L2	Neg	Undetermined	16,43	16,06	77,38 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L3	Pos	36,47	16,38	16,06	80,11 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L4	Pos	35,34	16,57	16,06	70,22 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L5	Neg	Undetermined	15,81	16,06	118,92 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
L6	Pos	35,18	16,24	16,06	88,27 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
S1	Neg	Undetermined	15,90	16,06	111,73 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10
S2	Pos	25,82	16,66	16,06	65,97 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,10

Controllo di processo (campione non diluito)

Campione	Ct campione	Ct controllo processo	efficienza estrazione	commenti
S1	35,88	29,51	0,72 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di CP alla diluizione 1:10
S2	33,60	29,51	3,54 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di CP alla diluizione 1:10

Controllo di processo (campione diluito 1:10)

Campione	Ct campione	Ct controllo processo	efficienza estrazione	commenti
S1	38,09	29,51	0,156 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di CP alla diluizione 1:10
S2	36,49	29,51	0,474 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di CP alla diluizione 1:10

Da un'analisi dei risultati ottenuti si evidenzia una considerevole azione inibente nel campione S1 sia nei confronti dei virus target ricercati (HAV, Norovirus GII) che, soprattutto, nei confronti del controllo di processo. Azione inibente che viene ad essere superata nel campione diluito 1:10, a scapito di eventuali basse positività del campione per uno dei parametri (come si può vedere dai valori di efficienza di estrazione ottenuti per il campione diluito 1:10).

La relazione finale del Ring Test ha messo in evidenza che il nostro laboratorio ha dato: 8/8 (100%) risposte corrette per il **target HAV**; 8/8 (100%) risposte corrette per il **target NoV GI**; 8/8 (100%) risposte corrette per il **target NoV GII**. Ottenendo, quindi, una *Sensibilità*, *Specificità* ed *Accuratezza* del 100%.

L'Accuratezza complessiva dei laboratori è stata 100% per HAV, 92.5% per NoVGI e 93.6% per NoVGII.

La percentuale di risultati falsamente negativi ottenuti complessivamente è stata del 6.5% per NoVGI e 4.3% per NoVGII. Risultati falsi positivi sono stati riscontrati nelle prove per la determinazione di NoVGI (1.1%) e NoVGII (2.1%).

4.3.3 ESITI RING TEST REAL TIME RT-PCR PER LA DETERMINAZIONE DI NOVs E HAV NEI MOLLUSCHI BIVALVI RT04 – 2015

I **laboratori coinvolti** nel circuito inter-laboratorio 2015 sono stati 12.

Il nostro laboratorio, identificato con il n° “01”, ha eseguito il Ring Test sia per HAV che per NoV GI e GII.

I campioni sono stati esaminati solo non diluiti.

Si riportano di seguito i risultati ottenuti dall’analisi dei campioni del Ring Test.

HAV (campione non diluito)

Campione	pos/neg	Ct campione	Ct campione + RNA-EC	Ct RNA-EC	efficienza amplificazione	commenti
<i>L1</i>	<i>Pos</i>	<i>30,17</i>	<i>14,99</i>	<i>14,81</i>	<i>88,27 %</i>	<i>Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008</i>
<i>L2</i>	<i>Pos</i>	<i>33,91</i>	<i>14,53</i>	<i>14,81</i>	<i>121,42 %</i>	<i>Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008</i>
<i>L3</i>	<i>Neg</i>	<i>Undetermined</i>	<i>14,88</i>	<i>14,81</i>	<i>95,26 %</i>	<i>Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008</i>
<i>L4</i>	<i>Neg</i>	<i>Undetermined</i>	<i>15,37</i>	<i>14,81</i>	<i>67,83 %</i>	<i>Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008</i>
<i>S1</i>	<i>Neg</i>	<i>Undetermined</i>	<i>15,09</i>	<i>14,81</i>	<i>82,36 %</i>	<i>Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008</i>
<i>S2</i>	<i>Pos</i>	<i>33,15</i>	<i>14,79</i>	<i>14,81</i>	<i>101,39 %</i>	<i>Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008</i>

NoV GI (campione non diluito)

Campione	pos/neg	Ct campione	Ct campione + RNA-EC	Ct RNA-EC	efficienza amplificazione	commenti
L1	Neg	Undetermined	14,69	15,34	156,92 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008
L2	Pos	35,17	14,71	15,34	154,76 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008
L3	Neg	Undetermined	14,62	15,34	164,72%	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008
L4	Pos	36,57	14,56	15,34	171,71 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008
S1	Neg	Undetermined	14,62	15,34	164,72%	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008
S2	Pos	38,59	14,62	15,34	164,72%	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008

NoV GII (campione non diluito)

Campione	pos/neg	Ct campione	Ct campione + RNA-EC	Ct RNA-EC	efficienza amplificazione	commenti
L1	Neg	Undetermined	17,98	17,99	100,69 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008
L2	Pos	34,11	17,78	17,99	115,67 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008
L3	Neg	Undetermined	18,19	17,99	87,05 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008
L4	Pos	33,88	18,75	17,99	59,05 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008
S1	Neg	Undetermined	17,99	17,99	100 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008
S2	Pos	35,75	17,78	17,99	115,67 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di EC Tal Quale (TQ). t applicata = 0,008

Controllo di processo (campione non diluito)

Campione	Ct campione	Ct controllo processo	efficienza estrazione	commenti
S1	36,91	27,89	0,116 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di CP alla diluizione 1:10
S2	37,43	27,89	0,0804 %	Per il calcolo è stato utilizzato il Ct di CP alla diluizione 1:10

La relazione finale del Ring Test ha messo in evidenza che il nostro laboratorio ha dato: 6/6 (100%) risposte corrette per il **target HAV**; 6/6 (100%) risposte corrette per il **target NoV GI**; 6/6 (100%) risposte corrette per il **target NoV GII**. Ottenendo, quindi, una *Sensibilità*, *Specificità* ed *Accuratezza* del 100%.

Per le sospensioni liquide l'accuratezza complessiva dei laboratori partecipanti è stata pari al 100% per HAV e NoVGI e del 97.9% per NoVGII; mentre per le prove su matrice mollusco è stata del 100% per HAV, 91.7% per NoVGI e 95.8% per NoVGII. Considerando il totale dei campioni esaminati l'accuratezza complessiva dei laboratori è stata del 100% per HAV e del 97.2 % per NoVGI e NoVGII.

La percentuale di risultati falsamente negativi ottenuti complessivamente è stata del 2.8% per NoVGI e 1.4% per NoVGII. Risultati falsi positivi sono stati riscontrati nelle prove per la determinazione di NoVGII (1.4%).

4.4 RISULTATI DELLE ANALISI

4.4.1 ANNO 2013

L'attività effettuata ha previsto la collezione e l'analisi di campioni provenienti dal campo, su cui sono state utilizzate le tecniche diagnostiche messe a punto e/o ottimizzate nel 2013.

La raccolta dei **campioni di MEL nel 2013** ha coinvolto le ASP di Messina e Siracusa, dalle quali sono pervenuti rispettivamente:

- 4 campioni di MEL;
- 23 campioni (12 da un centro di mitilicoltura e 11 provenienti dall'altro centro di mitilicoltura) di MEL;

per un totale di 27 campioni di *Mytilus galloprovincialis*.

Il Piano di Monitoraggio (D.D.S. 01091 del 13/06/2011) dei MEL nei due centri di mitilicoltura di Siracusa è iniziato **a maggio 2013** ed è stato eseguito in entrambi gli stabilimenti secondo la cadenza prestabilita fino al mese di ottobre, ad eccezione del mese di agosto durante il quale in uno dei due centri è stato effettuato un solo campionamento.

I campioni pervenuti da Messina provenivano tutti da uno stesso CDM/CSM e sono stati prelevati nel corso di indagini conoscitive ufficiali: 2 campioni sono stati prelevati nel mese di marzo; 1 campione nel mese di maggio (prima della immissione in mare di campioni di mitili provenienti da un allevamento classificato Zona A); 1 nel mese di luglio.

Sono stati, inoltre, analizzati 4 campioni **di acque salmastre** provenienti dalla provincia di Siracusa (2 per ciascun centro di mitilicoltura), prelevati fra aprile e luglio, ai fini della riclassificazione delle acque di un areale precedentemente classificato come Zona B. Dal mese di agosto in poi i campionamenti di acque degli allevamenti si sono interrotti, per problemi nell'effettuare i prelievi.

Sono stati, infine, analizzati 2 campioni di **acque condottate** provenienti dal comune di Santo Stefano di Quisquina (AG), dove nel 2011 si era verificata una epidemia da Norovirus probabilmente di origine idrica, al fine di valutare a distanza dall'epidemia le condizioni igienico sanitarie delle acque municipali.

In totale sono stati campionati 6 campioni di acque.

I genomi (RNA e DNA) virali sono stati ricercati nei campioni di MEL utilizzando sia il metodo di estrazione con le colonnine di affinità (RNA: QIAamp® Viral RNA Mini Kit – QIAGEN; DNA: DNeasy® Blood & Tissue Kit Dneasy Blood & Tissue Kit - QIAGEN) sia il metodo di estrazione magnetica (BioMérieux NucliSENS® System). Tutti gli estratti sono stati sottoposti ai *Protocolli 2013* (punto 3.7; da punto 3.7.1 a punto 3.7.5).

Gli esiti delle analisi effettuate nel 2013 sono riportati in **Tabella 4.5**. Come si può osservare, 2 campioni di MEL su 27 (7,4%) della provincia di Messina sono risultati positivi per NoV GII in Real Time RT-PCR, ma non in RT-PCR Classica “end-point” (Booster RT-PCR); ciò è ascrivibile, presumibilmente, alla differente sensibilità delle due metodiche. I campioni sono stati inviati all’Istituto Superiore di Sanità, che ha confermato le analisi. Nessun campione è risultato positivo per HAV e AdVs.

Verso la fine del 2014 e nel corso del 2015 sono state effettuate ulteriori analisi sui campioni di MEL del 2013, utilizzando le metodiche sviluppate nel 2014 (punto 3.7; da punto 3.7.6 a punto 3.7.11). Poiché i risultati delle prove di validazione del metodo “Semi-Nested RT-PCR per la ricerca dell’HAV (Metodo A)” hanno dimostrato che la tecnica di estrazione non influenza la performance della metodica, si è scelto di sottoporre a tali prove solo i genomi (RNA e DNA) ottenuti utilizzando il BioMérieux NucliSENS® System. Gli esiti di tali accertamenti diagnostici sono riportati in **Tabella 4.6**.

Tabella 4.5. Campioni Anno 2013 (Analisi 2013) – Protocolli 2013

Matrice	N. Campioni	Provincia	Comune	CSM	CDM	Semi-Nested RT-PCR HAV (Metodo A)	Real Time RT-PCR HAV	RT-PCR Booster NoVs	Real Time RT-PCR NoV GI	Real Time RT-PCR NoV GII	Nested PCR Adenovirus (Metodo A)
						(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)
Miti	4	ME	Messina	1	/	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	0/4
	23	SR	Siracusa	2	2	5/23	0/23	0/23	0/23	0/23	0/23
Acque	4	SR	Siracusa	2	2	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	2	AG	Santo Stefano di Quisquina	/	/	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Totale	33					5/33	0/33	0/33	0/33	2/33	0/33

Tabella 4.6. Campioni Anno 2013 (Analisi 2014-2015) - Protocolli 2014

Matrice	N. Campioni	Provincia	Comune	CSM	CDM	Nested RT-PCR HAV (Metodo B)	Semi-Nested RT-PCR NoV GI	Semi-Nested RT-PCR NoV GII	Nested RT-PCR NoV GIV	Nested RT-PCR HEV	Nested RT-PCR Enterovirus	Nested PCR Adenovirus (Metodo B)
						(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)
Mitili	4	ME	Messina	1	/	0/4	2/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	23	SR	Siracusa	2	2	10/23	3/23	1/23	0/23	0/23	3/23	1/23
Acque	4	SR	Siracusa	2	2	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	2	AG	Santo Stefano di Quisquina	/	/	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
<i>Totale</i>	33					10/33	5/33	3/33	0/33	0/33	3/33	1/33

L'utilizzo dei *Protocolli del 2014* ha permesso di evidenziare positività per diversi virus enterici che non erano stati rilevati con le metodiche precedentemente impiegate. Infatti, come si può osservare in **Tabella 4.6**, il **Virus dell'Epatite A** è stato riscontrato in 10 campioni di MEL su 27 (37,04%), tutte cozze provenienti dalla provincia di Siracusa. Di questi, solo 2 campioni sono risultati positivi per HAV con entrambi i metodi di preparazione, mentre 7 campioni positivi erano stati preparati con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀* e 1 con la Soluzione di *Proteinasi K*. Dall'analisi delle sequenze, 9 campioni sono stati classificati come **genotipo IB** e 1 campione come **genotipo IA**.

Per quanto riguarda i **NoVs**, 6 campioni di cozze su 27 sono risultati positivi (22,2%). In particolare, 3 campioni (11,1%) sono risultati positivi per **NoV GII**. Di questi 1 proveniva dalla provincia di Siracusa ed è risultato positivo per **NoV GII.1** (preparato con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀*). I due restanti campioni positivi provenivano dalla provincia di Messina, dallo stesso stabilimento in cui si era riscontrata la positività per **NoV GII** in Real Time RT-PCR nel 2013 (1 preparato con la Soluzione di *Proteinasi K* e 1 preparato con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀*). L'analisi di sequenza ha attribuito anche questi campioni alla variante **GII.1**.

Inoltre, 3 campioni di MEL della provincia di Siracusa (11,1%) e 2 campioni provenienti da Messina (7,41%) sono risultati positivi per **NoV GI**. Dei tre campioni **NoV GI** positivi di Siracusa, 2 sono stati identificati come **GI.2** (1 preparato con la Soluzione di *Proteinasi K* e 1 preparato con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀*) e 1 come **GI.3** (preparato con la Soluzione di *Proteinasi K*). L'analisi di sequenza dei due campioni positivi di Messina ha rilevato invece la presenza in un campione del **NoV GI.2** e nell'altro del **GI.9**; tali campioni erano gli stessi in cui era stato identificato anche il **NoV GII.1**.

Infine, in 3 campioni di MEL (11,1%) della provincia di Siracusa è stata evidenziata la presenza di **Enterovirus**, di questi 1 era stato preparato con la Soluzione di *Proteinasi K* e 2 con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀*. I tre campioni positivi per *Enterovirus* sono stati confermati dal sequenziamento come *Enterovirus* non-polio. Nel 2014 erano risultati positivi per *Enterovirus* inizialmente 5 campioni, ma a seguito del sequenziamento, effettuato nel 2015, due si sono rivelati dei falsi positivi. Non è stata possibile una

tipizzazione più accurata degli *Enterovirus* poiché la regione amplificata dalla metodica in uso è la 5'NTR ed il frammento che si ottiene è molto piccolo, consentendo di individuare con certezza solo l'appartenenza o meno ai poliovirus. Due dei tre campioni positivi per Enterovirus erano risultati positivi anche per HAV genotipo IB ed uno per NoV GI.2.

In 1 campione di MEL (3,7%) della provincia di Siracusa è stata riscontrata positività per **Adenovirus 40**, il campione era stato preparato con il metodo della *Proteinasi K*. Tale campione presentava contemporaneamente positività anche all'HAV genotipo IB e al NoV GI.2.

Non è stata rilevata alcuna positività per **HEV**.

I 6 campioni di acque sono risultati negativi per tutti gli agenti virali ricercati. In particolare, i risultati ottenuti dalle analisi condotte sui 2 campioni di acque condottate di S. Stefano di Quisquina, hanno consentito di confermare il ripristino delle caratteristiche igienico-sanitarie delle acque e sono state oggetto di pubblicazione ⁽¹³⁴⁾.

I campioni risultati positivi per HAV, EV e AdVs sono stati sottoposti ad accertamenti per verificare l'infettività dei virus inoculando l'aliquota preparata con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀* in monostrati cellulari permissivi, rispettivamente **FRhK-4**, **BGM** e **A549** secondo i protocolli precedentemente descritti (punto 3.9). Nessun virus è stato isolato in colture cellulari.

4.4.2 ANNO 2014

La raccolta dei **campioni di MEL nel 2014** ha coinvolto le ASP di Agrigento, Catania, Messina, Palermo, e Siracusa, dalle quali sono pervenuti complessivamente 24 campioni di MEL vivi (19 *Mytilus galloprovincialis*, 1 *Mytilus edulis*, 3 *Tapes semidecussatus*, 1 *Tapes venerupis decussata*).

Da Siracusa sono pervenuti 13 campioni di *Mytilus galloprovincialis* prelevati presso i centri di mitilicoltura oggetto del progetto.

Gli altri campioni erano stati conferiti per indagini conoscitive ufficiali ed erano stati prelevati:

- 4 (1 *Mytilus galloprovincialis*, 1 *Mytilus edulis*, 1 *Tapes semidecussatus*, 1 *Tapes venerupis decussata*) presso esercizi commerciali di Lampedusa (Agrigento) (tre depositi ingrosso/dettaglio ed una pescheria);
- 4 (*Mytilus galloprovincialis*) presso esercizi commerciali di Catania (un supermercato e tre pescherie; due pescherie delle quali commercializzavano mitili provenienti dallo stesso CDM/CSM di Messina in cui si era riscontrata la positività per NoVs nel corso del 2013);
- 2 (1 *Mytilus galloprovincialis* e 1 *Tapes semidecussatus*) presso un esercizio commerciale (punto vendita al dettaglio) di Palermo e 1 dal Posto di Ispezione Frontaliera (PIF) del porto di Palermo (*Tapes semidecussatus*).

In particolare, a seguito di segnalazione di casi di Epatite Virale A in soggetti soggiornanti a Lampedusa a luglio 2014, nel mese di settembre sono stati esaminati i MEL provenienti da quattro esercizi commerciali di Lampedusa e due esercizi commerciali di Palermo. Tutti i MEL esaminati provenivano dagli stessi stabilimenti di produzione (le cozze da Ferrara e le vongole da Foggia) che avevano fornito i MEL a Lampedusa durante il periodo epidemico.

Il Piano di Monitoraggio (D.D.S. 01091 del 13/06/2011) dei MEL nei due centri di mitilicoltura di Siracusa è iniziato a **maggio 2014** ed è stato eseguito in entrambi gli stabilimenti secondo la cadenza prestabilita, ad eccezione del mese di agosto durante il quale non stato effettuato alcun campionamento ed il mese di dicembre durante il quale è stato effettuato il campionamento solo in uno dei due centri.

Il campione prelevato dal PIF di Palermo risale al mese di febbraio ed era costituito da vongole provenienti dalla Tunisia.

L'unico altro campione di provenienza non nazionale era un campione di cozze di provenienza cilena prelevato nel mese di aprile da un esercizio commerciale di Catania.

Gli altri campioni provenienti dagli esercizi commerciali sono stati prelevati a maggio e settembre e provenivano, oltre che da Ferrara e Foggia, 2 da Messina (commercializzati a Catania) e 1 da Rovigo.

Nel corso dell'anno sono state condotte anche analisi su 4 **campioni di acque**. In particolare, sono stati analizzati tre campioni di acqua (1 del dissalatore e 2 di acqua di mare) prelevati a Lampedusa al fine di indagare in merito ad una eventuale origine idrica dell'epidemia da HAV di luglio.

Il quarto era un campione di acque superficiali prelevato dall'alveo del torrente "canale" a Delia (Caltanissetta) a seguito di un Procedimento Penale aperto per impiego ad uso irriguo di acque non controllate.

I genomi (RNA e DNA) virali sono stati ricercati nei campioni di MEL utilizzando sia il metodo di estrazione con le colonnine di affinità (RNA: QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit – QIAGEN; DNA: DNeasy[®] Blood & Tissue Kit Dneasy Blood & Tissue Kit - QIAGEN) sia il metodo di estrazione magnetica (BioMérieux NucliSENS[®] System). Tutti gli estratti sono stati sottoposti ai *Protocolli 2013*. Ai *Protocolli 2014*, effettuati in un secondo tempo (fra il 2014 ed il 2015), sono stati sottoposti solo i genomi (RNA e DNA) ottenuti utilizzando il metodo di estrazione con il BioMérieux NucliSENS[®] System.

Gli esiti delle analisi effettuate rispettivamente con i *Protocolli 2013* e con i *Protocolli 2014* sono riportati in **Tabella 4.7** e in **Tabella 4.8**.

Tabella 4.7. Campioni Anno 2014 (Analisi 2014-2015) - Protocolli 2013

Matrice	N. Campioni	Provincia	Comune	CSM	CDM	Semi-Nested RT-PCR HAV (Metodo A)	Real Time RT-PCR HAV	RT-PCR Booster NoVs	Real Time RT-PCR NoV GI	Real Time RT-PCR NoV GII	Nested PCR Adenovirus (Metodo A)
						(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)
Mitili	2	ME	Messina	1	/	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	13	SR	Siracusa	2	2	0/13	0/13	0/13	0/13	0/13	0/13
	4	AG	Lampedusa	/	/	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	2	CT	Catania	/	/	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	3	PA	Palermo	/	/	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Acque	1	CL	Delia	/	/	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1
	3	AG	Lampedusa	/	/	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Totale	28					0/28	0/28	1/28	0/28	1/28	0/28

Tabella 4.8. Campioni Anno 2014 (Analisi 2014-2015) - Protocolli 2014

Matrice	N. Campioni	Provincia	Comune	CSM	CDM	Nested RT-PCR HAV (Metodo B)	Semi-Nested RT-PCR NoV GI	Semi-Nested RT-PCR NoV GII	Nested RT-PCR NoV GIV	Nested RT-PCR HEV	Nested RT-PCR Enterovirus	Nested PCR Adenovirus (Metodo B)
						(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)	(Positivi/Totale)
Mitili	2	ME	Messina	2	/	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	13	SR	Siracusa	2	2	0/13	1/13	0/13	2/13	0/13	0/13	1/13
	4	AG	Lampedusa	/	/	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	2	CT	Catania	/	/	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2
	3	PA	Palermo	/	/	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Acque	1	CL	Delia	/	/	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	3	AG	Lampedusa	/	/	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Totale	28					0/28	2/28	2/28	2/28	0/28	1/28	1/28

Anche con i campioni del 2014, l'utilizzo dei *Protocolli del 2014* ha permesso di evidenziare positività per diversi virus enterici che non erano stati rilevati con i *Protocolli 2013*.

In 5 campioni su 24 (20,8%) di MEL è stata rilevata la presenza di **NoVs**. Il sequenziamento ha confermato come **NoV GII.1** un campione (4,2%) di vongole prelevato dal PIF del porto di Palermo proveniente dalla Tunisia (preparato con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀*) e come **NoV GIV.1** due campioni (8,3%) di cozze di Siracusa (1 preparato con la Soluzione di *Proteinasi K* e 1 preparato con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀*). In totale 2 campioni sono risultati positivi per **NoV GI** (8,3%): 1 campione di cozze proveniente da Siracusa (preparato con la Soluzione di *Proteinasi K*) è stato caratterizzato come **NoV GI.1**; mentre 1 campione di cozze prelevate dalla ASP di Catania, in una pescheria che commercializzava mitili provenienti dallo stesso CSM di Messina oggetto di positività per **NoVs** nel 2013, è risultato contemporaneamente positivo a **NoVs GI.2** e **GI.8** ad entrambi i metodi di preparazione.

Un campione (4,2%) della provincia di Catania è risultato positivo per **Enterovirus** in Nested RT-PCR ed è stato confermato dal sequenziamento come *Enterovirus* non-polio. Si tratta del campione di cozze di origine cilena preparato con la Soluzione di *Proteinasi K*.

Inoltre, 1 campione (4,2%) della provincia di Siracusa, preparato con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀*, è risultato positivo per **Adenovirus 40**.

Come si può osservare in **Tabella 4.7** e in **Tabella 4.8**, l'unico campione di acque superficiali esaminato è risultato positivo per Norovirus GII ed è stato inviato all'Istituto Superiore di Sanità, che ha confermato le analisi; dal sequenziamento è risultato essere un Norovirus **GII.4**.

Come si può osservare in **Tabella 4.7** e in **Tabella 4.8** nessun campione di MEL del 2014 era positivo per **HAV** e per **HEV**.

I 3 campioni di acque provenienti da Lampedusa sono risultati negativi per tutti gli agenti virali ricercati.

I campioni risultati positivi per EV e AdVs sono stati sottoposti ad accertamenti per verificare l'infettività dei virus inoculando i campioni preparati con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀* in monostrati cellulari permissivi,

rispettivamente **BGM** e **A549**, secondo i protocolli precedentemente descritti (punto 3.9). Nessun virus è stato isolato in colture cellulari.

4.4.3 ANNO 2015

Nel 2015 sono stati campionati solo 2 **campioni di MEL** dalla ASP di Palermo: 1 di vongole (*Tapes semidecussatus*) provenienti dalla Tunisia, prelevate nel mese di gennaio dal Posto di Ispezione Frontaliera (PIF) del porto di Palermo; 1 di cozze (*Mytilus galloprovincialis*) campionato presso un supermercato di Palermo in Agosto 2015, a seguito di segnalazione di Epatite Virale A in soggetti, presumibilmente causato dal consumo di mitili acquistati presso tale rivenditore. Entrambi i campioni sono stati esaminati sia con i protocolli del 2013 che con quelli del 2014 e sono risultati negativi per tutti gli agenti virali ricercati.

Nonostante le prove di comparazione dei metodi di estrazione già effettuate, anche nel 2015 i genomi (RNA e DNA) virali sono stati ottenuti dai due campioni di MEL dell'anno utilizzando sia il metodo di estrazione con le colonnine di affinità (RNA: QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit – QIAGEN; DNA: DNeasy[®] Blood & Tissue Kit Dneasy Blood & Tissue Kit - QIAGEN) sia il metodo di estrazione magnetica (BioMérieux NucliSENS[®] System), questo per mantenere invariate le condizioni sperimentali su tutti i campioni oggetto di studio. Tutti gli estratti sono stati sottoposti ai *Protocolli 2013*. Ai *Protocolli 2014* sono stati sottoposti solo i genomi (RNA e DNA) ottenuti utilizzando il metodo di estrazione con il BioMérieux NucliSENS[®] System.

Per aumentare la casistica e valutare un diverso periodo di campionamento, sono stati analizzati con le metodiche messe a punto nel 2014 anche 11 campioni di MEL del 2012 che erano stati sottoposti ad accertamenti diagnostici per HAV e NoVs con metodiche differenti da quelle oggetto del presente studio risultando negativi. I campioni del 2012 erano stati prelevati fra il mese di marzo ed il mese di dicembre ed erano costituiti da 9 campioni di *Mytilus galloprovincialis* provenienti da Siracusa dagli stessi CDM/CSM oggetto di studio (6 da un centro di mitilicoltura e 3 dall'altro centro di mitilicoltura) e 2 campioni di *Tapes semidecussatus* provenienti dalla Tunisia, prelevate dal Posto di Ispezione Frontaliera (PIF) del porto di Palermo.

I genomi (RNA e DNA) virali sono stati ottenuti dai campioni del 2012 solo utilizzando il BioMérieux NucliSENS[®] System.

Tali campioni 2012 sono stati analizzati solo con i *Protocolli 2014*, gli esiti sono riportati in ***Tabella 4.9***.

Tabella 4.9. Campioni Anno 2012 (Analisi 2015) - Protocolli 2014

Matrice	N. Campioni	Provincia	Comune	CSM	CDM	Nested RT-PCR HAV (Metodo B)	Semi-Nested RT-PCR NoV GI	Semi-Nested RT-PCR NoV GII	Nested RT-PCR NoV GIV	Nested RT-PCR HEV	Nested RT-PCR Enterovirus	Nested PCR Adenovirus (Metodo B)
						<i>(Positivi/Totale)</i>	<i>(Positivi/Totale)</i>	<i>(Positivi/Totale)</i>	<i>(Positivi/Totale)</i>	<i>(Positivi/Totale)</i>	<i>(Positivi/Totale)</i>	<i>(Positivi/Totale)</i>
Miti	9	SR	Siracusa	2	2	2/9	4/9	0/9	1/9	0/9	2/9	0/9
	2	PA	Palermo	/	/	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2
<i>Totale</i>	<i>11</i>					3/11	5/11	0/11	1/11	0/11	3/11	0/11

Come si può osservare in *Tabella 4.9*, il **Virus dell'Epatite A** è stato riscontrato in 3 campioni di MEL su 11 (27,3%), tutti preparati con la Soluzione di *Proteinasi K*. Dei tre campioni positivi 2 erano campioni di cozze provenienti dalla provincia di Siracusa e 1 di vongole di origine tunisina. Dall'analisi delle sequenze sono stati classificati tutti come **genotipo IB**.

Per quanto riguarda i **NoVs**, 5 campioni di MEL su 11 (45,4%) sono risultati positivi per **NoV GI**. Di questi 4 erano campioni di cozze provenienti dalla provincia di Siracusa, 3 sono risultati al sequenziamento NoV **GI.2** (2 preparati con la Soluzione di *Proteinasi K* e 1 preparato con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀*) e 1 campione (preparato pure con la Soluzione di *Proteinasi K*) è risultato **GI.3**. Uno dei quattro campioni è risultato contemporaneamente positivo a **GI.2** e **GIV.1**. Il quinto campione è risultato contemporaneamente positivo a **GI.2** e all'HAV genotipo **IB**.

Inoltre, 3 campioni (27,3%) sono risultati positivi per **Enterovirus** in Nested RT-PCR. Due erano campioni di cozze della provincia di Siracusa (1 preparato con la Soluzione di *Proteinasi K* e 1 con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀*) e uno era costituito da vongole provenienti dalla Tunisia preparate con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀*. Tutti i campioni positivi per *Enterovirus* sono stati confermati dal sequenziamento come *Enterovirus* non-polio.

Non è stata riscontrata alcuna positività per **HEV**.

I campioni risultati positivi per HAV e EV sono stati sottoposti ad accertamenti per verificare l'infettività dei virus inoculando i campioni preparati con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀* in monostrati cellulari permissivi, rispettivamente **FRhK-4** e **BGM** secondo i protocolli precedentemente descritti (punto 3.9). Nessun virus è stato isolato in colture cellulari.

4.4.4 ESITI GLOBALI (2012-2015)

Avendo utilizzato due diverse tecniche di preparazione dei campioni (metodo Soluzione di *Proteinasi K* e metodo *glicina*-PEG₈₀₀₀), sono stati analizzati complessivamente 128 preparati di MEL, sottoposti a 384 estrazioni genomiche (128 estrazioni effettuate mediante silice magnetica e 256 estrazioni effettuate mediante colonnine di affinità, rispettivamente 128 per l'RNA e 128 per il DNA), rappresentative di 64 campioni raccolti dal 2012 al 2015. L'indagine ha interessato 7 diversi patogeni (HAV, NoV GI, NoV GII, NoV GIV, Enterovirus, HEV, Adenovirus). I risultati di tali analisi sono mostrati in **Tabella 4.10**.

Sono state analizzate, inoltre, per gli stessi patogeni, 30 estrazioni genomiche di acque (10 estrazioni effettuate mediante silice magnetica e 20 estrazioni effettuate mediante colonnine di affinità, rispettivamente 10 per l'RNA e 10 per il DNA), rappresentative di 10 campioni raccolti nel 2013 e nel 2014, tutte risultate negative per i parametri ricercati.

I dati ottenuti sui campioni HAV positivi del 2012 e del 2013 sono stati pubblicati di recente nell'ambito di uno studio su matrici idriche e mitili⁽¹⁶⁸⁾, nessun campione del 2014 e del 2015 è risultato positivo per HAV.

Gli alberi filogenetici dei MEL positivi per HAV e per NoVs sono riportati rispettivamente in **Figura 4.3** e **Figura 4.4**. Ciascun cluster comprende, oltre alle sequenze ottenute nel presente studio anche sequenze di riferimento ricavate da GenBank.

Per ottenere l'albero degli HAV positivi, le relazioni filogenetiche delle sequenze ottenute sono state elaborate insieme a 21 sequenze di HAV genotipo IB, 12 sequenze di HAV genotipo IA, 2 sequenze HAV genotipo II (un IIA e un IIB) e 3 sequenze di HAV genotipo III (due IIIA e un IIIB); alcune erano sequenze prototipo di ciascuna variante dell'HAV depositate in GenBank, altre derivavano da lavori su reflui o casi clinici^(219, 338).

Per ottenere l'albero dei NoVs, le relazioni filogenetiche delle sequenze ottenute sono state elaborate insieme a 9 sequenze di referenza di NoV GI e 17 sequenze di referenza di NoV GII.

Per l'analisi di sequenza è stato utilizzato il software MEGA versione 6.0 (375).

Tabella 4.10. Risultati delle analisi genetiche qualitative dei campioni di MEL campionati nel periodo 2012-2015

Identificativo	Sito Prelievo	Data Prelievo	Estrazione	HAV	NoV GI	NoV GII	NoV GIV	EVs	HEV	AdVs
Z2_19552	Allevamento Cozze	Marzo, 2012	glicina	neg	NoV-GI.2	neg	neg	Non-polio EV	neg	neg
Z3_19552	Allevamento Cozze	Marzo, 2012	pk	neg	neg	neg	NoV-GIV.1	neg	neg	neg
Z4_34558	Vongole Tunisia (PIF)	Maggio, 2012	glicina	neg	NoV-GI.2	neg	neg	neg	neg	neg
Z5_34558	Vongole Tunisia (PIF)	Maggio, 2012	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z6_34751	Allevamento Cozze	Maggio, 2012	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z7_34751	Allevamento Cozze	Maggio, 2012	pk	neg	neg	neg	neg	Non-polio EV	neg	neg
Z8_40365	Allevamento Cozze	Giugno, 2012	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z9_40365	Allevamento Cozze	Giugno, 2012	pk	neg	NoV-GI.3	neg	neg	neg	neg	neg
Z10_50969	Allevamento Cozze	Luglio, 2012	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z11_50969	Allevamento Cozze	Luglio, 2012	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z12_50972	Allevamento Cozze	Luglio, 2012	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z13_50972	Allevamento Cozze	Luglio, 2012	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z14_56093	Allevamento Cozze	Agosto, 2012	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z15_56093	Allevamento Cozze	Agosto, 2012	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z16_56104	Allevamento Cozze	Agosto, 2012	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z17_56104	Allevamento Cozze	Agosto, 2012	pk	neg	NoV-GI.2	neg	neg	neg	neg	neg
Z18_72098	Allevamento Cozze	Ottobre, 2012	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z19_72098	Allevamento Cozze	Ottobre, 2012	pk	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z20_76830	Allevamento Cozze	Novembre, 2012	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z21_76830	Allevamento Cozze	Novembre, 2012	pk	HAV-IB	NoV-GI.2	neg	neg	neg	neg	neg
Z22_88518	Vongole Tunisia (PIF)	Dicembre, 2012	glicina	neg	neg	neg	neg	Non-polio EV	neg	neg
Z23_88518	Vongole Tunisia (PIF)	Dicembre, 2012	pk	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z59_20217	CDM/CSM Cozze	Marzo, 2013	glicina	neg	neg	NoV-GII	neg	neg	neg	neg
Z58_20217	CDM/CSM Cozze	Marzo, 2013	pk	neg	NoV-GI.2	NoV-GII.1	neg	neg	neg	neg

Identificativo	Sito Prelievo	Data Prelievo	Estrazione	HAV	NoV GI	NoV GII	NoV GIV	EVs	HEV	AdVs
Z60_20247	CDM/CSM Cozze	Marzo, 2013	glicina	neg	NoV-GI.9	NoV-GII.1	neg	neg	neg	neg
Z61_20247	CDM/CSM Cozze	Marzo, 2013	pk	neg	neg	NoV-GII	neg	neg	neg	neg
Z77_30530	Allevamento Cozze	Maggio, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z76_30530	Allevamento Cozze	Maggio, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z53_32744	Allevamento Cozze	Maggio, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z52_32744	Allevamento Cozze	Maggio, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z46_33604	CDM/CSM Cozze	Maggio, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z47_33604	CDM/CSM Cozze	Maggio, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z55_34652	Allevamento Cozze	Maggio, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z54_34652	Allevamento Cozze	Maggio, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z71_36816	Allevamento Cozze	Maggio, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z70_36816	Allevamento Cozze	Maggio, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z73_40029	Allevamento Cozze	Giugno, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z72_40029	Allevamento Cozze	Giugno, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z56_42413	Allevamento Cozze	Giugno, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z57_42413	Allevamento Cozze	Giugno, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z78_44456	Allevamento Cozze	Giugno, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z79_44456	Allevamento Cozze	Giugno, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z50_45333	Allevamento Cozze	Giugno, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z51_45333	Allevamento Cozze	Giugno, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z48_47285	Allevamento Cozze	Luglio, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z49_47285	Allevamento Cozze	Luglio, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z64_48741	CDM/CSM Cozze	Luglio, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z65_48741	CDM/CSM Cozze	Luglio, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z75_48881	Allevamento Cozze	Luglio, 2013	glicina	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z74_48881	Allevamento Cozze	Luglio, 2013	pk	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Identificativo	Sito Prelievo	Data Prelievo	Estrazione	HAV	NoV GI	NoV GII	NoV GIV	EVs	HEV	AdVs
Z62_50578	Allevamento Cozze	Luglio, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z63_50578	Allevamento Cozze	Luglio, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z69_52339	Allevamento Cozze	Luglio, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z68_52339	Allevamento Cozze	Luglio, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z66_53595	Allevamento Cozze	Agosto, 2013	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z67_53595	Allevamento Cozze	Agosto, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z24_58859	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	glicina	neg	NoV-GI.2	neg	neg	neg	neg	Z24_58859
Z25_58859	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	Non-polio EV	neg	Z25_58859
Z26_58862	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	glicina	HAV-IA	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z27_58862	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z28_60310	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	glicina	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z29_60310	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	pk	HAV-IB	NoV-GI.3	neg	neg	neg	neg	neg
Z30_62244	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	glicina	HAV-IB	neg	neg	neg	Non-polio EV	neg	neg
Z31_62244	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z32_63796	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	glicina	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z33_63796	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z34_65679	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	glicina	HAV-IB	neg	neg	neg	Non-polio EV	neg	neg
Z35_65679	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	pk	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z36_67822	Allevamento Cozze	Ottobre, 2013	glicina	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z37_67822	Allevamento Cozze	Ottobre, 2013	pk	neg	NoV-GI.2	neg	neg	neg	neg	AdV-40
Z38_70010	Allevamento Cozze	Ottobre, 2013	glicina	neg	neg	NoV-GII.1	neg	neg	neg	neg
Z39_70010	Allevamento Cozze	Ottobre, 2013	pk	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z40_72272	Allevamento Cozze	Ottobre, 2013	glicina	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z41_72272	Allevamento Cozze	Ottobre, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Identificativo	Sito Prelievo	Data Prelievo	Estrazione	HAV	NoV GI	NoV GII	NoV GIV	EVs	HEV	AdVs
Z42_74227	Allevamento Cozze	Ottobre, 2013	glicina	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z43_74227	Allevamento Cozze	Ottobre, 2013	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z44_8051	Vongole Tunisia (PIF)	Febbraio, 2014	glicina	neg	neg	NoV-GII.1	neg	neg	neg	neg
Z45_8051	Vongole Tunisia (PIF)	Febbraio, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z80_29883	Cozze Supermercato	Aprile, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z81_29883	Cozze Supermercato	Aprile, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	Non-polio EV	neg	neg
Z82_31216	Cozze Pescheria (ME)	Maggio, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z83_31216	Cozze Pescheria (ME)	Maggio, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z84_32061	Cozze Pescheria (ME)	Maggio, 2014	glicina	neg	NoV-GI.2	neg	neg	neg	neg	neg
Z85_32061	Cozze Pescheria (ME)	Maggio, 2014	pk	neg	NoV-GI.8	neg	neg	neg	neg	neg
Z86_32867	Cozze Pescheria (CT)	Maggio, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z87_32867	Cozze Pescheria (CT)	Maggio, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z88_35331	Allevamento Cozze	Maggio, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z89_35331	Allevamento Cozze	Maggio, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z90_37535	Allevamento Cozze	Maggio, 2014	glicina	neg	neg	neg	NoV-GIV.1	neg	neg	neg
Z91_37535	Allevamento Cozze	Maggio, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z92_41187	Allevamento Cozze	Giugno, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z93_41187	Allevamento Cozze	Giugno, 2014	pk	neg	NoV-GI.1	neg	neg	neg	neg	neg
XXX1_44904	Allevamento Cozze	Giugno, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
XXX2_44904	Allevamento Cozze	Giugno, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z94_48583	Allevamento Cozze	Luglio, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z95_48583	Allevamento Cozze	Luglio, 2014	pk	neg	neg	neg	NoV-GIV.1	neg	neg	neg
Z96_50356	Allevamento Cozze	Luglio, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	AdV-40
Z97_50356	Allevamento Cozze	Luglio, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Identificativo	Sito Prelievo	Data Prelievo	Estrazione	HAV	NoV GI	NoV GII	NoV GIV	EVs	HEV	AdVs
Z98_62470	Vongole Deposito (AG)	Settembre, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z99_62470	Vongole Deposito (AG)	Settembre, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z100_62474	Cozze Deposito (AG)	Settembre, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z101_62474	Cozze Deposito (AG)	Settembre, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z102_62477	Cozze Pescheria (AG)	Settembre, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z103_62477	Cozze Pescheria (AG)	Settembre, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z104_62480	Vongole Deposito (AG)	Settembre, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z105_62480	Vongole Deposito (AG)	Settembre, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z106_63150	Allevamento Cozze	Settembre, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z107_63150	Allevamento Cozze	Settembre, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z108_64412	Cozze Dettaglio (PA)	Settembre, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z109_64412	Cozze Dettaglio (PA)	Settembre, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z110_64413	Vongole Dettaglio (PA)	Settembre, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z111_64413	Vongole Dettaglio (PA)	Settembre, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z112_67311	Allevamento Cozze	Settembre, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z113_67311	Allevamento Cozze	Settembre, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z114_71563	Allevamento Cozze	Ottobre, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z115_71563	Allevamento Cozze	Ottobre, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z116_76329	Allevamento Cozze	Ottobre, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z117_76329	Allevamento Cozze	Ottobre, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z118_80740	Allevamento Cozze	Novembre, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z119_80740	Allevamento Cozze	Novembre, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z120_85436	Allevamento Cozze	Novembre, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z121_85436	Allevamento Cozze	Novembre, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Identificativo	Sito Prelievo	Data Prelievo	Estrazione	HAV	NoV GI	NoV GII	NoV GIV	EVs	HEV	AdVs
Z122_90159	Allevamento Cozze	Dicembre, 2014	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z123_90159	Allevamento Cozze	Dicembre, 2014	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z124_1287	Vongole Tunisia (PIF)	Gennaio, 2015	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z125_1287	Vongole Tunisia (PIF)	Gennaio, 2015	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
XXX3_36916	Cozze Supermercato	Agosto, 2015	glicina	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
XXX4_36916	Cozze Supermercato	Agosto, 2015	pk	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

glicina = estrazione con il metodo *glicina*-PEG₈₀₀₀

pk = estrazione con la Soluzione di *Proteinasi K*

Figura 4.3. Albero filogenetico costruito nella regione codificante la giunzione VP1/2A (Metodo B, 267 bp) che mostra la relazione fra le sequenze ottenute dai MEL positivi per HAV e sequenze depositate in GenBank. I campioni sono riportati con l'identificativo seguito dalla tipologia di MEL e dalla data di prelievo

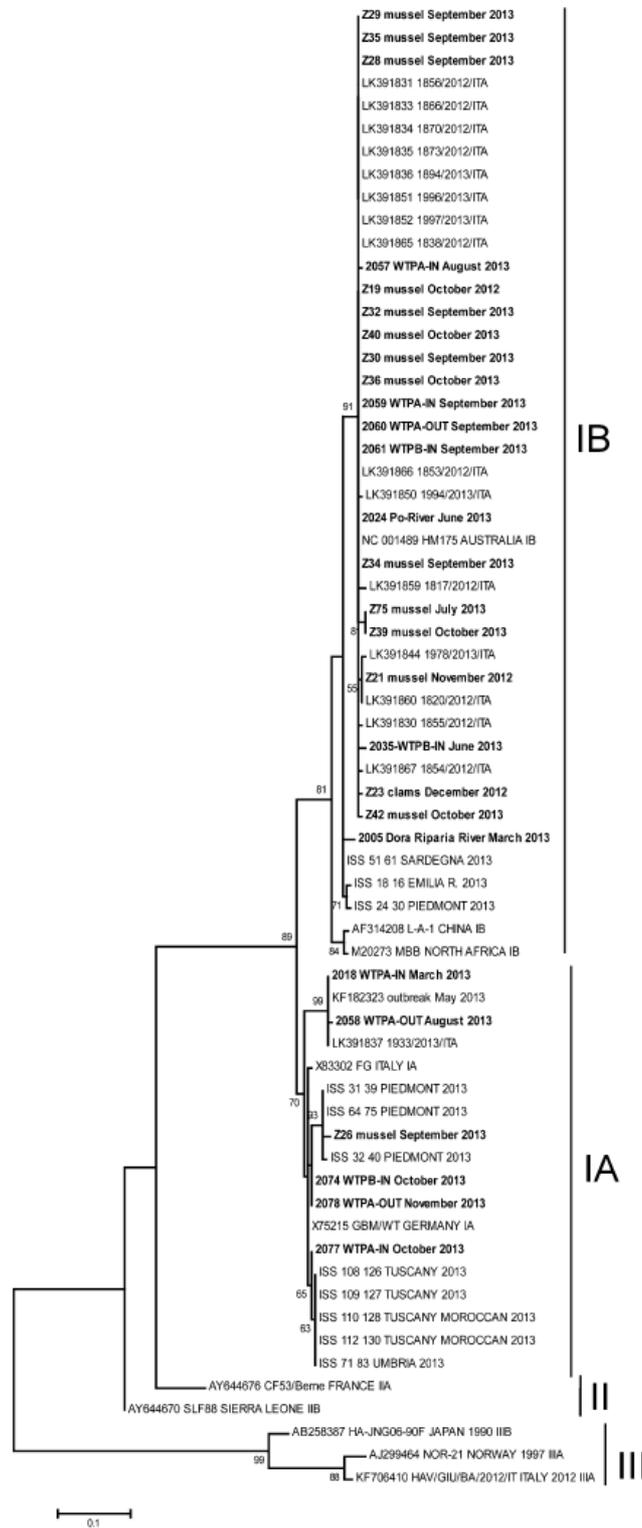
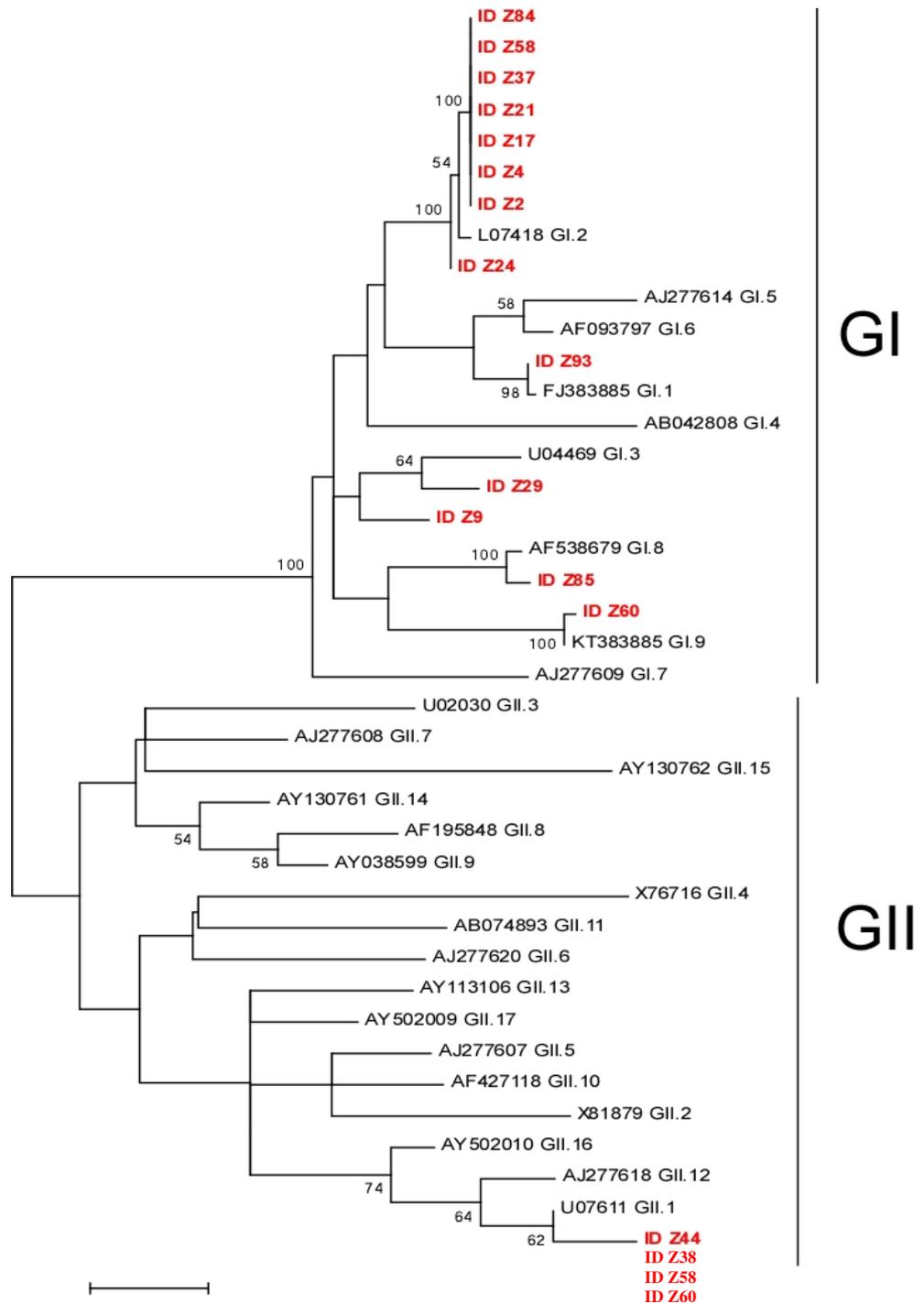


Figura 4.4. Albero filogenetico costruito nella regione codificante per la RNA Polimerasi RNA-dipendente (RdRp) (NoV GI e NoV GII rispettivamente 188 bp e 237 bp) che mostra la relazione fra le sequenze ottenute dai MEL positivi per NoV GI e NoV GII e sequenze depositate in GenBank. I campioni (ID seguito dall'identificativo) sono in rosso



Capitolo 5

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Il progetto si proponeva inizialmente di ricercare nei MEL soltanto il Virus dell'Epatite A ed i *Norovirus*, ma nel corso dello stesso si è stabilito di ampliare lo screening anche ad altri virus enterici potenzialmente trasmissibili con gli alimenti: *Enterovirus*, Virus dell'Epatite E e *Adenovirus*.

Ai fini dell'attività di monitoraggio sono stati selezionati 2 centri di mitilicoltura in provincia di Siracusa ricadenti nello stesso specchio d'acqua, che sono contemporaneamente centri di mitilicoltura, CDM e CSM. Sono stati anche esaminati tutti i campioni di MEL pervenuti per accertamenti di routine da parte della Polizia Giudiziaria, da Posti d'Ispezione Frontaliera (PIF) e da punti vendita all'ingrosso ed al dettaglio.

Inoltre, per valutare le condizioni ambientali in cui tali MEL venivano allevati, sono state analizzate anche le acque marine di allevamento in cui ricadono i due centri di mitilicoltura, selezionati all'inizio dello studio per le loro caratteristiche produttive. Sono stati, altresì, saggiati campioni di acque superficiali e municipali, pervenute per indagini conoscitive ufficiali in cui si voleva indagare in merito alla presenza o meno di virus enterici, a seguito di probabile contaminazione di origine fecale.

Nel corso dello studio sono stati esaminati in totale 64 campioni di MEL (56 *Mytilus galloprovincialis*, 1 *Mytilus edulis*, 6 *Tapes semidecussatus* e 1 *Tapes venerupis decussata*) e 10 campioni di acque (6 di mare, 2 potabili condottate, 1 proveniente da un dissalatore ed 1 di torrente).

Ulteriore obiettivo del progetto è stata la messa a punto di metodi biomolecolari sia di RT-PCR/PCR tradizionale di tipo "end point" (per tutti i virus enterici oggetto di studio) che di Real Time RT-PCR (per HAV e *Norovirus* GI e GII) e l'applicazione di essi ai campioni raccolti. Complessivamente sono stati standardizzati e provati 13 differenti protocolli di lavoro, 10 di RT-PCR/PCR tradizionale "end point" ed 3 di Real Time RT-PCR. In particolare sono stati sviluppati 6 *Protocolli nel 2013* e 7 *Protocolli nel 2014*. I Protocolli 2014 si sono rivelati più idonei e sensibili nel rilevare le positività nei campioni di MEL esaminati. Le discrepanze osservate potrebbero essere ascrivibili ai diversi target genici indagati dalle varie tecniche diagnostiche, infatti come già riscontrato in precedenti studi, spesso un solo metodo non è in grado di rilevare tutti i campioni positivi ^(220, 395).

Per tenere sotto controllo e valutare le performance operative e la riproducibilità interlaboratorio si è partecipato a tre Proficiency Tests eseguiti con le Metodiche Real Time, organizzati dal Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali dei molluschi bivalvi (LNR-virus), ISS – Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, ottenendo sempre il 100% di risultati conformi per tutti e tre i parametri analizzati (HAV, NoV GI, NoV GII).

Avendo utilizzato due diverse tecniche di preparazione dei campioni (metodo Soluzione di *Proteinasi K* e metodo *glicina-PEG₈₀₀₀*), sono stati analizzati complessivamente 128 preparati di MEL. Inoltre, i genomi (RNA e DNA) virali sono stati ricercati in tutti i campioni di MEL utilizzando sia il metodo di estrazione con le colonnine di affinità (RNA: QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit – QIAGEN; DNA: DNeasy[®] Blood & Tissue Kit Dneasy Blood & Tissue Kit - QIAGEN) che il metodo di estrazione magnetica (BioMérieux NucliSENS[®] System), per un totale di 384 estratti genomici.

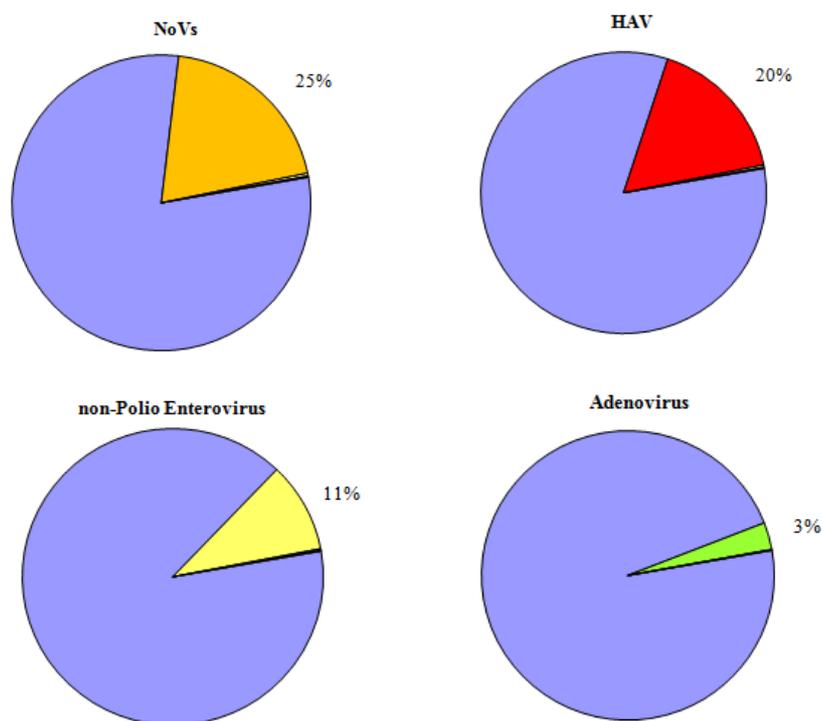
Tutti e 384 gli estratti dei campioni di MEL sono stati sottoposti ai *Protocolli 2013*. Mentre i *Protocolli 2014* sono stati applicati solo ai 128 estratti ottenuti con il metodo di estrazione magnetica, questo perchè le prove di validazione della “*Semi-Nested RT-PCR per la ricerca dell’HAV (Metodo A)*”, condotte nel 2014, hanno messo in evidenza che non vi era differenza negli esiti ottenuti dai due metodi di estrazione genomica.

Già altri Autori avevano impiegato l’uno o l’altro metodo di estrazione nella ricerca di virus enterici in matrici alimentari ^(45, 346, 370).

I risultati delle diverse tecniche di biologia molecolare, pur essendo discordanti fra loro, hanno consentito di rilevare complessivamente la presenza di virus enterici in 38/128 aliquote analizzate (pari al 29,7%), corrispondente a 28/64 campioni di MEL analizzati (pari al 43,7%).

Di questi 64 campioni, 16 (25%) sono risultati positivi per *Norovirus*, 13 (20,3%) sono risultati positivi per il Virus dell’Epatite A, 7 (10,9%) sono risultati positivi per *Enterovirus* non-polio e 2 (3,1%) per *Adenovirus* 40 (specie enterica F) (**Figura 5.1**). In 10 campioni di MEL (15,6%) sono state evidenziate positività multiple per due virus e in 2 campioni (3,1%) sono state evidenziate positività per tre virus. In nessun campione di molluschi è stato riscontrato il Virus dell’Epatite E.

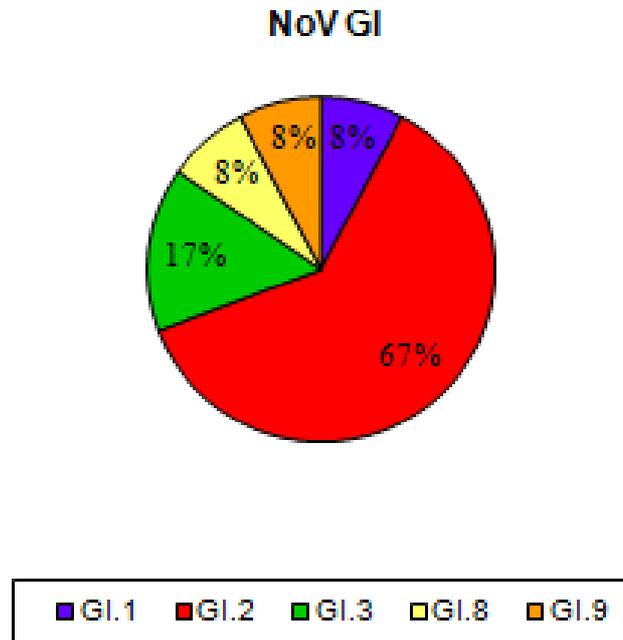
Figura 5.1. Positività per virus enterici nei MEL (2012-2015)



Nell'ambito dei positivi per HAV è stato identificato il solo genotipo I con una netta prevalenza del sub-genotipo IB (12/13 positivi) rispetto al sub-genotipo IA. Le positività sono state riscontrate solo in campioni prelevati nel 2013 e, in misura minore, nel 2012. I risultati relativi alla ricerca del virus dell'epatite A sono stati pubblicati di recente nell'ambito di uno studio su matrici idriche e mitili ⁽¹⁶⁸⁾.

Una maggiore eterogeneità di profili genetici è stata registrata per i NoVs, per i quali sono state rilevate positività nei campioni di MEL prelevati nel 2012, nel 2013 e nel 2014. Le analisi condotte hanno, infatti, permesso di rilevare la presenza dei genogruppi GI (12 campioni), GII (4 campioni) e GIV (3 campioni). Un campione è risultato contemporaneamente positivo per GI e GIV e due per GI e GII, inoltre in un campione è stata riscontrata contemporaneamente positività per NoV GI.2 e GI.8. Nell'ambito del genogruppo GI sono stati individuati profili ascrivibili a cinque differenti genotipi (GI.1, GI.2, GI.3, GI.8, GI.9), dei quali il più frequente è stato il GI.2. I genogruppi GII e GIV sono rappresentati da un unico genotipo, rispettivamente GII.1 e GIV.1. In particolare, per quanto riguarda il genogruppo GI, i genotipi rilevati erano così distribuiti: GI.2 (8 campioni, di cui 1 positivo anche a GII.1; 66,7%), GI.3 (2 campioni; 16,7%), GI.1 (1 campione; 8,3%), GI.8 (1 campione, positivo anche per GI.2; 8,3%), GI.9 (1 campione, positivo anche per GII.1; 8,3%) (**Figura 5.2**).

Figura 5.2. Diversità dei genotipi di NoV GI tra il 2012 e il 2015 in Sicilia



Anche per i 10 campioni di acque sono stati utilizzati entrambi i metodi di estrazione (colonnine di affinità ed estrazione magnetica), ottenendo in totale 30 estratti genomici. Soltanto nel campione di acque dolci superficiali è stata rilevata la presenza di virus enterici, registrando la positività per *Norovirus* GI.4.

Non è stato possibile isolare nei monostrati cellulari nessuno dei virus osservati con i metodi di biologia molecolare.

A parità di metodo analitico biomolecolare, sono stati ottenuti dei risultati differenti in funzione della modalità di preparazione del campione (metodo Soluzione di *Proteinasi K* o metodo *glicina-PEG₈₀₀₀*), infatti in alcuni casi erano positivi i campioni preparati con la *Proteinasi K*, in altri casi quelli preparati con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀* ed in poche occasioni si otteneva positività con entrambi i metodi di preparazione.

Allo scopo di verificare se la differenza fra il numero di positivi ottenuti con un metodo di preparazione e quello ottenuto con l'altro metodo è dovuta al caso oppure no, ossia per verificare se vi era una differenza significativa fra i due metodi di preparazione del campione, è stato effettuato il test statistico del chi-quadro (X^2) su tutti e 64 i campioni esaminati, utilizzando come parametri l'evento "esito positivo" e l'evento "esito negativo", indipendentemente dall'agente eziologico (HAV, NoVs, AdVs, EVs) nei

confronti del quale era stata riscontrata la positività. Avendo ottenuto un valore del chi-quadro pari a 6,886, con un p-value = 0,009, si può asserire che vi è associazione tra i due metodi di preparazione e che quindi la differenza degli esiti ottenuti con i due metodi è significativa al 95% di probabilità ($p < 0,05$), ossia il numero complessivo delle positività ottenute su estratti derivanti da campioni pretrattati con la Soluzione di *Proteinasi K* o con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀* non è dovuto al caso, ma il trattamento con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀* sembrerebbe individuare un numero maggiore di positività rispetto all'impiego della Soluzione di *Proteinasi K*.

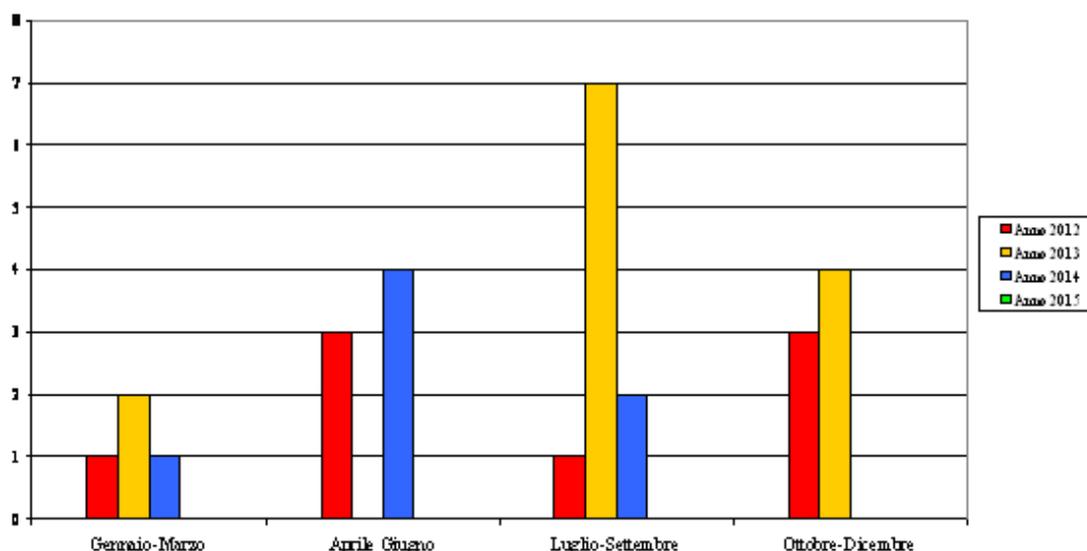
Lo stesso tipo di valutazione statistica è stata condotta considerando separatamente la positività per NoVs, per HAV, per EVs e per AdVs. Nel caso dei campioni positivi per NoVs è stato ottenuto un un valore del chi-quadro, con la correzione di continuità di Yates (che si applica quando una o più celle hanno una frequenza attesa inferiore a 5), pari a 3,47, con un p-value = 0,0627, quindi in conclusione si può asserire che non vi è alcuna associazione tra i due metodi di preparazione e che quindi la differenza degli esiti ottenuti con i due metodi non è significativa, ossia il numero delle positività per NoVs ottenute su estratti derivanti da campioni pretrattati con la Soluzione di *Proteinasi K* o con il metodo *glicina-PEG₈₀₀₀* è dovuto al caso. Per i campioni positivi per HAV è stato ottenuto un un valore del chi-quadro pari a 2,03, con un p-value = 0,1538, potendo anche in questo caso asserire che la differenza non è significativa e che quindi i due metodi di preparazione possono essere considerati equivalenti. Lo stesso dicasi per la positività agli EVs (nel qual caso il valore del chi-quadro è pari 0,21, con un p-value = 0,4452) e agli AdVs (chi-quadro = 0,02 e p-value = 0,8990). Un limite di questa analisi statistica potrebbe essere la numerosità non elevata dei campioni analizzati. Pertanto, sarebbe necessario ampliare la casistica con un numero più elevato di dati, per potere asserire con maggiore certezza che l'impiego del metodo *glicina-PEG₈₀₀₀* consente di recuperare un maggior numero di campioni positivi, incrementando la sensibilità del metodo.

Dai dati ottenuti si evince che, quando si analizzano matrici alimentari o ambientali, è estremamente difficoltoso individuare un unico metodo di preparazione del campione che consenta di rilevare tutti i positivi, in particolar modo qualora si è in presenza di bassi livelli di positività, così come già visto nella valutazione dei metodi biomolecolari. Quindi, dovendo operare una scelta, è essenziale tenere conto delle esigenze diagnostiche e della tempistica. Infatti, il metodo con la Soluzione di *Proteinasi K* è estremamente rapido e semplice (richiede circa due ore e apparecchiature di base da

laboratorio), ma non è idoneo per l'impiego nell'isolamento in colture cellulari e quindi per valutare l'infettività del virus; mentre il metodo *glicina-PEG₈₀₀* fornisce un campione che può essere utilizzato nelle colture cellulari, ma richiede 3 giorni di preparazione e si presenta piuttosto indaginoso, esigendo una maggiore manualità.

Accorpendo i risultati degli accertamenti condotti sui MEL prelevati nel triennio 2012-2015, indipendentemente dal metodo di preparazione del campione (metodo con Soluzione di *Proteinasi K* o metodo *glicina-PEG₈₀₀*), si osserva che le positività registrate nei confronti di almeno uno dei 7 agenti patogeni ricercati hanno una distribuzione temporale disomogenea (**Figura 5.3, Tabella 5.1**).

Figura 5.3. Distribuzione temporale delle positività nei MEL per Anno



In particolare, i campioni positivi sono tendenzialmente più numerosi nel semestre luglio-dicembre (60,7%). Se si vanno a considerare i singoli anni, osserviamo che in tale periodo dell'anno sono state registrate nel 2012 il 50% delle positività, nel 2013 l'84,6% e nel 2014 il 28,6%. E precisamente, la presenza di ampliconi di HAV è stata osservata solo nei prelievi riferibili a tale semestre sia nel 2012 che nel 2013, unici anni in cui è stata riscontrata la presenza del virus nei MEL; mentre per i NoVs sia nel 2012 che nel 2014 è stata registrata una prevalenza di campioni positivi $\geq 60\%$ nel semestre gennaio-giugno, con un'inversione di tendenza nel 2013 in cui il 66,6% degli ampliconi positivi erano invece attribuibili a campioni prelevati nel semestre luglio-dicembre. Un

numero significativo di positività per EVs è stato registrato nel mese di settembre 2013. Nel 2013, il bimestre settembre-ottobre è quello che ha restituito il maggior numero di campioni positivi dell'anno (10/13 ossia il 76,9%).

Tabella 5.1. Positività globali per singolo campione di MEL nel periodo 2012-2015

Identificativo	Sito Prelievo	Data Prelievo	HAV	NoV GI	NoV GII	NoV GIV	EVs	HEV	AdVs
Z2/Z3_19552	Allevamento Cozze	Marzo, 2012	neg	NoV-GL2	neg	NoV-GIV.1	Non-polio EV	neg	neg
Z4/Z5_34558	Vongole Tunisia (PIF)	Maggio, 2012	neg	NoV-GL2	neg	neg	neg	neg	neg
Z6/Z7_34751	Allevamento Cozze	Maggio, 2012	neg	neg	neg	neg	Non-polio EV	neg	neg
Z8/Z9_40365	Allevamento Cozze	Giugno, 2012	neg	NoV-GL3	neg	neg	neg	neg	neg
Z10/Z11_50969	Allevamento Cozze	Luglio, 2012	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z12/Z13_50972	Allevamento Cozze	Luglio, 2012	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z14/Z15_56093	Allevamento Cozze	Agosto, 2012	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z16/Z17_56104	Allevamento Cozze	Agosto, 2012	neg	NoV-GL2	neg	neg	neg	neg	neg
Z18/Z19_72098	Allevamento Cozze	Ottobre, 2012	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z20/Z21_76830	Allevamento Cozze	Novembre, 2012	HAV-IB	NoV-GL2	neg	neg	neg	neg	neg
Z22/Z23_88518	Vongole Tunisia (PIF)	Dicembre, 2012	HAV-IB	neg	neg	neg	Non-polio EV	neg	neg
Z58/Z59_20217	CDM/CSM Cozze	Marzo, 2013	neg	neg	NoV-GL2	NoV-GII.1	neg	neg	neg
Z60/Z61_20247	CDM/CSM Cozze	Marzo, 2013	neg	NoV-GL9	NoV-GII.1	neg	neg	neg	neg
Z76/Z77_30530	Allevamento Cozze	Maggio, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z52/Z53_32744	Allevamento Cozze	Maggio, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z46/Z47_33604	CDM/CSM Cozze	Maggio, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z54/Z55_34652	Allevamento Cozze	Maggio, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z70/Z71_36816	Allevamento Cozze	Maggio, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z72/Z73_40029	Allevamento Cozze	Giugno, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z56/Z57_42413	Allevamento Cozze	Giugno, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z78/Z79_44456	Allevamento Cozze	Giugno, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z50/Z51_45333	Allevamento Cozze	Giugno, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z48/Z49_47285	Allevamento Cozze	Luglio, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z64/Z65_48741	CDM/CSM Cozze	Luglio, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z74/Z75_48881	Allevamento Cozze	Luglio, 2013	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z62/Z63_50578	Allevamento Cozze	Luglio, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Identificativo	Sito Prelievo	Data Prelievo	HAV	NoV GI	NoV GII	NoV GIV	EVs	HEV	AdVs
Z68/Z69_52339	Allevamento Cozze	Luglio, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z66/Z67_53595	Allevamento Cozze	Agosto, 2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z24/Z25_58859	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	neg	NoV-GI.2	neg	neg	Non-polio EV	neg	neg
Z26/Z27_58862	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	HAV-IA	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z28/Z29_60310	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	HAV-IB	NoV-GI.3	neg	neg	neg	neg	neg
Z30/Z31_62244	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	HAV-IB	neg	neg	neg	Non-polio EV	neg	neg
Z32/Z33_63796	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z34/Z35_65679	Allevamento Cozze	Settembre, 2013	HAV-IB	neg	neg	neg	Non-polio EV	neg	neg
Z36/Z37_67822	Allevamento Cozze	Ottobre, 2013	HAV-IB	NoV-GI.2	neg	neg	neg	neg	AdV-40
Z38/Z39_70010	Allevamento Cozze	Ottobre, 2013	HAV-IB	neg	NoV-GII.1	neg	neg	neg	neg
Z40/Z41_72272	Allevamento Cozze	Ottobre, 2013	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z42/Z43_74227	Allevamento Cozze	Ottobre, 2013	HAV-IB	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z44/Z45_8051	Vongole Tunisia (PIF)	Febbraio, 2014	neg	neg	neg	NoV-GII.1	neg	neg	neg
Z80/Z81_29883	Cozze Supermercato	Aprile, 2014	neg	neg	neg	neg	Non-polio EV	neg	neg
Z82/Z83_31216	Cozze Pescheria (ME)	Maggio, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z84/Z85_32061	Cozze Pescheria (ME)	Maggio, 2014	neg	NoV-GI.2 NoV-GI.8	neg	neg	neg	neg	neg
Z86/Z87_32867	Cozze Pescheria (CT)	Maggio, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z88/Z89_35331	Allevamento Cozze	Maggio, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z90/Z91_37535	Allevamento Cozze	Maggio, 2014	neg	neg	neg	NoV-GIV.1	neg	neg	neg
Z92/Z93_41187	Allevamento Cozze	Giugno, 2014	neg	NoV-GI.1	neg	neg	neg	neg	neg
XXX1/XXX2_44904	Allevamento Cozze	Giugno, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z94/Z95_48583	Allevamento Cozze	Luglio, 2014	neg	neg	neg	NoV-GIV.1	neg	neg	neg
Z96/Z97_50356	Allevamento Cozze	Luglio, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	AdV-40
Z98/Z99_62470	Vongole Deposito (AG)	Settembre, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z100/Z101_62474	Cozze Deposito (AG)	Settembre, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

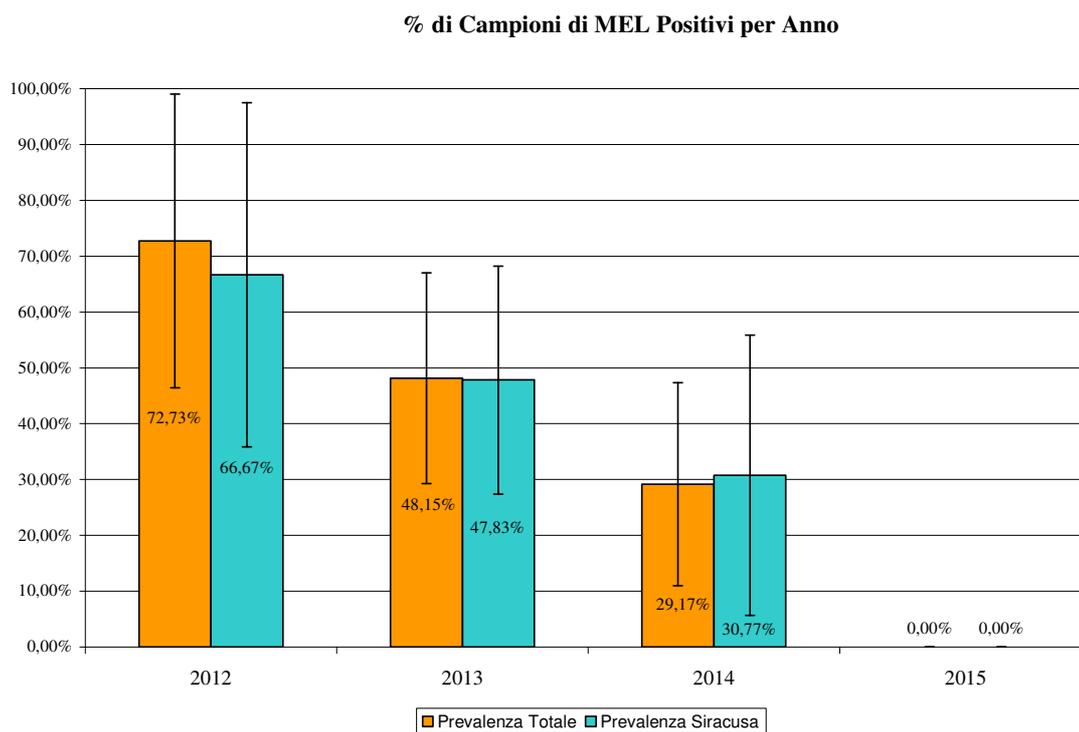
Identificativo	Sito Prelievo	Data Prelievo	HAV	NoV GI	NoV GII	NoV GIV	EVs	HEV	AdVs
Z102/Z103_62477	Cozze Pescheria (AG)	Settembre, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z104/Z105_62480	Vongole Deposito (AG)	Settembre, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z106/Z107_63150	Allevamento Cozze	Settembre, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z108/Z109_64412	Cozze Dettaglio (PA)	Settembre, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z110/Z111_64413	Vongole Dettaglio (PA)	Settembre, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z112/Z113_67311	Allevamento Cozze	Settembre, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z114/Z115_71563	Allevamento Cozze	Ottobre, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z116/Z117_76329	Allevamento Cozze	Ottobre, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z118/Z119_80740	Allevamento Cozze	Novembre, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z120/Z121_85436	Allevamento Cozze	Novembre, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z122/Z123_90159	Allevamento Cozze	Dicembre, 2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Z124/Z125_1287	Vongole Tunisia (PIF)	Gennaio, 2015	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
XXX3/XXX4_36916	Cozze Supermercato	Agosto, 2015	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

glicina = estrazione con il metodo *glicina*-PEG₈₀₀₀

pk = estrazione con la Soluzione di *Proteinasi K*

Per verificare se vi fosse correlazione fra le positività osservate e l'anno di prelievo dei MEL, sono state messe a confronto le prevalenze complessive dei campioni, indice di positività ad almeno uno dei patogeni ricercati, riscontrate nei quattro anni oggetto di studio, ottenendo i risultati riportati in **Figura 5.4**. I campioni prelevati nel 2015, oltre ad essere numericamente esigui, sono risultati negativi a tutti i parametri ricercati.

Figura 5.4. Prevalenza: Totale MEL Positivi e MEL Positivi Siracusa – Anni 2012-2015



Come si evince dal grafico non sono state evidenziate differenze significative tra le percentuali di positività riscontrate negli anni nella totalità dei campioni prelevati.

Poiché i campioni di MEL provenienti dagli stabilimenti di Siracusa costituivano il 70,3% dei campioni totali, con una diversa distribuzione negli anni (81,8% nel 2012, 85,18% nel 2013, 54,2% nel 2014 e 0% nel 2015), temendo che questo fattore potesse avere influenzato l'esito finale delle analisi, si è ritenuto opportuno ripetere la valutazione statistica estrapolando dal cumulativo i campioni prelevati presso i suddetti centri di mitilicoltura, ma anche in questo caso non è stata osservata alcuna differenza significativa tra le percentuali di positività registrate (**Figura 5.4**).

Risultato analogo è stato ottenuto, effettuando lo stesso tipo di analisi per ciascuno dei 6 virus ricercati per i quali era stata registrata almeno una positività (HAV, NoVs, EVs, AdVs).

La presenza del solo genotipo I dell'HAV è in linea con quanto noto circa la distribuzione del virus a livello mondiale, la prevalenza del sub-genotipo IA, ancorchè in contro tendenza con quanto solitamente osservato⁽³⁹⁵⁾, è sempre più spesso registrata in alimenti, matrici ambientali ed episodi epidemici^(63, 103, 219, 292) da solo o in associazione con altri sub-genotipi^(106, 107, 294).

L'elevata variabilità genetica dei *Norovirus* è resa ancora più complessa dalla crescente diffusione di genotipi ricombinanti, il cui riconoscimento è stato possibile grazie al potenziamento delle tecniche diagnostiche^(127, 132, 249, 263,315, 326, 327), la loro distribuzione è pertanto quanto più disparata nelle diverse tipologie di campioni^(16, 127, 183, 412). Anche questo studio mette in evidenza la varietà di genotipi presenti nel territorio siciliano, dimostrando la presenza del NoV GII.4 in un campione di acque dolci superficiali e di cinque differenti genotipi del NoV GI (GI.1, GI.2, GI.3, GI.8, GI.9) nei campioni di MEL. Il genotipo nettamente prevalente è stato il GI.2 (66,7%), così come riportato anche in altri studi^(16, 412).

Il rilevamento di virus enterici potenzialmente patogeni nei campioni di MEL analizzati, mostra che vi è una chiara necessità di andarli a monitorare ai fini della classificazione delle acque delle aree di produzione, attraverso analisi svolte preferibilmente non sulle matrici abiotiche (acque e sedimenti), ma sui molluschi stessi che svolgono in tal senso un implicito ruolo di "sentinella" del livello igienico-sanitario dell'ambiente in cui vivono.

Il progetto ha consentito di confrontare due diverse metodiche di preparazione dei campioni di MEL e di estrazione genomica, nonché 13 differenti saggi di biologia molecolare, messi a punto e ottimizzati per l'identificazione a largo spettro di alcuni dei principali virus enterici responsabili di patologie nell'uomo (HAV, NoVs, AdVs, HEV, EVs). Dalla loro applicazione è emerso che la diagnostica è spesso indaginosa e difficoltosa quando si analizzano matrici alimentari e ambientali (acque), sia per le problematiche esistenti nel concentrare particelle virali talvolta poco presenti in tale

tipologia di matrici, sia per la presenza di fattori inibenti nei campioni (lipidi, Ca^{2+} , composti organici), che essendo eterogenei possono influenzare in diversa misura gli esiti delle analisi, sia per la crescente variabilità genetica dei ceppi circolanti. I MB, in particolare, filtrando rilevanti quantità di acqua, mostrano elevate capacità di bioaccumulo. La contaminazione può essere diretta, dall'acqua di colonna o interstiziale del sedimento, o tramite ingestione di cibo o particolato. Le sostanze accumulate nella polpa dei MEL, mostrano concentrazioni maggiori nella ghiandola digestiva o epatopancreas, che svolge un ruolo attivo nella loro assimilazione ed eliminazione. La cinetica di contaminazione/decontaminazione non dipende solo dalla concentrazione iniziale del contaminante, ma anche da altri fattori come quelli fisiologici del mollusco (fattori specie-dipendenti, tasso di crescita e variazioni di massa nel tempo, queste ultime correlate soprattutto allo stato di maturità sessuale ed alla fase riproduttiva) e quelli ambientali (temperatura e quantità/qualità del particolato alimentare disponibile). Attualmente la biologia molecolare viene comunemente utilizzata a scopo diagnostico e di ricerca sia in campioni clinici che ambientali e in matrici alimentari. Il sequenziamento dei prodotti di PCR amplificati permette inoltre di avere informazioni più precise sui genotipi coinvolti, favorendo così l'identificazione di nuove varianti, l'individuazione delle fonti di contaminazione durante gli episodi epidemici e studi di tipo epidemiologico-molecolare.

Il rinvenimento di NoVs in campioni di MEL provenienti da un punto vendita autorizzato, durante l'epidemia determinata da tali virus nel 2006 in Campania, conferma la necessità di effettuare controlli lungo tutta la filiera alimentare ⁽³¹¹⁾ e ribadisce la necessità di individuare e standardizzare dei metodi condivisi nella comunità nazionale ed internazionale per la determinazione dei virus enterici. L'assenza in Italia e negli altri Paesi europei di un Piano Nazionale di Sorveglianza dei virus enterici in generale e dei NoVs e dell'HAV in particolare, nonché la mancanza di modalità di gestione delle positività per virus riscontrate nei MBV, ha portato il Ministero della Salute, sentito il parere dell'ISS ed in attesa delle determinazioni comunitarie, ad emettere una Nota il 16/06/2015 contenente delle indicazioni di emergenza per la gestione delle positività per Norovirus riscontrate nei MBV, a seguito dell'epidemia di origine virale da consumo di mitili verificatesi in Campania a febbraio del 2015 ⁽²⁸¹⁾.

Da quanto detto emerge chiaramente in che misura la valutazione e la gestione del rischio di infezioni da virus enterici connesso al consumo di MEL siano attualmente

tutt'altro che praticabili, per la loro realizzazione è infatti fondamentale attuare un Piano di Sorveglianza attivo a livello Nazionale e/o Internazionale, che includa i metodi analitici da utilizzare, in modo da acquisire un numero congruo di dati che permettano di fare inferenza a livello globale. La valutazione del rischio correlato è resa ancora più complessa dalle caratteristiche della molluschicoltura, che essendo esercitata soprattutto nelle acque di transizione, come gli ambienti lagunari o nella fascia strettamente costiera, costituisce per sua stessa natura un settore produttivo molto fragile, strettamente legato alle modifiche di tali ambienti ed ai fenomeni, sia naturali (eventi meteo-marini) che indotti (inquinamenti di tipo microbiologico e chimico), più o meno prevedibili e/o ricorrenti.

Questo studio sottolinea ulteriormente la necessità di intensificare il sistema di monitoraggio ed identificazione dei virus enterici tramite metodiche molecolari, associate a studi di tipo epidemiologico, al fine di ottenere una corretta valutazione del rischio sanitario legato alla presenza di virus enterici nei MEL. Sarebbe, inoltre, auspicabile una sorveglianza combinata che coinvolga matrici alimentari, ambientali e cliniche con l'intento di ottenere un quadro più completo delle varianti circolanti nella popolazione e nelle varie aree geografiche; tali informazioni potrebbero costituire un sistema di allerta circa possibili epidemie future e aiutarne il controllo.

L'attività svolta ha costituito un momento di scambio di informazioni ed opinioni, favorendo la sensibilizzazione di differenti figure operanti nel settore alimentare (veterinari, tecnici prelevatori, gestori di centri di mitilicoltura) e gettando le basi per una successiva ed ulteriore collaborazione.

Parte dei dati ottenuti nel corso del dottorato sono stati oggetto di due pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali:

- 1) Giammanco G.M., Di Bartolo I., Purpari G., Costantino C., Rotolo V., Spoto V., Geraci G., Bosco G., Petralia A., Guercio A., Macaluso G., Calamusa G., De Grazia S., Ruggeri F.M., Vitale F., Maida C.M., Mammina C. (2014). [Investigation and control of a Norovirus outbreak of probable waterborne transmission through a municipal groundwater system](#). *J. Water Health.*, 12(3): 452-64.
- 2) Iaconelli M., Purpari G., Della Libera S., Petricca S., Guercio A., Ciccaglione A.R., Bruni R., Taffon S., Equestre M., Fratini M., Muscillo M., La Rosa G. (M. Iaconelli

and G. Purpari have contributed equally to this work). (2015). [Hepatitis A and E Viruses in Wastewaters, in River Waters, and in Bivalve Molluscs in Italy](#). *Food Environ. Virol.* 06/2015; DOI:10.1007/s12560-015-9207-3 – ISSN 1867-0334 - 1.98 Impact Factor.

Capitolo 6

BIBLIOGRAFIA

Vengono di seguito riportati in **grassetto** i lavori ritenuti più rilevanti per la messa a punto o l'implementazione delle metodiche.

- 1) Abad F.X., Pintò R.M., Bosch A. (1994). Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied. Environmental Microbiology*, 60: 3704-3710.
- 2) Acharya S.K., Panda S.K. (2006). Hepatitis E virus: epidemiology, diagnosis, pathology and prevention. *Trop. Gastroenterol.*, 27: 63-68.
- 3) Acheson N.H. (2006). *Fundamentals of Molecular Virology*. John Wiley & Sons Inc. 1 edition. Chapter 12, pp. 123-133.
- 4) Adamo B., Almasio P.L., Amoroso P., Carniglia E., Cirrincione R., Coppola R.C., D'Argenio P., Demicheli V., Franco E., Fucci S., Gaeta G.B., Gallo G., Giambi C., Ialacci R., Mele A., Taliani G., Zanetti A. (2004). L'uso del vaccino anti epatite A in Italia. *PNLG. Istituto Superiore di Sanità. Health Reviews*.
- 5) Aggarwal R., Krawczynski. K. (2000). Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15: 9-20.
- 6) Aggarwal R., Kini D., Sofat S., Naik S.R., Krawczynski. K. (2000). Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis. *E. Lancet.*, 356: 1081-1082.
- 7) Aggarwal R., Naik. S.R. (2009). Epidemiology of hepatitis E: Current status. *J Gastroenterol. Hepatol.*, 24: 1484-1493.
- 8) Ahmad K. (2002). Norwalk-like virus attacks troops in Afghanistan. *Lancet Infect. Dis.*, 2: 391.
- 9) Alessi E., Croci L. (2005). Ruolo dei microrganismi indicatori e processi di depurazione. In: Pasolini B., Alessi E., De Medici D. Workshop di aggiornamento su problematiche emergenti nel settore dei prodotti ittici. *Rapporti ISTISAN 05/24*: 97-104.
- 10) **Allard A., Girones R., Juto P., Wadell G. (1990). Polymerase Chain Reaction for detection of adenovirus in stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2659-2667.**
- 11) **Allard A., Albisson B., Wadell G. (1992). Detection of Adenovirus in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step Polymerase Chain Reaction. *J. Medical Virol.*, 37: 149-157.**
- 12) Anastasi P., Bonanni E., Cecchini G., Divizia M., Donia D., Di Gianfilippo F., Gabrieli R., Petrinca A.R., Zanobini A. (2008). Virus removal in conventional wastewater treatment process. *Ig Sanita Pubbl.*, 64: 313-330.
- 13) Anderson D.A., Ross B.C. (1990). Morphogenesis of hepatitis A virus isolation and characterization of subviral particles. *J. Virol.*, 64: 5284-5289.
- 14) Artieda J., Pineiro L., Gonzalez M., Munoz M., Basterrechea M., Iturzaeta A., Cilla G. (2009). A swimming pool-related outbreak of pharyngoconjunctival fever in children due to adenovirus type 4, Gipuzkoa, Spain, 2008. *Euro Surveill.*, 14. pii: 19125.

- 15) **Aulicino F.A., Volterra L., Patti A. M., Muscillo M., Orsini P. (1993). Concentrazione e recupero di enterovirus da campioni di acqua di mare: ultrafiltrazione a flusso tangenziale. *L'Igiene Moderna*, 100: 1416-1432.**
- 16) Aw T.G., Yew-Hoong Gin K., Lin Ean Oon L., Xueqin Chen E., Woo C.H. (2009). Prevalence and Genotypes of Human Noroviruses in Tropical Urban Surface Waters and Clinical Samples in Singapore. *Applied and Environmental Microbiology*, 4984–4992.
- 17) Bajpai M., Gupta E. (2011). Transfusion-transmitted hepatitis E: is screening warranted? *Indian J. Med. Microbiol.*, 29: 353-358.
- 18) Balayan M.S. (1997). Epidemiology of hepatitis E virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*, 4: 155–165.
- 19) Banks M., Bendall R., Grierson S., Heath G., Mitchell J., Dalton H. (2004). Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.*, 10: 953-955.
- 20) Banks M., Grierson S., Fellows H.J., Stableforth W., Bendall R., Dalton. H.R. (2007). Transmission of hepatitis E virus. *Vet. Rec.*, 160-202.
- 21) Bank-Wolf B.R., Konig M., Thiel H.J. (2010). Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Vet. Microbiol.*, 140: 204-212.
- 22) Barraza E.M., Ludwig S.L., Gaydos J.C., Brundage J.F. (1999). Reemergence of adenovirus type 4 acute respiratory disease in military trainees: report of an outbreak during a lapse in vaccination. *J. Infect. Dis.*, 179: 1531-1533.
- 23) Baum S.G. (2000). Adenovirus. In: Mandell, L., Bennett, J.E., Dolin, R. (eds.) *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, Philadelphia, PA, pp. 1624-1630.
- 24) Belliot G., Kamel A.H., Estienney M., Ambert-Balay K., Pothier P. (2010). Evidence of emergence of new GGII.4 norovirus variants from gastroenteritis outbreak survey in France during the 2007-to-2008 and 2008-to-2009 winter seasons. *J. Clin Microbiol.*, 48: 994-998.
- 25) Bendall R., Ellis V., Ijaz S., Ali R., Dalton H. (2010). A comparison of two commercially available anti HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J. Med. Virol.*, 82: 799-805.
- 26) Berck A.J. (2007). Adenoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, 5th edn, Vol. II, Cap. 63 pp.2357-2394. Edited by D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins.
- 27) Beuret C., Kohler D., Baumgartner A., Luthi T.M. (2002). Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 1925-1931.

- 28) Blain F., Emerson S.U. (2007). Hepatitis A Virus. In *Fields Virology*, 5th edn, Vol. I, Cap. 27, pp.895-947. Edited by D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins.
- 29) Blanton L.H., Adams S.M., Beard R.S., Wei G., Bulens S.N., Widdowson M.A., Glass R.I., Monroe S.S. (2006). Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J. Infect. Dis.*, 193: 413-421.
- 30) Blohme I., Nyberg G., Jeansson S., Svalander C. (1992). Adenovirus infection in a renal transplant patient. *Transplant. Proc.*, 24: 295.
- 31) Boccia D., Guthmann J.P., Klovstad H., Hamid N., Tatay M., Ciglenecki I., Nizou J.Y., Nicand E., Guerin P.J. (2006). High mortality associated with an outbreak of hepatitis E among displaced persons in Darfur, Sudan. *Clin. Infect. Dis.*, 42: 1679-1684.
- 32) **Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.M., Wertheim-van Dillen P.M., van der Nordaa J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3): 495-503.**
- 33) Borgen K., Herremans T., Duizer E., Vennema H., Rutjes S., Bosman A., de Roda Husman A.M., Koopmans M. (2008). Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; a case series 2004 - 2006. *BMC Infect. Dis.*, 8: 61.
- 34) Bouquet J., Tessé S., Lunazzi A., Eloit M., Rose N., Nicand E., Pavio N. (2011). Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008-2009. *Emerg. Infect. Dis.*, 17: 2018-2025.
- 35) Boutrouille A., Bakkali-Kassimi L., Crucière C., Pavio N. (2007). Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in French blood donors. *J. Clin. Microbiol.*, 45: 2009-2010.
- 36) **Boxman I.L.A., Tilburg J.H.C., te Loeke A.J.M., Vannema H., Jonker K., de Boer E., Koopmans M. (2006). Detection of Norovirus in shellfish in Netherland. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 391-396.**
- 37) Brandt C.D., Kim H.W., Vargosko A.J., Jeffries B.C., Arrobio J.O., Rindge B., Parrott R.H., Chanock R.M. (1969). Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *Am. J. Epidemiol.*, 90: 484-500.
- 38) Brost S., Wenzel J.J., Ganten T.M., Filser M., Flechtenmacher C., Boehm S., Astani A., Jilg W., Zeier M., Schnitzler P. (2010). Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E virus infection in Southwest Germany. *J. Clin. Virol.*, 47: 89-92.
- 39) Brown E.A., Zajac A.J., Lemon S.M. (1993). 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. *Journal of Virology*, 68: 1066-1074.

- 40) Buesa J., Montava R., Abu-Mallouh R., Fos M., Ribes J.M., Bartolome R., Vanaclocha H., Torner N., Dominguez A. (2008). Sequential evolution of genotype GII.4 norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain. *J. Med. Virol.*, 80: 1288-1295.
- 41) Bull R.A., Tu E.T.V., McIver C.J., Rawlinson W.D., White P.A. (2006). Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 327-33.
- 42) Bull R.A., Tanaka M.M., White P.A. (2007). Norovirus recombination. *J. Gen. Virol.*, 88: 3347-3359.
- 43) Busta F.F., Suslow T.V., Parish M.E., Beuchat L.R., Farber J.N., Garrett E.H., Harris L.J. (2003). Chapter VII. The Use of Indicators and Surrogate Microorganisms for the Evaluation of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 179-185.
- 44) Buti M., Clemente-Casares P., Jardi R., Formiga-Cruz M., Schaper M., Valdes A., Rodriguez- Frias F., Esteban R., Girones. R. (2004). Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J. Hepatol.*, 41: 126-31.
- 45) Butot S., Putallaz T., Sánchez G. (2007). Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Applied and Environment Microbiology*, 73: 186–192.
- 46) Cacciola I., Messineo F., Cacopardo B., Di Marco V., Galli C., Squadrito G., Musolino C., Saitta C., Pollicino T., Raimondo G. (2011). Hepatitis E virus infection as a cause of acute hepatitis in Southern Italy. *Dig. Liver Dis.*, 43: 996-1000.
- 47) **Cannella V., Purpari G., Ferrari A., Migliazzo A., Di Marco P., Guercio A. (2010). Detection of human enteric viruses in shellfish, vegetables, waters and environmental samples: a preliminary study. *Atti del 14th International Congress on Infectious Diseases (ICID). International Journal of Infectious Diseases, 14S1, 63-64: 26.006. (Miami, Florida, USA 9/12 marzo 2010).***
- 48) Carter M.J. (2005). Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1354-1380.
- 49) Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA. (1998). Civilian outbreak of adenovirus acute respiratory disease-South Dakota, 1997. *MMWR*, 47: 567-570.
- 50) Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA. (2001). Two fatal cases of adenovirus-related illness in previously healthy young adults-Illinois, 2000. *MMWR*, 50: 553-555.
- 51) Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA. (2007). Acute Respiratory Disease Associated with Adenovirus Serotype 14 - Four States, 2006-2007 *MMWR*, 56: 1181-1184.

- 52) Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA. (2009). Noroviruses. (www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro/norovirus.htm).
- 53) Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA. (2015). Hepatitis E (www.cdc.gov/hepatitis/HEV/HEVfaq.htm).
- 54) Chen S.Y., Tsai C.N., Lai M.W., Chen C.Y., Lin K.L., Lin T.Y., Chiu C.H. (2009). Norovirus infection as a cause of diarrhea-associated benign infantile seizures. *Clin. Infect. Dis.*, 48(7): 849-855.
- 55) Chironna M., Germinaro C., De Medici D., Fiore A., Di Pasquale S., Quarto M., Barbuti S. (2002). Detection of hepatitis A virus in mussels from different sources marketed in Puglia region (South Italy). *International Journal of Food Microbiology*, 75: 11-18.
- 56) Chironna M. (2003). Epidemiologia molecolare dell'epatite A in Puglia. In: Mele A., Tosti M.E., Spada E., Kondili L., Marzolini F. SEIEVA Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta. Rapporto 2000-2001. *Rapporti ISTISAN 03/23*: 38-39.
- 57) Chung J.Y., Han T.H., Park S.H., Kim S.W., Hwang E.S. (2010). Detection of GII-4/2006b variant and recombinant noroviruses in children with acute gastroenteritis, South Korea. *J. Med. Virol.*, 82: 146-152.
- 58) Clemente-Casares P., Pina S., Buti M., Jardi R., Martin M., Bofill-Mas S., Girones R. (2003). Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.*, 9:448-54.
- 59) Cockburn T.A. (1953). An epidemic of conjunctivitis in Colorado associated with pharyngitis, muscle pain, and pyrexia. *Am. J. Ophthalmol.*, 36: 1534-1539.
- 60) Cohen J.I., Ticehurst J.R., Purcell R.H., Burckler-White A., Baroudy B.M. (1987). Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *Journal of Virology*, 61: 50-59.
- 61) Cohen L.M., Benichou D., Martin A. (2002). Analysis of deletion mutants indicates that the 2° polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. *Journal Virology*, 76: 7495-7505.
- 62) Colford Jr. J.M., Wade T.J., Schiff K.C., Wright C.C., Griffith J.F., Sandhu S.K., Burns S., Sobsey M., Lovelace G., Weisberg S.B. (2007). Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiology*, 18(1): 27-35.
- 63) Collier M.G., Khudyakov Y.E., Selvage D., Adams-Cameron M., Epton E., Cronquist A., Jervis R.H., Lamba K., Kimura A.C., Sowadsky R., Hassan R., Park S.Y., Garza E., Elliott A.J., Rotstein D.S., Beal J., Kuntz T., Lance S.E., Dreisch R., Wise M.E., Nelson N.P., Suryaprasad A., Drobeniuc J., Holmberg S.D., Xu F. (2014). Outbreak of hepatitis A in the USA associated with frozen pomegranate arils imported from Turkey: an epidemiological case study. *Lancet Infect. Dis.*, 14: 976-981.

- 64) Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, Heyries L, Raoult D, Gerolami R. (2010). Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect. Dis.*, 202: 825-834.
- 65) Contato E., Miralo G., Sarteau A., Tampieri M.L., Tuffanelli A., Chioccioli M., Bucci G. (1995). Batteriofagi nei mitili e in acque di molluschicoltura. *Igiene Moderna*, 103: 361-371.
- 66) Corwin A.L., Khiem H.B., Clayson E.T., Pham K.S., Vo T.T., Vu T.Y., Cao T.T., Vaughn D., Merven J., Richie T.L., Putri M.P., He J., Graham R., Wignall F.S., Hyams K.C. (1996). A waterborne outbreak of hepatitis E virus transmission in southwestern Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 54: 559-562.
- 67) **Costafreda M.I., Bosh A., Pintò R.M. (2006). Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:3846-3855.**
- 68) Costa-Mattioli M., Ferre V., Monpoeho S., Garcia L., Colina R., Billaudel S., Vega I., Perez-Bercoff R., Cristina J. (2001a). Genetic variability of hepatitis A virus in South America reveals heterogeneity and co-circulation during epidemic outbreaks. *Journal Medical Virology*, 72: 2467-2652.
- 69) Costa-Mattioli M., Monpoeho S., Schvoerer C., Besse B., Aleman M.H., Billaudel S., Cristina J., Ferre V. (2001b). Genetic analysis of hepatitis A virus outbreak in France confirms the co-circulation of subgenotypes Ia, Ib and reveals a new genetic lineage. *Journal Medical Virology*, 65: 233-240.
- 70) Costa-Mattioli M., Ferre V., Casane D., Perez-Bercoff R., Coste-Burel M., Imbert-Marcille B.M., Andre E.C., Bressollette-Bodin C., Billaudel S., Cristina J. (2003). Evidence of recombination in natural population of hepatitis A virus. *Virology*, 311: 51-59.
- 71) Costantini V., Loisy F., Joens L., Le Guyader F.S., Saif L.J. (2006). Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 1800-9.
- 72) Cristina J., Costa-Mattioli M. (2007). Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. *Virus Research.*, 127: 151-157.
- 73) Croci L., De Medici D., Morace G., Fiore A., Scalfaro C., Beneduce F., Toti L. (1999a). Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested reverse transcription-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 48: 67-71.
- 74) Croci L., De Medici D., Scalfaro C., Fiore A., Divizia M., Donia D., Casentino A.M., Moretti P., Costantini G. (1999b). Determination of enteroviruses, Hepatitis A virus, bacteriophages and E.coli in Adriatic sea mussels. *J. Applied Microbiology*, 88: 293-298.
- 75) **Croci L., De Medici D. (2000). Epatite A trasmessa con gli alimenti. *Rapporti ISTISAN 00/2. Istituto Superiore di Sanità, 1999: 1-53.***

- 76) Croci L., De Medici D., Scalfaro C., Fiore A., Toti L. (2002). The survival of hepatitis A in fresh produce. *International Journal of Food Microbiology*, 73: 29-34.
- 77) Croci L., Suffredini E. (2003). Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 39(1): 35-45.
- 78) **Croci L., Losio N. – Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante RT-PCR convenzionale e Real Time PCR. Procedura Istituto Superiore di Sanità e Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Brescia.**
- 79) Cunha J.B., de Mendonca M.C., Miagostovich M.P., Leite J.P. (2010). First detection of porcine norovirus GII.18 in Latin America. *Res. Vet. Sci.* 89: 126-129.
- 80) Cuthbert J.A. (2001). Hepatitis A: old and new. *Clinical Microbiology Review*, 14: 38-58.
- 81) Dalton H.R., Thurairajah P.H., Fellows H.J., Hussaini H.S., Mitchell J., Bendall R., Banks M., Ijaz S., Teo C.G., Levine D.F. (2007). Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J. Viral. Hepat.*, 14:304-9.
- 82) Dalton H.R., Bendall R., Ijaz S., Banks M. (2008). Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect. Dis.*, 8: 698-709.
- 83) Dalton H.R., Bendall R.P., Rashid M., Ellis V., Ali R., Ramnarace R., Stableforth W., Headdon W., Abbott R., McLaughlin C., Froment E., Hall K.J., Michell N.P., Thatcher P., Henley W.E. (2011). Host risk factors and autochthonous hepatitis E infection. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 23: 1200-1205.
- 84) D'Angelo L.J., Hierholzer J.C., Keenlyside R.A., Anderson L.J., Martone W.J. (1979). Pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 4: report of a swimming pool-related outbreak with recovery of virus from pool water. *J. Infect. Dis.*, 140: 42-47.
- 85) D'Ambrosio E., Del Grosso N., Chicca A., Midulla M. (1982). Neutralizing antibodies against 33 human adenoviruses in normal children in Rome. *J. Hyg. (Lond)* 89, 155-161.
- 86) **da Silva A.K., Le Saux J.C., Parnaudeau S., Pommepeuy M., Elimelech M., Le Guyander F.S. (2007). Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using Real-Time Reverse Transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(24): 7891-7897.**
- 87) Daughenbaugh K.F., Fraser C.S., Hershey J.W., Hardy M.E. (2003). The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J.*, 22(11): 2852-2859.
- 88) de Jong J.C., Wigand R., Kidd A.H., Wadell G., Kapsenberg J.G., Muzerie C.J., Wermenbol A.G., Firtzloff R.G. (1993). Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. *J. Med. Virol.*, 11: 215-231.

- 89) de Jong J.C., Wermenbol A.G., Verweij-Uijterwaal M.W., Staterus K.W., Wertheim-van Dillen P., van Doornum G.J., Khoo S.H., Heirhoizer J.C. (1999). Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 3940-3945.
- 90) Decreto 27/12/2007. Recepimento delle intese tra il Governo, le Regioni e le Provincie autonome di Trento e Bolzano in materia di sicurezza alimentare. Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale della Regione Sicilia (p.I) n. 4 del 25/01/2008 n.2).
- 91) Decreto Legislativo n. 155 del 14/05/1988. Modifiche al decreto del Presidente della Repubblica 8 giugno 1982, n. 470, concernente attuazione della Direttiva CEE n. 76/160, relativa alla qualità delle acque di balneazione. Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 113 del 16/05/1993. Supplemento Ordinario n. 5.
- 92) Decreto Legislativo n. 530 del 30/12/1992. Attuazione della Direttiva 91/492/CE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi. Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 7 del 11/01/1993. Supplemento Ordinario n. 5.
- 93) Decreto Legislativo n. 31 del 02/02/2001. Attuazione della Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 52 del 03/03/2001. Supplemento Ordinario n. 41.
- 94) Decreto Legislativo n. 193 del 06/11/2007. Attuazione della Direttiva 2004/41/CE relativa ai controlli in materia di sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore. Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 261 del 09/11/2007. Supplemento Ordinario n. 228.
- 95) Dell'Amico M.C., Cavallo A., Gonzales J.L., Bonelli S.I., Valda Y., Pieri A., Segund H., Ibañez R., Mantella A., Bartalesi F., Tolari F., Bartoloni A. (2011). Hepatitis E virus genotype 3 in humans and Swine, Bolivia. *Emerg. Infect. Dis.*, 17: 1488-1490.
- 96) De Medici D., Ciccozzi M., Fiore A., Di Pasquale S., Parlato A., Ricci-Bitti P., Croci L. (2001). Closed-circuit system of the depuration of mussels experimentally contaminated with hepatitis A virus. *Journal of Food Protection*, 64: 877-880.
- 97) **De Medici D., Croci L., Suffredini E., Toti L. (2004). Reverse Transcription-Booster PCR for detection of Noroviruses in Shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 6329-6332.**
- 98) De Medici D., Paniconi M. (2005). Virus trasmessi con i prodotti ittici. In: Pasolini B., Alessi E., De Medici D. Workshop di aggiornamento su problematiche emergenti nel settore dei prodotti ittici. *Rapporti ISTISAN 05/24*: 65-72.
- 99) Direttiva 91/492/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi. (GU L268 del 24/09/1991).

- 100)Direttiva 2003/99/CEE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la Direttiva 92/117/CEE del Consiglio (GU L325/31 del 12/12/2003).
- 101)Divizia M., Gabrieli R., Donia D., Macaluso A., Bosch A., Guix S., Sánchez G., Villena C., Pintó R.M., Palombi L., Buonuomo E., Cenko F., Leno L., Bebeci D., Bino S. (2004). Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Sci. Technol.*, 50: 57-61.
- 102)Donaldson E.F., Lindesmith L.C., Lobue A.D., Baric R.S. (2008). Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol. Rev.*, 225: 190-211.
- 103)Donnan E.J. Donnan, Fielding J.E., Gregory J.E., Lalor K., Rowe S., Goldsmith P., Mira A., Fullerton K.E., Knope K., Copland J.G., D.S., Tracy S.L., Hogg G.G., Tan A., Adamopoulos J., Joanna Gaston J., Vally H. (2012). A Multistate Outbreak of Hepatitis A Associated With Semidried Tomatoes in Australia, 2009. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6): 775–781.
- 104)D.P.R. n. 236 del 24/05/1988. Attuazione della Direttiva CEE n. 80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, ai sensi dell'art. 15 della L. 16 aprile 1987, n. 183. Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 152 del 30/06/1988. S.O.
- 105)Durepaire N., Ranger-Rogez S., Gandji J.A., Weinbreck P., Rogez J.P., Denis F. (1995) Enteric prevalence of adenovirus in human immunodeficiency virus seropositive patients. *J. Med. Virol.*, 45: 56-60.
- 106)EFSA (European Food Safety Authority). ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2013). Outbreak of hepatitis A virus infection in four Nordic countries. 15 April 2013.
http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_document/s/417e.pdf
- 107)EFSA (European Food Safety Authority). ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2013). Update: Outbreak of Hepatitis A virus infection in Italy and Ireland. 9 July 2013.
http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_document/s/459e.pdf
- 108)Emerson S.D., Purcell R.H. (2003). Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.*, 13: 145-154.
- 109)Emerson S.U., Nguyen H., Graff J., Stefany D.A., Brockington A., Purcell R.H. (2004). In vitro replication of Hepatitis E virus (HEV) genomes and of HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J Virol.*, 78: 4838-4846.
- 110)Emerson S.U., Arankalle V.A., Purcell R.H. (2005). Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis.*, 192: 930-933.

- 111)Emerson S.U., Purcell R.H. (2007). Hepatitis E Virus. In *Fields Virology*, 5th edn, Vol. II, Cap. 78, pp.3047-3058. Edited by D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins.
- 112)Encyclopedia of Virology. (2008). Five-Volume Set, Third Edition 3rd Edition by B.W.J. Mahy (Editor), Marc H.V. van Regenmortel (Editor). Vol. 1, pp. 1-9.
- 113)Enders J.F., Bell J.A., Dingle J.H., Francis T.Jr., Hilleman M.R., Huebner R.J., Payne A.M. (1956). Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*, 124: 119-120.
- 114)Ettayebi K., Hardy M.E. (2003). Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J. Virol.*, 77(21): 11790-11797.
- 115)Fankhauser R.L., Monroe S.S., Noel J.S., Humphrey C.D., Bresee J.S., Parashar U.D., Ando T., Glass R.I. (2002). Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.*, 186: 1-7.
- 116)Farng N.T., Wu K.G., Lee Y.S., Lin Y.H., Hwang B.T. (2002). Comparison of clinical characteristics of adenovirus and non-adenovirus pneumonia in children. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 35: 37-41.
- 117)Fauquet C.M. (2005). Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. *M. M. A. M. J. D. V. B. L. A.*, 853-857.
- 118)Feagins A.R., Opriessnig T., Guenette D.K., Halbur P.G., Meng X.J. (2008). Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int. J. Food Microbiol.*, 123: 32-37.
- 119)Fernandez-Vega V., Sosnovtsev S.V., Belliot G., King A.D., Mitra T., Gorbalenya A., Green K.Y. (2004). Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J. Virol.*, 78(9): 4827-4837.
- 120)Fiore A.E. (2004). Hepatitis A transmitted by food. *Food Safety*, 38: 705-715.
- 121)**Fogeda M., Avellòn A., Cilla C.G., Echevarria J.M. (2009). Imported and Autochthonous Hepatitis E Virus Strains in Spain. *Journal of Medical Virology*, 81: 1743–1749.**
- 122)**Formiga-Cruz M., Hundesa A., Clemente-Casares P., Albiñana-Gimenez N., Allard A., Girones R. (2005). Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *J. Virol. Meth.*, 125: 111-118.**
- 123)Foy H.M., Cooney M.K., Hatlen J.B. (1968). Adenovirus type 3 epidemic associated with intermittent chlorination of a swimming pool. *Arch. Environ. Health*, 17: 795-802.
- 124)Foy H.M. (1997). Adenoviruses. In Evans AS, Kaslow RA, editors. *Viral infections in humans*. 4th ed. New York: Plenum Press, Gaydos CA, USA, pp. 119-138.

- 125) Francki R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.L., Brown F. (1991). Classification and nomenclature of viruses. *Archives of Virology Supplement.*, 2: 320-326.
- 126) Franco E., Giambi C., Ialacci R., Coppola R.C., Zanetti A.R. (2003). Risk groups for hepatitis A virus infection. *Vaccine*, 21: 2224-33.
- 127) Fukuda S., Sasaki Y., Takao S., Seno M. (2008). Recombinant Norovirus Implicated in Gastroenteritis Outbreaks in Hiroshima Prefecture, *Japan. Journal of Medical Virology*, 80: 921-928.
- 128) Fukuda S., Takao S., Shigemoto N., Tanizawa Y., Seno M. (2010). Transition of genotypes associated with norovirus gastroenteritis outbreaks in a limited area of Japan, Hiroshima Prefecture, during eight epidemic seasons. *Arch. Virol.*, 155: 111-115.
- 129) **Gabrieli R., Maccari F., Ruta A., Panà A., Divizia M. (2009). Norovirus detection in groundwater. *Food Environ. Virol.*, 1: 92-96.**
- 130) Garbuglia A.R., Scognamiglio P., Petrosillo N., Mastroianni C.A., Sordillo P., Gentile D., La Scala P., Girardi E., Capobianchi M.R. (2013). Hepatitis E Virus Genotype 4 Outbreak Italy, 2011. *Emer. Infect. Dis.*, 19: 110-114.
- 131) Garcia J., Espejo V., Nelson M., Sovero M., Villaran M.V., Gomez J., Barrantes M., Sanchez F., Comach G., Arango A.E., Aguayo E., de Rivera I.L., Chicaiza W., Jimenez M., Aleman W., Rodriguez F., Gonzales M.S., Kochel T.J., Halsey E. (2013). Human rhinovirus and enterovirus in influenza-like illness in Latin America. *Virology J.*, 10:305 <http://www.virologyj.com/content/10/1/305>
- 132) Giammanco G.M., Rotolo V., Medici M.C., Tummolo F., Bonura F., Chezzi C., Martella V., De Grazia S. (2012). Recombinant norovirus GII.g/GII.12 gastroenteritis in children. *Infect. Genet. Evol.*, 112(1): 169-174.
- 133) Giammanco G.M., De Grazia S., Tummolo F., Bonura F., Calderaro A., Buonavoglia A., Martella V., Medici M.C. (2013). Norovirus GII.4/Sidney/2012 in Italy, winter 2012-2013. *Emerg. Infect. Dis.*, 19(8): 1348-1349.
- 134) **Giammanco G.M., Di Bartolo I., Purpari G., Costantino C., Rotolo V., Spoto V., Geraci G., Bosco G., Petralia A., Guercio A., Macaluso G., Calamusa G., De Grazia S., Ruggeri F.M., Vitale F., Maida C.M., Mammina C. (2014). Investigation and control of a Norovirus outbreak of probable waterborne transmission through a municipal groundwater system. *J. Water Health*, 12(3): 452-64.**
- 135) Girardi A.J., Hilleman M.R., Zwickey R.E. (1964). Tests in hamsters for oncogenic quality of ordinary viruses including adenovirus type 7. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115, 1141-1150.
- 136) Glass R.I., Parashar U.D., Estes M.K. (2009). Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.*, 361: 1776-85.
- 137) Goens S. D., Perdue M.L. (2004). Hepatitis E viruses in humans and animals. *Anim. Health Res. Rev.*, 5:145-56.

- 138)Gosert R., Egger D., Bienz K.A. (2000). A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology*, 266: 157-169.
- 139)Goyal S.M., Adams W.N., O'Malley M.L., Lear D.W. (1984). Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the middle Atlantic region. *Applied Environmental Microbiology*, 48: 758.
- 140)Graff J., Richards O.C., Swiderek K.M., Davis M.T., Rusnak F. Harmon S.A. et al. (1999). Hepatitis A virus capsid protein VP1 as a heterogeneous C terminus. *Journal Virology*, 73: 6015-6023.
- 141)**Green J., Henshilwood K., Gallimore C.I. (1998). A Nested Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Small Round-Structured Viruses in Environmentally Contaminated Molluscan Shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 858–863.**
- 142)Green K.Y., Belliot G., Taylor J.L., Valdesuso J., Lew J.F., Kapikian A.Z., Lin F.Y. (2002). A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *J. Infect. Dis.*, 185(2):133-46. Epub 2002 Jan 3.
- 143)Green K.J. (2007). Caliciviridae : The Noroviruses. In *Fields Virology*, 5th edn, Vol. I, Cap. 28, pp.949-979. Edited by D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins.
- 144)Greig J.D., Lee M.B. (2009). Enteric outbreaks in long-term care facilities and recommendations for prevention: a review. *Epidemiol. Infect.*, 137(2): 145-155. Epub 2008 May 12.
- 145)Grima A., Gatt A., Zahra G., Gambin A. (2009). Outbreak of Norovirus infection in a nursing home for the elderly in Malta, November – December 2008. *Euro Surveill.* 14(4):pii=19103. Available online: <http://www.Eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19103>
- 146)Guix S., Asanaka M., Katayama K., Crawford S.E., Neill F.H., Atmar R.L., Estes M.K. (2007). Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J. Virol.*, 81(22): 12238-48.
- 147)Gust I.D., Lehmann N.I., Crowe S., McCrorie M., Locarini S.A., Lucas C.R. (1985). The origin of HM-175 strain of hepatitis A virus. *Journal of Infectious Disease*, 151: 365-367.
- 148)Haagsman A., Reuter G., Duizer E., Nagy G., Herremans T., Koopmans M., Szucs G. (2007). Seroepidemiology of hepatitis E virus in patients with non-A, non-B, non-C hepatitis in Hungary. *J. Med. Virol.*, 79: 927-930.
- 149)Hafliger D., Hubner P., Luthy J. (2000). Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *Int. J. Food Microbiol.*, 54: 123-126.

- 150) Halbur P.G., Kasorndorkbua C., Gilbert C., Guenette D., Potters M.B., Purcell R.H., Emerson S.U., Toth T.E., Meng X.J. (2001). Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 918-923.
- 151) Haqshenas G., Shivaprasad H.L., Woolcock P.R., Read D.H., Meng X.J. (2001). Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis splenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.*, 82: 2449-2462.
- 152) Hardy M. E. (2005). Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol. Lett.*, 253: 1-8.
- 153) Harley D., Harrower B., Lyon M., Dick A. (2001). A primary school outbreak of pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 3. *Commun. Dis. Intell.*, 25: 9-12.
- 154) Harrach B. (2008). Adenoviruses: General Features. Encyclopedia of Virology, 5 vols. Third Edition. (B.W.J. Mahy and M.H.V. Van Regenmortel, Editors), Elsevier, Oxford. vol. 1, pp. 1-9.
- 155) Havelaar A.H. (1987). Bacteriophages as model organisms in water treatment. *Microbiology Science*, 4: 362-364.
- 156) Havelaar A.H., Van Olphen M., Drost Y.C. (1993). F-specific RNA bacteriophages are adequate model organism for enteric viruses in fresh water. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 2956-2962.
- 157) Herbst-Kralovetz M., Mason H.S., Chen Q. (2010). Norwalk virus-like particles as vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, 9(3):299-307.
- 158) Herremans M., Duizer E., Jusic E., Koopmans M.P. (2007). Detection of hepatitis E virus-specific immunoglobulin in patients infected with hepatitis E virus genotype 1 or 3. *Clin. Vaccine Immunol.*, 14: 276-280.
- 159) Hewitt J., Greening G.E., Leonard M., Lewis G.D. (2013). Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. *Water Research*, 47: 6750-6761.
- 160) Hierholzer J.C., Wigand R., Anderson L.J., Adrian T., Gold J.W. (1988). Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43-47). *J. Infect. Dis.*, 158: 804-813.
- 161) Hierholzer J.C. (1992). Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin. Microbiol. Rev.*, 5: 262-274.
- 162) Hsieh S.Y., Meng X.J., Wu Y.H., Liu S.T., Tam A.W., Lin D.Y., Liaw Y.F. (1999). Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol.*, 37: 3828-3834.
- 163) Hsu C.C., Riley L.K., Livingston R.S. (2007). Molecular characterization of three novel murine noroviruses. *Virus Genes*, 34: 147-55.

- 164) Huebner R.J., Rowe W.P., Lane W.T. (1962). Oncogenic effects in hamsters of human adenoviruses 12 and 18. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 48: 2051-2058.
- 165) Humphrey T. J., Martin K.W., Walker D. (1995). Bacteriophage- a possible indicator for SRSV in oyster. *Microbiology Digest*, 12: 205-207.
- 166) Hussain Z., Dasb B.C., Husain S.A., Asima M., Chattopadhyay S., Malik A., Poovorawan A. (2005). Hepatitis A viral genotypes and clinical relevance: clinical and molecular characterization of hepatitis A virus isolates from northern India. *Hepatology Research.*, 32: 16-24.
- 167) <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>. Enterovirus.
- 168) **Iaconelli M., Purpari G., Della Libera S., Petricca S., Guercio A., Ciccaglione A.R., Bruni R., Taffon S., Equestre M., Fratini M., Muscillo M., La Rosa G. (M. Iaconelli and G. Purpari have contributed equally to this work). (2015). Hepatitis A and E Viruses in Wastewaters, in River Waters, and in Bivalve Molluscs in Italy. *Food Environ. Virol.* 06/2015; DOI:10.1007/s12560-015-9207-3 – ISSN 1867-0334 - 1.98 Impact Factor.**
- 169) Ijaz S., Arnold E., Banks M., Bendall R.P., Cramp M.E., Cunningham R., Dalton H.R., Harrison T.J., Hill S.F., Macfarlane L., Meigh R.E., Shafi S., Sheppard M.J., Smithson J., Wilson M.P., Teo C.G. (2005). Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J. Infect. Dis.*, 192: 1166-1172.
- 170) Ikeda T., Mizuta K., Abiko C., Aoki Y., Itagaki T., Katsushima F., et al. (2012). Acute respiratory infections due to enterovirus 68 in Yamagata, Japan between 2005 and 2010. *Microbiol Immunol.*, 56(2) :139-143.
- 171) Ippagunta S.K., Naik S., Sharma B., Aggarwal R. (2007). Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. *J. Med. Virol.*, 79: 1827-1831.
- 172) Irving L.G., Smith F.A. (1981). One-year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 51-59.
- 173) **ISO/TS 15216-1:2013: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 1: Method for quantification**
- 174) **ISO/TS 15216-2:2013: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection.**
- 175) Ito S., Takeshita S., Nezu A., Aihara Y., Usuku S., Noguchi Y., Yokota S. (2006). Norovirus-associated encephalopathy. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 25(7): 651-652.
- 176) Iturriza-Gómara M., Elliot A.J., Dockery C., Fleming D.M., Gray J.J. (2009). Structured surveillance of infectious intestinal disease in pre-school children in the community: 'The Nappy Study'. *Epidemiol. Infect.*, 137: 922-931.

- 177) Jacobsen K.H., Koopman J.S. (2004). Declining of hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol. infect.*, 132: 1005-1022.
- 178) Jameel S. (1999). Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert Rev. Mol. Med.*, 116.
- 179) Jiang S.C. (2006). Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environ. Sci. Technol.*, 40: 7132-7140.
- 180) Johne R., Plenge-Bönig A., Hess M., Ulrich R.G., Reetz J., Schielke A. (2010). Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J. Gen. Virol.*, 91: 750-758.
- 181) Jones M.S., Harrach B., Ganac R.D., Gozum M.M., Dela Cruz W.P., Riedel B., Pan C., Delwart E.L., Schnurr D.P. (2007). New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J. Virol.*, 81: 5978-5984.
- 182) Jones T.F. (2010). When diarrhea gets deadly: a look at gastroenteritis outbreaks in nursing homes. *Clin Infect Dis.* Oct 15;51(8):915-6.
- 183) Kageyama T., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B., Kojima S., Takai R., Oka T., Takeda N., Ktayama K. (2004). Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J. of Clin. Microbiol.*, 2988-2995.
- 184) **Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B., Takeda N., Katayama K. (2003). Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 41(4): 1548-1557.**
- 185) Kaneko H., Suzutani T., Aoki K., Kitaichi N., Ishida S., Ishiko H., Ohashi T., Okamoto S., Nakagawa H., Hinokuma R., Asato Y., Oniki S., Hashimoto T., Iida T., Ohno S. (2011). Epidemiological and virological features of epidemic keratoconjunctivitis due to new human adenovirus type 54 in Japan. *Br. J. Ophthalmol.*, 95: 32-36.
- 186) Kapikian A.Z. (2000). The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J. Infect. Dis.*, 181 Suppl 2:S295-302.: S295-S302.
- 187) Kaufmann A., Kenfak-Foguena A., André C., Canellini G., Bürgisser P., Moradpour D., Darling K.E., Cavassini M. (2011). Hepatitis E virus seroprevalence among blood donors in southwest Switzerland. *PLoS One.*;6:e21150.
- 188) Kemmer N.M., Miskovsky E.P. (2000). Hepatitis A. *Infectious Disease Clinics of North America*, 14: 605-615.
- 189) Kemp M.C., Hierholzer J.C., Cabradilla C.P., Obavijesti J.F. (1983). The changing etiology of epidemic keratoconjunctivitis: antigenic and restriction enzyme analysis of adenovirus 19 and 37 isolated over a 10 year period. *J. Infect. Dis.*, 148: 29-33.
- 190) Keum H.O., Moon H.J., Park S.J., Kim H.K., Rho S.M., Park B.K. (2009). Porcine noroviruses and sapoviruses on Korean swine farms. *Arch. Virol.*, 154: 1765-74.

- 191)Khuroo M.S., Rustgi V.K., Dawson G.J., Mushahwar I.K., Yattoo G.N., Kamili S., Khan B.A. (1994). Spectrum of hepatitis E virus infection in India. *J. Med. Virol.*, 43: 281-286.
- 192)Khuroo M.S., Kamili S., Khuroo M.S. (2009). Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J. Viral. Hepat.*, Jul; 16: 519-323.
- 193)Koo D., Bouvier B., Wesley M., Courtright P., Reingold A. (1989). Epidemic keratoconjunctivitis in a university medical center ophthalmology clinic; need for re-evaluation of the design and disinfection of instruments. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 10: 547-552.
- 194)Koo H.L., Ajami N., Atmar R.L., DuPont H.L. (2010). Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discov. Med.*, Jul;10(50): 61-70.
- 195)Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A., Rozanov M.N., Reyes G.R., Bradley D.W.. (1992). Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 89: 8259-8263.
- 196)Koopmans M., Vinje J., de Wit M., Leenen I., van der Poel W., van Duynhoven Y. (2000). Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *J. Infect. Dis.*, 181 Suppl 2: S262-S269.
- 197)Koopmans M., von Bonsdorff C.H., Vinje J., De Medici D., Monroe S. (2002). Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev.* 26-2: 187-205.
- 198)Koopmans M., Duizer E. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *Intern. J. Food Microbiol.*, 90: 23-41.
- 199)Kowalski R.P., Sundar-Raj C.V., Romanowski E.G., Gordon Y.J. (2001). The disinfection of contact lenses contaminated with adenovirus. *Am. J. Ophthalmol.*, 132: 777-779.
- 200)Krikelis V., Spyrou N., Markoulatos P., Serie C. (1985). Seasonal distribution of enteroviruses and adenoviruses in domestic sewage. *Can. J. Microbiol.*, 31: 24-25.
- 201)Krillov L.R. (2005). Adenovirus infections in the immunocompromised host. *Pediatr. Infect. Dis.*, 24: 555-556.
- 202)Kroneman A., Verhoef L., Harris J., Vennema H., Duizer E., van Duynhoven Y., Gray J., Iturriza M., Bottiger B., Falkenhorst G., Johnsen C., von Bonsdorff C.H., Maunula L., Kuusi M., Pothier P., Gallay A., Schreier E., Hohne M., Koch J., Szucs G., Reuter G., Krisztalovics K., Lynch M., McKeown P., Foley B., Coughlan S., Ruggeri F.M., Di Bartolo I., Vainio K., Isakbaeva E., Poljsak-Prijatelj M., Grom A.H., Mijovski J.Z., Bosch A., Buesa J., Fauquier A.S., Hernandez-Pezzi G., Hedlund K.O., Koopmans M.P. (2008a) Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J. Clin. Microbiol.*, 46: 2959-2965.

- 203) Kroneman A., Harris J., Vennema H., Duizer E., van Duynhoven Y., Gray J., Iturriza M., Bottiger B., Falkenhorst G., Johnsen C., von Bonsdorff C.H., Maunula L., Kuusi M., Pothier P., Gallay A., Schreier E., Koch J., Szucs G., Reuter G., Krisztalovics K., Lynch M., McKeown P., Foley B., Coughlan S., Ruggeri F.M., Di Bartolo I., Vainio K., Isakbaeva E., Poljsak-Prijatelj M., Grom A.H., Bosch A., Buesa J., Fauquier A.S., Hernandez-Pezzi G., Hedlund K.O., Koopmans M.P. (2008b). Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses. *J. Public Health (Oxf)*, 30: 82-90.
- 204) Krüttgen A., Scheithauer S., Häusler M., Kleines M.. (2011). First report of an autochthonous hepatitis E virus genotype 3 infection in a 5 month old female child in Germany. *J. Clin. Virol.*, 50: 175-176.
- 205) Kukkula M., Arstila P., Klossner M.L., Maunula L., Bonsdorff C.H., Jaatinen P. (1997). Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand. J. Infect. Dis.*, 29: 415-148.
- 206) Kukkula M., Maunula L., Silvennoinen E., von Bonsdorff C.H. (1999). Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J. Infect. Dis.*, 180: 1771-1776.
- 207) Kuniholm M.H., Purcell R.H., McQuillan G.M., Engle R.E., Wasley A., Nelson K.E. (2009). Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J. Infect. Dis.*, 200: 48-56.
- 208) Kusov Y.Y., Morace G., Probst C., Gauss-Muller V. (1997). Interaction of hepatitis A virus (HAV) precursor proteins 3AB and 3ABC with 5' and 3' termini of the HAV RNA. *Virus Research*, 51: 151-157.
- 209) Labrique A.B., Zaman K., Hossain Z., Saha P., Yunus M., Hossain A., Ticehurst J.R., Nelson K.E. (2010). Epidemiology and risk factors of incident hepatitis E virus infections in rural Bangladesh. *Am. J. Epidemiol.*, 172: 952-61.
- 210) La Rosa G., Fontana S., Di Grazia A., Iaconelli M., Pourshaban M., Muscillo M. (2007a). Molecular Identification and Genetic Analysis of Norovirus Genogroups I and II in Water Environments: Comparative Analysis of Different Reverse Transcription-PCR Assays. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 4152-61 [Erratum in: *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(19): 6329].
- 211) La Rosa G., Pourshaban M., Iaconelli M., Muscillo M. (2007b). Adenovirus quali patogeni emergenti responsabili di infezioni idrodifuse. *Biologi Italiani*, 4: 51-57.
- 212) La Rosa G., Pourshaban M., Iaconelli M., Muscillo M. (2008a). Recreational and drinking waters as a source of norovirus gastroenteritis outbreaks: a review and update. *Environmental Biotechnology.*, 4: 15-24.
- 213) La Rosa G., Pourshaban M., Iaconelli M., Muscillo M. (2008b). Detection of genogroup IV noroviruses in environmental and clinical samples and partial sequencing through rapid amplification of cDNA ends. *Arch. Virol.*, 153: 2077-83.

- 214) La Rosa G., Pourshaban M., Iaconelli M., Muscillo M. (2009). Quantification of Norovirus genogroups I and II in environmental and clinical samples using Taqman Real-Time RT-PCR. *Food and Environmental Virology.*, 1: 15-22.
- 215) La Rosa G., Iaconelli M., Pourshaban M., Muscillo M. (2010a). Detection and molecular characterization of noroviruses from five sewage treatment plants in central Italy. *Water Res.*, 44: 1777-1784.
- 216) La Rosa G., Pourshaban M., Iaconelli M., Muscillo M. (2010b). Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 46: 266-73.
- 217) La Rosa G., Muscillo M., Vennarucci V.S., Garbuglia A.R., La Scala P., Capobianchi M.R. (2011). Hepatitis E virus in Italy: molecular analysis of travel-related and autochthonous cases. *J. Gen. Virol.*, 92: 1617-1626.
- 218) **La Rosa G., Fratini M., Spuri Vennarucci V., Guercio A., Purpari G., Muscillo M. (2012). GIV noroviruses and other enteric viruses in bivalves: a preliminary study. *New Microbiologica*, 35: 27-34.**
- 219) La Rosa G., Della Libera S., Iaconelli M., Ciccaglione A.R., Bruni R., Taffon S., Equestre M., Alfonsi V., Rizzo C., Tosti M.E., Chironna M., Romanò L., Zanetti A.R., Muscillo M. (2014a). Surveillance of hepatitis A virus in urban sewages and comparison with cases notified in the course of an outbreak, Italy 2013. *BMC Infectious Diseases*, 14: 419 <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/419>
- 220) La Rosa G., Fratini M., Muscillo M., Iaconelli M., Taffon S., Equestre M., Chionne P., Madonna E., Pisani G., Bruni R., Ciccaglione A.R. (2014b). Molecular characterisation of human hepatitis E virus from Italy: comparative analysis of five reverse transcription-PCR assays. *Virol J.* Apr 22;11:72. doi: 10.1186/1743-422X-11-72
- 221) Lees D. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 81-116.
- 222) Le Guyader F., Haugarreau L., Miossec L., Dubois E., Pommepey M. (2000). Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied Environmental Microbiology*, 68(8): 3214-3218.
- 223) **Le Guyader F., Dubois E., Menard D., Pommepey M. (1994). Detection of Hepatitis A Virus, Rotavirus and Enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by Reverse Transcription-Seminested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3665-3671.**
- 224) **Le Guyader F.S., Parnaudeau S., Schaeffer J., Bosch A., Loisy F., Pommepey M., Atmar R.L. (2009). Detection and quantification of norovirus in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 618-624.**
- 225) Lew J.F., Moe C.L., Monroe S.S., Allen J.R., Harrison B.M., Forrester, B.D. Stine, S.E., Woods P.A., Hierholzer J.C., Herrmann J.E (1991). Astrovirus and adenovirus associated with diarrhea in children in day care settings. *J. Infect. Dis.*, 164: 673-678.

- 226) Lewis H.C., Boisson S., Ijaz S., Hewitt K., Ngui S.L., Boxall E., Teo C.G., Morgan D. (2008). Hepatitis E in England and Wales. *Emerg. Infect. Dis.*, 14: 165-167.
- 227) Li R.C., Ge S.X., Li Y.P., Zheng Y.J., Nong Y., Guo Q.S., Zhang J., Ng M.H., Xia N.S. (2006a). Seroprevalence of hepatitis E virus infection, rural southern People's Republic of China. *Emerg. Infect. Dis.*, 12: 1682-1688.
- 228) Li X., Kamili S., Krawczynski K. (2006b). Quantitative detection of hepatitis E virus RNA and dynamics of viral replication in experimental infection. *J. Viral. Hepat.*, 13:835-839.
- 229) Li W., Shu X., Pu Y., Bi J., Yang G., Yin G. (2011). Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in Yunnan Province, China. *Arch Virol.*, 156: 1989-1995.
- 230) Lindesmith L.C., Donaldson E.F., Lobue A.D., Cannon J.L., Zheng D.P., Vinje J., Baric R.S. (2008). Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.*, 5(2): 31.
- 231) Lindesmith L.C., Donaldson E., Leon J., Moe C.L., Frelinger J.A., Johnston R.E., Weber D.J., Baric R.S. (2010). Heterotypic humoral and cellular immune responses following Norwalk virus infection. *J. Virol.*, 84: 1800-15.
- 232) Liu C. (1991) Adenoviruses. In: Belshe, R.B. (ed.) Textbook of human virology , 2 nd Ed. Mosby Year Book. St. Louis, MO, pp. 791-803.
- 233) Liu B.L., Lambden P.R., Gunther H., Otto P., Elschner M., Clarke I.N. (1999). Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J. Virol.*, 73: 819-25.
- 234) Lobue A.D., Lindesmith L., Yount B., Harrington P.R., Thompson J.M., Johnston R.E., Moe C.L., Baric R.S. (2006). Multivalent norovirus vaccines induce strong mucosal and systemic blocking antibodies against multiple strains. *Vaccine*, 24: 5220-5234.
- 235) **Loisy F., Atmar R.L., Guillon P., Le Cann P., Pommepuy M., Le Guyander F.S. (2005). Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Methods*, 123(1): 1-7.**
- 236) Lopalco P.L., Malfait P., Menniti-Ippolito F., et al. (2005). Determinants of acquiring hepatitis A virus disease in a large Italian region in endemic and epidemic periods. *Journal of Viral Hepatology*, 12: 315-21.
- 237) Lopman B.A., Reacher M.H., Vipond I.B., Sarangi J., Brown D.W. (2004). Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin. Infect. Dis.*, 39(3): 318-24. Epub 2004 Jul 9.
- 238) Lopman B.A., Gastanaduy P., Park G.W., Hall A.J., Parashar U.D., Vinjé J. (2012). Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Curr. Opin. Virol.*, 2(1): 96-102.

- 239) **Lowther J.A., Henshilwood K., Lees D.N. (2008). Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. *J. Food Prot.*, 71 (7): 3846-55.**
- 240) Lu L., Li C., Hagedorn C.H. (2006a). Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.*, 16: 5-36.
- 241) **Lu X., Erdman D.D. (2006b). Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. *Arch. Virol.*, 151: 1587–1602.**
- 242) Lucena F., Lasobras J., McIntosh D., Forca M., Lofre L. (1994). Effect of the distance from the polluting focus on relative concentration of Bacteroides fragilis phages and coliphages in mussels. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 2272-2277.
- 243) Mansuy J.M., Legrand-Abravanel F., Calot J.P., Peron J.M., Alric L., Agudo S., Rech H., Destruel F., Izopet J. (2008). High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in blood donors from South West France. *J. Med. Virol.*, 80: 289-293.
- 244) Mansuy J.M., Abravanel F., Miedouge M., Mengelle C., Merviel C., Dubois M., Kamar N., Rostaing L., Alric L., Moreau J., Peron J.M., Izopet J. (2009). Acute hepatitis E in south-west France over a 5-year period. *J. Clin. Virol.*, 44 :74-77.
- 245) Mansuy J.M., Bendall R., Legrand-Abravanel F., Sauné K., Miédouge M., Ellis V., Rech H., Destruel F., Kamar N., Dalton H.R., Izopet J. (2011). Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 17: 2309-2312.
- 246) Marr L. (2007). Sexually Transmitted Diseases: A Physician Tells You What You Need to Know. Second Edition. JHU Press. Baltimore, Mariland.
- 247) Martella V., Campolo M., Lorusso E., Cavicchio P., Camero M., Bellacicco A.L., Decaro N., Elia G., Greco G., Corrente M., Desario C., Arista S., Banyai K., Koopmans M., Buonavoglia C. (2007). Norovirus in captive lion cub. *Emerg. Infect. Dis.*, 13 (7): 1071–1073.
- 248) Martella V., Lorusso E., Decaro N., Elia G., Radogna A., D’Abramo M., Desario C., Cavalli A., Corrente M., Camero M., Germinario C.A., Banyai K., Di Martino B., Marsilio F., Carmichael L.E., Buonavoglia C. (2008). Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg. Infect. Dis.*, 14 (8): 1306–1308.
- 249) Martella V., Medici M.C., De Grazia S., Tummolo F., Calderaro A., Bonura F., Saporito L., Terio V., Catella C., Lanave G., Buonavoglia C., Giammanco G.M. (2013). Evidence for recombination between the pandemic GII.4 norovirus strains New Orleans 2009 and Sidney 2012. *J. Clin. Microbiol.*, 51(11): 3855-3857.
- 250) Martin A., Escriou N., Chao S. F., Lemon S.M., Girard M., Wychowaski C. (1995). Identification and site-directed mutagenesis of the primary (2A/2B) cleavage site of the hepatitis A virus polyprotein: functional impact on the infectivity of HAV transcripts. *Virology*, 213: 213-222.

- 251) **Martin L.R., Duke G.M., Osorio J.E., Hall D.J., Palmenberg A.C. (1996). Mutational analysis of the Mengovirus poly[©] tract and surrounding heteropolymeric sequences. *J. Virol.*, 70(3): 2027-2031.**
- 252) Martin A., Benichou D., Chao S.F., Cohen L.M., Lemon S.M. (1999). Maturation of the hepatitis A virus capsid protein VP1 is not dependent on processing by the 3Cpro proteinase. *Journal Virology*. 73: 6220-6227.
- 253) Martin A., Lemon S.M. (2002). The molecular biology of hepatitis A virus. In: Ou, J.H. (Ed), *Hepatitis Viruses*. Kluwer Academic Publishers: 23-50.
- 254) Martin A., Lemon S.M. (2006). Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology*, 43: S164- S172.
- 255) Martone W.J., Hierholzer J.C., Keenlyside R.A., Fraser D.W., D'Angelo L.J., Winkler W.G. (1980). An outbreak of adenovirus type 3 disease at a private recreation center swimming pool. *Am. J. Epidemiol.*, 111: 229-237.
- 256) Matsubayashi K., Kang J.H., Sakata H., Takahashi K., Shindo M., Kato M., Sato S., Kato T., Nishimori H., Tsuji K., Maguchi H., Yoshida J., Maekubo H., Mishiro S., Ikeda H. (2008). A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion*, 48: 1368-1375.
- 257) Maunula L., Miettinen I.T., von Bonsdorff C.H. (2005). Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerg. Infect. Dis.*, 11: 1716-21.
- 258) McNeill K.M., Hendrix R.M., Lindner J.L., Benton F.R., Monteith S.C., Tuchscherer M.A., Gray G.C., Gaydos J.C. (1999). Large, persistent epidemic of adenovirus type 4-associated respiratory disease in U.S. army trainees. *Emerg. Infect. Dis.*, 5: 798-801.
- 259) Medici M.C., Martinelli M., Ruggeri F.M., Abelli L.A., Bosco S., Arcangeletti M.C., Pinardi F., De Conto F., Calderaro A., Chezzi C., Dettori G. (2005) Broadly reactive nested reverse transcription-PCR using an internal RNA standard control for detection of noroviruses in stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 3772-3778.
- 260) Medici M.C., Abelli L.A., Ruggeri F.M., Di Bartolo I., Arcangeletti M.C., Pinardi F., De Conto F., Izzi G., Bernasconi S., Chezzi C., Dettori G. (2006). Molecular epidemiology of norovirus infections in sporadic cases of viral gastroenteritis among children in Northern Italy. *J. Med. Virol.*, 78(11): 1486-1492.
- 261) Medici M.C., Morelli A., Arcangeletti M.C., Calderaro A., De Conto F., Martinelli M., Abelli L.A., Dettori G., Chezzi C. (2009). An outbreak of norovirus infection in an Italian residential-care facility for the elderly. *Clin. Microbiol. Infect.*, 15(1): 97-100.
- 262) Medici M.C., Abelli L.A., Dodi I., Dettori G., Chezzi C. (2010). Norovirus RNA in the blood of a child with gastroenteritis and convulsions-A case report. *J. Clin. Virol.*, 48(2): 147-149. Epub 2010 Apr 8.

- 263)Medici M.C., Tummolo F., Martella V., Giammanco G.M., De Grazia S., Arcangeletti M.C., De Conto F., Chezzi C., Calderaro A. (2014). Novel recombinant GII.P16_GII.13 and GII:P16_GII.3 norovirus strains in Italy. *Virus Res.*, 188: 142-145.
- 264)Medici M.C., Tummolo F., Calderaro A., Chironna M., Giammanco G., De Grazia S., Arcangeletti M.C., De Conto F., Chezzi C., Martella V. (2015a). Identification of the novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy, 2015. *EuroSurveill.*, 20(35):pii=30010.DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.35.30010>
- 265)Medici M.C., Tummolo F., De Grazia S., Calderaro A., De Conto F., Terio V., Chironna M., Bonura F., Pucci M., Banyai K., Martella V., Giammanco G.M. (2015b). Epidemiological dynamics of norovirus GII.4 variant New Orleans 2009. *J. Gen. Virol.*, 96(9): 2919-2927.
- 266)Mena K.D., Gerba C.P. (2009). Waterborne adenovirus. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 198: 133-167.
- 267)Meng X.J., Purcell R.H., Halbur P.G., Lehman J.R., Webb D.M., Tsareva T.S., Haynes J.S., Thacker B.J., Emerson S.U. (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 9860-9865.
- 268)Meng X.J., Halbur P.G., Haynes J.S., Tsareva T.S., Bruna J.D., Royer R.L., Purcell R.H., Emerson S.U. (1998a). Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch. Virol.*, 143: 1405-1415.
- 269)Meng X.J., Halbur P.G., Shapiro M.S., Govindarajan S., Bruna J.D., Mushahwar I.K., Purcell R.H., Emerson S.U. (1998b). Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J. Virol.*, 72: 9714-9721.
- 270)Meng X.J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D.K., Toth T.E., Engle R.E., Emerson S.U., Purcell R.H. (2002). Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 117-122.
- 271)Meng X.J. (2010). Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol.*, 140(3-4): 256.doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.017.
- 272)Metodica allegata al kit Applied Biosystems - GeneAmp® RNA PCR Core Kit.
- 273)Metodica allegata al kit Bioline - MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit.
- 274)Metodica allegata al kit Bioline - MyTaq™ Red Mix Kit.
- 275)Metodica allegata al kit Invitrogen - RNA UltraSense™ One-Step (Quantitative) qRT-PCR System.
- 276)Metodica allegata al kit QIAGEN – QIAamp® Viral RNA Mini Kit.
- 277)Metodica allegata al kit QIAGEN - Taq PCR Core Kit.

- 278) Metodica allegata ai reagenti BioMérieux – NucliSENS Lysis Buffer.
- 279) Metodica allegata ai reagenti BioMérieux – NucliSENS Magnetic Extraction Reagents.
- 280) **Metodo qualitativo “Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante Real Time PCR” - Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali nei molluschi bivalvi - Istituto Superiore di Sanità.**
- 281) Ministero della Salute. DGISAN 0024557-P-16/06/2015. Gestione delle positività per Norovirus nei Molluschi Bivalvi Vivi nelle aree di produzione.
- 282) **Mira F., Di Bella S., Cannella V., De Gregorio V., Purpari G., Guercio A. (2008). Ottimizzazione di un metodo di estrazione e concentrazione del virus dell’HAV da campioni di cozze (*Mitylus galloprovincialis*). *Atti del X Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.*, 248-249. (Alghero 22/24 ottobre 2008).**
- 283) Mizuta, K., Suzuki, H., Ina, Y., Yazaki, N., Sakamoto, M., Katsushima, N., and Numazaki, Y. (1994). Six-year longitudinal analysis of adenovirus type 3 genome types isolated in Yamagata, Japan. *J. Med. Virol.*, 42, 198-202.
- 284) Motte A, Roquelaure B, Galambrun C, Bernard F, Zandotti C, Colson P. (2012). Hepatitis E in three immunocompromized children in southeastern France. *J. Clin. Virol.*, 53:162-6.
- 285) **MP 09/180 Rev.0 del 24.05.2013: Metodo di prova interno per la ricerca del virus dell’Epatite A in alimenti, acqua e campioni biologici mediante PCR. I.Z.S.L.E.R.**
- 286) **Muscillo M., Fratini M., Graffeo R., Sanguinetti M., Martella V., Green K.Y., Della Libera S., La Rosa G. (2013). GIV Noroviruses in Wastewaters and in Stool Specimens from Hospitalized Patients. *Food Environ Virol.*, 5: 194–202. DOI 10.1007/s12560-013-9121-5**
- 287) Nainan O.V., Margolis H.S., Robertson B.H., Balayan M., Brinton M.A. (1991). Sequence analysis of a new hepatitis A virus naturally infecting cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Journal General Virology*, 72: 1685-1689.
- 288) Nayak M.K., Chatterjee D., Nataraju S.M., Pativada M., Mitra U., Chatterjee M.K., Saha T.K., Sarkar U., Krishnan T. (2009). A new variant of Norovirus GII.4/2007 and inter-genotype recombinant strains of NVGII causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. *J. Clin Virol.*; 45: 223-229.
- 289) Nakamura K, Saga Y, Iwai M, Obara M, Horimoto E, Hasegawa S, Kurata T, Okumura H, Nagoshi M, Takizawa T. (2010). Frequent Detection of Noroviruses and Sapoviruses in Swine and High Genetic Diversity of Porcine Sapovirus in Japan during Fiscal Year 2008. *J. Clin Microbiol.*, 48: 1215-22.
- 290) Navaneethan U., Al Mohajer M., Shata M.T. (2008). Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int.*, 28:1190-9.

- 291) Nelson K.E., Kmush B., Labrique A.B. (2011). The epidemiology of hepatitis E virus infections in developed countries and among immunocompromised patients. *Expert Rev. Anti Infect Ther.*, 9:1133-48.
- 292) Nenonen N.P., Hernroth B., Chauque A.A., Hannoun C., Bergstrom T. (2006). Detection of Hepatitis A Virus Genotype IB Variants in Clams From Maputo Bay, Mozambique. *Journal of Medical Virology*, 78: 896–905.
- 293) Newell D.G., Koopmans M., Verhoef L., Duizer E., Aidara-Kane A., Sprong H., Opsteegh M., Langelaar M., Threfall J., Scheutz F., van der Giessen J., Kruse H. (2010). Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 3–15.
- 294) Ngui S.L., Granerod J., Jewes L.A., Crowcroft N.S., Teo C.G. (2008). Outbreaks of Hepatitis A in England and Wales Associated With Two Co-Circulating Hepatitis A Virus Strains. *Journal of Medical Virology*, 80: 1181–1188.
- 295) Nishizawa T., Takahashi M., Mizuo H., Miyajima H., Gotanda Y., Okamoto H. (2003). Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99% identity over the entire genome. *J Gen Virol.*, 84: 1245-1251.
- 296) Norder H., Sundqvist L., Magnusson L., Østergaard Breum S., Löfdahl M., Larsen L.E., Hjulsager C.K., Magnius L., Böttiger B.E., Widén F. (2009). Endemic hepatitis E in two Nordic countries. *Eurosurveillance*, Vol 14.
- 297) Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., Pallansch M.A. (1999). Molecular Evolution of the Human Enteroviruses: Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *Journal of Virology*, 1941-1948.
- 298) Oberste M.S., Schnurr D., Maher K., al-Busaidy S., Pallansch M.A. (2001). Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *Journal of General Virology*, 82: 409–416.
- 299) Okamoto H. (2007). Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.*, 127: 216-228.
- 300) Okamoto H. (2011). Efficient cell culture systems for hepatitis E virus strains in feces and circulating blood. *Rev. Med. Virol.*, 21: 18-31.
- 301) Orrù G., Masia G., Orru G., Romano L., Piras V., Coppola R.C. (2004). Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *J. Virol. Methods*, 118: 77-82.
- 302) **Ottaviani M., Bonadonna L. (2000). Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano. Volume secondo. Parte 2. Rapporti ISTISAN 00/14 Pt.2: 309-327.**

- 303) Pallansch M., Roos R. (2007). Enteroviruses, Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and newer Enteroviruses. In *Fields Virology*, 5th edn, Vol. I, Cap. 25, pp.839-893. Edited by D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins.
- 304) Panda S. K., Thakral D., Rehman S. (2007). Hepatitis E virus. *Rev Med Virol.*, 17: 151-180.
- 305) Papapetropoulou M., Vantarakis A.C. (1998). Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification. *J. Infect.*, 36: 101-103.
- 306) Park G.W., Barclay L., Macinga D., Charbonneau D., Pettigrew C.A., Vinjé J: (2010). Comparative efficacy of seven hand sanitizers against murine norovirus, feline calicivirus, and GII.4 norovirus. *J. Food Prot.*, 73: 2232-2238.
- 307) Parrino T.A., Schreiber D.S., Trier J.S., Kapikian A.Z., Blacklow N.R. (1977). Clinical immunity in acute gastroenteritis by the Norwalk agent. *N. Engl. J. Med.*, 297: 86–89.
- 308) Patel M.M., Widdowson M.A., Glass R.I., Akazawa K., Vinje J., Parashar U.D. (2008). Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.*, 14: 1224-1231.
- 309) Patel M.M., Hall A.J., Vinjé J., Parashar U.D. (2009). Noroviruses: a comprehensive review. *J. Clin. Virol.*, 44(1): 1-8.
- 310) Payment P., Locas A. (2011). Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water*, 49(1): 4-11.
- 311) Pepe T., Ventrone I., Suffredini E., Caruso M., Croci L., Anastasio A. (2010). Applicazione di un protocollo One-Step Real Time RT-PCR per la ricerca di Norovirus in Molluschi Bivalvi raccolti e commercializzati nella regione Campania. *A.I.V.I.*, 61-64.
- 312) Pereira M.S., Pereira H.G., Clarke S.K.R. (1965). Human adenovirus type 31. A new serotype with oncogenic properties. *Lancet*, 1: 21-23.
- 313) Petrinca A.R., Donia D., Pierangeli A., Gabrieli R., Degener A.M., Bonanni E., Diaco L., Cecchini G., Anastasi P., Divizia M. (2009). Presence and environmental circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants. *J. Appl. Microbiol.*, 106: 1608-17.
- 314) Pfefferle S, Frickmann H, Gabriel M, Schmitz N, Günther S, Schmidt-Chanasit J. (2011). Fatal course of an autochthonous hepatitis E virus infection in a patient with leukemia in Germany. *Infection*. [Epub ahead of print]
- 315) Phan T.G., Kaneshi K., Ueda Y., Nakaya S., Nishimura S., Yamamoto A., Sugita K., Takanashi S., Okitsu S., Ushijima H. (2007). Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in Noroviruses. *J. Med. Virol.*, 79: 1388-400.

- 316) Pina S., Puig M., Lucena F., Jofre J., Girones R. (1998). **Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(9): 3376-3382. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106735/>
- 317) Pina S., Buti M., Jardì R., Clemente-Cesares P., Lofre J., Girones R. (2001). Genetic analysis of hepatitis A virus strain recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *Journal of General Virology*, 82: 2955-2963.
- 318) **Pintò R.M., Costafreda M.I., Ribes E., Bosch A. (2009). From quantitative risk-assessment to risk management in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. Manuscript submitted to Appl. Environ. Microbiol.**
- 319) **POMIAC01.002 Rev.2 del 28.02.2012: Metodo per la ricerca di Epatite A e Norovirus in alimenti mediante Real-Time PCR.**
- 320) Pring-Åkerblom P., Adrian T. (1995). Sequence characterization of the adenovirus 31 fibre and comparison with serotypes of subgenera A to F. *Res. Virol.*, 146: 343-354.
- 321) Protocollo del kit BioMérieux – NucliSENS Magnetic Extraction Kit.
- 322) **Puig M., Jofre J., Lucena F., Allard A., Wadell G., Girones R. (1994). Detection of Adenovirus and Enterovirus in polluted waters by nested PCR amplification.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (8): 2963-2970.
- 323) Puenpa J., Theamboonlers A., Korkong S., Linsuwanon P., Thongmee C., Chatproedprai S., et al. (2011). Molecular characterization and complete genome analysis of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 from children with hand, foot and mouth disease in Thailand during 2008-2011. *Arch Virol.*, 156(11): 2007-2013.
- 324) Pulendran B., Ahmed R. (2006). Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell.*, 124(4): 849–863.
- 325) Purcell R.H., Emerson S.U. (2001). Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J.*, 42: 161-177.
- 326) Ramirez S., De Grazia S., Giammanco G.M., Milici M., Colomba C., Ruggeri F.M., Martella V., Arista S. (2006). Detection of the norovirus variants GII.4 hunter and GIIB/hilversum in Italian children with gastroenteritis. *J. Med. Virol.*, 78: 1656-1662.
- 327) Ramirez S., Giammanco G.M., De Grazia S., Colomba C., Martella V., Arista S. (2009). Emerging GII.4 norovirus variants affect children with diarrhea in Palermo, Italy in 2006. *J. Med. Virol.*, 81: 139-145.
- 328) Räsänen S., Lappalainen S., Kaikkonen S., Hämäläinen M., Salminen M., Vesikari T. (2010). Mixed viral infections causing acute gastroenteritis in children in a waterborne outbreak. *Epidemiol. Infect.*, 138: 1227-1234.

- 329)REGOLAMENTO (CE) N. 852/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari.
- 330)REGOLAMENTO (CE) N. 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.
- 331)REGOLAMENTO (CE) N. 854/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.
- 332)REGOLAMENTO (CE) N. 882/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali.
- 333)REGOLAMENTO (CE) N. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
- 334)Regolamento (UE) 2015/2285 DELLA COMMISSIONE che modifica l'allegato II del regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano per quanto riguarda taluni requisiti per i molluschi bivalvi vivi, gli echinodermi, i tunicati e i gasteropodi marini, nonché l'allegato I del regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
- 335)Reuter G., Pankovics P., Szucs G. (2008).Genetic drift of norovirus genotype GII-4 in seven consecutive epidemic seasons in Hungary. *J. Clin Virol.*, 42: 135-140.
- 336)Reuter G., Fodor D., Forgach P., Katai A., Szucs G. (2009). Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J. Clin. Virol.*, 44: 277-281.
- 337)Richards G.P. (1998). Microbial purification of shellfish. *J. Food. Prot.*, 51: 218-251.
- 338)Rizzo C., Alfonsi V., Bruni R., Busani L., Ciccaglione A.R., De Medici D., et al. (2013). Ongoing outbreak of hepatitis A in Italy: Preliminary report as of 31 May 2013. *Eurosurveillance Weekly*, 18(27): 20518.
- 339)Robertson B.H., Jansen R.W., Khanna B., Totsuka A., Nainan O.V., Siegl G., Widell A., Margolis H.S., Isomura S., Ito K., Ishizu T., Moritsugu Y., Lemon S.M. (1992). Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *Journal General Virology*, 73: 1365-1377.
- 340)Rockx B., De Wit M., Vennema H., Vinjé J., De Bruin E., Van Duynhoven Y., Koopmans M. (2002). Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin. Infect. Dis.*, 35(3): 246-253.

- 341) Roger I., Glass M.D., Umesh D., Parashar M.D., M.P.H., Estes M.K. (2009). Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.*, 361(18): 1776-1785.
- 342) Romanò L., Paladini S., Tagliacarne C., Canuti M., Bianchi S., Zanetti A.R. (2011). Hepatitis E in Italy: a long-term prospective study. *J. Hepatol.*, 54: 34-40.
- 343) Rose N., Boutrouille A., Fablet C., Madec F., Eloit M., Pavio N. (2010). The use of Bayesian methods for evaluating the performance of a virus-like particles-based ELISA for serology of hepatitis E virus infection in swine. *J. Virol. Methods*, 163: 329-335
- 344) Rosenthal N.A., Lee L.E., Vermeulen B.A., Hedberg K., Keene W.E., Widdowson M.A., Cieslak P.R., Vinjé J. (2011). Epidemiological and genetic characteristics of norovirus outbreaks in long-term care facilities, 2003-2006. *Epidemiol Infect.*, 139(2): 286-294.
- 345) Rowe W.P., Huebner R.J., Gilmore L.K. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 84: 570-573.
- 346) Rutjes S.A., Lodder-Verschoor F., van der Poel W.H., van Duijnhoven Y.T., de Roda Husman A.M. (2006). Detection of noroviruses in foods: a study on virus extraction procedures in foods implicated in outbreaks of human gastroenteritis. *J. Food Prot.*, 69: 1949-1956.
- 347) Rzezutka A., Cook N. (2004). Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiology Review*, 28: 441-453.
- 348) Saad R.S., Demetris A.J., Kusne S., Randhawa P.S. (1997). Adenovirus hepatitis in the adult allograft liver. *Transplantation*, 64: 1483-1485.
- 349) Sair A.I., D'Souza D.H., Jaykus L.A. (2002). Human enteric viruses as causes of foodborne disease. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1: 73-89.
- 350) Sanchez J.L., Binn L.N., Innis B.L., Reynolds R.D., Lee T., Mitchell-Raymundo F., Craig S.C., Marquez J.P., Shepherd G.A., Polyak C.S., Conolly J., Kohlhase K.F. (2001). Epidemic of adenovirus-induced respiratory illness among US military recruits: epidemiologic and immunologic risk factors in healthy, young adults. *J. Med. Virol.*, 65: 710-718.
- 351) Sattar S.A., Tetro J., Bidawid S., Farber J. (2000). Foodborne spread of hepatitis A: recent studies on virus survival, transfer and inactivation. *Canadian Journal Infectious Disease*, 11(3): 159-163.
- 352) Savichtcheva O., Okabe S. (2006). Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Res.*, 40(13): 2463-2476.
- 353) Schmitz H., Wigand R., Heinrich W. (1983). Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am. J. Epidemiol.*, 117: 455-466.

- 354) Scipioni A., Mauroy A., Vinjé J., Thiry E. (2008). Animal noroviruses. *Vet. J.*, 178: 32-45.
- 355) Shidrawi R.G., Skidmore S.J., Coleman J.C., Dayton R., Murray-Lyon I.M. (1994). Hepatitis E - an important cause of imported non-A, non-B hepatitis among migrant workers in Qatar. *J. Med. Virol.*, 43: 412-414.
- 356) Shinozaki T., Araki K., Fujita Y., Kobayashi M., Tajima T., Abe T. (1991). Epidemiology of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children in the Tokyo area. *Scand. J. Infect. Dis.*, 23: 543-547.
- 357) Sidhu J.P., Toze S.G. (2009). Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. *Environ. Int.*, 35(1): 187-201.
- 358) Siebenga J.J., Vennema H., Zheng D.P., Vinjé J., Lee B.E., Pang X.L., Ho E.C., Lim W., Choudekar A., Broor S., Halperin T., Rasool N.B., Hewitt J., Greening G.E., Jin M., Duan Z.J., Lucero Y., O'Ryan M., Hoehne M., Schreier E., Ratcliff R.M., White P.A., Iritani N., Reuter G., Koopmans M.P. (2009). Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001-2007. *J. Infect. Dis.*, 200: 802-812.
- 359) Smith J.G., Wiethoff C.M., Stewart P.L., Nemerow G.R. (2010) Adenovirus. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 343: 195-224.
- 360) Sobsey M.D., Dean C.H., Kunckles M.E., Wagner R.A. (1980). Interaction on survival of enteric viruses in soil material. *Applied Environmental Microbiology*, 40: 92-101.
- 361) Sobsey M.D., Davis A.L., Rullmann V.A. (1987). Persistence of hepatitis A virus and other viruses in depurated Easter oysters. *Proc. Oceans*, 5: 1740-1749.
- 362) Sobsey M.D., Shields P.A., Hauchman F.S., Davis A.L., Rullman V.A., Bosch A. (1988). Survival and persistence of hepatitis A virus in environmental samples. In: AJ Zuckerman, ed. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York: Alan R Liss Inc.; 121-124.
- 363) Sosnovtsev S.V., Belliot G., Chang K.O., Onwudiwe O., Green K.Y. (2005). Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J. Virol.*, Apr;79(7): 4012-4024.
- 364) Spada E., Genovese D., Tosti ME., et al. (2005). An outbreak of hepatitis A virus infection with a high case-fatality rate among injecting drug user. *Journal Hepatology*, 43: 958-964.
- 365) Springthorpe S., Sattar J.M. (1996). Handwashing: product and technique comparisons. *Infect Control Sterilization Tech.*, 2: 19-22.
- 366) Steffen R. (2005). Changing travel-related global epidemiology of hepatitis A. *American Journal of Medicine*, 118: 46-49.

- 367)Stene-Johansen K., Jenum P.A., Hoel T., Blystad H., Sunde H., Skaug K. (2002). An outbreak of hepatitis A among homosexuals linked to a family outbreak. *Epidemiol. Infect.*, 129: 113–117.
- 368)Straub T.M., Höner zu Bentrup K., Orosz-Coghlan P., Dohnalkova A., Mayer B.K., Bartholomew R.A., Valdez C.O., Bruckner-Lea C.J., Gerba C.P., Abbaszadegan M., Nickerson C.A. (2007). In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.*, 13(3): 396-403.
- 369)**Suffredini E., Auricchio B. (2005) - Determinazione di Norovirus in Molluschi Eduli Lamellibranchi. Rapporti ISTISAN 05/24: 73-81.**
- 370)Summa M., von Bonsdorff C.H., Maunula L. (2012). Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries. *Journal of Virological Methods*, 183: 154– 160.
- 371)**Svraka S., Duizer E., Vennema H., de Bruin E., van der Veer B., Dorresteyn B., Koopmans M. (2007). Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol.*, 45(5): 1389-1394.**
- 372)**Taffon S., Bidini G., Vichi F., Corti G., Genovese D., Kondili L.A., Bindi R., Armellini F., Leoncini F., Bartoloni A., Mazzotta F., Rapicetta M. (2011). A unique HAV strain circulated in patients with acute HAV infection with different risk exposures in Tuscany, Italy. *Journal of Clinical Virology*, 50: 142–147.**
- 373)Tahan V., Ozdogan O., Tozun N. (2003). Epidemiology of viral hepatitis in the Mediterranean basin. *Rocz Akad Med Bialymst.*, 48: 11-17.
- 374)Tam A.W., Smith M.M., Guerra M.E., Huang C.C., Bradley D.W., Fry K.E., Reyes G.R. (1991). Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 185: 120-131.
- 375)Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–2729.
- 376)Tanaka Y., Takahashi K., Orito E., Karino Y., Kang J.H., Suzuki K., Matsui A., Hori A., Matsuda H., Sakugawa H., Asahina Y., Kitamura T., Mizokami M., Mishiro S. (2006). Molecular tracing of Japan-indigenous hepatitis E viruses. *J. Gen. Virol.*, 87: 949-954.
- 377)Tanaka T., Takahashi M., Kusano E., Okamoto H. (2007). Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.*, 88: 903-911.
- 378)Taniguchi M., Kim S.R., Mishiro S., Takahashi K., Shin M.H., Yun H., Park M.S., Li Z.M., Kim M.K., Fang J., Hayashi Y. (2009). Epidemiology of hepatitis E in Northeastern China, South Korea and Japan. *J. Infect.*, 58: 232-237.

- 379) Tartera C., Jofre J. (1987). Bacteriophages active against bacteroides fragilis in sewage- pollution waters. *Applied Environmental Microbiology*, 53: 1632-1637.
- 380) Taylor M.R. (1997). Molecular epidemiology of South African strains of hepatitis A virus : 1982-1996. *Journal Medical Virology*, 51: 273-279.
- 381) Teo C.G. (2006). Hepatitis E indigenous to economically developed countries: to what extent a zoonosis? *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 19: 460-466.
- 382) Terio V., Martella V., Moschidou P., Di P.P., Tantillo G., Buonavoglia C. (2010). Norovirus in retail shellfish. *Food Microbiol.*, 27: 29-32.
- 383) Tesar M., Jia X.Y., Summers D.F., Ehrenfeld E. (1993). Analysis of a potential myristoylation site in hepatitis A virus capsid protein VP4. *Virology*, 194: 616-626.
- 384) Teshale E.H., Grytdal S.P., Howard C., Barry V., Kamili S., Drobeniuc J., Hill V.R., Okware S., Hu D.J., Holmberg S.D. (2010). Evidence of person-to-person transmission of hepatitis E virus during a large outbreak in Northern Uganda. *Clin. Infect. Dis.*, 50: 1006-1010.
- 385) Tortorello M.L. (2003). Indicator organism for safety and quality-uses and methods for detection: Minireview. *J. AOAC Intern.*, 86(6): 1208-1217.
- 386) Tra My P.V., Rabaa M.A., Vinh H., Holmes E.C., Hoang N.V., Vinh N.T., et al. (2011). The emergence of rotavirus G12 and the prevalence of enteric viruses in hospitalized pediatric diarrheal patients in southern Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 85(4): 768-775.
- 387) Trentin J.J., Yabe Y., Taylor G. (1962). The quest for human cancer viruses. *Science*, 137: 835-841.
- 388) Turner M., Istre G.R., Beauchamp H., Baum M., Arnold S. (1987). Community outbreak of adenovirus type 7a infections associated with a swimming pool. *South. Med. J.*, 80: 712-715.
- 389) van den Berg H., Lodder W., van der Poel W., Vennema H., de Roda Husman A.M. (2005). Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Res. Microbiol.*, 156: 532-540.
- 390) van Ginneken V., Sitnyakowsky L., Jeffery J.E. (2009). Infectobesity: viral infections (especially with human adenovirus-36: Ad-36) may be a cause of obesity. *Med. Hypotheses*, 72: 383-388.
- 391) Vangipuram S.D., Sheele J., Atkinson R.L., Holland T.C., Dhurandhar N.V. (2004). A human adenovirus enhances preadipocytes differentiation. *Obes. Res.*, 12: 770-777.
- 392) **Vennema H., de Bruin E., Koopmans M. (2002). Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Virology*, 25: 233- 235.**

- 393) Verhoef L., Depoortere E., Boxman I., Duizer E., van Duynhoven Y., Harris J., Johnsen C., Kroneman A., Le Guyader S., Lim W., Maunula L., Meldal H., Ratcliff R., Reuter G., Schreier E., Siebenga J., Vainio K., Varela C., Vennema H., Koopmans M.P. (2008). Emergence of new norovirus variants on spring cruise ships and prediction of winter epidemics. *Emerg. Infect. Dis.*, 14: 238-243.
- 394) Villar L. M., Lampe E., Meyer A., Gaspar A.M. (2004). Genetic variability of hepatitis A virus isolates in Rio de Janeiro: implications for the vaccination of school children. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37: 1779-1787.
- 395) Villar L.M., Morais L.M., Aloise R., Melo M.M.M., Caldo I.A., Lampe E., Gaspar A.M.C. (2006). Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39: 873-881. ISSN 0100-879X.
- 396) **Vinje J., Koopmans M.P. (1996). Molecular detection and epidemiology of small round- structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.*, 174 (3): 610-615.**
- 397) Vinje J. (2015). Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.*, 53: 373-381. doi:10.1128/JCM.01535-14.
- 398) Wadell G (1984) Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 110: 191-220.
- 399) Walsh M.P., Chintakuntlawar A., Robinson C.M., Madisch I., Harrach B., Hudson N.R., Schnurr D., Heim A., Chodosh J., Seto D., Jones M.S. (2009). Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. *PLoS One*, 4: 5635.
- 400) Walsh M.P., Seto J., Jones M.S., Chodosh J., Xu W., Seto D. (2010). Computational Analysis Identifies Human Adenovirus Type 55 as a Re-Emergent Acute Respiratory Disease Pathogen. *J. Clin. Microbiol.*, 48: 991-993.
- 401) Wang W. K., Lin S.R., Lee C.M., King C.C., Chang S.C. (2002). Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies. *J Virol.*, 76: 4662-4665.
- 402) Wang L., Zhuang. H. (2004). Hepatitis E: an overview and recent advances in vaccine research. *World J. Gastroenterol.*, 10: 2157-2162.
- 403) Wang Q.H., Han M.G., Cheetham S., Souza M., Funk J.A., Saif L.J. (2005). Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg. Infect. Dis*, 11: 1874-81.
- 404) WHO (World Health Organization). (2006a). Water Sanitation and Health (WSH). Guidelines for safe recreational water environments. Vol.2, Swimming Pools and Similar Environments.
- 405) WHO (World Health Organization). (2006b). Water Sanitation and Health (WSH). Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Vol.4: Excreta and greywater use in agriculture.

- 406)WHO (World Health Organization). (2008). Water Sanitation and Health (WSH). Guidelines for drinking-water quality: incorporating 1st and 2nd addenda. Vol.1, Recommendations.-3rd ed.
- 407)WHO (World Health Organization). (2015). Polio Eradication & Endgame Midterm Review. July 2015.
- 408)Williams T.P., Kasomdorkbua C., Halbur P.G., Haqshenas, Guenette D.K., Toth T.E., Meng X.J. (2001). Evidence of extrahepatic sites G.of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 3040-3046.
- 409)Wold W.S.M., Horwitz M.S. (2007). Adenoviruses. In *Fields Virology*, 5th edn, Vol. II, Cap. 64 pp.2395-2436. Edited by D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins.
- 410)Wyatt R.G., Dolin R., Blacklow N.R., DuPont H.L., Buscho R.F., Thornhill T.S., Kapikian A.Z., Chanock R.M. (1974). Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J. Infect. Dis.*, 129(6): 709-714.
- 411)Wyn-Jones A.P., Carducci A., Cook N., D'Agostino M., Divizia M., Fleischer J., Gantzer C., Gawler A., Girones R., Holler C., Husman A.M., Kay D., Kozyra I., Lopez-Pila J., Muscillo M., Nascimento M.S., Papageorgiou G., Rutjes S., Sellwood J., Szewzyk R., Wyer M. (2011). Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Res.*, 45(3): 1025-1038.
- 412)Yongxin Y., Shuling Y., Bailin L., Yingjie P., Yongjie W. (2014). Genetic Diversity and Distribution of Human Norovirus in China (1999–2011). *BioMed Research International*, Article ID 196169, 13 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/196169>
- 413)Zanetti A.R., Schlauder G.G., Romano L., Tanzi E., Fabris P., Dawson G.J., Mushahwar I.K. (1999). Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J. Med. Virol.*, 57: 356-360.
- 414)Zeitler C.E., Estes M.K., Venkataram Prasad B.V. (2006). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus protease at 1.5-Å resolution. *J Virol.*, 80(10): 5050-5058.
- 415)Zhao C., Ma Z., Harrison T.J., Feng R., Zhang C., Qiao Z. Fan J., Ma H., Li M., Song A., Wang Y. (2009). A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J. Med. Virol.*, 81: 1371-1379.
- 416)Zheng D.P., Ando T., Fankhauser R.L., Beard R.S., Glass R.I., Monroe S.S. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346(2): 312-323.