

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie Alimentari

Ciclo XXV

Studio sull'inattivazione di virus enterici con  
composti ossidanti e alte pressioni idrostatiche.  
Sviluppo di recenti metodi di rilevamento virale in  
campioni alimentari contaminati.

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Barbanti Davide

Tutor:

Chiar.mo Prof. Sansebastiano Giuliano

Dottorando: Tibollo Simone

## -INDICE-

|   |         |
|---|---------|
| 1 – Introduzione  | pag. 1  |
| 1.1 – I Norovirus   | pag. 2  |
| 1.1.1 – Identificazione dell'agente virale  | pag. 2  |
| 1.1.2 – Morfologia  | pag. 3  |
| 1.1.3 – Classificazione dei Norovirus   | pag. 5  |
| 1.1.4 – Modalità di trasmissione  | pag. 6  |
| 1.1.5 – Infezione e aspetti clinici   | pag. 8  |
| 1.1.6 – Epidemiologia   | pag. 12 |
| 1.1.7 – Prevenzione e controllo   | pag. 17 |
| 1.1.8 – Surrogati del Norovirus   | pag. 20 |
| 1.2 – Alimenti associati alle infezioni da Norovirus  | pag. 21 |
| 1.3 – Metodi di rilevamento   | pag. 22 |
| 1.4 – Metodi di disinfezione  | pag. 26 |
| 1.4.1 – Perossido di idrogeno   | pag. 27 |
| 1.4.2 – High-Hydrostatic Pressure   | pag. 28 |
| 2 – Scopo del dottorato   | pag. 30 |
| 3 – Materiali e metodi  | pag. 32 |
| 3.1 – Virus e colture cellulari utilizzate  | pag. 33 |
| 3.2 – Prove sperimentali  | pag. 34 |
| 3.2.1 – Inattivazione con perossido di idrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )  | pag. 35 |
| 3.2.2 – Confronto di due metodiche per il rilevamento virale in campioni alimentari artificialmente contaminati                             | pag. 36 |
| 3.2.3 – Inattivazione con trattamenti HHP di campioni contaminati artificialmente e valutazione dei cambiamenti nella texture dell'alimento | pag. 38 |
| 3.3 – Analisi del titolo virale   | pag. 41 |
| 3.3.1 – Metodo di Reed-Muench   | pag. 41 |
| 3.3.2 – Analisi mediante real-time PCR  | pag. 42 |
| 3.3.3 – Costruzione della curva di calibrazione   | pag. 45 |
| 4 – Risultati   | pag. 47 |
| 4.1 – Risultati delle prove con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | pag. 48 |
| 4.1.1 – Prove col virus Coxsackie B5  | pag. 48 |
| 4.1.2 – Prove con il Calicivirus felino ceppo F9  | pag. 52 |

|   |         |
|---|---------|
| 4.1.3 – Prove con il Norovirus umano                                    | pag. 57 |
| 4.2 – Confronto dei protocolli per l'eluizione del virus                | pag. 57 |
| 4.2.1 – Risultati con il Calicivirus felino                             | pag. 57 |
| 4.2.2 – Risultati con Norovirus umano                                   | pag. 59 |
| 4.3 – Trattamenti con le alte pressioni idrostatiche                    | pag. 60 |
| 4.3.1 – Prove su campioni alimentari contaminati                        | pag. 60 |
| 4.3.2 – Analisi dei cambiamenti nella texture delle vongole             | pag. 60 |
| 5 – Conclusioni   | pag. 62 |
| 5.1 – Prove con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                           | pag. 64 |
| 5.2 – Confronti tra i protocolli con proteinasi K e PEG <sub>8000</sub> | pag. 65 |
| 5.3 – Trattamenti HHP   | pag. 67 |
| 6 – Bibliografia  | pag. 69 |

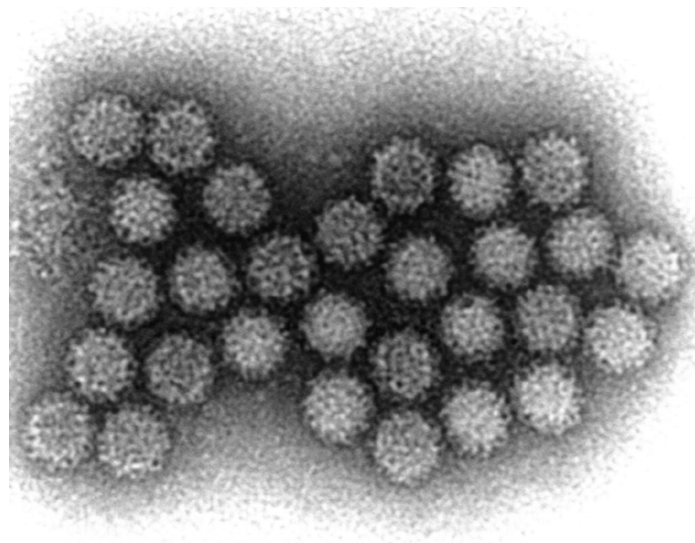
# 1 - Introduzione

## 1.1 – I Norovirus

### 1.1.1 – Identificazione dell'agente virale

I virus sono stati sospettati di essere la causa di epidemie di gastroenteriti non batteriche per più di 75 anni. Nel 1929, Zahorsky propose il nome “winter vomiting disease” per descrivere queste epidemie a causa della loro aumentata incidenza durante i mesi invernali. Negli anni '40, Gordon e collaboratori (Gordon et al. 1947) raccolsero campioni da pazienti durante una epidemia di gastroenterite non batterica e misero insieme il filtrato dei campioni per infettare sperimentalmente dei volontari. I volontari svilupparono gastroenteriti dopo 1-5 giorni dall'inoculo e si notò che l'agente infettante poteva essere passato serialmente attraverso il contatto interumano. L'abilità dell'inoculo di sviluppare gastroenteriti si perdeva in seguito ad inattivazione per calore mediante autoclavatura. I tentativi volti a identificare un patogeno virale mediante coltura in uova embrionali di pollo fallirono. Il CDC (Centers for Disease Control and Prevention) investigò su un'epidemia di “winter vomiting disease” che avvenne in una scuola elementare a Norwalk, Ohio nell'ottobre-novembre del 1968 (Adler et al. 1968). Il 50% degli studenti e insegnanti sviluppò una gastroenterite e all'incirca un terzo delle famiglie venute a contatto con i malati, si ammalarono a loro volta. I tentativi iniziali di identificare un agente eziologico fallirono, ma i campioni raccolti dai malati furono usati per fare nuovi inoculi per studi sperimentali all'NIH (National Institutes of Health) (Dolin et al. 1971). In seguito, Kapikian e colleghi (Kapikian et al. 1972) usarono il TEM (Transmission Electron Microscope) per identificare le particelle virali nei campioni dei volontari che erano stati infettati con un passaggio dell'inoculo del virus di Norwalk (Fig.1).

Fig.1 Visualizzazione al TEM di particelle di Norovirus.



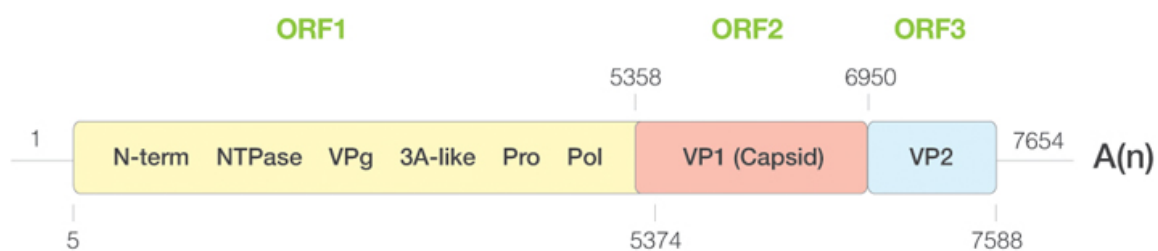
Inizialmente chiamato “Norwalk virus”, dal luogo della prima epidemia identificata, o “small round structured virus”, per la sua struttura rotondeggiante, viene oggi incluso nella famiglia dei *Caliciviridae* (dal greco *calixy* ovvero calice). I Norovirus (NoV) sono un insieme di virus con la stessa struttura genomica di base e sono considerati la principale causa di gastroenteriti acute di origine virale nel mondo (Green et al. 2000).

### 1.1.2 – Morfologia

I Norovirus (famiglia *Caliciviridae*) sono un gruppo di virus icosaedrici privi di envelope, con un genoma a RNA a singolo filamento, di senso positivo (Green et al. 2000). La famiglia dei *Caliciviridae* comprende quattro generi: i *Norovirus* e *Sapovirus* che sono agenti eziologici di gastroenterite nell’uomo, e i *Vesivirus* e *Lagovirus* che sono di pertinenza veterinaria. La trasmissione incrociata tra le specie di ceppi appartenenti ai primi due generi non è stata documentata.

Il genoma dei norovirus è lungo 7,5-7,7 kb (con un 45-56% di citosina + guanina) e dopo una piccola porzione non tradotta al 5’ (5’ NTR) comprende tre *open reading frame* (ORFs). Il genoma presenta all’estremità 5’, a differenza degli eucarioti che presentano la proteina CAP tipica degli RNA messaggeri, la proteina virale VPg essenziale per l’infettività virale e la fase iniziale della traduzione; all’estremità 3’ di 66 nt è invece presente una coda poli A necessaria per la traduzione. La prima ORF codifica una grossa poliproteina di circa 194 kDa che viene tagliata dopo la sintesi in varie proteine non strutturali che sono importanti per la replicazione del virus, ma che non si trovano nelle particelle virali. Queste proteine includono una nucleotide trifosfatasi, una proteina virale legata al genoma (VPg), una proteasi virale e una polimerasi (Hardy 2005). La regione prossimale 3’, che costituisce un RNA subgenomico di circa 2.8 kb, codifica in 2 ORF separate (ORF2 e ORF3 rispettivamente).

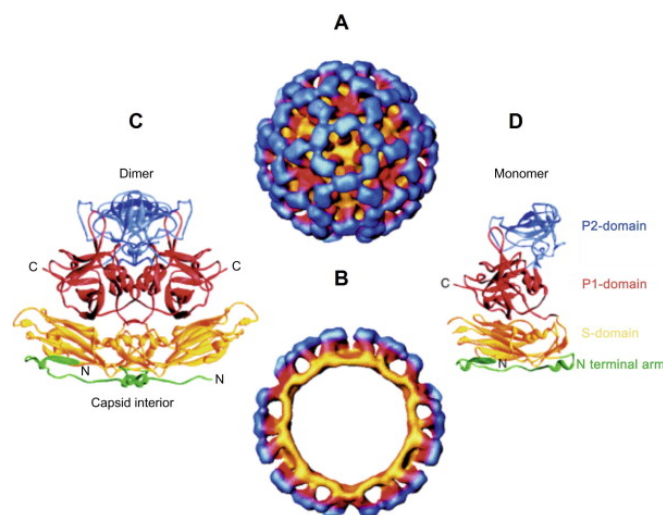
Fig.2 Schema della suddivisione del genoma dei Norovirus.



La seconda ORF codifica la proteina strutturale maggiore VP1 (60 kDa e formata da circa 530-555 aa); la terza ORF codifica VP2 (23 kDa e costituita da circa 208-268 aa), una proteina di base che è anche una proteina strutturale minore (Hardy 2005, Atmar and Estes 2006) (Fig.2).

Il capside virale è composto da 180 copie della proteina VP1, organizzate in 90 capsomeri dimerici. Le proteine capsidiche consistono di due domini, il dominio shell (S) e quello protruding (P), che sono tenuti assieme da una corta sequenza amminoacidica. Il dominio S è implicato nella formazione dello scheletro icosaedrico del virione, mentre il dominio P forma una struttura ad arco che sporge dallo scheletro. Il dominio P può essere ulteriormente diviso nei sottodomini P1 e P2, ognuno corrispondente rispettivamente alla coda e alla testa del dimero a forma di arco (Prasad et al. 1999) (Fig.3).

Fig.3 Struttura del capside



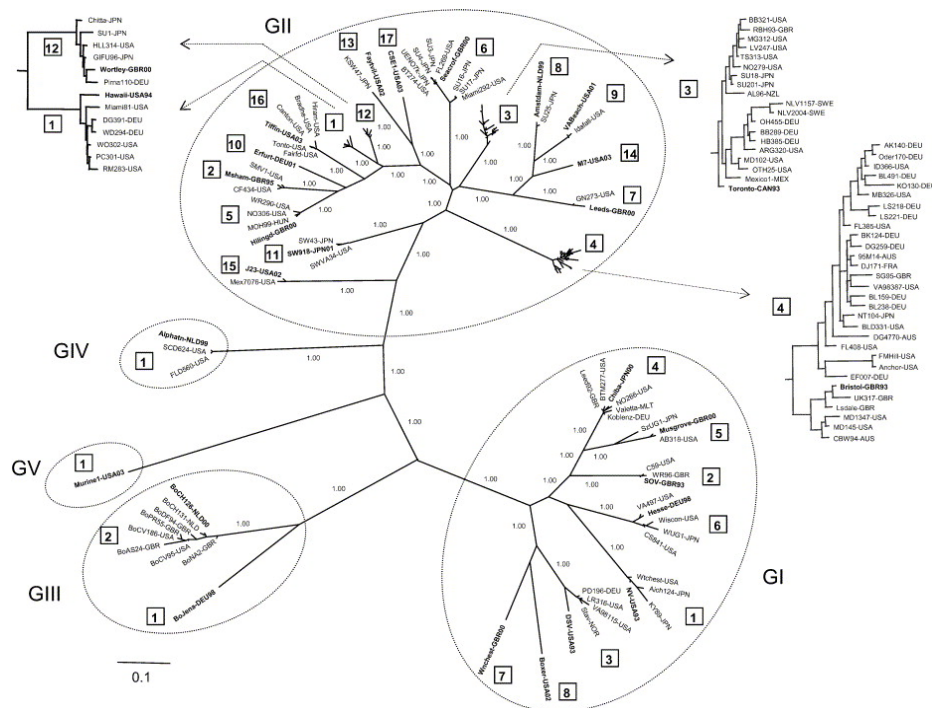
Il sottodominio P1 è costituito da filamenti  $\beta$  antiparalleli e da  $\alpha$ -eliche, mentre P2 si inserisce in P1 e forma un barile  $\beta$  di 6 filamenti antiparalleli. Siccome il sottodominio P2 è situato sulla superficie esterna del capside virale ed è evolutivamente molto variabile, si ritiene che sia essenziale per le interazioni con l'ospite. Infatti, studi recenti condotti con l'ausilio della cristallografia ai raggi X seguiti da ricerche di mutagenesi hanno svelato che l'interfaccia di legame agli antigeni superficiali sanguigni è collocata nel sottodominio P2 del dimero P (Tan et al. 2008). L'espressione *in vitro* di VP1 porta ad un assemblaggio spontaneo della proteina in particelle simil-virali (VLPs) (Jiang et al. 1992). Le VLPs sono antigenicamente e morfologicamente simili ai virioni normali, quindi sono utili reagenti per produrre un antisiero per saggi diagnostici e sono candidati per creare un vaccino. L'espressione del

dominio P *in vitro* produce dei dimeri P che successivamente si assemblano a formare un grosso complesso, le particelle P (Tan e Jiang 2005) che sono composte da 12 dimeri. Saggi di legame agli antigeni dei gruppi sanguigni (Histo Blood Group Antigen, HBGA) basati sulla saliva, hanno dimostrato che sia i dimeri P che le particelle P mantengono la capacità di legarsi agli HBGA umani (Tan et al. 2008). Da altri studi è emerso che trattando le VLPs con tripsina il dominio S viene completamente digerito, mentre il dominio P resta intatto (Hardy et al. 1995); tutto questo probabilmente è dovuto ad una struttura che risulta essere resistente alle proteasi.

### 1.1.3 – Classificazione dei Norovirus

I norovirus sono geneticamente e antigenicamente differenti. La mancanza di un sistema di coltura *in vitro* o di un modello animale rende impossibile la classificazione in sierotipi, quindi il metodo principale di classificazione è attraverso l'analisi genetica. La classificazione dei Norovirus è basata sull'analisi filogenetica della ORF2 di 164 sequenze di Norovirus che determina una suddivisione in 5 *genogruppi*: i genogruppi GI, GII e GIV sono tipici umani, mentre i genogruppi GIII e GV sono rispettivamente bovino e murino (Hall et al. 2011); il contagio interspecie non è ancora stato evidenziato, però alcuni ceppi di GII possono infettare i suini (Wang et al. 2005). All'interno di ogni genogruppo sono stati identificati uno o più *cluster* o *genotipi*.

Fig.4 Genogruppi e genotipi dei Norovirus.





Esaminando le 164 sequenze aminoacidiche derivanti dalla regione capsidica del Norovirus umano ed animale, sono stati identificati 5 genogruppi comprendenti 29 genotipi: 8 genotipi in GI, 17 in GII, 2 in GIII e 1 ciascuno in GIV e GV (Zheng et al. 2006) (Fig.4). Il virus di Norwalk è il prototipo del ceppo dei norovirus; appartiene al genogruppo I, cluster I.

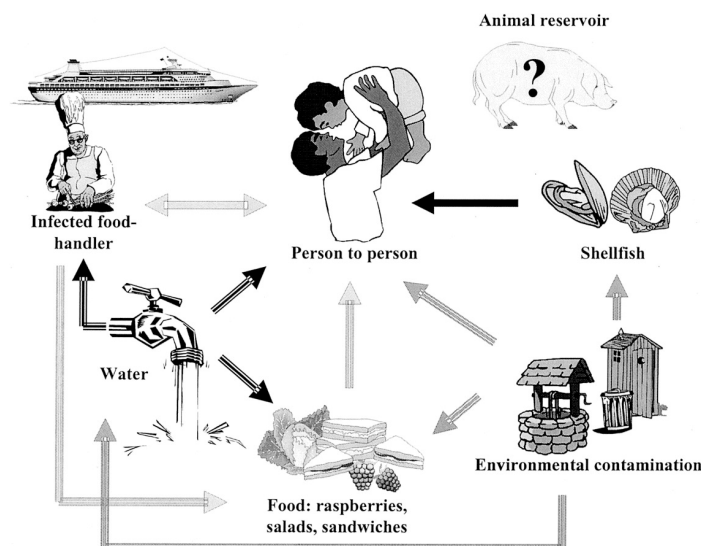
L'accumulo di mutazioni puntiformi, associate ad errori di replicazione e ricombinazione, è alla base della diversità del Norovirus; in realtà sono pochi i genogruppi responsabili della maggior parte dei casi di gastroenteriti acute nell'uomo, tra questi il genogruppo II e più precisamente il genotipo 4 (GII.4). Recenti studi di epidemiologia molecolare, infatti, hanno dimostrato che il 70% delle epidemie causate da Norovirus sono dovute alla variante genotipica GII.4 (Siebenga et al. 2009). Sebbene l'importanza delle mutazioni nell'evoluzione del Norovirus resta poco nota, senza dubbio la ricombinazione è uno dei processi alla base dell'evoluzione. Bull e collaboratori, per esempio, hanno identificato 20 tipi di Norovirus ricombinanti nel mondo (Bull et al. 2007), mentre altri ricercatori hanno suggerito che la ricombinazione potrebbe essere un importante meccanismo attraverso il quale GII.4 rimane persistente nella popolazione umana (Motomura et al. 2010). Alcune evidenze, infatti, hanno messo in luce che un piccolo cambiamento genetico nella regione del capsido può avere una grande influenza sulla virulenza del Norovirus. I Norovirus presentano un alto grado di variabilità genetica: membri di uno stesso genogruppo differiscono per il 45-61% a livello dei geni capsidici, mentre membri di un genotipo differiscono per il 14-44% ed inoltre ceppi di un genotipo differiscono per lo 0-14%. La variabilità di sequenza risulta essere maggiore rispetto a quella presente in altri generi di virus ad RNA, e questo probabilmente favorisce la capacità di evadere i meccanismi di difesa dell'ospite (Zheng et al. 2006).

#### 1.1.4 – Modalità di trasmissione

I norovirus sono trasmessi principalmente per via oro-fecale. La contaminazione fecale di cibo, acqua, così come la diffusione diretta da persona a persona, sono responsabili della maggior parte delle epidemie. La contaminazione degli alimenti può avvenire in ogni punto della filiera alimentare. Per esempio, frutti di mare e lamponi contaminati nel sito di raccolta (contaminazione primaria) sono implicati nelle epidemie, mentre altri alimenti, come insalate, cibi freddi e panini, hanno causato epidemie dopo essere stati contaminati dagli operatori nel sito di preparazione del cibo (Schwab et al. 2000). Spesso le gastroenteriti virali, infatti, sono dovute a cibo contaminato da operatori alimentari che possono trasmettere il virus durante il processo di produzione (contaminazione secondaria), pertanto è importante seguire delle

buone prassi igieniche. C'è un'alta incidenza (spesso maggiore del 30%) della trasmissione per contagio interumano, che porta a un'amplificazione di un'epidemia in luoghi chiusi, come reparti ospedalieri, navi da crociera e case di cura. Le infezioni da norovirus possono continuare a trasmettersi perché è molto difficile eradicare i virus dalle aree contaminate a causa della loro relativa resistenza a molti disinfettanti. Le diverse vie di trasmissione rendono difficile istituire degli interventi che possano interrompere la trasmissione del virus in modo efficace. Questa particolarità ha portato alla chiusura di hotel e navi da crociera che erano implicati in epidemie ricorrenti di norovirus così che potessero essere applicate misure più estese per disinfettare le aree potenzialmente contaminate (Cheesbrough et al. 2000). Per limitare la trasmissione interumana si dovrebbero lavare frequentemente le mani con il sapone; inoltre per le persone che vengono a contatto con malati sarebbe opportuno utilizzare mascherine.

Fig.5 Schema delle modalità di trasmissione del Norovirus.



Può avvenire anche la trasmissione aerea dei norovirus poiché a causa del vomito i virioni possono localizzarsi anche nei primi tratti dell'apparato respiratorio dove diffondono nell'ambiente e vengono inalati dai soggetti sani. Questo tipo di contagio dei norovirus è stato osservato in persone che erano passate in un pronto soccorso dove un paziente, che presentava vomito, era stato visitato (Sawyer et al. 1988). Un'altra epidemia avvenne in un ristorante dove un cliente, infettato da norovirus, aveva vomitato; i clienti seduti agli altri tavoli nel ristorante svilupparono gastroenteriti nei successivi 1-2 giorni. Il rischio di infezione era correlato inversamente alla distanza del tavolo di un cliente dal tavolo del soggetto infetto (Marks et al. 2000).

I norovirus possono resistere a temperature superiori ai 60°C ed inferiori a 0°C, come pure a concentrazioni di cloro fino a 100 ppm e ad altri disinfettanti ambientali, per cui è molto difficile la loro eliminazione dall'acqua potabile e dall'ambiente. Le feci disperse nelle acque fognarie possono contaminare le acque superficiali, incluse quelle marine, perché i trattamenti dei liquami non sono in grado di eliminare completamente i virus e questo può determinare un contagio degli alimenti a monte durante la loro produzione.

Il Norovirus è estremamente contagioso: si stima che la dose infettante sia inferiore a 18 particelle virali (Teunis et al. 2008), inoltre approssimativamente 5 miliardi di dosi infettanti possano essere presenti in un grammo di feci contaminate. A causa della loro bassa dose infettante, della loro persistenza sulle superfici e della loro resistenza ai detergenti convenzionalmente utilizzati per pulire, i NoV vengono considerati potenziali agenti di bioterrorismo di categoria B, in accordo con la classificazione dei patogeni importanti per la biodifesa (NIAID Biodefense Research) del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Koo et al. 2010).

Una questione ancora irrisolta riguarda il lasso di tempo durante il quale un individuo infetto rimane contagioso. Studi precedenti avevano individuato che la dispersione del virus si aveva solo nelle prime 100 ore dopo l'infezione. Nuovi saggi molecolari più sensibili hanno dimostrato che molte persone infette presentano il virus nelle loro feci per diverse settimane dopo la risoluzione dei sintomi.

Sebbene le regole igienico-sanitarie raccomandino che il personale che manipola l'alimento non debba ritornare al lavoro prima che siano passate 48-72 ore dalla risoluzione dei sintomi, è consigliabile applicare una rigorosa pulizia delle mani dopo essersi ristabiliti da una malattia associata ai norovirus. Questo consiglio dovrebbe essere applicato non solo alle persone che lavorano all'interno dell'industria alimentare ma anche a quelli che lavorano nelle aziende ospedaliere o in altri servizi che portano un individuo a contatto con un gran numero di altre persone.

#### 1.1.5 – Infezione e aspetti clinici

Il Norovirus è la principale causa di gastroenterite virale acuta in soggetti di tutte le età. Nell'uomo il periodo di incubazione varia tra le 15 e le 48 ore; il sintomo principale che caratterizza l'infezione da Norovirus è il vomito compulsivo accompagnato da diarrea, nausea, crampi addominali, febbre in certi casi, cefalea e dolori muscolari. L'infezione dura dalle 12 alle 60 ore, ma tale stato può prolungarsi in neonati, anziani e individui ospedalizzati; durante il decorso il rischio di diffusione del virus è elevato fino a 48 ore dopo la fine dei

sintomi perché le particelle virali sono eliminate in elevata quantità con le feci. La malattia non ha, in genere, conseguenze serie e la maggior parte degli individui guarisce in 1-2 giorni senza complicazioni. Generalmente si ricorre a terapie orali o intravenose per il trattamento della disidratazione, ovvero introducendo molti liquidi; nei casi più gravi si sono verificate enterocoliti necrotizzanti in neonati, diarrea cronica in individui immunodepressi e sindromi da intestino irritabile post-infezione. Sono stati anche registrati casi di morte tra anziani e nei reparti di lunga degenza (Hall et al. 2011). Una volta entrato nell'organismo il Norovirus infetta le cellule della mucosa intestinale e determina, ad esempio, allargamento ed accorciamento dei microvilli intestinali, modificazioni morfologiche delle cellule epiteliali, vacuolizzazione citoplasmatica (Atmar e Estes 2006). Il virus viene principalmente espulso tramite le feci, ma le particelle virali si possono ritrovare anche nel vomito dei soggetti infetti; inoltre viene eliminato con le feci fino a 4 settimane dopo l'infezione, con un picco di concentrazione che si aggira intorno a  $10^{11}$  particelle virali per grammo di feci. Circa il 30% delle infezioni sono asintomatiche, tali soggetti eliminano particelle virali in dosi minori rispetto ai soggetti sintomatici. La breve durata dei sintomi e le difficoltà di diagnosi in molti casi non permettono l'identificazione della malattia, pertanto la diffusione del Norovirus nella popolazione viene sottostimata con conseguente difficoltà nella raccolta ed elaborazione di dati epidemiologici.

Il ciclo replicativo del Norovirus è ancora oggi poco noto essendo impossibile sia coltivare tali virus in linee cellulari che riprodurre l'infezione in modelli animali (Guix et al. 2007).

Il genoma del Norovirus è un RNA a singolo filamento a polarità positiva, che una volta entrato nel citoplasma della mucosa intestinale, lavora come RNA messaggero e sintetizza tutti i componenti utilizzando il sistema traduzionale della cellula ospite in quanto tutti i virus non sono in grado di codificare in modo autonomo le strutture necessarie per la traduzione.

Le fasi di replicazione prevedono:

1. interazione del virus con la superficie delle cellule della mucosa intestinale
2. legame agli HBGA
3. rilascio del capsido
4. introduzione del genoma virale nella cellula.

A queste fasi iniziali seguono ulteriori passaggi che prevedono:

- a. la perdita della proteina VPg presente all'estremità 5' terminale
- b. il riconoscimento ed il legame dell'RNA virale al ribosoma cellulare.

A questo punto inizia la traduzione della ORF1 ovvero della poliproteina che successivamente viene clivata in proteine non strutturali che vanno a costituire il complesso di replicazione che genera a sua volta una seconda molecola di RNA definito RNA subgenomico (RNAs). L'RNAs slega la proteina VPg, si lega al ribosoma e dà inizio alla trascrizione delle proteine capsidiche VP1 e VP2. Contemporaneamente, le proteine che partecipano alla sintesi dell'RNA virale vengono trasportate alle vescicole che contengono l'RNA positivo. Avviene la sintesi del filamento negativo che serve come stampo per quello positivo. Le proteine strutturali VP1 e VP2 vanno a formare il capsido all'interno del quale viene incapsulato il genoma virale neosintetizzato. La progenie verrà successivamente rilasciata mediante lisi della cellula ospite nel lume intestinale, processo che determina il rilascio di acqua nell'intestino causando diarrea che veicola centinaia di milioni di questi virioni.

La suscettibilità all'infezione da norovirus coinvolge sia l'immunità innata dell'individuo che quella acquisita. Studi recenti hanno dimostrato che la resistenza di un individuo all'infezione dovuta al virus di Norwalk è correlata con l'espressione degli antigeni dei gruppi sanguigni (HBGA). Tutte e tre le maggiori famiglie di antigeni dei gruppi sanguigni, gli antigeni ABO, quelli di Lewis e la famiglia dei secretori, sono implicate nel riconoscimento dei Norovirus (Tan et al. 2008). Gli HBGA sono carboidrati che contengono porzioni saccaridiche collegate strutturalmente. L'antigene H o antigene di tipo O ( $\text{Fuca}1\text{-2Gal}$ ), ad esempio, viene generato da un fucosio trasferito ad un residuo di galattosio con un legame  $\alpha 1\text{-2}$ . L'antigene A [ $\text{GalNAc}\alpha 1\text{-3}(\text{Fuca}1\text{-2})\text{Gal}$ ] e l'antigene B [ $\text{Gal}\alpha 1\text{-3}(\text{Fuca}1\text{-2})\text{Gal}$ ] sono, invece, generati da un trasferimento di GalNAc e Gal, rispettivamente, ad una struttura H che non rispetta la struttura del nucleo di carboidrati. Le strutture del nucleo sono classificate in 4 tipologie principali, il tipo 1 ( $\text{Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc}\beta$ ), il tipo 2 ( $\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta$ ), il tipo 3 ( $\text{Gal}\beta 1\text{-3GalNAc}\alpha$ ), e il tipo 4 ( $\text{Gal}\beta 1\text{-3GalNAc}\beta$ ).

Il trasferimento del fucosio degli antigeni ABH negli eritrociti è catalizzato da FUT1, un membro della famiglia delle fucosiltransferasi, mentre nella saliva e nelle secrezioni della mucosa viene usata una differente fucosiltransferasi, FUT2 (Oriol 1990). Gli individui che non presentano gli alleli *FUT2* non possono sintetizzare gli antigeni ABH nelle secrezioni e sono chiamati secretori-negativi, sebbene gli stessi antigeni possono essere espressi dagli eritrociti grazie a FUT1. Gli alleli *FUT2* degli individui caucasici non secretori sono completamente inattivati da mutazioni nonsense, mentre quelli di individui asiatici non secretori non sono completamente inattivati a causa di mutazioni missenso. In questo modo, gli asiatici hanno un fenotipo secretore-negativo incompleto e producono una piccola quantità di antigeni ABH nelle secrezioni (Shirato et al. 2008). Individui con geni *FUT2* non

funzionanti non esprimono l'enzima fucosiltransferasi che è il responsabile della produzione di antigeni H con struttura di tipo 1. Le particelle simil virali (VLPs), derivate dal virus di Norwalk (NV/68), si legano agli HBGA nella saliva degli individui secretori. Queste VLPs si legano preferenzialmente ai carboidrati sintetici degli antigeni H di tipo 1 e di Lewis b. Sebbene le VLPs di NV/68 si leghino agli antigeni A nella saliva e ai carboidrati sintetici di tipo A, non sono in grado di legarsi ai carboidrati sintetici di tipo B e nemmeno alla maggioranza degli antigeni B nella saliva (Lindesmith et al. 2003). Da studi precedenti su volontari è emerso che il legame ai carboidrati è essenziale per l'infezione di NV/68. Persone con fenotipo secretore-negativo che non esprimono gli antigeni nelle secrezioni, sono resistenti all'infezione. Questa caratteristica è stata notata anche durante una epidemia che interessava il ceppo GII.4 (Thorven et al. 2005). La specificità di legame dei norovirus agli HBGA varia all'interno dei diversi ceppi virali; ad esempio, i secretori di tipo O sono più suscettibili all'infezione di NV/68, al contrario, i secretori di tipo B corrono meno rischi di essere infettati. A conferma di questo, VLPs di norovirus mostrano differenti profili di legame ai carboidrati degli antigeni ABH e di Lewis: infatti, studi epidemiologici hanno messo in evidenza che alcuni ceppi di norovirus possono infettare individui con altri fenotipi ABH o di secrezione (Rockx et al. 2005).

In uno studio, eseguito su 29 campioni di saliva di soggetti giapponesi sani, si è saggiata la capacità, dei VLPs di alcuni ceppi di norovirus, di legarsi agli antigeni ABH delle secrezioni. Per quanto riguarda il genogruppo I, erano stati saggiati 5 ceppi (GI/1, GI/2, GI/3, GI/4, GI/8); è stato osservato che questi norovirus si legano molto bene ai fenotipi secretori A, AB e O, ma non sono in grado di legarsi ad antigeni di tipo B tranne il genogruppo GI/8. Per quanto riguarda il genogruppo II, sono stati saggiati 11 ceppi, dei quali il ceppo GII/1 e GII/14 non si legano a nessun antigene presente nella saliva, mentre i ceppi GII/4 e GII/6 si legano a tutti gli antigeni, il GII/4 infetta anche gli individui non secretori incompleti che sono frequenti in Giappone (Shirato et al. 2008). Gli altri ceppi saggiati, invece, non si legano a tutti gli antigeni come fa GII/4 che, infatti, negli ultimi anni è stato implicato sempre più frequentemente nelle epidemie di norovirus. Si è anche notato che i vari ceppi non si legano a carboidrati di tipo H sintetici, quindi si pensa che il residuo di  $\alpha$ 1-2 fucosio che si lega ai trisaccaridi H sia il responsabile per il legame dei norovirus. Infine, sono state saggiate le capacità dei vari norovirus di distinguere tra i carboidrati di tipo 1 e di tipo 2. Quello che è stato visto è che i carboidrati di tipo 1 si legano più strettamente alle particelle simil virali di quanto non facciano i carboidrati di tipo 2, come indicato dai seguenti punti:

- la dissociazione di GII/4 dai pentasaccaridi B di tipo 1 era più lenta di quella dai pentasaccaridi B di tipo 2;
- il legame di GII/4 ai pentasaccaridi B di tipo 1 era più forte rispetto al legame a quelli del tipo 2, come si è visto dagli esperimenti con l'ELISA (Shirato et al. 2008).

L'immunità acquisita gioca un ruolo importante nella suscettibilità all'infezione. Di solito, si instaura una resistenza di breve termine alla re-infezione che è possibile notare nel caso in cui l'individuo venga messo di nuovo a contatto con lo stesso ceppo del virus. Tale resistenza dura da 6 a 14 settimane dopo il primo contatto. L'immunità è, ad ogni modo, specifica per un particolare ceppo, quindi si può indurre una nuova infezione utilizzando un ceppo distinto sierologicamente dal primo. I meccanismi dell'immunità, comunque, non sono ancora chiariti.

#### 1.1.6 - Epidemiologia

Nello stato dell'Ohio (USA) nel 1968 fu accertata la prima epidemia da Norovirus in alunni di una scuola elementare. Oggi ancora in ambito europeo non esiste una metodica comune e standardizzata per tutti i laboratori che effettuano ricerca di Norovirus e pertanto risulta difficile fornire un quadro epidemiologico completo. A questo scopo, un aspetto cruciale è rappresentato dai tempi analitici di risposta che devono essere brevi per poter adottare misure preventive in modo da controllare la diffusione dell'epidemia. Ad esempio il ritardo di segnalazioni alle autorità competenti nell'epidemia scoppiata nel luglio del 2005 in Puglia in un villaggio turistico non ha permesso di capire quale fosse la sorgente di contaminazione (Rizzo et al. 2007). Le infezioni gastroenteriche sostenute da Norovirus si manifestano in prevalenza in ambienti collettivi e confinati come mense, ristoranti, case di riposo, scuole, ospedali, villaggi turistici o navi da crociera. La principale misura preventiva per limitare la diffusione del Norovirus è la tempestività di segnalazione di presunti casi di gastroenterite sospetta alle autorità sanitarie locali. L'Istituto Superiore di Sanità partecipa al progetto **FBVE** (*Food-borne viruses in Europe*) per monitorare l'andamento dei focolai determinanti gastroenteriti virali nell'uomo. L'FBVE, infatti, nel settembre del 2001 ha istituito un database in rete in modo tale che tutti i membri del progetto possono segnalare eventuali focolai di gastroenteriti virali. A tale progetto FBVE hanno preso parte 26 istituti di 13 Stati membri (UK, Olanda, Danimarca, Finlandia, Francia, Germania, Ungheria, Irlanda, Italia, Norvegia, Slovenia, Spagna e Svezia).

I Norovirus presentano diffusione mondiale e nei paesi industrializzati sono i maggiori responsabili di gastroenterite virale acuta. E' stato stimato che in queste aree causino l'80%

degli episodi di malattia a carico dell'apparato digerente determinando epidemie che coinvolgono tutte le classi di età, soprattutto in comunità chiuse. I casi più gravi e le complicanze si manifestano raramente e quasi esclusivamente negli anziani e in soggetti immunocompromessi (Lopman et al. 2003b). Dati epidemiologici raccolti nell'ambito del progetto "*Foodborne viruses in Europe*" hanno accertato che in Europa, la maggior parte delle epidemie è causata da un singolo genotipo di Norovirus, il GII.4. Inizialmente si pensava che questi virus infettassero solo bambini in età scolare e adulti, ma recenti studi hanno invece dimostrato che possono essere contagiate persone di tutte le età e sono considerati, dopo i Rotavirus, la seconda causa di ospedalizzazione nei neonati. Ogni anno si contano circa 23 milioni di nuove infezioni da Norovirus solo negli USA, e solo questi ultimi costituiscono il 60% delle malattie causate da patogeni enterici noti (Mead et al. 1999). Inoltre uno studio più recente ha evidenziato che in media circa 5 milioni e mezzo di persone ogni anno contraggono il norovirus per ingestione di cibo contaminato in ambito domestico; questo numero ammonta a circa il 26% del totale delle infezioni da norovirus acquisite in ambito domestico (Scallan et al. 2011). I norovirus causano infezioni lungo tutto l'arco dell'anno, sebbene ci sia un picco di incidenza durante i mesi freddi (Mounts et al. 2000).

I ceppi dei gruppi I e II causano infezioni nella comunità, sebbene recenti studi hanno dimostrato una predominanza dei ceppi del gruppo II. Durante la metà degli anni '90, il ceppo GII.4 è stato indicato come il principale genotipo che causa epidemie in tutto il mondo (Noel et al. 1999). In 163 epidemie in cui è stato rilevato e genotipizzato il norovirus, GII/4 e GII/3 sono stati i genotipi più frequentemente associati alle epidemie veicolate dagli alimenti (Noda et al. 2007). Da allora il ceppo si è evoluto, ma continua ad essere la maggiore causa di epidemie in molte parti del mondo. In uno studio, condotto in Catalogna, su 62 epidemie di gastroenterite, circa il 52% dei campioni di feci erano positivi per il norovirus e in 51 epidemie questo virus è stato indicato come l'unico agente eziologico. Il genotipo è stato determinato in 38 epidemie (63,3%) e il ceppo GII.4 aveva l'incidenza media più alta (42%) e fu riscontrato principalmente negli ospedali e case di cura (52%) (Domínguez et al. 2008). In Italia il ceppo GII.4 è stato il ceppo predominante (81,4%) ritrovato nei campioni fecali di bambini ammessi ad un ospedale di Palermo con i sintomi di una gastroenterite (Ramirez et al. 2009).

La maggior parte delle infezioni ed epidemie sono causate da un singolo ceppo di norovirus, ma possono esserci delle coinfezioni, specialmente dopo l'esposizione a frutti di mare o ad acque di scarico contaminate. La ricombinazione può avvenire durante una coinfezione e porta alla generazione di nuovi ceppi virali (Bull et al. 2005).



Le infezioni da Norovirus sono una significativa causa di epidemie nelle case di cura e possono portare ad un aumento della necessità di cure ospedaliere e ad un aumento della mortalità (Lopman et al. 2004a). Allo stesso modo, epidemie nosocomiali avvengono negli ospedali e in altre strutture di assistenza sanitaria (Lopman et al. 2004b). Le epidemie di gastroenterite causate da norovirus avvengono con un'umentata frequenza sulle navi da crociera. Inoltre i norovirus sono tra le maggiori cause di gastroenteriti negli evacuati dopo disastri naturali, come successe per l'uragano Katrina alle persone che furono alloggiate in condizioni di sovraffollamento a Houston, in Texas (Palacio et al. 2005, Yee et al. 2007). Il CDC ha riportato i luoghi in cui sono avvenute 348 epidemie di norovirus dal gennaio 1996 al novembre 2000 negli Stati Uniti. Le epidemie si dividono come segue: il 39% avvenne in ristoranti, il 29% in case di cura ed ospedali, il 12% in scuole e centri di benessere, il 10% in zone vacanziera e navi da crociera, il 9% in altre strutture (Parashar et al. 2001).

**ITALIA.** Le ricerche epidemiologiche in Italia sul Norovirus sono ancora oggi poche. La provincia di Taranto nel 2006 per esempio è stata colpita da un'epidemia di Norovirus: secondo uno studio pubblicato su *Eurosurveillance* la causa era da attribuire molto probabilmente ad acqua contaminata. Nel periodo compreso tra maggio e settembre furono registrati ben 2860 casi (numero superiore ai 586 casi dello stesso periodo nel 2005). In particolare venne colpita la città capoluogo con 9,5 casi per 1000 abitanti (Martinelli et al. 2006).

Nel luglio 2000, un'epidemia di gastroenterite avvenne in un luogo di villeggiatura nel golfo di Taranto nel sud Italia. L'infezione colpì 344 persone, 69 delle quali erano membri dello staff del villaggio. Il virus di Norwalk è stato trovato in 22 su 28 campioni fecali testati. Il veicolo di infezione era molto probabilmente acqua potabile contaminata, come era stato identificato dagli ispettori sanitari da un'analisi su campioni del sistema di raccoglimento e distribuzione dell'acqua del villaggio turistico, che erano contaminati da batteri fecali. L'incidenza era maggiore nei membri dello staff impiegati negli sport acquatici. I rischi relativi erano significativi solo per l'esposizione all'acqua delle docce sulla spiaggia e al consumo di bibite con ghiaccio (Boccia et al. 2002).

Un altro studio descrive, invece, il focolaio di gastroenterite che ha interessato un elevato numero di turisti nel litorale abruzzese tra luglio e settembre 2003, la causa dell'epidemia fu il consumo di cozze allevate o pescate sulla costa adriatica abruzzese. L'analisi di campioni fecali evidenziò la presenza di Norovirus di genogruppo I e II (Savini et al. 2004).

**EUROPA.** I Norovirus sono senza dubbio i più importanti agenti di infezione gastrointestinale non batterica anche nei Paesi dell'Europa occidentale. È nato, pertanto, in Europa un network di ricerca sulle tossinfezioni alimentari di origine virale. Nella maggior parte dei Paesi europei è stato registrato un andamento crescente dei casi di infezione da Norovirus a partire dal 1997, con un picco significativo nel 2006 in molti Paesi. Uno studio pubblicato su *Eurosurveillance* nel 2006 fa il punto su un picco di Norovirus in 13 Paesi Europei quali: Germania, Danimarca, Spagna, Finlandia, Francia, Inghilterra e Galles, Ungheria, Irlanda, Italia, Paesi Bassi, Norvegia, Svezia, Slovenia. Solo in Francia e Spagna non è stato registrato un aumento della diffusione del virus, che invece è stato elevato in tutti gli altri Paesi considerati. Uno studio delle epidemie manifestatesi nel periodo compreso tra il 1995 e il 2000 fornisce dei dati di base per effettuare dei confronti su base europea. La ricerca si è svolta, infatti, inviando un questionario alle 13 istituzioni partecipanti, di 10 Paesi (Germania, Paesi Bassi, Svezia, Slovenia, Inghilterra e Galles, Spagna, Italia, Francia, Danimarca e Finlandia), per raccogliere informazioni sui sistemi di sorveglianza, sulle fonti di dati, sulle definizioni di caso e sul numero di epidemie analizzate. I risultati suggeriscono che oltre l'85% delle epidemie di gastroenterite di origine non batterica sono dovute a Norovirus (Lopman et al. 2003a). Questi studi hanno portato vari paesi a mettere in atto iniziative a livello nazionale. In Svezia, per esempio, l'incremento osservato nella stagione invernale 2002-2003 ha portato alla nascita di un sistema di sorveglianza del virus (Martin et al. 2004). Lo stesso gruppo di ricercatori che ha avviato lo studio europeo ha pubblicato nel febbraio 2004 un articolo su *Lancet*, dove viene evidenziata la correlazione tra l'aumento significativo nel corso del 2002 del Norovirus in tre aree europee (Inghilterra e Galles, Germania e Paesi Bassi) e la comparsa di una nuova variante del virus, GII.4, identificata in nove Paesi europei. La comparsa di questa variante, inoltre, sembra aver preceduto un picco di epidemie anomale che si sono manifestate nel corso della primavera e non, tipicamente, nell'autunno-inverno. Secondo gli autori, i risultati di questi studi sottolineano la necessità di un sistema di sorveglianza europeo coordinato. Lo studio, infatti, ha messo in evidenza anche notevoli differenze da Paese a Paese non solo per quanto riguarda i dati sulla prevalenza della malattia, ma anche per i metodi di sorveglianza, le definizioni di caso, le modalità di campionamento e controllo della popolazione. Anche i luoghi dove si manifestano le epidemie sono diversi: in Inghilterra e Galles, Spagna e Paesi Bassi la maggior parte dei casi sono stati registrati in ospedali e residenze per anziani (rispettivamente 78%, 64% e 66%). In Danimarca, invece, il 76% delle epidemie (13 su 17 registrate), si sono verificate in negozi e spacci di alimentari. Questo dato però potrebbe essere viziato dal fatto che nei Paesi Bassi la sorveglianza è

effettuata dall'Ispettorato della sicurezza alimentare, che raccoglie principalmente i dati relativi ai casi di malattia trasmessa dal cibo e non dalle persone, modalità che invece prevale nelle case di cura e ospedali. In Slovenia, la maggior parte delle epidemie (71%) avviene nei centri di cura diurni, mentre in Francia nelle case private (78%) (Lopman et al. 2004c). Per quanto riguarda l'Inghilterra, è la "Health protection agency" (HPA) britannica a raccogliere dati sulle infezioni intestinali dal 1992. Secondo questo sistema di sorveglianza, il Norovirus è responsabile di circa 1812 casi ogni anno, con due picchi significativi nell'arco del periodo 1992-2006: uno nel 2002, con oltre 4308 casi, in coincidenza con la comparsa di un nuovo ceppo virale, e uno nel 2006. In questo caso, in base ai dati del 2006, i casi sono stati 4446. I dati degli ultimi anni, e del 2006 in particolare, rispecchiano l'aumento dei casi di Norovirus in Europa. Uno studio nella zona sudoccidentale dell'Inghilterra ha identificato il Norovirus come causa del 63% delle epidemie. La HPA ha riportato inoltre che nel 2011 di tutte le epidemie ospedaliere circa il 65% furono confermate dai laboratori come dovute a infezione da Norovirus ([http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1287143931777](http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1287143931777)). Studi a livello europeo fino a luglio 2006, hanno riportato 35 casi di epidemie gastroenteriche che hanno coinvolto 13 navi. In 9 casi su 13 il Norovirus è risultato essere il responsabile di 1088 casi di passeggeri e membri dell'equipaggio. Le 9 navi interessate dal Norovirus hanno riportato epidemie ripetute in numero variabile da 2 a 5 evidenziando la persistenza del virus tra un'epidemia e l'altra a dimostrazione che è difficile eliminare questo agente patogeno specialmente da luoghi grandi e affollati. Le analisi virologiche effettuate hanno mostrato la presenza di due nuove varianti GII.4 (Koopmans et al. 2006). Un caso di epidemia dovuta al Norovirus è stata registrata in una casa di cura presso Majorca tra il 4 e il 23 Febbraio del 2008. Sono stati accertati ben 71 casi tra cui 53 residenti e 18 dipendenti. L'analisi dei campioni di sangue evidenziò la presenza del Norovirus, la causa fu attribuita all'acqua di rubinetto e venne evidenziato che la trasmissione avvenne da persona a persona (Luque Fernandez et al. 2008).

Un altro caso è stato registrato nel gennaio 2011 ad Oslo dove 56 persone sono state colpite da gastroenterite nel corso di un meeting avvenuto in un prestigioso hotel di Oslo. I campioni fecali analizzati evidenziarono che si trattava di Norovirus. I soggetti presentavano i sintomi tipici della gastroenterite, ovvero diarrea, vomito, nausea, dolori addominali e 21 manifestarono febbre; la causa resta però sconosciuta. Ben 56 individui non necessitarono di cure ospedaliere e i sintomi si manifestarono per più di due giorni solo in 19 casi (Guzman-Herrador et al. 2011). Nel periodo compreso tra gennaio e febbraio 2010 sono stati registrati più di 70 casi di gastroenterite in Irlanda ed Inghilterra in seguito al consumo di ostriche

provenienti dalle acque irlandesi. Le ostriche analizzate contenevano dalle 2040 alle 2350 copie di Norovirus. La causa fu associata alla contaminazione dell'acqua nella zona di raccolta delle ostriche, area che successivamente venne sottoposta a depurazione (Doré et al. 2010). Nell'aprile 2011 un'epidemia di Norovirus si è verificata in un ospedale di Atene, dove sono stati colpiti 28 individui: 16 membri dello staff, 10 pazienti e 2 parenti di pazienti sintomatici. La fonte del Norovirus però non è stata identificata con certezza ma stato è possibile evidenziare che la trasmissione è avvenuta da persona a persona e che i soggetti maggiormente colpiti erano già immunocompromessi (Georgiadou et al. 2011).

**USA.** le case di cura e gli ospedali sono i luoghi più interessati dalle epidemie di Norovirus. Un lavoro effettuato dal “*Nevada State Health Division*” (NSHD) dall'aprile 2010 su 15 strutture di cura a lunga degenza ha evidenziato ben 17 casi epidemici associati al Norovirus. I soggetti coinvolti furono 255 degenti e 126 membri dello staff, di cui 5 impiegati nelle cucine.

#### 1.1.7 – Prevenzione e controllo

Considerata la bassa dose infettante necessaria per causare un'infezione, l'elevata resistenza ambientale e ai disinfettanti e l'alta incidenza del contagio interumano è opportuno effettuare una scrupolosa prevenzione del contatto con materiale o cibo contaminato da norovirus. Per effettuare un efficace controllo della propagazione di un'epidemia di Norovirus è necessario mettere in atto delle misure anche in caso di sospetto: anche l'apparizione improvvisa di casi di diarrea e vomito deve fare sospettare un'epidemia di Norovirus. L'infezione si diffonde quando si realizzano le seguenti condizioni:

- 1) Presenza di individui affetti da Norovirus. Se feci e vomito vengono a contatto con l'ambiente la possibilità di contaminazione è elevata. Infatti, nel periodo massimo dell'infezione sono presenti più di un miliardo di particelle virali per ogni grammo di sostanza fecale;
- 2) Superfici esposte alla contaminazione (tutte le superfici sia verticali che orizzontali, a causa delle mani ma anche delle scarpe ed oggetti che attraversano l'area infetta, possono essere contaminate);
- 3) Sopravvivenza del virus nell'ambiente (se la decontaminazione fallisce, il Norovirus può persistere per lunghi periodi e conservare focolai di contaminazione nell'ambiente, come

dimostrato per esempio dalle diverse segnalazioni di epidemie consecutive a bordo di navi da crociera);

4) Trasmissione del virus (via oro-fecale, cibo e bevande).

Individui sensibili: la sensibilità al Norovirus sembra essere universale, ma recenti studi hanno evidenziato una correlazione tra gruppi sanguigni diversi e sensibilità a genotipi virali diversi. Individui di tutte le età possono sviluppare i sintomi dell'infezione. Non esiste un vaccino per il Norovirus e un'infezione precedente conferisce solo una temporanea immunità che non è estesa oltre il genotipo. Tutto questo può essere correlato al fatto che vi sono in circolazione differenti ceppi di Norovirus con proprietà antigeniche diverse e ad un'incompleta sensibilizzazione delle cellule di memoria del sistema immunitario. I soggetti a maggiore rischio, infatti, sono i bambini, gli anziani o persone immunocompromesse.

E' importante inoltre non toccare i cibi pronti da mangiare a mani nude, è necessario quindi che gli operatori alimentari usino guanti. Il Norovirus, infatti, una volta entrato negli alimenti può sopravvivere per lunghi periodi anche se sottoposto a trattamenti. Un metodo ottimale per eliminare il Norovirus è difficile da identificare poichè risulta essere resistente sia alle alte che alle basse temperature e pertanto risulta difficile eliminarlo dalla matrice alimentare. Un riscaldamento al di sopra dei 70° C e l'irraggiamento provocano però denaturazione delle proteine capsidiche e/o frammentazione dell'RNA. E' noto, però, che alimenti contaminati anche se sottoposti a riscaldamento sopra i 70° C potrebbero proteggere il virus dal calore; infatti un ambiente altamente proteico può proteggere il virus e pertanto bloccarne l'inattivazione. Inoltre, non tutti i tipi di cotture sono sufficienti ad eliminare in *toto* il patogeno; infatti la cottura a vapore utilizzata in cucina per esempio non supera i 70°C e quindi questo implica una persistenza delle particelle virali nell'alimento. Tra i disinfettanti utilizzati invece per le acque destinate alla depurazione dei molluschi ricordiamo il cloro, l'ozono o gli agenti fisici come gli UV e la filtrazione:

- a) il cloro è efficace per ridurre la contaminazione batterica, ma risulta essere poco efficace sul Norovirus;
- b) i raggi UV inattivano i microrganismi quando questi sono direttamente esposti all'irradiazione;
- c) l'ozono ossida le proteine del virus alterando la struttura molecolare (colpisce i gruppi HS) e provoca un blocco enzimatico; tale processo è facilitato nei virus in quanto privi di membrana cellulare.

La disinfezione delle superfici a contatto con il cibo è, quindi, un primo passo per interrompere la trasmissione del Norovirus, anche se recentemente è stato evidenziato che il Norovirus si potrebbe internalizzare nei vegetali e pertanto i disinfettanti potrebbero non avere l'effetto desiderato. Mentre le alte temperature potrebbero distruggere le vitamine e gli altri componenti nutrizionali dell'alimento, le alte pressioni rappresentano un metodo valido per inattivare il Norovirus. Le alte pressioni sono, infatti, in grado di distruggere il virus senza alterare il gusto e i valori nutrizionali dell'alimento (Lou et al. 2011); però da alcuni studi è emerso che ad esempio un incremento della concentrazione di zucchero e sale protegge il virus dalle alte pressioni. Uno studio (Li et al. 2010) ha evidenziato che l'utilizzo di acqua ossigenata e UV potrebbero essere usati per decontaminare gli alimenti freschi, evitando così di utilizzare disinfettanti. Il metodo di prevenzione, da adottare in presenza di casi di Norovirus, è l'isolamento del soggetto al fine di evitare una propagazione; in particolare in ambienti affollati come ad esempio le scuole. Isolando, pertanto, il soggetto infetto si minimizza il contatto con altri individui durante il periodo di massima infettività (24-72 ore dopo la comparsa dei primi sintomi) e in certi casi è opportuno isolare anche gli individui esposti che non manifestano ancora i sintomi, ma che potrebbero trovarsi nella fase di incubazione (Hall et al. 2011, Gilbride et al. 2009). Un'ulteriore metodo di prevenzione è la disinfezione degli ambienti, in particolare le superfici di bagni o superfici come le maniglie o gli scorrimano. I NoV sono in grado di sopravvivere fino a 7 giorni sulle superfici, di conseguenza una accurata pulizia potrebbe prevenire il trasferimento a soggetti sani (D'Souza et al. 2010). L'utilizzo di un adeguato disinfettante è molto importante e la sua efficacia dipende in gran parte anche dalla pulizia dello sporco grossolano effettuata in precedenza, oltre che da una corretta e accurata igiene delle mani perchè è stato dimostrato che le dita sono in grado di depositare e acquisire particelle virali a contatto con superfici contaminate (Barker et al. 2004). Vi sono degli accorgimenti da adottare, quali ad esempio il lavaggio delle mani con acqua corrente e saponi neutri o antisettici per ridurre l'eventuale presenza di microorganismi sulla loro superficie (Sickbert-Bennett et al. 2005). Da uno studio, infatti, è emerso che il lavaggio delle mani per 20 secondi con acqua e sapone riduce la presenza di RNA virale di 0.7-1.2 log<sub>10</sub> mentre l'uso di detergenti a base di alcool non determinano un'apprezzabile riduzione dell'RNA virale (Liu et al. 2010). Tali studi, però, non hanno mostrato i livelli di vitalità dei virioni rimasti sulla superficie delle mani in quanto è impossibile coltivarli in vitro. Nel caso del Norovirus è stata documentata l'efficacia dell'ipoclorito di sodio e di altri composti chimici che sono riportati nella lista **EPA** ([www.epa.gov/oppad001/list\\_g\\_norovirus.pdf](http://www.epa.gov/oppad001/list_g_norovirus.pdf)). In particolare molti studi negli ultimi anni

hanno preso in considerazione l'utilizzo di perossido di idrogeno in forma gassosa prodotto da macchinari appositi per la disinfezione di ambienti ospedalieri ottenendo risultati incoraggianti contro una ampia selezione di patogeni come: *Clostridium difficile* (Boyce et al. 2008, Barbut et al. 2009), spore (Andersen et al. 2006), batteriofagi MS2 (Pottage et al. 2010) e Calicivirus (Bentley et al. 2012, Otter et al. 2009).

#### 1.1.8 - Surrogati del Norovirus

Il fatto che non sia possibile la replicazione in vitro del NoV ha portato alla ricerca e alla selezione di surrogati in base alla loro capacità di replicarsi in coltura e alle loro affinità genetiche, fisiche o chimiche con il virus target (Richards 2012). Per studiare la resistenza dei NoV ai fattori ambientali e agli agenti virucidi sono stati utilizzati dei surrogati coltivabili in vitro, come il calicivirus felino (FCV) e il Norovirus murino (MNV). Si è notato, però, che l'etanolo ha una maggiore attività sull'FCV rispetto ad altri alcool e soluzioni di etanolo al 70% dopo 30 secondi sono in grado di ridurre i livelli di MNV di 2.5 unità logaritmiche (Allen et al. 2009, Shirato et al. 2008). Recentemente è stato dimostrato che sia l'MNV che l'FCV sono resistenti ai solventi organici e che la loro inattivazione avviene a temperature comprese tra i 63 e i 72°C (Cannon et al. 2006). Inoltre è stato evidenziato che l'MNV è più resistente rispetto all'FCV ai pH basici ed acidi. L'MNV è anche più resistente rispetto all'FCV a temperatura ambiente. Da alcuni studi è emerso che un 60% di etanolo ed isopropanolo determina una riduzione di 4-3.5 unità logaritmiche del titolo virale, rispettivamente, dopo un'esposizione di 30 secondi. Entrambi gli alcool sono comunemente usati nelle procedure di purificazione degli acidi nucleici senza provocarne la degradazione. E' stato, invece, evidenziato che il numero delle copie dell'RNA virale si riduce di circa un'unità logaritmica in presenza degli alcool probabilmente a causa dell'aggregazione dei virioni. La perdita dell'infettività associata alla presenza dell'RNA genomico suggerisce inoltre che l'alterazione proteica è il meccanismo attraverso il quale l'MNV viene inattivato. Dallo studio è anche emerso che i disinfettanti a base di cloro e iodio diluiti, annullano l'infettività dell'MNV. I dati inoltre ricavati per mezzo della RT-PCR suggeriscono che l'alterazione del capsido è il meccanismo attraverso il quale l'MNV inizia ad essere inattivato e che l'RNA genomico o parte di esso è ancora presente dopo il saggio. Questo porta ad evidenziare che i disinfettanti sono in grado di ridurre il titolo virale e che il genoma virale o dei frammenti possono essere rilevati attraverso RT-PCR. Essendo l'MNV molto simile al Norovirus umano, è possibile che tutte queste metodiche citate sopra abbiano una valenza di eliminazione anche per tale virus.

## 1.2 - Alimenti associati alle infezioni da Norovirus

Gli alimenti coinvolti nella trasmissione all'uomo di infezioni virali sono molteplici e vanno dall'acqua, che rappresenta una delle principali fonti di infezione, al latte, alla carne, alla frutta, ma un ruolo particolarmente importante è rivestito dai prodotti vegetali (insalata e frutti di bosco) e dai prodotti della pesca (soprattutto molluschi).

Negli ultimi anni, epidemie virali associate agli alimenti sono state ricondotte ai lamponi, alle fragole, all'acqua dei pozzi, ai panini e alle ostriche. La sorgente della contaminazione virale dei frutti di mare è la contaminazione fecale dell'acqua nella quale risiedono, ma bisogna tenere presente che il prodotto può venire contaminato attraverso l'uso di acque per le irrigazioni o di lavaggio contaminate, personale infetto addetto alla preparazione e al trattamento dell'alimento, contatto del prodotto con superfici contaminate (Goyal 2006). In base ai risultati condotti con virus di mammiferi è stato anche ipotizzato che i virus potrebbero essere captati mediante le radici delle piante.

I virus enterici eliminati con le feci degli individui infetti attraverso gli scarichi arrivano alle acque superficiali; essi sono più resistenti dei batteri ai comuni trattamenti di bonifica, compresa la clorazione ed è stato dimostrato che sopravvivono fino a 130 giorni in acqua di mare, quindi più a lungo dei batteri coliformi che, come è noto, vengono utilizzati come indicatori di contaminazione fecale sia dell'acqua che dei molluschi.

I molluschi rivestono un ruolo di primo piano nell'incidenza di malattie come le gastroenteriti e non è un caso. Essi, infatti, sono organismi filtratori la cui attività è pressoché ininterrotta e riescono a filtrare diversi litri di acqua: a seconda delle dimensioni e della specie, un mitilo filtra a 14°C circa 1,5 l di acqua all'ora, l'ostrica europea ne filtra 12 a 15°C, mentre quella americana supera i 18 l/h se tenuta a 20°C. Durante questa intensa attività di filtrazione i molluschi trattengono nel loro organismo non solo il plancton necessario al metabolismo, ma anche i batteri e virus eventualmente presenti nell'ambiente. E' da rilevare che i virus, in particolare, vengono trattenuti dai molluschi per diversi giorni, anche se posti in acque di stabulazione pulite ed è stato dimostrato che essi permangono anche dopo che questi hanno rilasciato i batteri indici di contaminazione fecale.

I casi di epidemie associate a questi prodotti stanno aumentando perché il prodotto viene normalmente mangiato crudo o poco cotto, eliminando in questo modo un fattore di sicurezza aggiunto dato dalla cottura (Alfano-Sobsey et al. 2011). Uno studio sulla contaminazione delle ostriche nel Regno Unito ha dimostrato che il 76,2% dei campioni analizzati erano risultati positivi al NoV con livelli di GII più alti dei GI e almeno un campione positivo per



ogni sito preso in considerazione. Inoltre è stato possibile notare una stagionalità nella contaminazione con i più alti livelli di NoV nei mesi invernali (Lowther et al. 2012). Un altro studio ha recuperato i dati di epidemie di gastroenterite da cinque stati europei riconducendo molte di queste a ingestione di ostriche contaminate (Westrell et al. 2010).

Altre epidemie legate al consumo di alimenti infetti hanno riguardato negli ultimi anni i prodotti vegetali, in particolare frutti di bosco e insalata (Ethelberg et al. 2010), irrigati con acque contaminate. Spesso questi alimenti hanno provocato epidemie in diversi stati a causa dell'importazione di lotti contaminati non controllati nel sito di raccolta. Un esempio su tutti è stata l'importazione di frutti di bosco dalla Polonia che in più occasioni ha portato a epidemie di NoV in scuole e mense (Sarvikivi et al. 2011, Maunula et al. 2009, Cotterelle et al. 2005, Korsager et al. 2005).

In Germania una delle più grandi epidemie di gastroenterite di origine alimentare che ha causato 11000 casi tra ragazzi di diverse scuole è stata collegata al consumo di un dessert preparato con fragole surgelate che sono risultate contaminate da NoV ([http://www.rki.de/EN/Home/Outbreak\\_AV.html](http://www.rki.de/EN/Home/Outbreak_AV.html)).

### 1.3 – Metodi di rilevamento

I Norovirus non sono in grado di replicare in colture cellulari e ne risulta quindi difficile l'isolamento e l'identificazione. Per determinare in modo diretto il virus è necessario: un'alta sensibilità per poter rilevare anche un piccolo numero di particelle virali, tempi brevi d'analisi, costi contenuti, facilità e riproducibilità di esecuzione. La scelta di una metodologia per la determinazione dei virus enterici deve tener conto di due esigenze:

1. complessità dei virus enterici
2. bassa dose infettante

Inizialmente il Norovirus veniva rilevato nelle feci per mezzo della Microscopia Elettronica diretta (EM) e l'immunolettromicroscopia (IEM). La microscopia elettronica è stata in passato molto utilizzata a scopo diagnostico per determinare la presenza del virus nelle feci, ma tale metodo era costoso e poco sensibile, infatti poteva rilevare concentrazioni di virus di  $10^6$ , inoltre non era applicabile a livello di alimenti. La concentrazione del virus, però, nelle feci deve essere intorno alle 100 particelle/ml per poter essere visualizzato; poiché durante le infezioni da Norovirus è possibile che si abbia un basso livello di rilascio del virus, la diagnosi mediante IEM può dare falsi positivi. Il problema della ridotta sensibilità di

rilevamento risulta ancora più accentuata in riferimento agli alimenti in cui la contaminazione comporta la presenza di basse concentrazioni virali.

L'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) è una tecnica utile per la rilevazione di antigeni virali; è di facile applicazione, infatti vi è un'ampia disponibilità in kit commerciali. Richiede la presenza di un anticorpo specifico per un determinato antigene. Il campione potenzialmente infetto viene "immobilizzato" su un supporto solido e messo a contatto con l'anticorpo; se quest'ultimo riconosce l'epitopo vi si lega e forma il complesso antigene-anticorpo. L'anticorpo o è legato covalentemente ad un enzima o può essere lui stesso riconosciuto da un anticorpo secondario coniugato ad un enzima (perossidasi o fosfatasi alcalina). Si effettua un lavaggio ad ogni passaggio con soluzioni tampone per eliminare proteine o anticorpi in eccesso che non si sono legati in modo specifico. Nell'ultimo passaggio si aggiunge un substrato "aggredibile" dall'enzima legato all'anticorpo (p-nitrofenilfosfato); se il legame antigene-anticorpo è avvenuto quest'ultimo viene scisso dall'enzima presente con produzione di p-nitrofenolo e comparsa di una colorazione gialla. L'intensità della colorazione, misurabile allo spettrofotometro, è semiquantitativa secondo una scala arbitraria di intensità. La tecnica presenta tempi di esecuzione contenuti (6 h per la rilevazione di virus enterici), è semplice ed economica e viene quindi utilizzata per lo screening di routine; tuttavia i risultati presentano una scarsa specificità ed inoltre non permette di rilevare tutti i genogruppi del Norovirus (Thornton et al. 2004). In campo alimentare, pertanto, la tecnica ELISA per la ricerca di Norovirus viene utilizzata poco.

A causa dell'impossibilità del Norovirus di replicare in colture cellulari, della scarsa sensibilità delle tecniche immuno-enzimatiche nel determinare casi sporadici e del basso titolo virale presente negli alimenti e nell'acqua non rilevabili con microscopia elettronica, sono state sviluppate, in alternativa, metodiche molecolari per la rilevazione e caratterizzazione di Norovirus, tecniche che hanno facilitato gli studi epidemiologici relativi alla loro circolazione e permesso diagnosi di gastroenteriti da essi provocate con aumentata sensibilità e specificità. Attualmente le tecniche di biologia molecolare sono gli strumenti maggiormente utilizzati per rilevare il Norovirus nelle feci, in campioni alimentari ed ambientali. La tecnica maggiormente utilizzata risulta essere la real-time PCR.

L'utilizzo della real-time PCR, che in questi ultimi anni si è affermata anche per i virus enterici oltre che per il rilevamento di batteri patogeni, in diverse matrici alimentari, unisce ai vantaggi della PCR classica (sensibilità, specificità e rapidità di risposta) la possibilità di monitorare lo svolgimento della reazione mentre è ancora in atto. Questa peculiarità viene sfruttata per eliminare tutte quelle fasi post-PCR quali l'elettroforesi, il blotting o il

sequenziamento, necessari per caratterizzare l'amplificato, ma che allungano i tempi di analisi e necessitano dell'uso di reagenti tossici o mutageni. La risposta della reazione viene resa quantitativa determinando gli accumuli degli amplificati all'inizio della fase esponenziale della PCR.

I dati che si ottengono permettono di quantificare il frammento amplificato grazie all'utilizzo di marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della PCR. Tale metodo rappresenta quindi un valido strumento applicabile sia al controllo delle derrate alimentari sia in estesi piani di monitoraggio necessari per la valutazione del rischio microbiologico.

I sistemi di rilevamento di questa metodica si basano sul principio della Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET), e si avvalgono dell'utilizzo di coloranti che si legano specificamente ai doppi filamenti di DNA sintetizzati o di sonde specifiche legate a molecole fluorescenti.

Il primo sistema utilizza coloranti che emettono fluorescenza quando si legano alla struttura secondaria del doppio filamento di DNA che si crea durante l'amplificazione. Tra i coloranti proposti quello che ha fornito i migliori risultati è il SYBR Green I (che emette una fluorescenza a 520nm quando si lega con il DNA). Bisogna tener presente che reazioni di amplificazione diverse possono fornire, a parità di concentrazione del target, intensità di fluorescenza diversa in funzione della lunghezza dell'amplificato. Più di una molecola di colorante infatti può legarsi ad un singolo filamento di DNA sintetizzato durante l'amplificazione, così amplificati lunghi generano una fluorescenza maggiore rispetto a quelli corti. La Real Time-PCR che utilizza il colorante SYBR Green I è una tecnica aspecifica in quanto questo colorante si lega indiscriminatamente con qualsiasi filamento di DNA sintetizzato durante l'amplificazione. Per questo motivo la specificità della reazione viene determinata definendo la temperatura di melting ( $T_m$ ) dei prodotti di amplificazione.

Il secondo sistema utilizza una sonda fluorescente che si lega in modo specifico alla sequenza del genoma compresa tra i primers, aumentando la specificità del sistema sopra descritto. La sonda è costituita da un oligonucleotide che in prossimità dell'estremità 5' lega una molecola fluorescente ad alta energia detta "Reporter", mentre in prossimità dell'estremità 3' lega una molecola fluorescente a bassa energia detta "Quencher". Durante la reazione la sonda fluorescente si ibridizza per prima alla sequenza di DNA complementare, e successivamente si legano i due primers che innescano l'attività 5'-esonucleasica della DNA-polimerasi. Tale enzima catalizza sia la degradazione della sonda che la contemporanea estensione di un nuovo filamento.

La curva di amplificazione che deriva da una PCR, ossia il diagramma di fluorescenza ottenuto rispetto al numero di cicli, è solo teoricamente di tipo esponenziale; in realtà dopo la prima fase esponenziale, in cui nessuno dei componenti della reazione è limitante, tende ad assumere un andamento di tipo lineare ed eventualmente raggiunge un plateau. Poiché repliche di reazioni identiche presentano efficienze di reazione diverse, la misurazione della reazione in fase finale non risulta direttamente connessa con l'ammontare iniziale di DNA target. La possibilità di seguire le reazioni in tempo reale permette di analizzarle nel momento in cui l'amplificazione è in fase esponenziale. L'andamento delle reazioni viene visualizzato in grafico nel quale per ogni DNA viene rappresentata la fluorescenza (asse y) misurata in ogni ciclo di reazione (asse x). La quantificazione da PCR real-time basata su una retta standard può utilizzare DNA plasmidico o altre forme di DNA in cui la concentrazione assoluta di ciascuno standard è conosciuta.

La quantificazione ottenibile con i diversi sistemi di real-time PCR può essere relativa o assoluta. Per la quantificazione della carica virale si utilizza la quantificazione relativa, per cui è sempre necessaria la presenza di un controllo interno che, amplificato, darà la possibilità di normalizzare i dati ottenuti con un confronto di tipo relativo. Riferendoci invece all'analisi qualitativa, la specificità del dato qualitativo ottenuto viene confermato in maniera del tutto automatizzata e con pochissimo tempo (5 minuti circa), attraverso il calcolo e relativo plot della curva di dissociazione del prodotto di PCR di ogni campione analizzato, che consente di migliorare la specificità del sistema con la misura del  $T_m$  del DNA target. Questo dato ci consente di discriminare eventuali segnali di amplificazione derivanti da prodotti aspecifici della reazione.

In molte epidemie l'agente eziologico non può essere confermato, ma si sospetta che siano causate da virus. E' opinione generale che il numero di epidemie virali legate al consumo di alimenti infetti, sia molto più grande del numero che viene normalmente riportato. Una ragione per spiegare il fallimento nel confermare una eziologia virale è dovuta alla mancanza di metodi sensibili e affidabili per la rilevazione di virus negli alimenti implicati.

Il bisogno di sviluppare metodi semplici, rapidi e accurati per la concentrazione dei virus da una grande quantità di alimenti non può essere sottovalutata. Una metodologia ideale dovrebbe produrre un campione finale che non interferisca con le tecniche di virologia convenzionale o molecolare usate per il rilevamento dei virus. Inoltre, la metodologia dovrebbe essere in grado di concentrare il virus da molti tipi diversi di alimenti così che possa essere usata in situazioni in cui l'integrità e la sicurezza del cibo sono in questione e sia

d'aiuto nello sviluppo di un sistema di sorveglianza, basato su tecniche di laboratorio, per la ricerca rapida in epidemie che abbiano una stessa sorgente di infezione (Goyal et al. 2006).

## 1.4 – Metodi di disinfezione

I norovirus non sono un problema solo dal punto di vista della sanità pubblica ma anche sotto un aspetto puramente economico in termini di costi per la disinfezione delle stanze, in cui erano presenti pazienti infetti, così come i costi per le cure degli ospedalizzati. Non va sottovalutato, poi, il danno economico derivante dalle ore di lavoro e dagli stipendi che vanno persi. Un discorso strettamente correlato è quello degli alimenti contaminati che, come si è visto in precedenza, spesso portano a epidemie su larga scala, il che comporta grossi costi per la sanità oltre al ritiro dal commercio delle derrate contaminate con ulteriore spreco di denaro per fare in modo di informare tutta la popolazione del rischio legato al particolare alimento. Il costo delle epidemie di norovirus nel Regno Unito è stato stimato in 1 milione di sterline per 1000 letti (Lopman et al. 2004b). Va da sé che un rilevamento tempestivo dei norovirus in soggetti infetti o in alimenti contaminati mediante le metodiche esposte in precedenza porterebbe un giovamento sotto il profilo sanitario ed economico, soprattutto se tali tecniche venissero applicate anche nello screening degli alimenti più a rischio di contaminazione svolgendo un ruolo preventivo. Negli ultimi anni sono aumentati gli studi che prendono in considerazione i soggetti asintomatici che possono trasmettere il patogeno senza presentare i sintomi classici della malattia e che risultano pertanto un grosso problema dal punto di vista sanitario fungendo da serbatoi per la contaminazione virale. In particolare queste persone dovrebbero prestare particolare attenzione all'igiene se impiegate in ambito alimentare nella preparazione di pasti siccome è stato notato che spesso epidemie di gastroenterite sono iniziate proprio a causa di questi dipendenti (Barrabeig et al. 2010) e che in generale le cariche virali medie di questi individui sono molto simili a quelle di individui sintomatici (Ozawa et al. 2007).

Alla luce di quanto detto risulta che per impedire la diffusione del contagio si possano effettuare due tipologie di intervento: la disinfezione delle superfici e degli ambienti contaminati e la disinfezione (preventiva o meno) degli alimenti a rischio elevato di contaminazione come i bivalvi ad esempio.

Per quanto riguarda la disinfezione degli ambienti, dopo opportuna detersione ed eliminazione dello sporco grossolano, si può procedere con mezzi fisici (ad esempio acqua calda oltre gli 80°C, vapore, raggi UV) o metodi chimici. Questi ultimi in genere vengono utilizzati

maggiormente perchè si sono dimostrati più efficaci nell'ottenere un significativo abbattimento anche di cariche virali consistenti. In particolare vengono utilizzati i composti del cloro, primo fra tutti l'ipoclorito, dello iodio, i tensioattivi cationici, gli alcoli e i perossidi. Molti di questi composti però pur essendo poco costosi e facilmente reperibili sono spesso nocivi o irritanti per occhi e mucose e possono costituire un problema anche per le superfici in quanto alcuni possono avere proprietà corrosive. Negli ultimi anni si sta affermando il perossido di idrogeno soprattutto per la disinfezione di superfici in ambito ospedaliero, il quale viene usato sotto forma di vapore e agisce sulle superfici esposte senza risultare corrosivo o tossico.

La disinfezione degli alimenti contaminati da virus invece pone delle problematiche diverse rispetto alle superfici, intanto perchè a differenza di altri tipi di contaminazione i normali metodi usati in campo alimentare (acidificazione, abbassamento dell'attività dell'acqua, aggiunta di sali, ecc.) risultano inefficaci contro i virus. Va considerato inoltre che i normali trattamenti con vapore o calore in generale possono essere utilizzati solo per alimenti destinati ad un certo utilizzo, dato che è necessario mantenere determinate temperature per un certo lasso di tempo perchè il trattamento abbia effetto. Inoltre questi trattamenti vanno ad alterare la composizione nutrizionale dell'alimento stesso che perde molte sostanze nutritive. Dagli anni '90 si è cercato di rimediare a questo problema con l'utilizzo delle alte pressioni idrostatiche per alimenti quali succhi o gelatine di frutta soprattutto in Giappone e Stati Uniti; questo perchè il trattamento HHP (High-Hydrostatic Pressure) consente di ottenere abbattimenti virali elevati senza innalzamenti significativi di temperatura e mantenendo inalterate le proprietà nutritive dell'alimento. Negli ultimi anni si sta cercando di estendere il trattamento anche ad altri prodotti come le ostriche per renderle più sicure dal punto di vista microbiologico dato che vengono spesso consumate crude. Per ora le alte pressioni seppure si siano dimostrate efficaci contro diversi patogeni rimangono una tecnica di nicchia destinata agli alimenti di alta qualità dato l'alto prezzo del macchinario e della messa in funzione dello stesso.

#### 1.4.1 – Perossido di idrogeno

I perossidi, come l'acqua ossigenata o l'acido peracetico, sono composti chimici instabili in soluzione che si decompongono rilasciando ossigeno agendo in questo modo da ossidanti. Sono dei comuni disinfettanti usati nell'industria alimentare che facilitano la pulizia e la sanificazione delle superfici e dell'ambiente (Rudnick et al. 2009). La disinfezione con questi

composti è efficace già a basse concentrazioni in presenza di residui di sporco e proteine (Christensen et al. 1990); inoltre presentano un ampio spettro d'azione.

Il perossido di idrogeno è impiegato in campo medico, nell'industria alimentare e nella disinfezione ambientale perchè possiede una forte attività antimicrobica unita ad una bassa corrosività e tossicità. In particolare uno studio ha preso in considerazione il suo utilizzo nel trattamento delle acque reflue e dei liquami con buoni risultati sull'abbattimento dei microorganismi (Tofant et al. 2006). Diversamente da altri composti non genera prodotti di scarto o gas tossici (Gopal et al. 2010), perciò il suo utilizzo implica un minore impatto ambientale rispetto all'acido peracetico. L'efficacia antimicrobica dell'acqua ossigenata è comparabile a quella di un trattamento con 100-200 ppm di candeggina a temperatura ambiente (Ölmez and Kretzschmar 2009). Negli ultimi anni il perossido di idrogeno è stato impiegato in associazione con alcuni metalli, luce UV (Bayliss and Waites 1980; Dotson et al. 2010) e ozono per formare il radicale  $\cdot\text{OH}$ ; tutti questi metodi producono efficaci ossidanti con una reattività seconda solo a quella del fluoro.

Come riportato precedentemente il perossido di idrogeno si sta facendo largo come disinfettante in forma gassosa negli ambienti ospedalieri in cui abbiano soggiornato pazienti con infezioni di batteri o virus particolarmente resistenti alla disinfezione delle superfici.

#### 1.4.2 – High-Hydrostatic Pressure (HHP)

Il trattamento con alte pressioni idrostatiche è una tecnica che permette l'eliminazione di batteri e virus e allo stesso tempo produce ridotti cambiamenti delle proprietà sensoriali e nutrizionali dell'alimento. Il processo è stato applicato ad una grande varietà di alimenti come frutta, vegetali, carne, pesce, prodotti caseari e uova.

Il trattamento avviene all'interno di una camera che viene chiusa ermeticamente e nella quale viene posto l'alimento. Attraverso l'acqua che viene fatta entrare nella camera si ha l'applicazione in maniera isostatica della pressione che viene trasmessa a tutte le parti dell'alimento. Inoltre durante il raggiungimento della pressione voluta, che in generale per gli alimenti si attesta su valori da 300 a 600 MPa nell'industria alimentare, si ha un innalzamento della temperatura nel fluido che trasmette la pressione così come nell'alimento sottoposto a trattamento. Questo innalzamento di temperatura avviene piuttosto velocemente e si attesta nell'ordine di circa 3 gradi ogni 100MPa. I costi come detto risultano ancora piuttosto elevati avendo una media che va da 0,05 a 0,5 dollari per litro o per chilogrammo in base alle condizioni di processo (Rastogi et al. 2007, Hernando-Sáinz et al. 2008).

Molti studi hanno preso in considerazione l'utilizzo di questa tecnica per eliminare l'eventuale contaminazione microbica da campioni di mitili. In particolare due studi recenti hanno dimostrato che è possibile ottenere una significativa riduzione del titolo virale di norovirus murino contenuto in ostriche applicando un trattamento a 400 MPa per 5 minuti e mantenendo la temperatura sotto i 5 °C (Li et al. 2009, Tang et al. 2010).



## 2 - Scopo del dottorato

I Norovirus costituiscono un problema a livello sanitario mondiale; essi sono in grado di resistere per molto tempo nell'ambiente, sulle superfici e sono difficili da eliminare quando contaminano i cibi. Inoltre è sufficiente una bassa dose per causare la malattia. Questi sono i motivi che mi hanno spinto a effettuare degli studi su questo e altri virus ad esso associati. In particolare il mio lavoro di tesi si è focalizzato su due punti molto importanti:

- lo studio dell'efficacia di metodi chimici ( $H_2O_2$ ) e fisici (trattamento HHP) nell'inattivazione di virus enterici umani e non;
- il confronto di metodiche per l'eluizione e il rilevamento del virus da campioni alimentari contaminati artificialmente da Calicivirus.

## 3 - Materiali e metodi

### 3.1- Virus e colture cellulari utilizzate

In questo studio sono stati usati i seguenti virus: Coxsackie B5, Calicivirus Felino (FCV) ceppo F9 e Norovirus umano del genogruppo GII.

Per quanto riguarda il Norovirus, che non è in grado di crescere in coltura cellulare, le particelle virali sono state ottenute da campioni fecali di pazienti infetti. Inizialmente è stato prelevato 1 grammo di feci che è stato risospeso in 9 ml di PBS (Phosphate buffered saline) alla concentrazione di 0,01 M. La sospensione è stata posta in agitazione tramite vortex per 60 secondi, centrifugata a 10000 g per 10 minuti a 4 °C e infine filtrata usando filtri con diametro dei pori di 0,22 µm per rimuovere le contaminazioni batteriche. La soluzione virale così ottenuta è stata mantenuta a -80 °C fino al suo utilizzo nelle prove sperimentali.

Il virus Coxsackie B5 si replica nella linea cellulare di rene di scimmia (RC-37) mentre le cellule renali di gatto (Crandell-Reese Feline Kidney, CRFK) vengono usate per il Calicivirus felino. La replicazione virale si ottiene inoculando 0,1 ml della sospensione virale in una bottiglia, privata del terreno colturale, contenente lo strato cellulare. La bottiglia viene, quindi, incubata per un'ora a 37 °C. Successivamente si aggiungono 25 ml di terreno di crescita in ogni bottiglia costituito per le cellule RC-37 da un terzo di terreno di Hank e due terzi di terreno di Eagle con l'aggiunta del 10% sul totale di siero fetale bovino mentre per le CRFK il terreno è uno solo ed è MEM (Minimum Essential Medium con sale di Earl) addizionato di lattalbumina e il 10% del volume è costituito da siero fetale bovino. La bottiglia viene riposta in incubazione a 37 °C fino alla comparsa dell'effetto citopatico dovuto alla lisi delle cellule da parte delle particelle virali neoformate. A questo punto la bottiglia viene congelata a -20 °C e in seguito viene scongelata e ricongelata per altre due volte per permettere la lisi anche di quelle cellule che erano rimaste integre, permettendo un maggiore recupero di virus. Il terreno liquido viene recuperato in provettoni e centrifugato a 1000 g per 2 minuti per separare il surnatante, che contiene il virus, dal pellet, dove sono contenuti i resti cellulari. La sospensione virale viene, quindi, purificata tramite centrifugazione con ultrafiltri Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units fino alla completa eliminazione del liquido seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Si procede infine al recupero delle particelle virali, rimaste adese alle pareti del filtro, staccandole meccanicamente con una pipetta pasteur e 2-3 ml di soluzione tampone. I virus recuperati vengono congelati a -80 °C fino al loro utilizzo per le prove sperimentali.

Le sospensioni virali ottenute sono state analizzate prima dell'inizio delle prove sperimentali per controllare il titolo virale di partenza.

## 3.2 – Prove sperimentali

Durante il periodo di dottorato sono state svolte diverse prove per verificare l'efficacia di alcuni metodi chimici e fisici nell'inattivazione dei virus utilizzati e la capacità di recupero di un protocollo di rilevamento di calicivirus. Di seguito vengono riportati i protocolli utilizzati per tutte le prove effettuate.

### 3.2.1 – Inattivazione con perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ )

In queste prove lo scopo è stato quello di testare la capacità di diverse concentrazioni di disinfettante nell'inattivazione dei tre virus menzionati in precedenza.

Partendo da una soluzione commerciale al 35% di acqua ossigenata sono state preparate di volta in volta diverse soluzioni a concentrazioni diverse diluendo quella di partenza con tampone fosfato di Sorensen in modo da mantenere il pH intorno alla neutralità (25000 mg/l; 20000 mg/l; 18000 mg/l; 17000 mg/l; 15000 mg/l; 10000 mg/l; 7000 mg/l; 5000 mg/l; 3800 mg/l; 1150 mg/l). Inoltre per controllare che la soluzione preparata avesse effettivamente la concentrazione voluta, è stata eseguita ogni volta una titolazione colorimetrica con Permanganato di Potassio ( $KMnO_4$ ) alla concentrazione dello 0,1 N.

Una volta preparata, 99 ml di soluzione disinfettante sono stati messi in un contenitore di vetro con intercapedine e magnete appoggiato su un agitatore magnetico per mantenere mescolata la soluzione. Per ogni prova 1 ml di sospensione virale viene scongelato dallo stock preparato in precedenza e aggiunto alla soluzione disinfettante. In seguito vengono eseguiti dei prelievi di 1 ml di soluzione a tempi prestabiliti: 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 minuti. Questi prelievi vengono raccolti in provette coniche sterili di vetro, preparate in precedenza, in cui era stato messo 1ml di catalasi di fegato bovino alla concentrazione di 1 MU per neutralizzare l'attività del disinfettante. Una volta ottenuto il campione si procede all'allestimento di diluizioni scalari in base 10 prelevando 0,5 ml di soluzione dal campione di partenza e mettendolo in un tubo per tessuto di vetro in cui erano presenti 4,5 ml di terreno liquido. Il titolo virale è stato determinato in micrometodica nelle modalità che verranno descritte più avanti.

Le prove sono state condotte sia a temperatura ambiente sia a 37 °C e in questo secondo caso è stata fatta passare acqua, prelevata da un termostato, alla temperatura voluta nell'intercapedine tramite una pompa peristaltica. L'acqua veniva poi risospinta verso il termostato per mantenere la temperatura della soluzione sempre a 37 °C. Le prove effettuate con il Norovirus umano sono state condotte solo alla temperatura di 37 °C mentre per gli altri

due virus si è valutata anche l'attività del perossido di idrogeno a temperatura ambiente che in generale si è mantenuta intorno ai 20-22 °C.

Come detto sono state ottenute informazioni sul titolo virale per ogni prelievo di ogni prova in modo da poter visualizzare un andamento del titolo in funzione del tempo. Questi dati sono poi stati normalizzati andando a dividere il valore del titolo virale di un determinato tempo per quello del tempo 0 per poter visualizzare tutti gli andamenti su uno stesso grafico e poter confrontare i risultati ottenuti alle diverse concentrazioni per le prove ad una stessa temperatura. Da questi dati è stato possibile, utilizzando il software statistico SPSS, calcolare i tempi medi necessari per ottenere una inattivazione del 99%, 99,9% e 99,99% (pari a una riduzione del titolo virale di 2, 3 e 4 unità logaritmiche). Inoltre con questi tempi medi si è potuto costruire delle rette di regressione per ogni percentuale di inattivazione in modo da determinare quali siano le combinazioni più adatte di tempi di contatto e concentrazioni che possano essere utilizzate per la disinfezione delle superfici.

### 3.2.2 – Confronto di due metodiche per il rilevamento virale in campioni alimentari artificialmente contaminati

Il problema del rilevamento virale in campioni alimentari è, come si è detto, un punto critico nella determinazione delle contaminazioni alimentari. In particolar modo i protocolli di eluizione e concentrazione del virus svolgono un ruolo cruciale in tal senso. Proprio per questo sono state eseguite prove in parallelo su campioni alimentari contaminati artificialmente con FCV o NoV utilizzando due protocolli differenti per l'eluizione del virus dall'alimento. Un protocollo prevedeva l'utilizzo delle Proteinasi K, una serina proteasi usata spesso in biologia molecolare per digerire le proteine e rimuovere la contaminazione da preparazioni di acidi nucleici (Costantini et al. 2006); l'altro metodo impiega il tampone glicina e il PEG<sub>8000</sub> (Glicole Polietilenico con taglio molecolare da 8000 Da).

#### Protocollo della proteinasi K

Il protocollo prevede una iniziale omogeneizzazione del campione contaminato, 2 grammi dell'omogenato vengono quindi recuperati e messi in una provetta di plastica con 2 ml di una soluzione di Proteinasi K alla concentrazione di 0,1 mg/l. La provetta viene lasciata in agitazione meccanica continua a 150 rpm a 37 °C per un'ora, al termine della quale viene centrifugata a 4000 g per 10 minuti a 4 °C e si recupera il surnatante per le successive fasi di analisi e titolazione.

Siccome i primi test avevano evidenziato un effetto citotossico indotto dall'azione della Proteinasi K sulle cellule, è stato necessario aggiungere un passaggio con un inibitore dell'enzima per le prove con il FCV. L'inibitore è la Metossisuccinil-Alanina-Alanina-Prolina-Fenilalanina-Clorometilchetone (MeOSuc-AAPF-CMK); 10 µl di questo composto sono stati aggiunti al surnatante (precedentemente recuperato e posto in una nuova provetta) in modo da avere una concentrazione finale di 0,05 mM. Questa sostanza, così come altre simili ad essa, è stata descritta in letteratura come un efficace inibitore della Proteinasi K (Anilkumar et al. 2009). La provetta viene agitata e lasciata per 15 minuti a temperatura ambiente per permettere l'inattivazione dell'enzima, in seguito viene nuovamente centrifugata a 4000 g per 10 minuti a 4 °C. Infine si recupera il surnatante a cui vengono aggiunti 0,1 ml di un mix di antibiotici contenente: penicillina, streptomina e ampicillina. Questo ultimo passaggio viene fatto per evitare le contaminazioni batteriche.

#### Protocollo del PEG<sub>8000</sub>

Questo protocollo è strutturato in 3 giorni con diversi passaggi di centrifugazione, purificazione e concentrazione del campione.

**Tabella 1** Passaggi del protocollo con PEG<sub>8000</sub>

| <b>Primo giorno</b>  | <b>Secondo giorno</b>  | <b>Terzo giorno</b>                                       |
|--|--|---|
| Omogeneizzazione alimento e aggiunta di tampone glicina (rapporto 1:1) | Centrifugazione a 10000 g per 45 minuti a 4°C                          | Centrifugazione a 10000 g per 45 minuti a 4°C             |
| Becher per 30 minuti a 4°C agitato ogni 5 minuti                       | Risospensione pellet con 10 ml di H <sub>2</sub> O sterile             | Risospensione pellet con 2 ml di H <sub>2</sub> O sterile |
| Centrifugazione a 10000 g per 20 minuti                                | Centrifugazione a 10000 g per 20 minuti                                | Centrifugazione a 10000g per 20 minuti                    |
| Surnatante a contatto con PEG <sub>8000</sub> (rapporto 1:4) overnight | Surnatante a contatto con PEG <sub>8000</sub> (rapporto 1:4) overnight | Recupero dei 2ml di surnatante                            |

Come in precedenza, anche in questo caso vengono aggiunti gli antibiotici.

### Prove con il Calicivirus felino

Prima di iniziare le prove con il Calicivirus felino era stato fatto replicare il virus e controllato il titolo si era provveduto a diluire la soluzione iniziale di 100 volte. Questa soluzione è stata quindi aliquotata in provette Falcon da 50 ml in ragione di 42 ml di soluzione per ognuna e successivamente sono state congelate a -20 °C fino al loro utilizzo.

Inizialmente un becher è stato pesato a vuoto e al suo interno sono stati messi 30 grammi di un mix di frutti di bosco. Una volta scongelata la soluzione virale, 10 ml sono stati sgocciolati sull'alimento e lasciati in contatto per almeno 30 minuti agitando di tanto in tanto il contenitore per permettere la contaminazione del campione. In seguito tutto il liquido è stato recuperato, classificato come "soluzione di recupero" e analizzato per determinarne il titolo virale. I frutti di bosco rimasti nel becher sono stati omogenati e 2 grammi dell'omogenato sono stati utilizzati per l'analisi usando il protocollo della proteinasi K. Il resto è stato pesato nuovamente per determinare il peso dell'omogenato e aggiungere, quindi, il corrispettivo in volume di tampone glicina, primo passaggio del protocollo del PEG<sub>8000</sub>.

Un totale di 18 prove sono state effettuate. Siccome la soluzione contaminante era divisa in lotti da 42 ml, per evitare che ci fosse una diminuzione del titolo virale tra una prova e l'altra, dovuto al congelamento e scongelamento della soluzione stessa, si è deciso di utilizzarla tutta una volta scongelata. In questo modo da ogni falcon è stato possibile contaminare 3 becher ognuno con 10 ml di soluzione virale e 30 grammi di alimento, analizzati ognuno con i due protocolli descritti. Altri 10 ml di soluzione sono stati messi in un becher vuoto per fungere da controllo positivo, siccome sono stati sottoposti a trattamento con i due protocolli come per i campioni con l'alimento, mentre i rimanenti 2 ml sono stati analizzati direttamente per calcolare il titolo virale iniziale della soluzione.

Una volta ottenuti tutti i campioni il titolo è stato calcolato secondo il metodo di Reed-Muench ed espresso come logaritmo del TCID<sub>50</sub> (la dose infettante il 50% delle colture cellulari). I dati ottenuti sono stati analizzati ulteriormente con il software statistico SPSS applicando un test t di Student con un limite di confidenza posto al 5% per verificare se ci fosse una differenza statisticamente significativa tra i valori di recupero dei due metodi impiegati.

### Prove con il Norovirus umano

Le prove condotte usando il NoV sono state allestite in modo simile a quelle del Calicivirus felino. Dopo aver scongelato la soluzione contaminante, questa è stata diluita 1/10. Della sospensione virale ottenuta 10ml sono stati usati per contaminare 30 grammi di frutti di bosco



in un becher. Dopo 30 minuti di contatto è stato recuperato tutto il liquido presente e l'alimento è stato omogeneizzato. Come è avvenuto per le prove del FCV descritte in precedenza, sono stati recuperati 2 grammi da sottoporre ad analisi col protocollo della proteinasi K mentre il restante omogenato è stato analizzato con l'altra metodica.

In questo caso sono state eseguite solo 6 prove perché la quantità di campioni fecali stoccati era limitata e non è stato possibile ottenerne di nuovi.

Una volta ottenuti i campioni, questi sono stati analizzati tramite real-time PCR ed è stato possibile avere dati quantitativi grazie al fatto che era stata costruita una retta di calibrazione dello strumento con campioni a concentrazione nota. Anche in questo caso si è deciso di applicare un test t di Student per verificare se ci fossero delle differenze statisticamente significative, ponendo il limite di confidenza al 5%.

### 3.2.3 – Inattivazione con trattamenti HHP di campioni contaminati artificialmente e valutazione dei cambiamenti nella texture dell'alimento.

I trattamenti con alte pressioni idrostatiche si sono rivelati un ottimo metodo per l'eliminazione di contaminazioni da particolari alimenti quali i molluschi bivalvi. In particolare, come già è stato menzionato, diversi studi sono rivolti alla determinazione dell'efficacia di questa metodica nei confronti delle contaminazioni di ostriche e vongole da parte di Norovirus umano e altri virus legati storicamente a questi tipi di alimenti. Per questo motivo è stato deciso, nell'ambito di questo progetto di dottorato, di prendere in considerazione anche questo aspetto essendo strettamente legato alle altre due tematiche già affrontate in precedenza. Si è quindi proceduto scegliendo come alimento delle vongole veraci acquistate nel reparto pescheria di un centro commerciale e di effettuare prove di inattivazione con le alte pressioni sul campione contaminato artificialmente con FCV. Non è stato possibile utilizzare virus enterici umani perché i trattamenti sono stati effettuati alla SSICA (Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari), quindi per una maggiore sicurezza dell'operatore preposto all'utilizzo del macchinario si è deciso per l'utilizzo del virus felino. Inoltre per valutare l'effetto prodotto dal trattamento sull'alimento sono state analizzate anche le proprietà della texture dopo trattamento e rapportate ad un campione di riferimento.

#### Contaminazione artificiale dei campioni

I sacchetti di vongole da 1 Kg sono stati tutti acquistati dallo stesso rivenditore. Un acquario è stato riempito con 10 litri di acqua demineralizzata a cui è stata aggiunta una quantità di sale tale da portare la sua concentrazione finale al 3%. Le vongole sono state lasciate nell'acqua ad

acclimatarsi per almeno 24 ore mantenendo la temperatura in un range dai 14 °C ai 17 °C. Una soluzione di 100 ml contenente il virus è stata scongelata e versata nell'acquario e da questo momento le vongole sono state lasciate per almeno 24 ore in contatto per permettere la filtrazione e l'accumulo delle particelle virali all'interno delle loro ghiandole digestive. Dopo un giorno si è proceduto al recupero delle vongole eliminando quelle con le valve rotte o visibilmente morte. Le vongole rimaste sono state divise equamente in 5 contenitori di plastica per alimenti in cui sono stati aggiunti 120 ml di soluzione sterile al 2,5 % di sale per permettere la sopravvivenza dei molluschi fino al momento del trattamento HHP. I sacchetti sono stati chiusi col calore e posti in un altro sacchetto per evitare il più possibile la perdita di liquido. A questo punto i sacchetti sono stati trasportati refrigerati alla SSICA dove il secondo sacchetto è stato chiuso sotto vuoto. Inoltre un segno di riconoscimento riguardante la pressione e il tempo di trattamento è stato posto su ogni sacchetto per permettere un riconoscimento dopo il trattamento. Uno dei sacchetti, classificato come "controllo positivo", non ha subito il trattamento. Infine un campione dell'acqua in cui erano state contaminate le vongole è stato prelevato per ogni prova per stimare la carica virale dell'acqua.

#### Trattamento con le alte pressioni idrostatiche

Alla SSICA i trattamenti pressori sono stati effettuati con la macchina Quintus Food Press 6000. A differenza del "campione positivo" che non è stato trattato, gli altri quattro sacchetti sono stati sottoposti a tempi di trattamento di 1, 3, 5 e 7 minuti per una data pressione. In pratica per ogni lotto di vongole da un chilo, quattro sacchetti venivano trattati per i tempi menzionati mantenendo però invariata la pressione del trattamento. Le pressioni scelte sono state 300, 400, 500 e 600 MPa e la temperatura iniziale del fluido nella camera era mantenuto vicino alla temperatura ambiente. Una volta che la pressione veniva applicata la temperatura iniziava a salire con un andamento di circa 3 °C ogni 100 MPa di pressione. Il massimo di temperatura registrato durante i trattamenti è stato di 35 °C. In tutto sono state eseguite 3 prove per ogni pressione.

#### Analisi dei campioni e determinazione del titolo virale

I sacchetti contenenti i campioni sono stati riportati in dipartimento alla sezione di Igiene e opportunamente aperti in condizioni di sterilità. Per ogni campione trattato è stato allestito un becher in cui sono state messe le ghiandole digestive delle vongole sguosciate. Essendo gli organi in cui questi molluschi vanno ad accumulare quello che filtrano nell'acqua, è ovvio che in queste ghiandole si andranno a ritrovare le particelle virali; per questo motivo si è deciso di

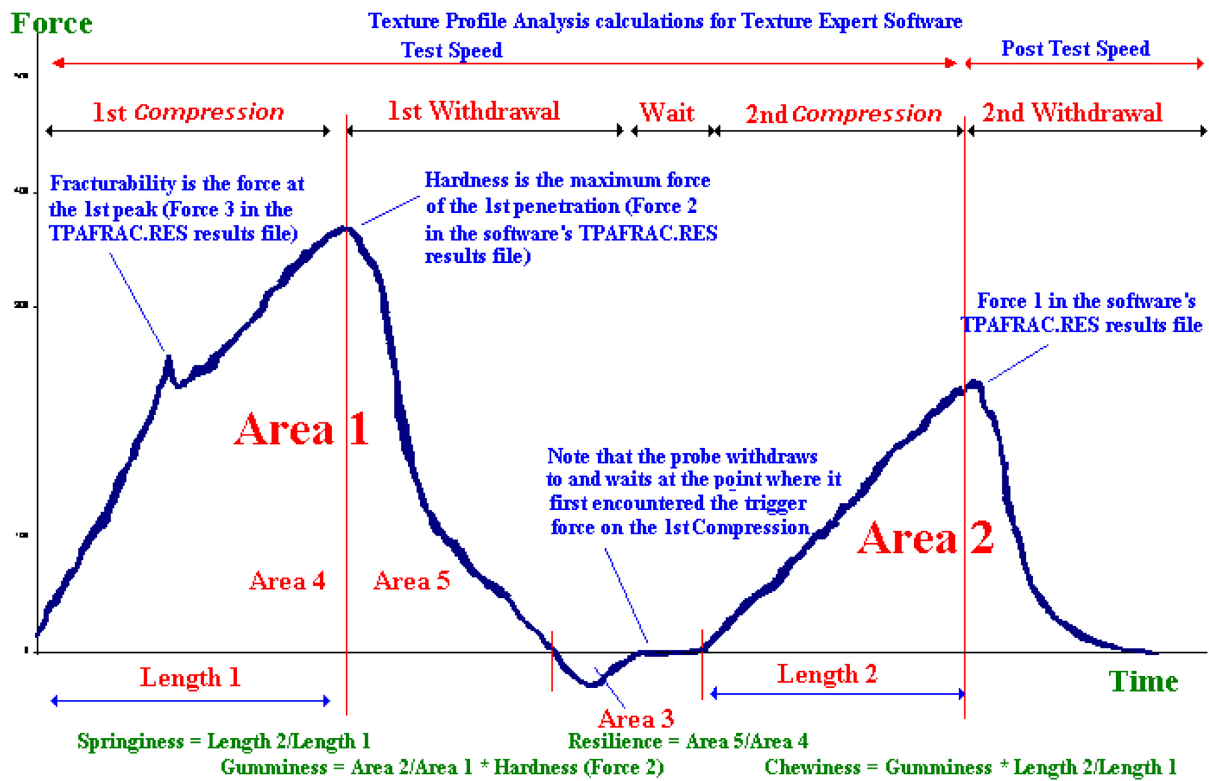
analizzare solo questa parte del mitile. Una volta recuperate tutte le ghiandole di un campione si è proceduto all'omogeneizzazione delle stesse. Si è quindi applicato il protocollo della proteinasi K con le modalità precedentemente descritte e al termine di questa metodica si è provveduto alla determinazione del titolo virale di tutti i campioni trattati e non, calcolandolo secondo il metodo di Reed-Muench.

#### Analisi della texture

L'analisi della texture è stata eseguita su campioni non contaminati ma preparati allo stesso modo di quelli col virus. Le vongole sono state lasciate nell'acquario all'incirca per lo stesso periodo di tempo e, una volta recuperate, sono state divise in cinque sacchetti di cui uno non ha subito il trattamento pressorio ed è stato denominato "non trattato". Gli altri quattro sono stati trattati a due a due per tempi di 3 e 7 minuti, mantenendo invariata la pressione. Per quanto riguarda le pressioni applicate, sono state le stesse delle prove con campioni contaminati. Si è scelto di analizzare gli effetti di un tempo intermedio e del tempo massimo di trattamento anche per avere un maggior numero di osservazioni per ogni tempo considerato.

Le vongole sono state analizzate usando il texture analyser TA-XT2i® usando un test TPA (Texture Profile Analysis) che consiste nell'applicazione di una doppia compressione sull'alimento per simulare la masticazione. Il corpo della vongola è sottoposto ad uno stress meccanico con una sonda cilindrica (P/35 DIA CYLINDER ALUMINIUM) fino al raggiungimento di una deformazione del 40%. E' stata applicata una forza di 0,05 N per 3 secondi con una velocità di 2 mm/s. I parametri considerati sono stati: durezza (forza necessaria per comprimere un alimento tra i molari), gommosità (energia necessaria per disintegrare un alimento semisolido fino a che è pronto per essere deglutito), elasticità (quanto un alimento ritorna alla sua forma originale quando la forza è rimossa) e coesività (forze interne all'alimento). In pratica prendendo come esempio il grafico di un test TPA in figura 6, la durezza è il picco del primo ciclo di compressione; l'elasticità è il rapporto tra il tempo che ci vuole dall'inizio della seconda compressione per arrivare al picco di forza e il tempo dall'inizio della prima compressione per arrivare al picco; la coesività è il rapporto tra l'area della forza positiva della seconda compressione fratto l'area della forza della prima compressione; la gommosità non è altro che la durezza per la coesività.

**Figura 6** Grafico di un test TPA.



Analisi statistica

I dati recuperati dai grafici ottenuti tramite il software del texture analyser sono stati inseriti nel software statistico SPSS. Per ogni parametro il risultato dei campioni non trattati è stato paragonato a quello dei campioni trattati per 3 e 7 minuti con un test ANOVA univariata con analisi Post-hoc LSD.

### 3.3 – Analisi del titolo virale

#### 3.3.1 – Metodo di Reed-Muench

Il titolo virale di una sospensione virale è stato calcolato, per il Calicivirus felino e il virus Coxsackie B5, secondo il metodo di Reed-Muench descritto di seguito. Dalla soluzione virale di partenza vengono allestite diluizioni scalari in base 10, questo viene fatto prelevando 0,5ml della soluzione da diluire che viene messa in un tubo con all'interno 4,5 ml del terreno liquido (nel caso di FCV il terreno è MEM mentre per il Coxsackie B5 si tratta di Eagle). Nel frattempo vengono preparate delle piastra da 96 pozzetti per l'analisi in micrometodica. In ogni pozzetto vengono messi in ordine: 25 µl di terreno di crescita, 25 µl di una diluizione e infine 50 µl di una sospensione contenente la coltura cellulare. Inoltre vengono seminate in questo modo due file, da otto pozzetti ognuna, per ogni diluizione. Le diluizioni vengono

preparate in numero tale che una volta seminate sia possibile ottenere dei pozzetti in cui non si nota la replicazione del virus. Le piastrine vengono, quindi, incubate a 37 °C in atmosfera modificata al 5% di CO<sub>2</sub> e dopo 6 giorni si valuta la presenza dell'effetto citopatico indotta dalla replicazione virale.

Questo effetto citopatico, visibile al microscopio come una cellula rotondeggiante e traslucida, altro non è se non lo scoppio della cellula con conseguente rilascio di particelle virali che si sono replicate al suo interno. Per ogni diluizione seminata vengono quindi calcolati i pozzetti positivi, cioè quelli che presentano questo effetto.

Il metodo di Reed-Muench è un'analisi del punto in cui si hanno il 50% delle colture cellulari infette. In pratica implica la determinazione della diluizione che produce il 50% di infezione dei pozzetti. Si calcola un indice con la formula fornita da Reed-Muench e mostrata di seguito

$$Index = \frac{A - 50}{A - B}$$

dove A è il valore della percentuale di pozzetti infetti immediatamente superiore al 50% e B è il valore della percentuale di pozzetti infetti immediatamente inferiore al 50%.

L'indice sommato al valore assoluto della diluizione che ha causato il grado di infezione immediatamente al di sopra del 50% è un valore che messo all'esponente di 10 da come risultato il TCID<sub>50</sub> (Dose infettante il 50% delle colture cellulari) in 25 µl. Questo valore viene moltiplicato per quattro per ottenere il TCID<sub>50</sub> riferito a 100 µl che è il volume totale di un pozzetto. Infine si esprime il risultato come logaritmo del TCID<sub>50</sub>.

### 3.3.2 – Analisi mediante real-time PCR

I campioni di Norovirus non si replicano in coltura, per questo motivo non si può analizzare il loro titolo tramite il metodo appena descritto ma è necessario utilizzare delle tecniche di biologia molecolare. La real-time PCR permette di ottenere risultati in poco tempo e se si dispone di una retta di calibratura dello strumento si può anche avere informazioni quantitative su un campione.

I campioni di NoV sono stati analizzati partendo dall'estrazione dell'RNA effettuata con il kit commerciale Nucleo Spin RNAII attenendosi al protocollo fornito dal produttore (tabella 2).

**Tabella 2** Fasi del protocollo di estrazione.

| <b>STEP</b>                   | <b>REAGENTI</b>                     | <b>QUANTITA'</b>           | <b>PROCEDIMENTO</b>   |
|-------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|---|
| <b>Lisi</b>                   | RA1<br>β-mercaptoetanol<br>campione | 350 µl<br>3,5 µl<br>150 µl | Mettere i reagenti in una eppendorf da 1,5 ml e vortexare.  |
| <b>Legame dell'RNA</b>        | Etanolo 70%                         | 350 µl                     | Aggiungere l'etanolo e vortexare. Si possono formare precipitati.   |
| <b>Trasferimento campione</b> | Campione                            | 700 µl                     | Raccogliere tutto il campione nelle colonnine blu. Centrifugare a 8000rpm per 1' (8000g per 30 sec).                    |
| <b>Rimozione dei sali</b>     | Buffer MDB                          | 350 µl                     | Sostituire la provetta di raccolta e aggiungere il reagente. Centrifugare a 13000rpm per 1' (11000g per 1').            |
| <b>Digestione del DNA</b>     | DNAsi I diluita                     | 95 µl                      | Sostituire la provetta di raccolta, sotto la colonnina, ed incubare a temperatura ambiente per 15'.                     |
| <b>1° lavaggio</b>            | RA2                                 | 200 µl                     | RA2 serve per inattivare la DNAsi. Centrifugare a 8000rpm per 1' (8000g per 30 sec).                                    |
| <b>2° lavaggio</b>            | RA3                                 | 600 µl                     | Cambiare la provetta di raccolta e aggiungere il reagente. Centrifugare a 8000rpm per 1'.                               |
| <b>3° lavaggio</b>            | RA3                                 | 250 µl                     | Svuotare la provetta di raccolta e riutilizzarla. Centrifugare a 13000rpm per 2' (11000g per 2').                       |
| <b>Eluizione dell'RNA</b>     | H <sub>2</sub> O<br>RNase-free      | 50 µl                      | Sostituire la provetta di raccolta con una eppendorf sterile da 1,5 ml. Centrifugare a 13000rpm per 1' (11000g per 1'). |

Gli acidi nucleici sono stati in seguito retrotrascritti in cDNA usando i reagenti e il profilo termico nelle tabelle 3 e 4.

**Tabella 3** Reagenti usati per la retrotrascrizione.

| <b>Reagenti<br/>(conc. iniziale)</b>  | <b>Concentrazione<br/>finale</b> | <b>Quantità per<br/>campione</b> |
|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| dNTPs (10mM)                          | 4mM                              | 8µl                              |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM)              | 5mM                              | 4µl                              |
| Buffer PCR (10X)                      | 1X                               | 2µl                              |
| Esameri random<br>(50µM)              | 2,5µM                            | 1µl                              |
| Inibitore delle RNAsi<br>(20U/µl)     | 1U/µl                            | 1µl                              |
| MuLV reverso<br>trascrittasi (50U/µl) | 2,5U/µl                          | 1µl                              |
| RNA                                   |                                  | 3µl                              |

**Tabella 4** Profilo termico della retrotrascrizione.

| <b>Fase</b>       | <b>Temperatura</b> | <b>Tempo</b> | <b>Cicli</b> |
|-------------------|--------------------|--------------|--------------|
| Retrotrascrizione | 42 °C              | 60 min       | 1            |
| Denaturazione     | 94 °C              | 5 min        | 1            |

Il DNA complementare è stato poi usato come stampo per la reazione di real-time PCR nella quale per ogni tubo, con un volume finale di 20 µl, erano presenti: 10 µl di Power SYBR Green Master mix; 5 µl di primer (Mattison et al. 2011) e 5 µl di cDNA. I primer e il profilo termico di questa reazione sono mostrati nelle tabelle 5 e 6.

**Tabella 5** Sequenze dei primer usati per la real-time PCR.

| <b>Primer</b> | <b>Sequenza</b>             |
|---------------|-----------------------------|
| <b>COG2R</b>  | TCGACGCCATCTTCATTCA         |
| <b>QNIF2d</b> | ATGTTCAAGGTGGATGAGATTCTCTGA |

**Tabella 6** Profilo termico della real-time PCR.

| Fase           | Temperatura | Tempo | Cicli |
|----------------|-------------|-------|-------|
| Denaturazione  | 95 °C       | 5 min | 1     |
| Denaturazione  | 95 °C       | 15 s  | 45    |
| Appaiamento    | 60 °C       | 60 s  | 45    |
| Allungamento   | 72 °C       | 60 s  | 45    |
| Raffreddamento | 40 °C       | 60 s  | 1     |

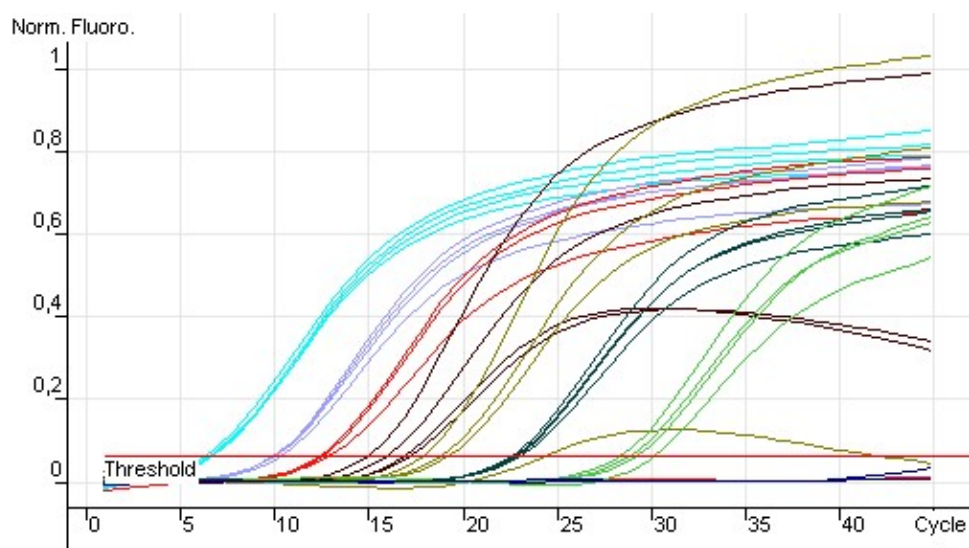
L'amplificazione, rilevamento e analisi dei dati per la real-time PCR sono stati ottenuti con la macchina Rotor Gene 6000 che era stata settata per permettere l'analisi quantitativa grazie alla costruzione di una retta di calibrazione. In generale la determinazione di un campione positivo veniva fatta basandosi sull'analisi della curva di melting. Per ogni prova analizzata veniva inserito un campione positivo per permettere il confronto con le altre curve di melting. Un campione con un picco nella curva uguale a quello del campione di riferimento è stato considerato positivo e si è proceduto a quantificarlo. I campioni risultati positivi sono stati analizzati ulteriormente mediante elettroforesi con un gel di agarosio al 2% per confermare il risultato.

### 3.3.3 – Costruzione della curva di calibrazione

Per la costruzione della curva di calibrazione si è proceduto inizialmente ottenendo un campione altamente concentrato e purificato di segmenti di cDNA bersaglio effettuando una PCR con i primer usati per la real-time. Questo campione è stato analizzato con un Nano-drop 1000 UV, uno spettrofotometro molto sensibile, per ottenere l'esatta quantità di DNA espressa in ng/ $\mu$ l. Dal valore ottenuto è stato calcolato il numero di molecole di DNA per  $\mu$ l. A questo punto sono state allestite delle diluizioni scalari in base 10 partendo dal campione analizzato e arrivando fino al grado massimo di diluizione. Ogni diluizione è stata, quindi, analizzata in quadruplo tramite la macchina per la real-time PCR (figura 7) e il software è stato poi in grado di disegnare la curva di calibrazione che aveva un valore di R di 0,99.



**Figura 7** Curve relative alle diluizioni analizzate per la costruzione della curva standard.



## 4 - Risultati

## 4.1 – Risultati delle prove con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Le prove sono state condotte in camera sterile. Data la grande numerosità delle prove non è stato possibile effettuare prove multiple per tutte le concentrazioni testate, per questo i risultati sono riferiti a singole prove.

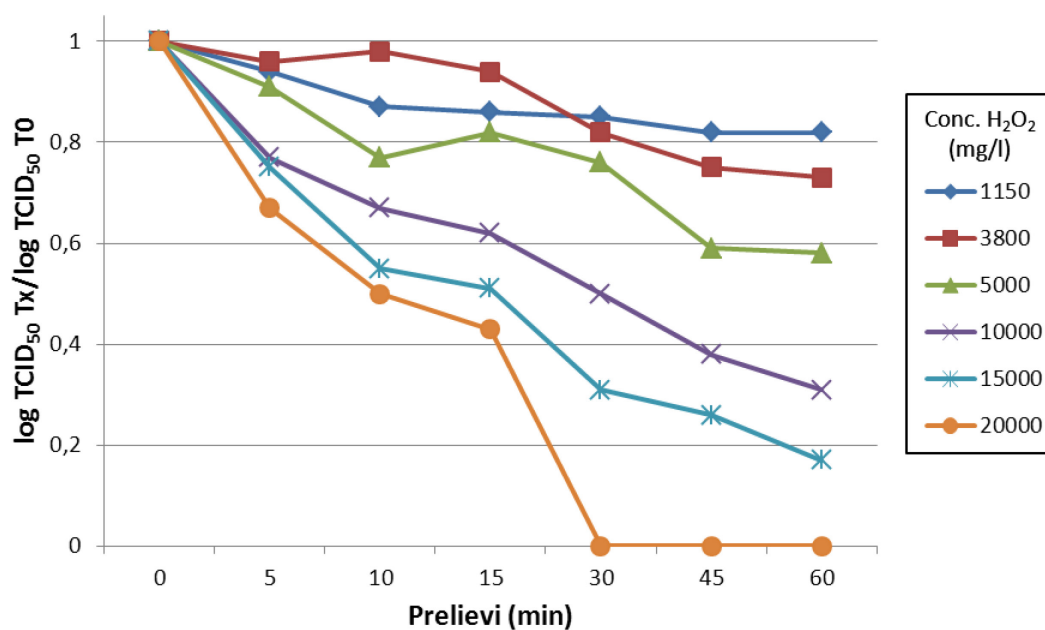
### 4.1.1 – Prove col virus Coxsackie B5

I titoli virali ottenuti per le prove col virus Coxsackie B5 sono mostrati nelle tabelle 7 e 8 mentre nelle figure 8 e 9 sono visualizzati gli andamenti dei titoli virali.

**Tabella 7** Risultati espressi in logTCID<sub>50</sub> per le prove a temperatura ambiente.

| Concentrazione<br>disinfettante (mg/l) | Prelievi (min) |      |      |      |      |      |      |
|--|----------------|------|------|------|------|------|------|
|  | 0              | 5    | 10   | 15   | 30   | 45   | 60   |
| 1150                                   | 4,89           | 4,6  | 4,27 | 4,22 | 4,14 | 4,03 | 4,03 |
| 3800                                   | 4,15           | 3,98 | 4,06 | 3,91 | 3,4  | 3,13 | 3,05 |
| 5000                                   | 5,01           | 4,56 | 3,87 | 4,1  | 3,8  | 2,98 | 2,93 |
| 10000                                  | 4,17           | 3,22 | 2,78 | 2,6  | 2,1  | 1,6  | 1,27 |
| 15000                                  | 4,1            | 3,06 | 2,27 | 2,1  | 1,27 | 1,06 | 0,69 |
| 20000                                  | 4,15           | 2,76 | 2,07 | 1,8  | 0    | 0    | 0    |

**Figura 8** Andamento del titolo virale per le prove a temperatura ambiente.



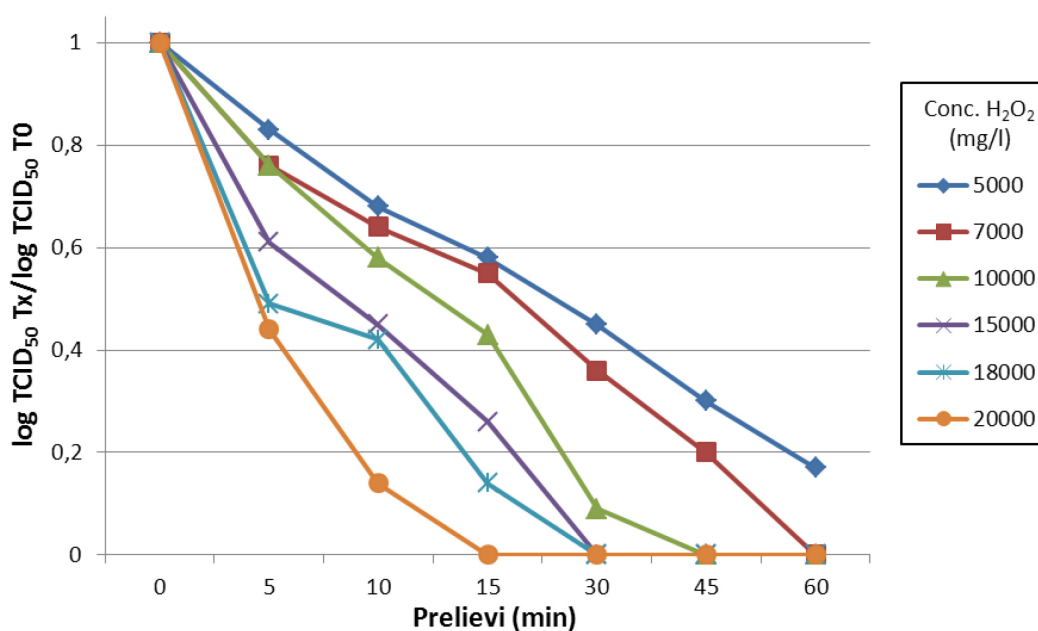
Nei grafici in ascissa è stato posto il rapporto tra il logaritmo del TCID<sub>50</sub> ad un dato tempo con il logaritmo del TCID<sub>50</sub> al tempo 0; in questo modo è stato possibile confrontare tutte le prove effettuate con la stessa temperatura. In ordinata è stato invece posto il tempo, espresso in minuti, riguardante i prelievi effettuati per ogni prova. Ogni linea, quindi, mostra l'andamento di una prova ad una concentrazione specifica di disinfettante mentre i punti coincidono con i valori del titolo virale ad ogni prelievo.

Come si può notare dal grafico riguardante le prove a temperatura ambiente, si nota che l'unica prova per cui è stato possibile ottenere una inattivazione totale del titolo virale è stata quella con una concentrazione di disinfettante di 20000 mg/l, pari a una soluzione al 2% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Inoltre si può vedere che alla concentrazione di 3800 mg/l i risultati ottenuti non sono stati in linea con gli altri forse a causa di qualche errore nell'effettuare i prelievi.

**Tabella 8** Valori del logTCID<sub>50</sub> relativo alle prove a 37 °C.

| Concentrazione disinfettante (mg/l) | Prelievi (min) |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------------------|----------------|------|------|------|------|------|------|
|                                     | 0              | 5    | 10   | 15   | 30   | 45   | 60   |
| 5000                                | 3,96           | 3,27 | 2,71 | 2,31 | 1,78 | 1,16 | 0,67 |
| 7000                                | 4,06           | 3,1  | 2,6  | 2,22 | 1,45 | 0,81 | 0    |
| 10000                               | 3,63           | 2,76 | 2,11 | 1,55 | 0,34 | 0    | 0    |
| 15000                               | 3,55           | 2,17 | 1,6  | 0,94 | 0    | 0    | 0    |
| 18000                               | 4,66           | 2,26 | 1,95 | 0,67 | 0    | 0    | 0    |
| 20000                               | 4,82           | 2,14 | 0,69 | 0    | 0    | 0    | 0    |

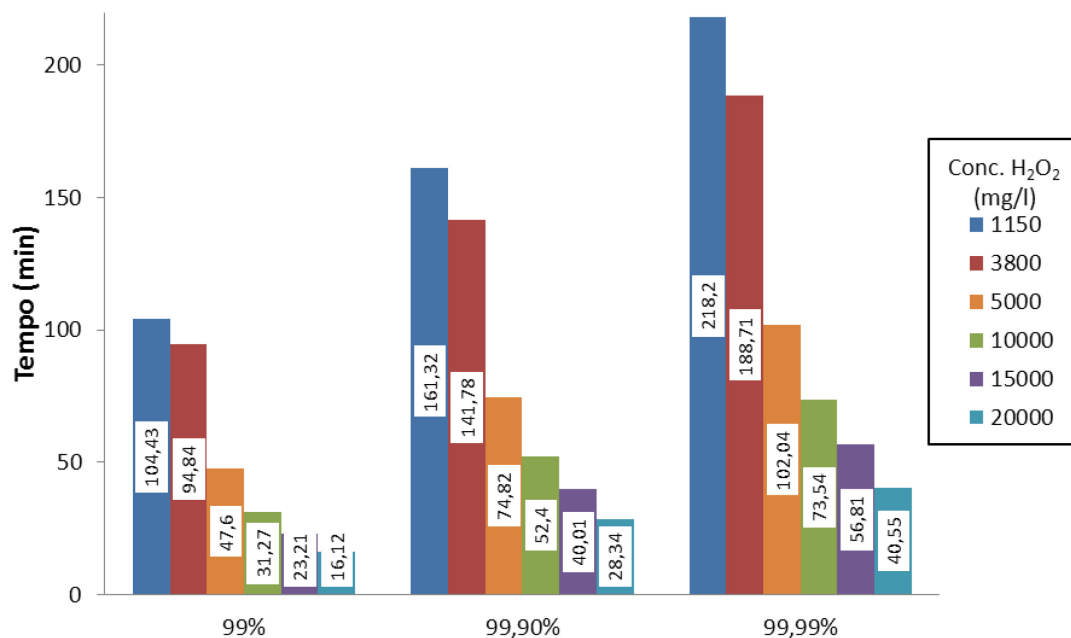
**Figura 9** Andamento del titolo virale per le prove a 37 °C.



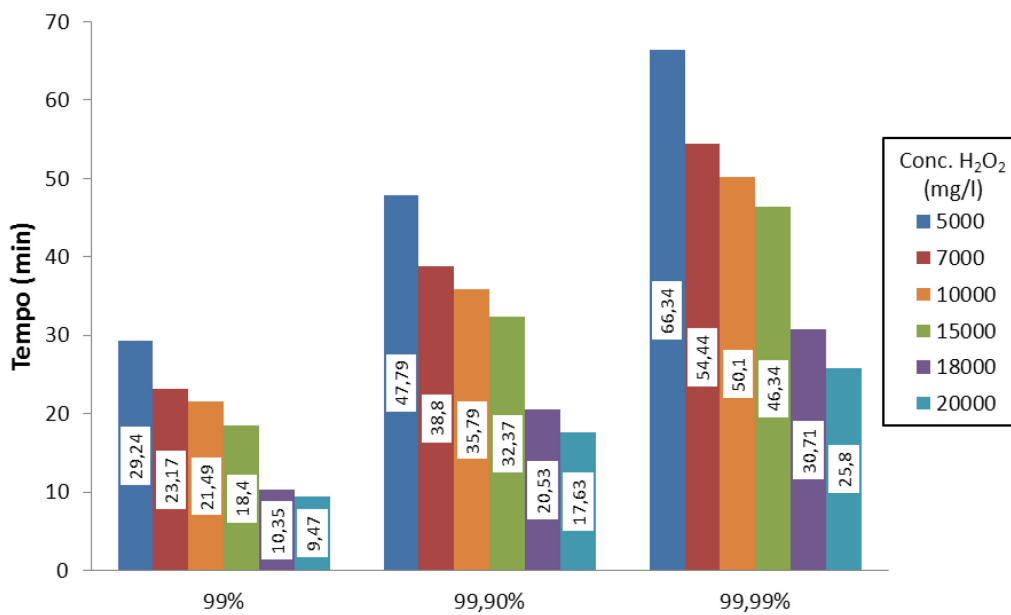
L'andamento delle prove effettuate a 37 °C è decisamente più rapido in quanto si ottiene una inattivazione più veloce del virus, infatti alla concentrazione di 20000 mg/l il tempo necessario per l'inattivazione è di 15 minuti. Inoltre si ottiene la riduzione totale del titolo virale anche per le concentrazioni minori. L'unica prova in cui non è stato possibile ottenere l'eliminazione di tutte le particelle virali è stata quella alla concentrazione di 5000 mg/l che in ogni caso dopo 60 minuti ha causato una riduzione di più dell'80% del titolo virale di partenza.

Sono stati, poi, calcolati i tempi medi per ottenere una inattivazione di 2, 3 e 4 unità logaritmiche e i risultati sono riportati nelle figure 10 e 11. Nei grafici sull'asse delle y si ritrovano i tempi espressi in minuti mentre sull'asse x ci sono le tre percentuali di riduzione del titolo virale considerate. Ogni rettangolo colorato rappresenta il tempo che ci vuole per ottenere una inattivazione di una certa percentuale del titolo virale alla concentrazione di disinfettante data. Si notano in generale dei tempi maggiori per le prove a temperatura ambiente rispetto a quelle a 37 °C ed un aumento dei tempi per gradi di inattivazione maggiori.

**Figura 10** Tempi medi di inattivazione per le prove a temperatura ambiente.



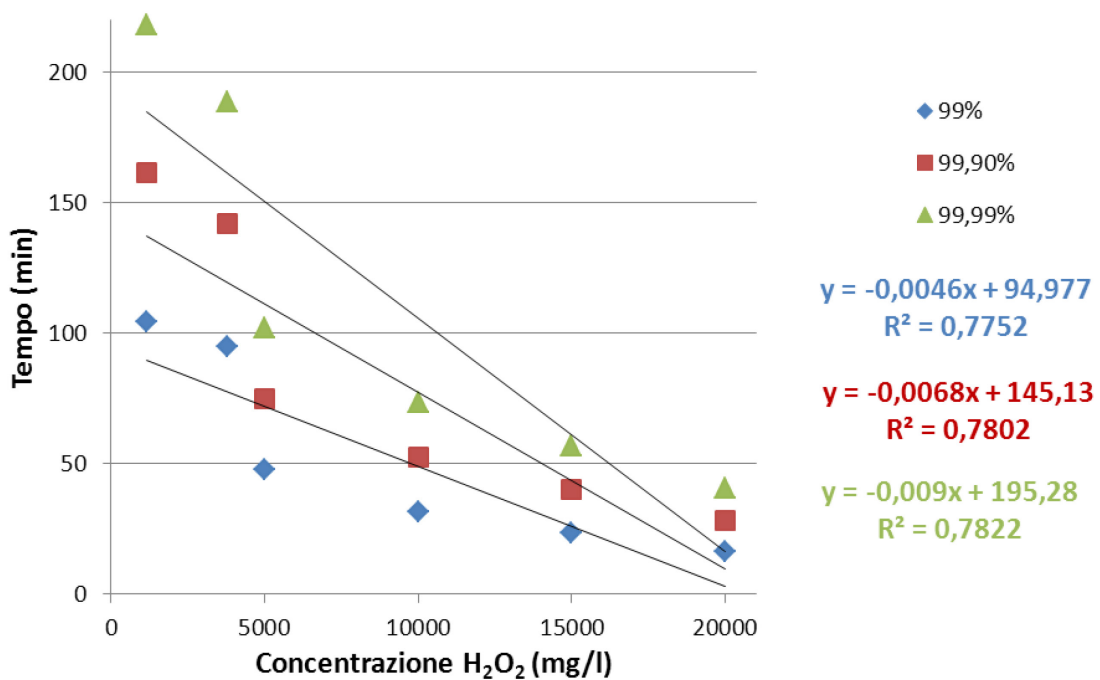
**Figura 11** Tempi medi di inattivazione per le prove a 37 °C.



Se alla concentrazione di disinfettante maggiore testata (20000 mg/l) per una riduzione del titolo del 99% sono necessari 16,12 minuti a temperatura ambiente, a 37 °C ne bastano 9,47 mentre per riduzioni del 99,99% i tempi sono rispettivamente di 40,55 e 25,8 minuti.

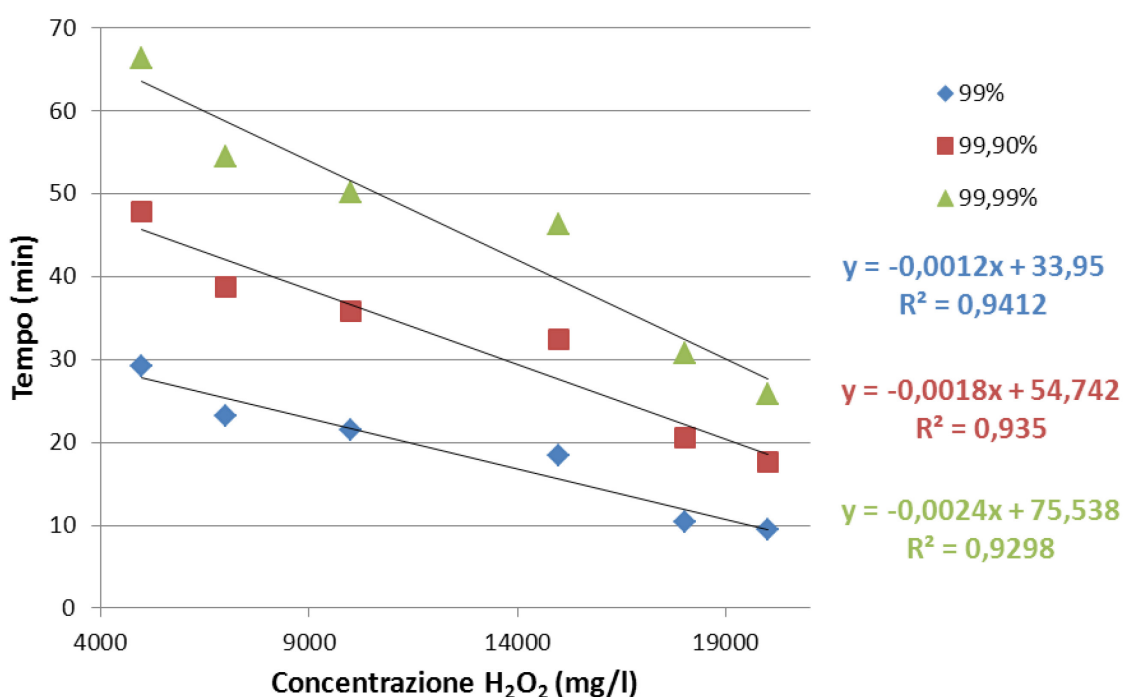
Infine con i dati raccolti è stato possibile costruire le rette di regressione per le percentuali di inattivazione del 99%, 99,9% e 99,99% che sono mostrate nelle figure 12 e 13.

**Figura 12** Rette di regressione per le prove a temperatura ambiente.



Gli assi hanno le stesse unità di misura dei precedenti grafici dei tempi medi, essendo stati creati a partire da quei dati. Inoltre sono state visualizzate le equazioni che descrivono le tre rette di regressione con i colori relativi alle rette a cui fanno riferimento.

**Figura 13** Rette di regressione per le prove a 37 °C.



#### 4.1.2 – Prove con il Calicivirus felino ceppo F9

Così come per il virus Coxsackie B5 anche in questo caso i risultati delle prove, espressi come logaritmo del TCID<sub>50</sub> e presentati nelle tabelle 9 e 10, sono stati normalizzati prima di essere messi in grafico. L'andamento dei titoli virali è visualizzato nelle figure 14 e 15. Le unità di misura sono le stesse usate per i corrispettivi grafici del virus Coxsackie.

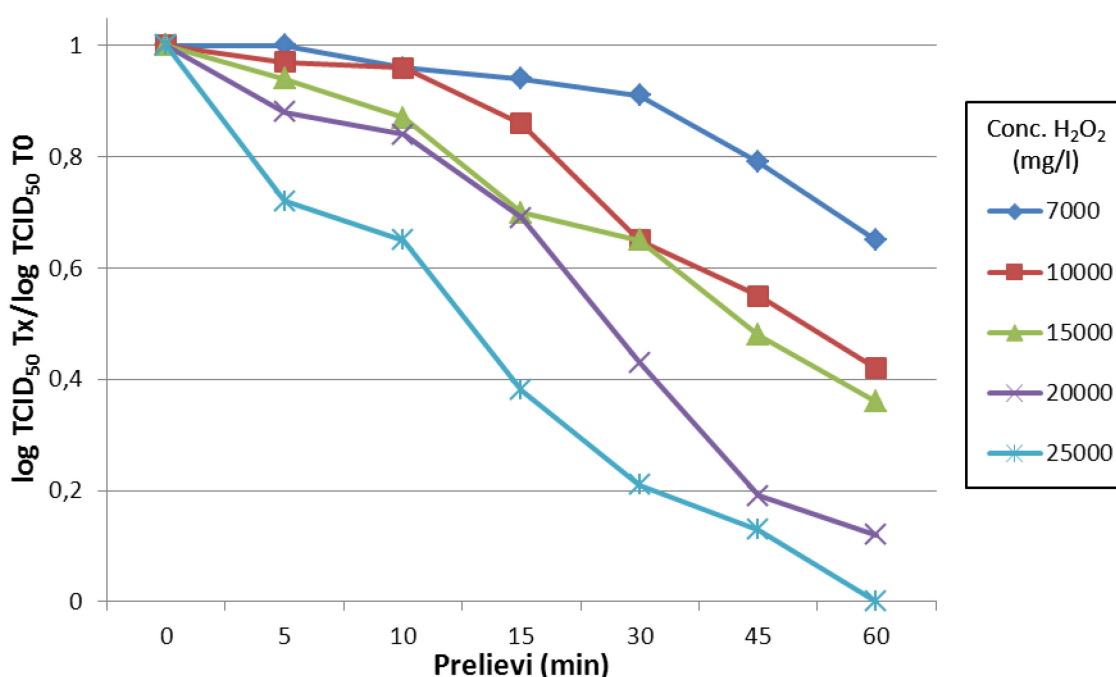
Dalla tabella 9 si vede come a concentrazioni basse di disinfettante non si ha una riduzione apprezzabile del titolo virale, alla concentrazione di 7000 mg/l non si arriva neanche al 40% di inattivazione della carica virale di partenza.

Dal grafico emerge che a temperatura ambiente solo per concentrazioni di disinfettante superiori a 20000 mg/l si ottengono delle riduzioni del titolo particolarmente significative e solo con 25000 mg/l dopo 60 minuti è stato possibile ottenere un'inattivazione totale del virus.

**Tabella 9** Valori del logTCID<sub>50</sub> per i diversi prelievi delle prove a temperatura ambiente.

| Concentrazione<br>disinfettante (mg/l) | Prelievi (min) |      |      |      |      |      |      |
|--|----------------|------|------|------|------|------|------|
|  | 0              | 5    | 10   | 15   | 30   | 45   | 60   |
| <b>7000</b>                            | 5,4            | 5,4  | 5,2  | 5,05 | 4,94 | 4,27 | 3,5  |
| <b>10000</b>                           | 5,33           | 5,17 | 5,14 | 4,6  | 3,49 | 2,91 | 2,22 |
| <b>15000</b>                           | 5,86           | 5,49 | 5,1  | 4,1  | 3,8  | 2,8  | 2,1  |
| <b>20000</b>                           | 5,8            | 5,1  | 4,87 | 3,99 | 2,48 | 1,1  | 0,71 |
| <b>25000</b>                           | 5,96           | 4,27 | 3,89 | 2,29 | 1,23 | 0,78 | 0    |

**Figura 14** Trend dei titoli virali per le prove a temperatura ambiente.



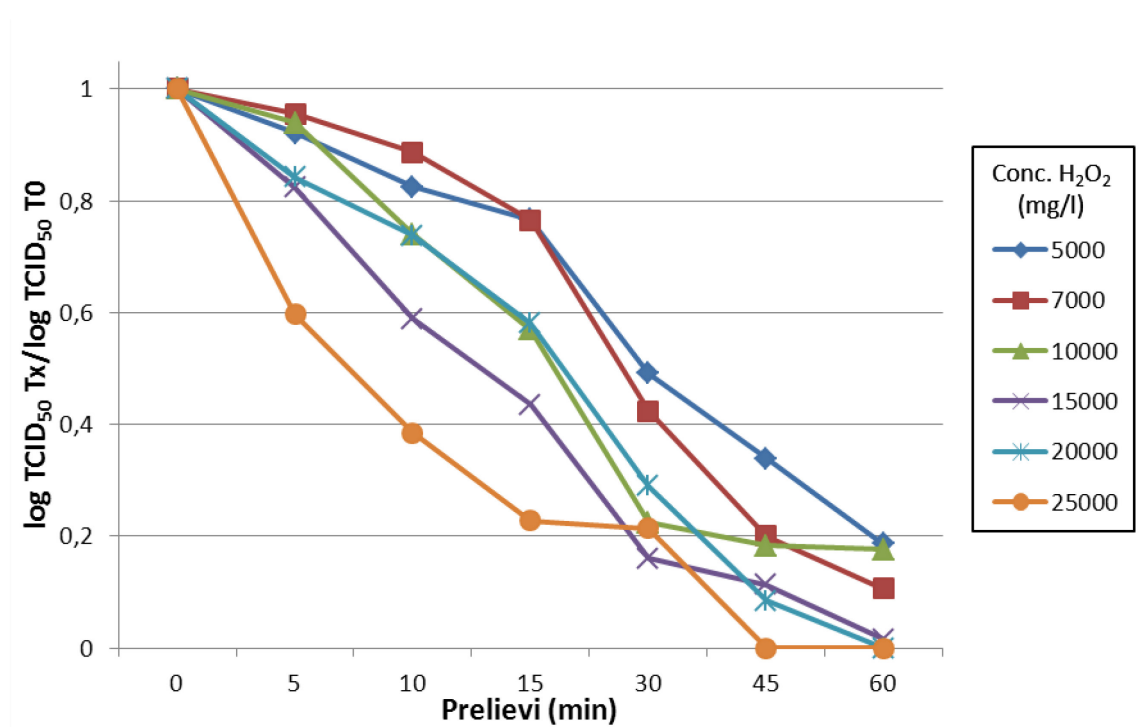
A 37 °C, come già notato in precedenza con il virus Coxsackie B5, l'inattivazione avviene più velocemente che a temperatura ambiente ma, diversamente da quanto avvenuto per l'altro virus, in questo caso solo le due concentrazioni maggiori testate hanno dato una riduzione del 100% della carica virale. Si può notare che per la prova effettuata alla concentrazione di disinfettante di 20000 mg/l si ha una riduzione del titolo virale minore rispetto a quello ottenuto per la prova a 15000 mg/l pur partendo da due titoli virali piuttosto simili. Questo è spiegabile solo ammettendo qualche errore nell'effettuare i prelievi visto che non è documentata una particolare resistenza del virus solo a queste concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Tabella 10** Titoli virali espressi in logTCID<sub>50</sub> per le prove a 37 °C.

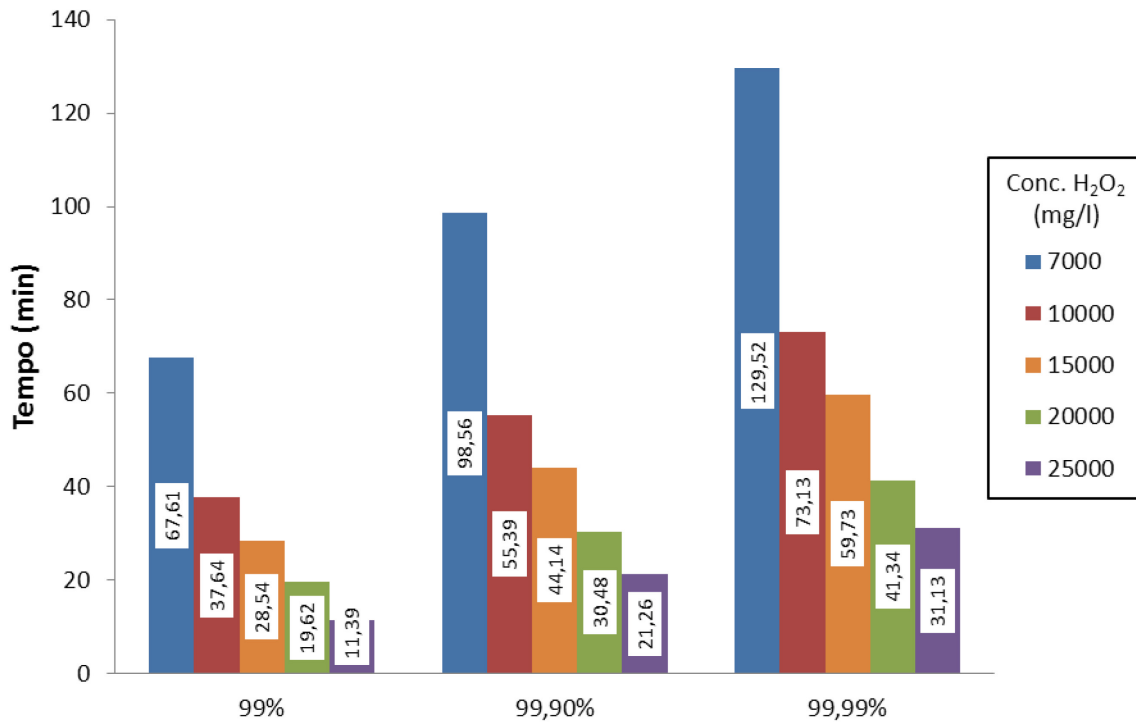
| Concentrazione<br>disinfettante (mg/l) | Prelievi (min) |      |      |      |      |      |      |
|--|----------------|------|------|------|------|------|------|
|  | 0              | 5    | 10   | 15   | 30   | 45   | 60   |
| <b>5000</b>                            | 5,54           | 5,10 | 4,57 | 4,25 | 2,72 | 1,88 | 1,03 |
| <b>7000</b>                            | 5,66           | 5,41 | 5,02 | 4,33 | 2,4  | 1,14 | 0,6  |
| <b>10000</b>                           | 5,85           | 5,49 | 4,33 | 3,33 | 1,31 | 1,07 | 1,03 |
| <b>15000</b>                           | 5,33           | 4,39 | 3,14 | 2,32 | 0,85 | 0,6  | 0,09 |
| <b>20000</b>                           | 5,18           | 4,36 | 3,82 | 3,01 | 1,5  | 0,44 | 0    |
| <b>25000</b>                           | 5,14           | 3,07 | 1,98 | 1,17 | 1,1  | 0    | 0    |

**Figura 15** Trend dei titoli virali per le prove a 37 °C.

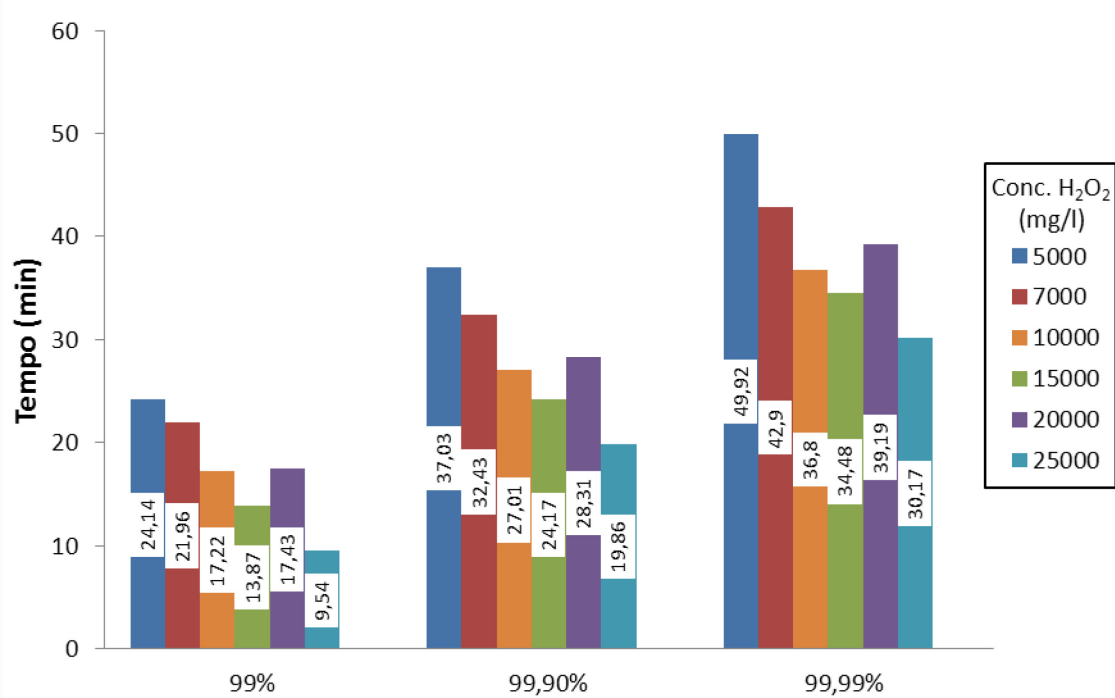


Il trend visto per i titoli virali è presente anche osservando i tempi medi di inattivazione. Anche in questo caso per le prove a 37 °C si notano tempi inferiori a quelli a temperatura ambiente per prove alla stessa concentrazione di acqua ossigenata; addirittura la differenza è quasi del doppio per alcune prove. In figura 17 è anche ben visibile come la prova a 20000 mg/l si discosti dall'andamento delle altre prove.

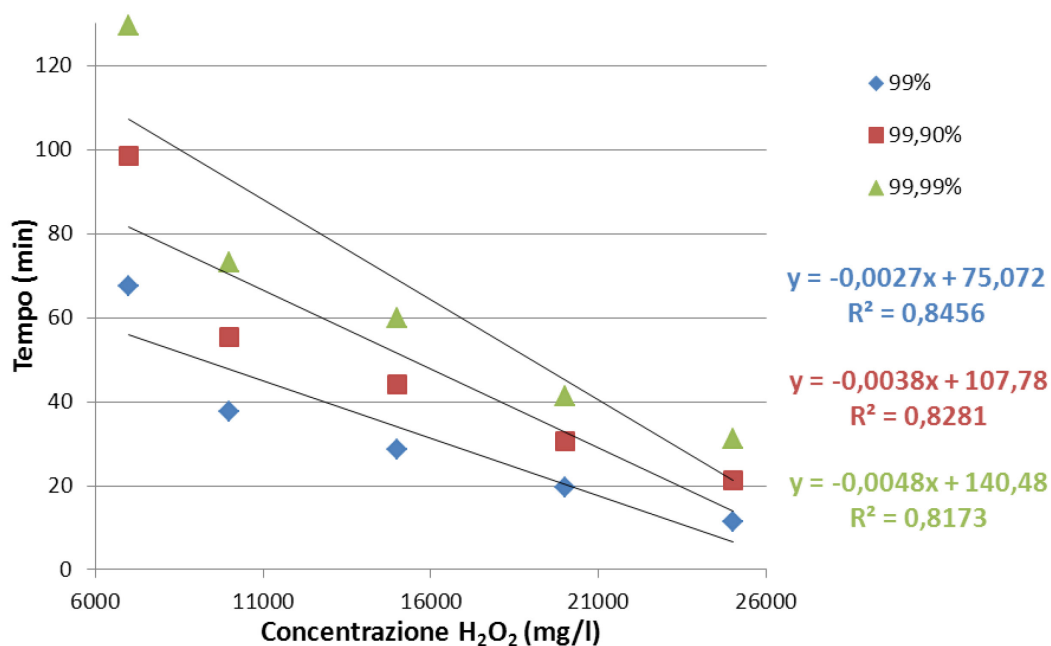
**Figura 16** Tempi medi di inattivazione per le prove a temperatura ambiente.



**Figura 17** Tempi medi di inattivazione per le prove a 37 °C.

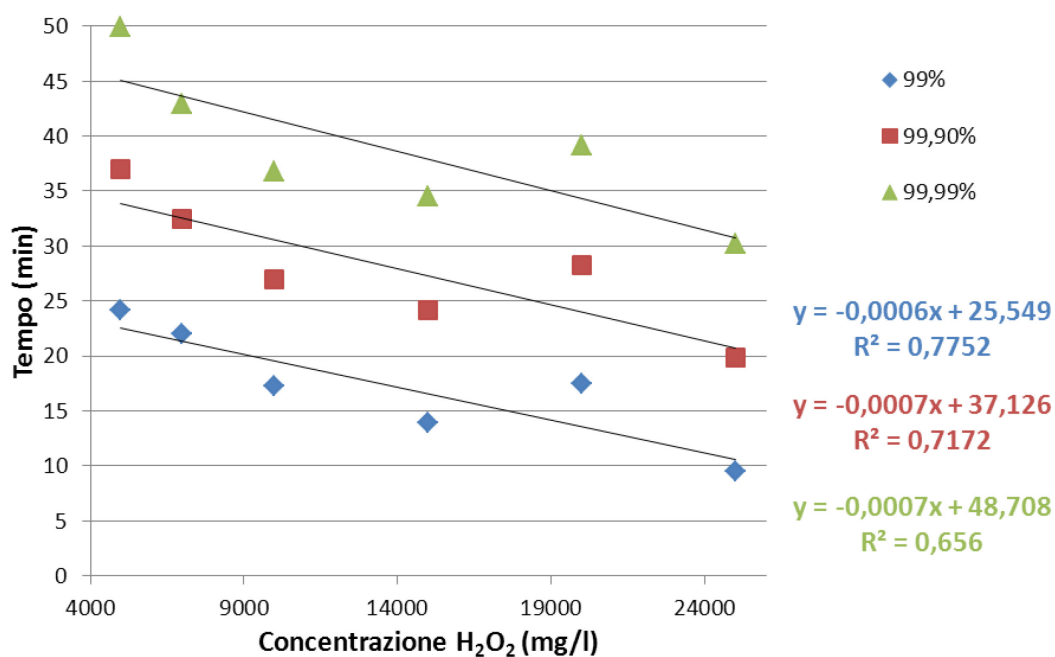


**Figura 18** Rette di regressione per le prove a temperatura ambiente.



Dai dati sui tempi medi sono state ricavate le rette di regressione e, come si può vedere in figura 18, a temperatura ambiente gli  $R^2$  delle rette sono tutti sopra lo 0,8 come ci si poteva aspettare visto l'andamento delle prove. Invece per le prove a 37 °C si notano degli  $R^2$  più bassi dovuti alla prova a 20000 mg/l che tende a portarsi decisamente al di sopra degli altri valori e quindi ad appiattire la retta.

**Figura 19** Rette di regressione per le prove a 37 °C.



#### 4.1.3 – Prove con il Norovirus umano

Per le prove condotte utilizzando il Norovirus umano è stato possibile ottenere dei risultati quantitativi con la real-time PCR che sono stati inseriti in tabella 11. I risultati sono tutti espressi in copie di DNA per  $\mu\text{l}$ . Si vede dai valori che, a parte per la prova a 20000 mg/l, tutte le prove non hanno andamenti decrescenti del titolo ma anzi si nota un andamento piuttosto fluttuante con valori a volte più alti o assenti rispetto ai prelievi a tempi precedenti.

**Tabella 11** Risultati delle prove con Norovirus umano espressi in copie di DNA/ $\mu\text{l}$ .

| Tempo (min) | 10000 mg/l | 15000 mg/l | 17000 mg/l | 20000 mg/l | 25000 mg/l |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0           | 450,3      | n.d.       | 22,18      | 334,8      | 9,76       |
| 5           | 422,7      | 9,563      | 29,14      | 109,7      | n.d.       |
| 10          | 50,46      | 21,16      | n.d.       | 177,1      | 15,81      |
| 15          | 149,0      | 31         | 9,686      | 182,9      | n.d.       |
| 30          | 2,734      | 7,332      | 41,37      | 235,2      | 23,36      |
| 45          | 222,6      | 98,05      | 36,77      | 193,7      | 12,61      |
| 60          | n.d.       | 12,28      | 22,39      | 24,44      | n.d.       |

## 4.2 – Confronto dei protocolli per l’eluizione del virus.

In questa parte della tesi di dottorato mi sono focalizzato sul confronto di una metodica che utilizza la proteinasi K per staccare i virus dalla matrice alimentare, con un’altra che impiega invece il tampone glicina e il PEG<sub>8000</sub>. Le prove sono state svolte in parallelo, cioè applicando i due metodi sullo stesso campione contaminato di partenza, per limitare al massimo la variabilità nei titoli virali in modo che fossero direttamente confrontabili i risultati.

### 4.2.1 – Risultati con il Calicivirus felino

I risultati dei titoli virali di tutti i campioni recuperati durante le prove sono stati calcolati secondo il metodo di Reed-Muench e sono stati espressi come logaritmo del TCID<sub>50</sub>. I dati sono visualizzati in tabella 12.

**Tabella 12** Valori del logTCID<sub>50</sub> dei campioni recuperati durante le prove.

| Campioni              | Minimo | Massimo | Media | Dev. St. (±) |
|-----------------------|--------|---------|-------|--------------|
| Soluzione iniziale    | 3,892  | 5,031   | 4,668 | 0,523        |
| Soluzione di recupero | 1,012  | 2,216   | 1,725 | 0,400        |
| PKpos*                | 0,675  | 1,269   | 0,982 | 0,332        |
| PEGpos <sup>+</sup>   | 2,055  | 3,173   | 2,769 | 0,492        |
| Proteinasi K          | 1,217  | 2,329   | 2,010 | 0,292        |
| PEG <sub>8000</sub>   | 0,602  | 0,875   | 0,706 | 0,080        |

\*PKpos è il valore relativo al campione positivo dopo applicazione del protocollo della proteinasi K.

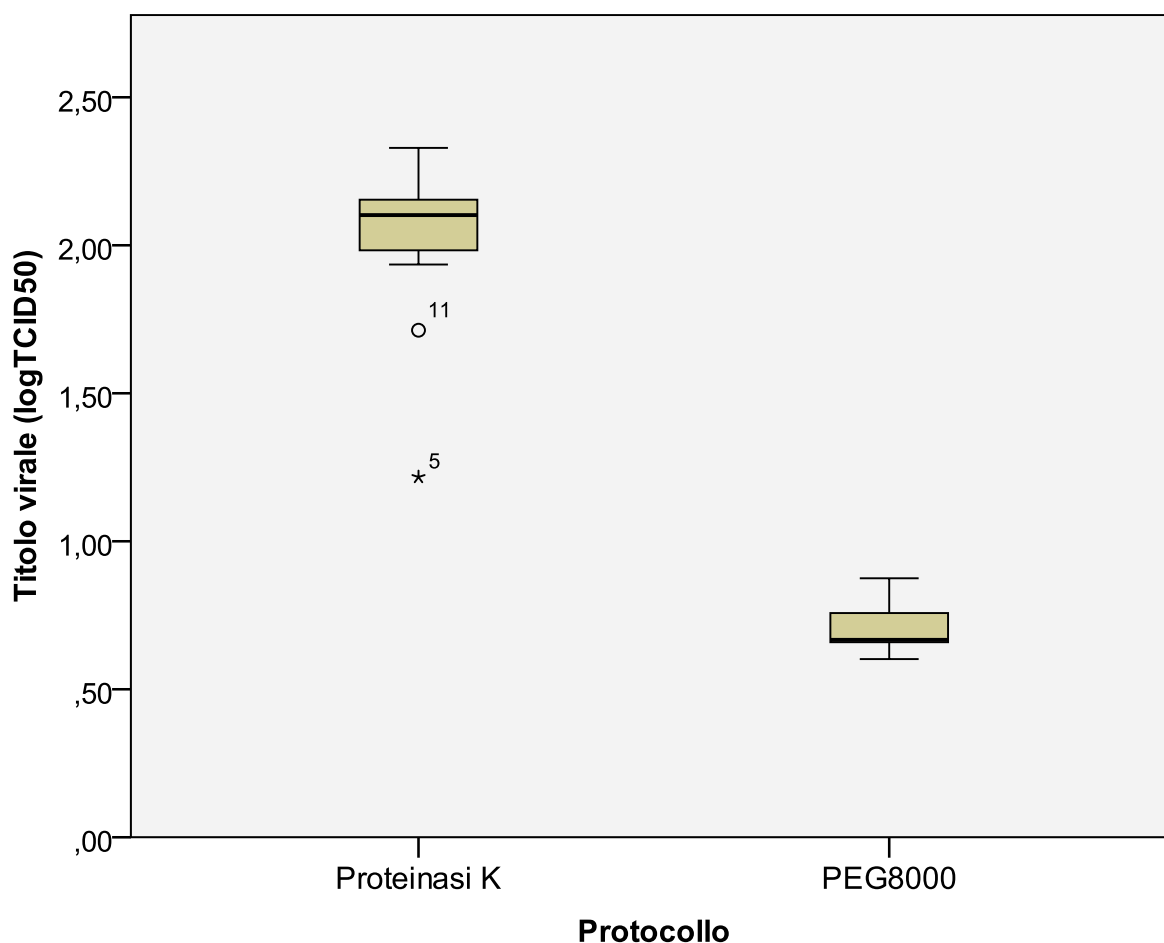
<sup>+</sup>PEGpos è il valore del titolo del campione positivo trattato col protocollo del PEG<sub>8000</sub>.

La soluzione contaminante inizialmente aveva un titolo medio di 4,668 mentre il liquido, recuperato prima dell'omogeneizzazione del campione alimentare, aveva un titolo medio di 1,725. Da questi due valori è possibile stimare all'incirca la quantità di virus rimasta attaccata ai frutti di bosco semplicemente sottraendo al primo valore il secondo; il risultato è 2,943.

A questo punto è interessante soffermarsi a considerare i risultati ottenuti applicando i due protocolli alla matrice alimentare. Come si nota dalla tabella con il protocollo della proteinasi K è stato possibile recuperare in media molto più virus rispetto a quando si è applicato l'altro protocollo, rispettivamente il titolo medio di recupero è stato 2,010 contro 0,706. Un dato molto significativo è fornito poi anche dall'analisi dei titoli effettuata sui campioni analizzati con i due metodi sulla sola soluzione contaminante senza frutti di bosco. In questo caso si nota che è il protocollo del PEG<sub>8000</sub> a recuperare più virus con un titolo medio di 2,769 mentre con la proteinasi K si è ottenuto un titolo medio di 0,982.

I dati riguardanti i titoli medi recuperati con i protocolli dai campioni alimentari contaminati sono stati analizzati anche con il software statistico SPSS con un test t di Student. Dal test è risultato che la differenza nel recupero dei due metodi è statisticamente significativa con un valore di significatività di 0,000. In figura 20 è possibile vedere una rappresentazione grafica dei risultati fatta con il software SPSS. In ascissa è presente il titolo mentre in ordinata sono posti i due protocolli.

**Figura 20** Risultati dei titoli virali dei campioni alimentari visualizzati con box plot.



#### 4.2.2 – Risultati con Norovirus umano

I dati ottenuti con questo virus sono incoraggianti anche se non conclusivi essendo state effettuate poche prove. La concentrazione iniziale era di 176,5 copie per  $\mu\text{l}$ . I risultati sono in tabella 13 e si può notare come ancora una volta il protocollo della proteinasi K abbia ottenuto dei valori maggiori nel recupero delle particelle virali con un valore di 22,73 copie per  $\mu\text{l}$  contro 4,89 per il PEG<sub>8000</sub>. La differenza tra i due valori è di più di 5 volte, inoltre anche per queste prove è stata analizzata la soluzione recuperata prima dell'omogeneizzazione ed è risultato che la concentrazione delle particelle virali rimaste aveva una media di 6,623 copie/ $\mu\text{l}$ .

**Tabella 13** Dati espressi in copie di DNA/ $\mu\text{l}$  per i recuperi con i due protocolli.

| Protocollo          | Minimo | Massimo | Media | Dev. St. ( $\pm$ ) |
|---------------------|--------|---------|-------|--------------------|
| Proteinasi K        | 4,43   | 60,20   | 22,73 | 20,4               |
| PEG <sub>8000</sub> | 1,19   | 8,67    | 4,89  | 2,75               |

## 4.3 – Trattamenti con le alte pressioni idrostatiche

### 4.3.1 – Prove su campioni alimentari contaminati

Le vongole contaminate col Calicivirus felino sono state trattate con le alte pressioni per verificare l'efficacia di tale trattamento nel ridurre la carica virale. I risultati sono mostrati nella tabella 14.

**Tabella 14** Titolo virale in logTCID<sub>50</sub> dei campioni sottoposti a trattamento HHP.

Tra parentesi è visualizzata la deviazione standard.

| Pressione (MPa) | Controllo positivo | 1 min          | 3 min | 5 min | 7 min |
|-----------------|--------------------|----------------|-------|-------|-------|
| 300             | 3.48 (± 0.28)      | 1.13 (± 0.23)  | 0     | 0     | 0     |
| 400             | 3.47 (± 0.31)      | 0.55 (± 0.151) | 0     | 0     | 0     |
| 500             | 3.29 (± 0.1)       | 0              | 0     | 0     | 0     |
| 600             | 3.75 (± 0.43)      | 0              | 0     | 0     | 0     |

Per ogni valore pressorio sono presentati i valori del titolo virale del campione positivo insieme a quelli dei campioni sottoposti ai trattamenti per 1, 3, 5 e 7 minuti. I titoli sono espressi in logTCID<sub>50</sub>. Come descritto precedentemente è stato analizzato il titolo medio del virus rimasto nell'acqua che era di 4,37 mentre come si può notare il campione non trattato aveva un titolo di circa 3,5. Trattamenti di 3 minuti o superiori sono risultati sufficienti per ottenere una inattivazione totale del virus all'interno delle ghiandole digestive dei molluschi mentre per trattamenti di 1 minuto sono stati ottenuti dei risultati positivi alle pressioni di 300 MPa e 400 MPa.

### 4.3.2 – Analisi dei cambiamenti nella texture delle vongole

Oltre all'analisi della capacità di inattivazione del trattamento HHP, sono stati raccolti anche dei dati sui cambiamenti che avvengono a livello della texture delle vongole. In particolare sono stati analizzati quattro lotti di vongole da 1 Kg sottoponendole alle stesse pressioni usate per il trattamento delle vongole contaminate. Tramite il texture analyser è stato possibile ottenere un grafico per ogni vongola analizzata e da questi grafici sono stati estrapolati i valori per i quattro parametri considerati: durezza, elasticità, coesività e gommosità. Per ogni trattamento sono state analizzate una media di 27 vongole e i risultati sono presentati nella tabella 15.

In generale si vede come la durezza subisca un aumento dopo il trattamento, così come la gommosità che dipende direttamente da questo parametro. L'elasticità e la coesività hanno invece una diminuzione di valore in seguito al trattamento pressorio.

**Tabella 15** Valori ottenuti dal test TPA delle vongole trattate e non, alle diverse pressioni.

| <b>Parametri</b>       | <b>Campione</b> | <b>300 MPa</b> | <b>400 MPa</b> | <b>500 MPa</b> | <b>600 MPa</b> |
|------------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Durezza (Kgf)</b>   | Non trattato    | 0,536 ± 0,336  |                |                |                |
|                        | 3min            | 4,927 ± 1,406  | 3,072 ± 1,246  | 2,961 ± 1,514  | 2,807 ± 1,154  |
|                        | 7min            | 8,292 ± 2,929  | 2,994 ± 1,03   | 4,461 ± 2,251  | 3,057 ± 2,902  |
| <b>Elasticità (mm)</b> | Non trattato    | 0,717 ± 0,109  |                |                |                |
|                        | 3min            | 0,386 ± 0,06   | 0,503 ± 0,047  | 0,584 ± 0,051  | 0,567 ± 0,046  |
|                        | 7min            | 0,342 ± 0,046  | 0,537 ± 0,051  | 0,555 ± 0,06   | 0,564 ± 0,051  |
| <b>Coesività</b>       | Non trattato    | 0,463 ± 0,067  |                |                |                |
|                        | 3min            | 0,229 ± 0,03   | 0,268 ± 0,031  | 0,301 ± 0,032  | 0,338 ± 0,048  |
|                        | 7min            | 0,2 ± 0,028    | 0,283 ± 0,036  | 0,3 ± 0,045    | 0,342 ± 0,044  |
| <b>Gommosità (Kgf)</b> | Non trattato    | 0,24 ± 0,133   |                |                |                |
|                        | 3min            | 1,125 ± 0,342  | 0,812 ± 0,309  | 0,862 ± 0,385  | 0,934 ± 0,389  |
|                        | 7min            | 1,626 ± 0,534  | 0,828 ± 0,237  | 1,273 ± 0,57   | 1,002 ± 0,88   |



# 5 - Conclusioni

Il problema dei virus che causano gastroenterite nell'uomo può sembrare di poca importanza a prima vista ma da quello che è stato detto e considerando l'ampio numero di lavori volti alla ricerca di un metodo per limitarne la diffusione, si può capire quanto invece siano pericolosi per la società. I danni causati dai virus come i Norovirus sono in primis legati alla salute ma possono avere forti ripercussioni anche di tipo economico. Va considerato che una contaminazione da Norovirus è di difficile limitazione (nel senso del contagio) ed eliminazione (dagli ambienti e alimenti), per questo quando se ne presentano vanno prese tutte le misure necessarie per limitarne gli effetti nella popolazione. Il costo della sanificazione delle superfici e dell'ospedalizzazione di soggetti a rischio è molto alto, inoltre la perdita di ore di lavoro, unito al fatto che il virus viene rilasciato con le feci fino a 72 ore dopo la risoluzione dei sintomi, comporta un'ulteriore danno economico. Anche la contaminazione degli alimenti può produrre un grosso danno economico e d'immagine per i produttori e distributori del cibo incriminato. Sono importanti anche quei soggetti asintomatici che per il loro lavoro sono portati al contatto con il pubblico o con il cibo, visto che è stato dimostrato che seppure eliminino con le feci quantità minori di virus rispetto ai sintomatici le concentrazioni per grammo di feci sono abbastanza simili.

Purtroppo, mentre risulta possibile effettuare una prevenzione del contagio interumano isolando i soggetti malati, una prevenzione della contaminazione alimentare è quasi impossibile considerato che non si può controllare ogni punto della filiera alimentare. L'unica cosa che si può fare è attenersi il più possibile alle corrette prassi igieniche. Inoltre non esistono ancora dei metodi standardizzati per la ricerca di questi virus in alimenti, cosa che potrebbe portare ad effettuare degli screening degli alimenti a rischio di contaminazione per evitarne la messa in commercio. In ogni caso rimarrebbe sempre il problema dei soggetti asintomatici già menzionati e il problema dell'acqua come veicolo di infezione che da solo comporta un grosso rischio di contaminazione. Negli ultimi anni si è andati alla ricerca di un vaccino contro il Norovirus ma i risultati sono frustrati dall'alta variabilità e ricombinazione dei diversi ceppi del virus per cui servirà ancora del tempo prima di individuare un candidato utile almeno contro un buon numero di genotipi se non di genogruppi.

Il mio lavoro si è andato definendo proprio all'interno di questi problemi, nella ricerca di metodi efficaci per l'inattivazione e l'eliminazione del virus dagli ambienti e dai campioni alimentari oltre che nel rilevamento tempestivo di contaminazioni alimentari con metodiche più recenti.

## 5.1 – Prove con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

I risultati ottenuti dalle prove con il virus Coxsackie B5 hanno messo in evidenza come l'acqua ossigenata agisca meglio a temperature di almeno 37 °C; una osservazione già nota in letteratura. Stessa cosa può dirsi dei risultati col Calicivirus felino. Dai dati si nota che a temperatura ambiente le massime concentrazioni impiegate sono le uniche ad aver ottenuto l'inattivazione totale del virus in soluzione mentre alzando la temperatura a 37 °C la riduzione totale del titolo virale è stata raggiunta anche a concentrazioni di 7000 mg/l per il Coxsackie B5 e 20000 mg/l per il Calicivirus felino (nella prova a 15000 mg/l l'inattivazione è stata del 99,91%).

Per quanto riguarda i tempi medi di inattivazione si può vedere dai grafici un andamento piuttosto omogeneo nella riduzione di tali tempi al crescere della concentrazione di disinfettante. Per quanto riguarda il Coxsackie si era notato che l'andamento dei titoli virali era decisamente inconsueto per la prova a 3800 mg/l a temperatura ambiente ma tale risultato non ha influito in modo così marcato sui tempi medi di inattivazione che per questa prova sono probabilmente più alti di quanto ci si sarebbe potuto aspettare ma ciononostante più contenuti della prova a 1150 mg/l. Un discorso simile lo si può fare per la prova a 20000 mg/l a 37 °C per l'FCV anche se in questo caso i tempi ricavati dall'andamento dei titoli virali ai diversi prelievi sono più alti di quelli delle due prove che lo precedono. Va considerato anche per questi dati che a 37 °C i tempi sono minori che a temperatura ambiente, inoltre il divario va aumentando man mano che ci si sposta nel confronto verso percentuali di inattivazione maggiore.

Infine le rette di regressione rispecchiano quello che è stato appena detto sui tempi di inattivazione, infatti per il Coxsackie B5 a temperatura ambiente dove si aveva la prova con un andamento non in linea con le altre abbiamo degli R<sup>2</sup> piuttosto bassi mentre a 37 °C l'andamento delle rette è più regolare con un R<sup>2</sup> che supera per tutte e tre il valore di 0,9. Per il Calicivirus il discorso è simile in quanto si hanno rette migliori per le prove a temperatura ambiente mentre a 37 °C gli R<sup>2</sup> hanno un valore sotto lo 0,8. E' ovvio che essendo i risultati raccolti finora provenienti da osservazioni singole bisognerà provvedere a effettuare altre prove in modo da avere maggiori informazioni per ogni prova così da evidenziare le possibili anomalie nell'andamento delle prove o da appianare quei dati che si discostano dagli altri. Ciononostante i dati forniscono delle ottime informazioni sulla capacità del perossido di idrogeno di inattivare i virus che possono essere presenti negli ambienti e sulle superfici.

I risultati finora commentati portano anche ad un'altra conclusione. Infatti mettendo a confronto i dati dei due virus si può notare come il Calicivirus felino sia notevolmente più resistente rispetto al Coxsackie B5 in quanto per ottenere un'inattivazione totale del virus sono state sempre necessarie concentrazioni più alte di disinfettante. Questo ci può dare un'idea della differente resistenza che possono avere virus diversi nei confronti dei disinfettanti. Questa stessa differenza di resistenza è presente anche tra FCV e NoV come riportato in letteratura in svariati studi. I risultati delle prove con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NoV lo confermano, infatti non è stato possibile inattivare il virus alle concentrazioni testate anzi si è notato un andamento fluttuante nei titoli virali.

In definitiva il perossido di idrogeno è in grado di produrre un danno ossidativo alle particelle virali. Questo danno avviene per prima cosa a livello del capsido e se il disinfettante non viene bloccato in modo appropriato si può avere anche un danno all'RNA. Probabilmente è successo che alcuni frammenti di RNA sono rimasti intatti dopo il trattamento anche se le particelle virali non erano più intatte e questo è stato sufficiente perché tali campioni venissero rilevati come positivi. Il fatto che i primer per la real-time PCR amplifichino una regione molto piccola di sole 88 basi può aumentare questo problema perché, con bassi tempi di contatto o basse concentrazioni, il disinfettante non ha la possibilità di agire a fondo sui virioni lasciando l'RNA quasi intatto e quindi rilevabile. Inoltre alcune variabili possono influire sull'attività del disinfettante producendo i risultati ottenuti nelle prove col NoV. Questo è il grande problema legato al rilevamento con le sole metodiche molecolari, non si può sapere con esattezza se i risultati positivi ottenuti siano relativi a particelle ancora vitali e infettanti o no. Per eliminare il problema in letteratura si è fatto spesso riferimento all'uso di un enzima chiamato RNAsi A che è in grado di tagliare i filamenti di RNA che sono esposti e non protetti da un capsido integro (Nuanalsuwan e Cliver 2002). Aggiungendo un passaggio con questo enzima dopo il trattamento con il disinfettante fornirà dei risultati più affidabili.

In futuro sarà importante effettuare studi direttamente sul Norovirus per verificare l'effettiva capacità di inattivazione di particolari concentrazioni di disinfettante per ottenere informazioni più precise sui tempi di applicazione. E' naturale che tali studi avranno grossi benefici dalla scoperta di una coltura cellulare in cui tale virus possa essere replicato.

## 5.2 – Confronto tra i protocolli con proteinasi K e PEG<sub>8000</sub>

I dati ottenuti con questi due protocolli nelle prove con il Calicivirus felino sono stati particolarmente interessanti. Sono già stati menzionati i valori del logTCID<sub>50</sub> del recupero per

i due protocolli grazie ai quali è stata calcolata la percentuale di recupero per ognuno che è risultata del 68,297% per il protocollo della proteinasi K e del 23,989% per l'altro metodo. Si nota una differenza di 3 volte tra i due valori; differenza che è risultata statisticamente significativa e quindi ci indica che il protocollo della proteinasi K è migliore nel recupero delle particelle virali e l'accoppiamento con la real-time PCR lo rende anche molto veloce e sensibile. Infatti dal momento dell'omogeneizzazione (primo passo del protocollo per un alimento che arrivi in un laboratorio per essere analizzato) all'ottenimento del risultato passano solo 6 ore in tutto mentre con l'altro metodo bisognerebbe aspettare almeno 3 giorni. Un risultato molto interessante è stato quello ottenuto con l'applicazione dei due metodi sulla soluzione infettante senza matrice alimentare. In questo caso i risultati sono stati ribaltati con il protocollo del PEG<sub>8000</sub> che è stato in grado di recuperare circa 3 volte più virioni rispetto all'altro metodo. Il dato però non risulta così strano se si pensa alle caratteristiche della proteinasi K; infatti quest'enzima agisce sulle strutture proteiche e nell'eliminazione delle contaminazioni da acidi nucleici. Nelle prove con i frutti di bosco la sua azione era rivolta per lo più alle bucce dei frutti e, quindi, al distacco dei virus dalla buccia mentre in assenza di matrice alimentare la sua azione si è abbattuta direttamente sulle particelle virali distruggendo il capsido e impedendo l'infezione delle colture cellulari. Questo dato porta alla considerazione che per diverse matrici c'è la necessità di mettere a punto diversi protocolli di rilevamento che si adattino alle caratteristiche della matrice permettendo il massimo del recupero possibile.

I risultati delle prove con il Norovirus non sono così eclatanti come quelli del Calicivirus felino ma in ogni caso sottolineano la capacità del protocollo della proteinasi K di recuperare maggiori quantità di virus rispetto all'altro metodo. In questo caso un'analisi statistica condotta sui risultati ottenuti non ha fornito un risultato statisticamente significativo, va però ricordata ancora una volta la maggiore velocità di risposta ottenuta col protocollo della proteinasi K per cui quest'ultimo metodo è da preferirsi. Purtroppo le difficoltà nel reperire nuovi campioni di Norovirus non hanno permesso di effettuare ulteriori prove per il momento. Però, in considerazione dell'interesse per il protocollo della proteinasi K in letteratura, si può concludere che questo metodo è un buon candidato per diventare un metodo standardizzato di ricerca dei Norovirus in campioni alimentari e che potrebbe anche essere usato non solo nel verificare una contaminazione a seguito di una epidemia ma anche nello screening di quegli alimenti che sono così spesso fonte di infezioni e causa di epidemie in tutto il mondo.

### 5.3 – Trattamenti HHP

I trattamenti con le alte pressioni idrostatiche sono stati particolarmente efficaci nell'inattivazione delle cariche virali presenti nelle vongole contaminate. Solo per trattamenti di 1 minuto alle pressioni di 300 MPa e 400 MPa non si è ottenuto un abbattimento totale anche se la riduzione del titolo è stata rispettivamente del 68% e dell'80%. L'utilizzo di basse temperature non è stato preso in considerazione in questo studio anche se è stato dimostrato che trattamenti a 400 MPa per 5 minuti a 5 °C sono in grado di abbattere di 4,05 log<sub>10</sub> PFU il titolo virale di ostriche contaminate con Norovirus Murino (MNV-1) (Kingsley et al. 2007).

Un altro studio ha utilizzato MNV-1 per contaminare delle vongole di Manila sottoposte a trattamenti pressori per diversi tempi di contatto e i risultati sono molto simili a quelli ottenuti in questo lavoro, infatti la presenza del virus era stata rilevata anche in quel caso in prove con una pressione inferiore a 500 MPa (Arcangeli et al. 2012). Ad ogni modo MNV-1 era presente nei campioni trattati a 300 MPa e 400 MPa per tutti i tempi testati e anche se questi risultati sembrano in contrasto con quelli ottenuti in questo lavoro bisogna tenere presente che il MNV-1 è considerato più resistente del FCV alla disinfezione e sterilizzazione (Richards 2012).

Insieme all'analisi della riduzione del titolo virale in seguito ai trattamenti pressori, sono stati raccolti dati sui cambiamenti nei parametri della texture delle vongole e sono state valutate anche se ci fossero delle differenze tra i diversi trattamenti con un programma statistico. In generale si è visto che tra il campione non trattato e i diversi trattamenti c'è sempre una differenza statisticamente significativa mentre tra un trattamento e l'altro le cose possono variare in base alla pressione applicata.

Dalla tabella 11 si vede che la durezza tende ad aumentare molto già dopo un trattamento di 3 minuti mentre a 7 minuti si notano ulteriori incrementi solo per trattamenti di 300 MPa e 500 MPa. Alle altre due pressioni il valore di significatività è risultato essere 0,719 e 0,517 rispettivamente per il trattamento a 400 MPa e a 600 MPa. La gommosità, dipendendo dalla durezza, ha lo stesso andamento anche per quanto riguarda le differenze tra i trattamenti a 3 e 7 minuti con una significatività di 0,771 e 0,575 rispettivamente per i trattamenti a 400 MPa e 600 MPa. L'andamento di questi risultati è in linea con quanto riportato in altri studi che hanno preso in considerazione i cambiamenti nei parametri della texture degli alimenti (Chéret et al. 2005, Briones-Labarca et al. 2012).

Per quanto riguarda, invece, l'elasticità e la coesività si osserva una diminuzione dei valori come è logico aspettarsi considerando i cambiamenti che avvengono all'interno del mollusco.

In questo caso però non tra i trattamenti a 3 e a 7 minuti non ci sono in nessun caso differenze statisticamente significative e non si nota nemmeno un picco nei valori del trattamento a 300 MPa, anzi in questo caso sono in generale più bassi rispetto a quelli ottenuti alle altre pressioni che tra di loro tendono a mantenersi stabili.

In questo caso non è stato possibile effettuare prove anche con il Norovirus ma sarebbe davvero di grande interesse valutare la capacità di trattamenti HHP contro tale virus. Gli studi che impiegano il Norovirus murino forniscono già delle interessanti informazioni sulla differenza di resistenza tra MNV-1 e FCV ma per avere dati definitivi sull'efficacia e l'applicabilità di questi trattamenti pressori uno studio diretto degli effetti sul Norovirus umano sarebbero da preferire.

## 6 - Bibliografia



- Adler J.L., Zickl R. (1969): Winter vomiting disease. *J Infect Dis*, **119**, 668-673.
- Alfano-Sobsey E., Sweat D., Hall A., Breedlove F., Rodriguez R., Greene S., Pierce A., Sobsey M., Davies M., Ledford S.L. (2011) Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiol Infect*, **140**, 276-282.
- Allen D.J., Noad R., Samuel D., Gray J.J., Roy P., Iturriza-Gómara M. (2009) Characterisation of a GII-4 norovirus variant-specific surface-exposed site involved in antibody binding. *Virology*, **6**:150.
- Andersen B.M., Rasch M., Hochlin K., Jensen F.-H., Wismar P., Fredriksen J.-E. (2006) Decontamination of rooms, medical equipment and ambulances using an aerosol of hydrogen peroxide disinfectant. *J Hosp Infect*, **62**, 149-155.
- Anilkumar R.K., Shanmugasundaram M., Hoang Q., Kuo M., Chapman L.M., Chen H.H. (2009) Synthesis and application of MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-CH<sub>2</sub>Cl as potent proteinase K inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, **19**, 1296-1300.
- Arcangeli G., Terregino C., De Benedictis P., Zecchin B., Manfrin A., Rossetti E., Magnabosco C., Mancin M., Brutti A. (2012) Effect of high hydrostatic pressure on murine norovirus in Manila clams. *Lett Appl Microbiol*, **54**, 325-329.
- Atmar R.L., Estes M.K. (2006) The epidemiologic and clinical importance of Norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am*, **35**, 275-290.
- Barbut F., Menuet D., Verachten M., Girou E. (2009) Comparison of the efficacy of a hydrogen peroxide dry-mist disinfection system and sodium hypochlorite solution for eradication of *Clostridium difficile* spores. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **30**, 507-514.
- Barker J., Vipond I.B., Bloomfield S.F. (2004) Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect*, **58**, 42-49.
- Barrabeig I., Rovira A., Buesa J., Bartolomé R., Pintó R., Prellezo H., Domínguez À. (2010) Foodborne norovirus outbreak: the role of an asymptomatic food handler. *BMC Infect Dis*, **10**, 269.
- Bayliss C.E., Waites W.M. (1980) The effect of hydrogen peroxide and ultraviolet irradiation on non-sporing bacteria. *J App Bacteriol*, **48**, 417-422.
- Bentley K., Dove B.K., Parks S.R., Walker J.T., Bennett A.M. (2012) Hydrogen peroxide vapour decontamination of surfaces artificially contaminated with norovirus surrogate feline Calicivirus. *J Hosp Infect*, **80**, 116-121.
- Boccia D., Tozzi A.E., Cotter B., Rizzo C., Russo T., Buttinelli G., Caprioli A., Marziano M.L., Ruggeri F.M. (2002) Waterborne outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. *Emerg Infect Dis*, **8**, 563-568.
- Boyce J.M., Havill N.L., Otter J.A., McDonald L.C., Adams N.M.T., Cooper T., Thompson A., Wiggs L., Killgore G., Tauman A., Noble-Wang J. (2008) Impact of hydrogen peroxide vapor room decontamination on *Clostridium difficile* environmental contamination and transmission in a healthcare setting. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **29**, 723-729.
- Briones-Labarca V., Perez-Won M., Zamarca M., Aguilera-Radic J.M., Tabilo-Munizaga G. (2012) Effects of high hydrostatic pressure on microstructure, texture, colour and biochemical changes of red abalone (*Haliotis rufecens*) during cold storage time. *Innovat Food Science Emerg Technol*, **13**, 42-50.

- Bull R.A., Hansman G.S., Clancy L.E., Tanaka M.M., Rawlinson W.D., White P.A. (2005) Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis*, **11**, 1079-1085.
- Bull R.A., Tanaka M.M., White P.A. (2007) Norovirus recombination. *J Gen Virol*, **88**, 3347-3359.
- Cannon J.L., Papafragkou E., Park G.W., Osborne J., Jaykus L.A., Vinjé J. (2006) Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J Food Prot*, **69**, 2761-2765.
- Cheesbrough J.S., Green J., Gallimore G.I., Wright P.A., Brown D.W. (2000) Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. *Epidemiol Infect*, **125**, 93-98.
- Chéret R., Chapleau N., Delbarre-Ladrat C., Verrez-Bagnis V., de Lamballerie M. (2005) Effects of high pressure on texture and microstructure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fillets. *J Food Science*, **70**, 477-483.
- Christensen B.E., Trønnes H.N., Vollan K., Smidsrød O., Bakke R. (1990) Biofilm removal by low concentrations of hydrogen peroxide. *Biofouling*, **2**, 165-175.
- 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**, 1800-1809.
- Cotterelle B., Drougard C., Rolland J., Becamel M., Boudon M., Pinede S., Traoré O., Balay K., Pothier P., Espié E. (2005) Outbreak of norovirus infection associated with the consumption of frozen raspberries, France, March 2005. *Euro Surveill*, **10**(17):pii=2690. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2690>.
- D'Souza D.H., Sair A., Williams K., Papafragkou E., Jean J., Moore C., Jaykus L. (2006) Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *Int J Food Microbiol*, **108**, 84-91.
- Dolin R., Blacklow N.R., DuPont H., Formal S., Buscho R.F., Kasel J.A., Chames R.P., Hornick R., Chanock R.M. (1971) Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis*, **123**, 307-312.
- Domínguez A., Torner N., Ruiz L., Martínez A., Barrabeig I., Camps N., Godoy P., Minguell S., Parrón I., Pumarés A., Sala M.R., Bartolomé R., Pérez U., de Simón M., Montava R., Buesa J. (2008) Aetiology and epidemiology of viral gastroenteritis outbreaks in Catalonia (Spain) in 2004-2005. *J Clin Virol*, **43**, 126-131.
- Doré B., Keaveney S., Flannery J., Rajko-Nenow P. (2010) Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February-March 2010. *Euro Surveill*, **15**(19):pii=19567. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19567>.
- Dotson A.D., Keen V.O., Metz D., Linden K.G. (2010) UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of drinking water increases post-chlorination DBP formation. *Water Res*, **44**, 3703-3713.
- Ethelberg S., Lisby M., Böttiger B., Schultz A.C., Villif A., Jensen T., Olsen K.E., Scheut F., Kjelsø C., Müller L. (2010) Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. *Euro Surveill*, **15**(6):pii=19484. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19484>.
- Georgiadou S.P., Loukeris D., Smilakou S., Daikos G.L., Sipsas N.V. (2011) Effective control of an acute gastroenteritis outbreak due to Norovirus infection in a hospital ward in Athens, Greece, April 2011. *Euro Surveill*, **16**(28):pii=19915. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19915>.

- Gilbride S.J., Lee B.E., Taylor G.D., Forgie S.E. (2009) Successful containment of a norovirus outbreak in an acute adult psychiatric area. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **30**, 289-291.
- Gopal A., Coventry J., Wan J., Roginsky H., Ajlouni S. (2010) Alternative disinfection techniques to extend the shelf life of minimally processed iceberg lettuce. *Food Microbiol*, **27**, 210-219.
- Gordon I., Ingraham H.S., Korn R.F. (1947) Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J Exp Med*, **86**, 409-422.
- Goyal S.M. (2006) Methods of virus detection in foods. In: *Viruses in food*. p. 101-119.
- Green K.Y., Ando T., Balayan M.S., Berke T., Clarke I.N., Estes M.K., Matson D.O., Nakata S., Neill J.D., Studdert M.J., Thiel H.J. (2000) Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis*, **181** (Suppl. 2), S322-S330.
- 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 cell. *J Virol*, **81**, 12238-12248.
- Guzman-Herrador B., Heier B.T., Osborg E.J., Nguyen V.H., Vold L. (2011) Outbreak of norovirus infection in a hotel in Oslo, Norway, January 2011. *Euro Surveill*, **16**(30): pii=19928. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19928>.
- Hall A.J., Vinjé J., Lopman B., Park G.W., Yen C., Gregoricus N., Parashar U. (2011) Update Norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Recommendations and Reports*, **60** (RR03), 1-15.
- Hardy M.E. (2005) Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett*. **253**(1): 1-8.
- Hardy M.E., White L.J., Ball J.M., Estes M.K. (1995) Specific proteolytic cleavage of recombinant Norwalk virus capsid protein. *J Virol*, **69**, 1693-1698.
- Health Protection Agency (2011) Weekly update of norovirus activity. Available online:
- Hernando-Sáinz A., Tárrago-Mingo S., Purroy-Balda F. Tonello-Samson C. (2008) Advances in design for successful commercial high pressure food processing. *Food Aust*, **60**, 154-156.
- [http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1287143931777](http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1287143931777)
- Jiang X., Wang M., Graham D.Y., Estes M.K. (1992) Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol*, **66**, 6527-6532.
- Kapikian A.Z., Wyatt R.G., Dolin R., Thornhill T.S., Kalica A.R., Chanock R.M. (1972) Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*, **10**, 1075-1081.
- Kingsley D.H., Holliman D.R., Calci K.R., Chen H., Flick G.J. (2007) Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 581-585.
- Koo H.L., Ajami N., Atmar R.L., DuPont H.L. (2010) Norovirus: the principal cause of foodborne disease worldwide. *Discov Med*, **10**, 61-70.
- Koopmans M., Harris J., Verhoef L., Depoortere E., Takkinen J., Coulombier D. (2006) European investigation into recent Norovirus outbreaks on cruise ships: update. *Euro Surveill*, **11**(27):pii=2997. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2997>.
- Korsager B., Hede S., Bøggild H., Böttiger B., Mølbak K. (2005) Two outbreaks of norovirus infections associated with the consumption of imported frozen raspberries, Denmark, May-June 2005. *Euro Surveill*, **10**(25):pii=2729. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2729>.

- Li D., Baert L., De Jonghe M., Van Coillie E., Ryckeboer J., Devlieghere F., Uyttendaele M. (2011) Inactivation of Murine Norovirus 1, Coliphage  $\phi$ X174, and *Bacillus fragilis* Phage B40-8 on Surfaces and Fresh-Cut Iceberg Lettuce by Hydrogen Peroxide and UV Light. *Appl Environ Microbiol*, **77**, 1399–1404.
- Li D., Tang Q.J., Wang J.F., Wang Y.M., Zhao Q., Xue C.H. (2009) Effects of high-pressure processing on murine norovirus-1 in oysters (*Crassostrea gigas*) in situ. *Food Control*, **20**, 992-996.
- Lindesmith L., Moe C., Marionneau S., Ruvoen N., Jiang X., Lindblad L., Stewart P., LePendu J., Baric R. (2003) Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med*, **9**, 548-553.
- Liu P., Yuen Y., Hsiao H.M., Jaykus L.A., Moe C. (2010) Effectiveness of liquid soap and hand sanitizer against Norwalk virus on contaminated hands. *Appl Environ Microbiol*, **76**, 394-399.
- Lopman B.A., Reacher M., Gallimore C., Adak G.K., Gray J.J., Brown D.W. (2003b) A summertime peck of “winter vomiting disease”: Surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. *BMC Public Health*, **3**, 13.
- Lopman B.A., Reacher M.H., van Duijnhoven Y., Hanon F.-X., Brown D., Koopmans M. (2003a) Viral Gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis*, **9**, 90-96.
- Lopman B.A., Reacher M.H., Vipond I.B., Hill D., Perry C., Halladay T., Brown D.W., Edmunds W.J., Sarangi J. (2004b) Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. *Emerg Infect Dis*, **10**, 1827-1834.
- Lopman B.A., Reacher M.H., Vipond I.B., Sarangi J., Brown D.W. (2004a) Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis*, **39**, 318-324.
- Lopman B.A., Vennema H., Kohli E., Pothier P., Sanchez A., Negrodo A., Buesa J., Schreier E., Reacher M., Brown D., Gray J., Iturriza M., Gallimore C., Bottiger B., Hedlund K.O., Torvén M., von Bonsdorff C.H., Maunula L., Poljsak-Prijatelj M., Zimsek J., Reuter G., Szűcs G., Melegh B., Svennson L., van Duijnhoven Y., Koopmans M. (2004c) Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet*, **363**, 682-688.
- Lou F., Neetoo H., Chen H., Li J. (2011) Inactivation of a Human Norovirus Surrogate by High-Pressure Processing: Effectiveness, Mechanism, and Potential Application in the Fresh Produce Industry. *Appl Environ Microbiol*, **77**, 1862–1871.
- Lowther J.A., Gustar N.E., Powell A.L., Hartnell R.E., Lees D.N. (2012) Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol*, **78**, 5812-5817.
- Luque Fernandez M.A., Galmés Truyols A., Herrera Guibert D., Arbona Cerdá G., Sancho Gayá F. (2008) Cohort study of an outbreak of viral gastroenteritis in a nursing home for elderly, Majorca, Spain, February 2008. *Euro Surveill*, **13**(51):pii=19070. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19070>.
- Marks P.J., Vipond I.B., Carlisle D., Deakin D., Fey R.E., Caul E.O. (2000) Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect*, **124**, 481-487.
- Martin S., Andersson Y., Hedlund K.-O., Giesecke J. (2004) New norovirus surveillance system in Sweden. *Euro Surveill*, **8**(39):pii=2556. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2556>

Martinelli D., Prato R., Chironna M., Sallustio A., Caputi G., Conversano M., Ciofi Degli Atti M., D'Ancona F.P., Germinario C.A., Quarto M. (2006) Large outbreak of viral gastroenteritis caused by contaminated drinking water in Apulia, Italy. *Euro Surveill*, **12**(16):pii=3176. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3176>.

Maunula L., Roivainen M., Keränen M., Mäkelä S., Söderberg K., Summa M., von Bonsdorff C.H., Lappalainen M., Korhonen T., Kuusi M., Niskanen T. (2009) Detection of human Norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Euro Surveill*, **14**(49):pii=19435. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19435>.

Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, **5**, 607-625.

Motomura K., Yokoyama M., Ode H., Nakamura H., Mori H., Kanda T., Oka T., Katayama K., Noda M., Tanaka T., Takeda N., Sato H. (2010) The Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol*, **84**, 8085-8097.

Mounts A.W., Ando T., Koopmans M., Bresee J.S., Noel J., Glass R.I. (2000) Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis*, **181**, S284-287.

Noda M., Fukuda S., Nishio O. (2007) Statistical analysis of attack rate in norovirus foodborne outbreaks. *Int J Food Microbiol*, **122**, 216-220.

Noel J.S., Fankhauser R.L., Ando T., Monroe S.S., Glass R.I. (1999) Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution. *J Infect Dis*, **179**, 1334-1344.

Nuanualsuwan S., Cliver D.O. (2002) Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J Virol Met*, **104**, 217-225.

Ölmez H., Kretzschmar U. (2009) Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT-Food Science and Technology*, **42**, 686-693.

Oriol R. (1990) Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains. Evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues. *J Immunogenet*, **17**, 235-245.

Otter J.A., Puchowitz M., Ryan D., Salkeld J.A.G., Cooper T.A., Havill N.L., Tuozzo K., Boyce J.M. (2009) Feasibility of routinely using hydrogen peroxide vapour to decontaminate rooms in a busy United States hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **30**, 574-577.

Ozawa K., Oka T., Takeda N., Hansman G.S. (2007) Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol*, **45**, 3996-4005.

Palacio H., Shah U., Kilborn C., Martinez D., Page V., Gavagan T., Mattox K., DuPont H., Estes M.K., Feigin R., Atmar R.L., Neill F.H., Versalovic J., Stager C., Musher D., Faul M., Davies M., Cortese M., Lau E. (2005) Norovirus outbreak among evacuees from hurricane Katrina-Houston, Texas, September 2005. *MMWR Morb Mortal Weekly Rep*, **54**, 1016-1018.

Parashar U.D., Quiroz E.S., Mounts A.W., Monroe S.S., Fankhauser R.L., Ando T., Noel J.S., Bulens S.N., Beard S.R., Li J.F., Bresee J.S., Glass R.I. (2001) Norwalk-like viruses: Public health consequences and outbreak management. *MMWR Recomm Rep*, **50**, 1-17.

Pottage T., Richardson C., Parks S., Walker J.T. Bennett A.M. (2010) Evaluation of hydrogen peroxide gaseous disinfection systems to decontaminate viruses. *J Hosp Infect*, **74**, 55-61.

- Prasad B.V., Hardy M.E., Dokland T., Bella J., Rossmann M.G., Estes M.K. (1999) X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, **286**, 287-290.
- 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.
- Rastogi N.K., Raghavarao K.S., Balasubramaniam V.M., Niranjana K., Knorr D. (2007) Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **47**, 69-112.
- Richards G.P. (2012) Critical review of Norovirus surrogates in food safety research: rationale for considering volunteer studies. *Food Environ Virol*, **4**, 6-13.
- Rizzo C., Di Bartolo I., Santantonio M., Coscia M.F., Monno R., De Vito D., Ruggeri F.M., Rizzo G. (2007) Epidemiological and virological investigation of a norovirus outbreak in a resort in Puglia, Italy. *BMC Infectious Diseases*, **7**, 135.
- Robert Koch Institute (2012) Outbreak of acute vomiting with diarrhoea in children and youths over, cause identified. Available online: [http://www.rki.de/EN/Home/Outbreak\\_AV.html](http://www.rki.de/EN/Home/Outbreak_AV.html).
- Rockx B.H., Vennema H., Hoebe C.J., Duizer E., Koopmans M.P. (2005) Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J Infect Dis*, **191**, 749-754.
- Rudnick S.N., McDevitt J.J., First M.W., Spengler J.D. (2009) Inactivating influenza viruses on surfaces using hydrogen peroxide or triethylene glycol at low vapour concentrations. *Am J Infect Control*, **37**, 813-819.
- Sarvikivi E., Roivainen M., Maunula L., Niskanen T., Korhonen T., Lappalainen M., Kuusi M. (2011) Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries. *Epidemiol Infect*, **140**, 260-267.
- Savini G., Migliorati G., Monaco F., Di Francesco C.E., Casaccia C., Ripani A., Pinoni C., Giovannini A., Marfaglia C., Principe V., Ruggeri F.M. (2004) Report of an outbreak of Norovirus gastroenteritis in a tourist resort of the Abruzzo coastal area. In Abstract 4<sup>th</sup> National Congress of the Italian Society of Virology (SIV), 20-22 September, Orvieto.
- Sawyer L.A., et al. (1988) 25- to 30-nm virus particle associated with a hospital outbreak of acute gastroenteritis with evidence for airborne transmission. *Am J Epidemiol*, **127**, 1261-1271.
- Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.-A., Roy S.L., Jones J.L., Griffin P.M. (2011) Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis*, **17**, 7-15.
- Schwab K.J., Estes M.K., Atmar R.L. (2000) Norwalk and other human caliciviruses: molecular characterization, epidemiology, and pathogenesis. In: Cary J.W., Linz J.E., Bhatnagar D., editors. *Microbial foodborne diseases: mechanisms of pathogenicity and toxin synthesis*. Lancaster (PA): Technomic Publishing Company, Inc.; 469-493.
- Shirato H., Ogawa S., Ito H., Sato T., Kameyama A., Narimatsu H., Xiaofan Z., Miyamura T., Wakita T., Ishii K., Takeda N. (2008) Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J Virol*, **82**, 10756-10767.
- Sickbert-Bennett E.E., Weber D.J., Gergen-Teague M.F., Sobsey M.D., Samsa G.P., Rutala W.A. (2005) Comparative efficacy of hand hygiene agents in the reduction of bacteria and viruses. *Am J Infect Control*, **33**, 67-77.
- 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. (2009) Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of Norovirus GII.4 Variants. *J. Infect Dis*, **200**, 802-12.
- Tan M., Fang P., Chachivo T., Xia M., Huang P., Fang Z., Jiang W., Jiang X. (2008) Noroviral P particle: Structure, function and applications in virus-host interaction. *Virology*, **382**, 115-123.
- Tan M., Jiang X. (2005) The P domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virology*, **79**, 14017-14030.
- Tang Q.J., Li D., Xu J., Wang J.F., Zhao Y., Li Z., Xue C.H. (2010) Mechanism of inactivation of murine norovirus-1 by high pressure processing. *Int J Food Microbiol*, **137**, 186-189.
- Teunis P.F., Moe C.L., Liu P., Miller S.E., Lindesmith L., Baric R.S., Le Pendu J., Calderon R.L. (2008) Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virology*, **80**, 1468-1476.
- Thornton A.C., Jennings-Conklin K.S., McCormick M.I. (2004) Noroviruses: Agents in Outbreaks of Acute Gastroenteritis. *Disaster Manag Response*, **2**, 4-9.
- Thorven M., Grahn A., Hedlund K.O., Johansson H., Wahlfrid C., Larson G., Svensson L. (2005) A homozygous nonsense mutation (428G→A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *J Virology*, **79**, 15351-15355.
- Tofant A., Vučemilo M., Pavičić Ž., Milić D. (2006) The hydrogen peroxide, as a potentially useful slurry disinfectant. *Livestock Science*, **102**, 243-247.
- 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.
- Westrell T., Dusch V., Ethelberg S., Harris J., Hjertqvist M., Jourdan-da-Silva N., Koller A., Lenglet A., Lisby M., Vold L. (2010) Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Euro Surveill*, **15**(12):pii=19524. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19524>.
- Wobus C.E., Karst S.M., Thackray L.B., Chang K.-O., Sosnovtsev S.V., Belliot G., Krug A., Mackenzie J.M., Green K.Y., Virgin IV H.W. (2004) Replication of norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol*, **2**, e432.
- Yee E.L., Palacio H., Atmar R.L., Shah U., Kilborn C., Faul M., Gavagan T.E., Feigin R.D., Versalovic J., Neill F.H., Panlilio A.L., Miller M., Spahr J., Glass R.I. (2007) Widespread outbreak of norovirus gastroenteritis among evacuees of Hurricane Katrina residing in a large "megashelter" in Houston, Texas: lessons learned for prevention. *Clin Infect Dis*, **44**, 1032-1039.
- 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**, 312-323.