



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO



MEDICINA
VETERINARIA
TERAMO

Virus a Trasmissione Alimentare

Gianluigi Ferri

Unità di Ispezione, Controllo e Sanità degli Alimenti di Origine Animale
Dipartimento di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Teramo

gferri@unite.it

1

Premessa

I casi di tossinfezioni alimentari di natura virale sono sottostimati

La possibilità di utilizzare metodiche biomolecolari innovative quali la Next Generation Sequencing (NGS) ha migliorato sia il **rilevamento** di virus trasmessi per via alimentare che una **maggiore efficienza dei programmi di sorveglianza**

2

Virus a trasmissione alimentare e loro ruolo nella sicurezza alimentare

- Parassiti intracellulari non in grado di replicare al di fuori della cellula ospite specifica
- La cellula ospite tratta le informazioni genetiche del virus come se fossero proprie
- La replicazione del virus avviene attraverso la trascrizione e la traduzione del genoma virale usando i meccanismi della cellula ospite
- I virus non sono coltivabili in substrati privi di cellule viventi

3

Virus a trasmissione alimentare e loro ruolo nella sicurezza alimentare

- La trasmissione del virus non dipende solo dalla sua interazione con l'ospite, ma risente anche della influenza con l'ambiente esterno
- Fuori dall'organismo dell'ospite, i virus sono particelle inerti prive di un proprio metabolismo
- Più a lungo sono in grado di resistere nell'ambiente allo stato infettante, più alta è la probabilità di trasmissione e diffusione della infezione

4

Virus a trasmissione alimentare e loro ruolo nella sicurezza alimentare

- La trasmissione per via alimentare è stata dimostrata in virus tassonomicamente ascrivibili ad almeno 10 famiglie
- Le malattie alimentari associate a queste infezioni presentano una sintomatologia che varia da blande forme diarroiche a gravi encefaliti

5

- Virus che sono solo contaminanti degli alimenti

Si trasmettono attraverso la via oro-fecale

- Contaminazioni da maestranze infette (frequenti)
- Contaminazioni durante il processo produttivo (frequenti es. Molluschi bivalve molluscan shellfish)

L'infezione dell'ospite avviene per ingestione dell'alimento contaminato, a cui seguono l'invasione delle cellule dell'epitelio intestinale e la replicazione del virus nel medesimo distretto oppure altrove nell'organismo

6

- Virus che sono solo contaminanti degli alimenti

Si trasmettono attraverso la via oro-fecale

- Contaminazioni da maestranze infette (frequenti)

7

I focolai di malattia alimentare da NoV sono ad es. spesso legati a maestranze che contaminano alimenti destinati ad essere consumati **direttamente crudi o non sottoposti ad ulteriori trattamenti** prima del consumo (Ready To Eat)

Molti di questi focolai vedono implicate maestranze con patologie gastroenteriche in atto o da poco superate; in molti casi si è verificato il contatto con familiari infetti (bambini) prima della manipolazione dell'alimento

Gli errori più comuni da parte delle maestranze nei focolai di NoV e HAV sono riferibili a:

- soggetti **infetti o portatori** del virus
- che manipolano alimenti **RTE** in modo **improprio** (a mani nude)
- mani non adeguatamente lavate e disinfettate

La **scarsa igiene personale** è stata anche identificata come un co-fattore nel determinismo di focolai di malattia alimentare da NoV

Le maestranze possono contaminare gli alimenti in seguito ad episodi di vomito (NoV) o con feci (NoV/HAV), quando non rispettano le più basilari norme di igiene personale dopo l'uso dei servizi igienici

Sono maggiormente coinvolte **maestranze asintomatiche** rispetto a quelle che presentano una sintomatologia, il che spiega quanto possa essere difficile identificare e arginare un focolaio di malattia

8

- Virus che sono solo contaminanti degli alimenti

Si trasmettono attraverso la via oro-fecale

- Contaminazioni durante il processo produttivo (frequenti es. Molluschi bivalve molluscan shellfish)

9

Durante la **produzione primaria** materie prime a rischio vengono contaminate (frutti di bosco e altri alimenti di origine vegetale, molluschi bivalvi)

Gli **scarichi** e le **acque reflue** rappresentano le principali fonti di contaminazione e NoV e HAV i gruppi che destano le maggiori preoccupazioni (WHO, FAO)

Scarichi e acque reflue frequentemente contengono **più virus a RNA**, privi di envelope, diversamente a quanto si verifica nel caso di contaminazioni da parte delle maestranze

In questi casi la coabitazione di più virus a RNA e la seguente co-infezione di cellule umane da parte di ceppi virali geneticamente distinti può portare alla nascita di **ricombinanti virali** che mescolano le loro mutazioni individuali rendono imprevedibili gli effetti sul comportamento virale e la virulenza

10

- Virus animali e vegetali che troviamo *all'interno degli alimenti*

Emerging Hazards (World Health Organization e Food and Agricultural Organization)

Virus dell'Epatite E (HEV)
Nipah Virus
Virus dell'Influenza Aviare H5N1

11

Virus il cui rischio di infezione è legato ad **alimenti specifici**; il **ruolo** di un determinato alimento nel causare la malattia virale, così come le **possibilità di associazione** tra virus e alimento impongono l'adozione di scrupolose misure di **prevenzione**

12

Zoonosi a trasmissione alimentare si verificano per consumo di carni, organi ed altri prodotti che contengono il virus in quanto provenienti da animali infetti

Per i virus questa è una via di trasmissione molto rara, sebbene vada sempre ipotizzata ed investigata all'insorgere di ogni focolaio di malattia alimentare

Questo è il caso specialmente dell'HEV, dal momento che **fegati di suidi** domestici e selvatici consumati crudi o poco cotti rappresentano la principale fonte di contaminazione/infezione

In aggiunta sindromi da Nipah virus si sono verificate in seguito ad ingestione di alimenti contaminati

13

Norovirus NoV

14

Solo negli USA:

21 milioni di casi di gastroenterite

71.000 ospedalizzazioni

800.000 morti

Moore MD, Goulter RM, Jaykus L-A. Human norovirus as a foodborne pathogen: challenges and developments. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2015;6:411–33. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015643>.

15

In passato conosciuti come

- *Small Round Structured Virus - SRSVs* (piccoli virus strutturati rotondi)
- *Norwalk-Like Virus - NLVs* (Norwalk-like virus)

Attualmente sono i più frequenti agenti di gastroenteriti virali epidemiche conseguenti a consumo di alimenti o di acqua

Tra le più importanti cause di gastroenterite acuta umana nel mondo

16

Genere *Norovirus* - Famiglia *Caliciviride*

Il virione ha forma di calice
 Dimensioni: 27 -40 nanometri (nm)
 Privo di envelope
 RNA monocatenario
 Dose infettante: da 10 a 100 particelle virali

17

Il Norovirus prototipo

Norwalk virus

Scoperto da Kapikian et al. (1972) in seguito ad un **focolaio di gastroenterite in una scuola in Norwalk (Ohio).**

Come fu identificato ?????

Immune electron microscopy :

esame feci di volontari che avevano consumato filtrati fecali provenienti da casi di malattia

(Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., and 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)

18

Norovirus (NoV): vengono classificati su base filogenetica in 6 genogruppi, da GI a GVI.
 GI e GII: i più frequenti in corso di epidemie gastroenteriche umane (anche GIV)
 GIII anche riscontrato nei maiali; GIII infetta bovini e suini; GV è stato isolato dai topi; GVI infetta cani e gatti.

Infezioni nell'uomo



Ricombinazioni tra virus di diversi genogruppi sono rare → le differenze tassonomiche sono legate alla presenza di diverse specie ospiti

analisi filogenetica
 proteine del capside

19

Resistenza (studi condotti su volontari umani)

- Conserva infettività dopo esposizione a **pH 2.7 per 3 h a T° ambiente**
- In mitili sottoposti a **trattamento termico e marinati a pH 3.75** infettività conservata per **un mese**
- Conserva **infettività in condizioni di refrigerazione e di congelamento**
- Resiste all'essiccamento

20

La Malattia

Incubazione da 12 a 72 ore (normalmente dopo 1-2 giorni)

Gastroenterite, nausea, vomito, diarrea, crampi addominali

Risoluzione: molto rapida (circa 24 - 48 ore)

Immunità: di breve durata (dipende dal genotipo, esistono più di 20 genotipi!!!)

Maggiormente colpiti bambini (età < 5 anni) e anziani

21

Impatto significativo dei NoV sulla salute pubblica in tutto il mondo

Capacità di dare luogo ad infezioni clinicamente rilevanti in tutti i gruppi di età (elevato reservoir nella popolazione umana)

Elevato titolo virale nelle feci e nel vomito dei soggetti malati

Capacità di trasmissione attraverso diverse vie e modalità

Bassa dose infettante

Elevata resistenza nell'ambiente

Elevata diversità genetica → incapacità di sviluppare nell' uomo la comparsa di un' immunità duratura (18 mesi al massimo). La maggior parte dei NoV's riesce a evitare le attività bloccanti dei recettori presenti sugli anticorpi innescati da una precedente infezione grazie all'accumulo di mutazioni nel proprio genoma

Il principale ostacolo nella ricerca delle infezioni da NoV nell'uomo è stata la mancanza di un robusto e riproducibile sistema di coltivazione in vitro

22

International Organization for Standardization (ISO).
*Microbiology of the food chain—horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using **real-time RTPCR**— part 1: Method for quantification 2017–03;07.100.30.*

Sukhrîe FHA et al. *Using molecular epidemiology to trace transmission of nosocomial norovirus infection. J Clin. Microbiol.* 2011;49:602–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.01443-10>

Thanks to molecular tracing of outbreaks and the acquired knowledge on sources and ways of transmission measures such as efficient disinfection and water treatment are increasingly taken to reduce the risk of foodborne NoV infections

Current Clinical Microbiology Reports <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0087-9>

23

Currently, EU regulatory authorities are focusing in following areas in Norovirus combat:

- (i) whole genome sequencing for the characterization of Norovirus and other foodborne viruses;
- (ii) surveillance to generate more information about levels of Norovirus occurring in food;
- (iii) refinements to current RT-PCR to improve detection of low numbers of norovirus particles in all food matrices;
- (iv) the binding properties and possible methods of inactivation of norovirus;
- (v) the effectiveness of depuration (or alternatives such as high pressure, UV, ozone, irradiation) in removing Norovirus from oysters; and
- (vi) establishment of the infectious dose in different food commodities including shellfish and fresh produce (lettuce and berries)

24

Virus dell'Epatite A - HAV

25

Virus Epatite A (HAV) è un epatovirus

Famiglia : *Picornaviridae*

Genere *Hepatovirus*

Gli Hepatovirus sono stati isolati solo da uomo e primati → altre specie che fungono da reservoir non sembrano coinvolte nella diffusione del virus

26

Virus Epatite A (HAV) è un epatovirus

La frequenza di mutazione HAV è bassa e quindi il suo genoma è relativamente conservato nel tempo

Particelle virali, due versioni:

- Virioni icosaedrici nudi, senza envelope (diametro 27 nm) eliminati con le feci
- Virioni pseudo-enveloped presenti nel sangue dei soggetti infetti e nelle colture cellulari.

Sono stati definiti sei genotipi di HAV: i genotipi da I a III infettano l'uomo e sono suddivisi in sottogenemici A e B. Il sottotipo IA è predominante in Europa

27

Resistenza

•HAV è altamente resistente all'inattivazione indotta con diversi metodi sia chimici e sia fisici

(Flehmig et al., 1985; Sattar et al., 1989; Mbithi et al., 1990, 1993).

•Ben scientificamente documentata è, in particolare, la **tolleranza termica** e la sopravvivenza di HAV in differenti matrici alimentari (es. bivalvi e derivati del latte)

(Millard et al., 1987; Abad et al., 1997; Croci et al., 1999; Hewitt & Greening, 2006; Sow et al., 2011; Parry&Mortimer, 1984; Bidawid et al., 2000; Shin Young Park & Sang-Do Ha 2015);

28

Resistenza

HAV può sopravvivere nell'ambiente inclusa l'acqua di mare e il sedimento marino per più di tre mesi (Sobsey et al., 1988)

Dopo 60' a 60°C mantiene ancora l'integrità e la infettività. Dopo 10-12 ore a 56°C risulta solo parzialmente inattivato

In condizioni di refrigerazione e di congelamento HAV rimane intatto e infettivo per diversi anni

E' resistente all'essiccamento

E' stabile a pH 1 e sopravvive per 4 settimane in cozze marinate a pH 3,75 (Hollinger and Emerson, 2001; Hewitt and Greening, 2004).

29

Resistenza

•300 mg/L di acido percloroacetico non lo inattivano così come non è inattivato da 1 g/L di clorammine a 20°C x 15'

-(Hollinger and Emerson, 2001)

30

Trasmissione

• L'HAV è generalmente trasmessa all'uomo attraverso la via oro-fecale.

• Il periodo di incubazione dell'epatite A (HA) è di circa 28-30 giorni (range: 15-50).

• La malattia, acuta e generalmente auto-limitante, colpisce il fegato ed è caratterizzata da febbre, diarrea e ittero.

• La proporzione di infezioni sintomatiche è molto bassa nei bambini piccoli (sotto i sei anni di età), ma l'espressione clinica e la gravità aumentano con l'età.

• il tasso di mortalità globale è intorno allo 0,3%, ma può arrivare fino all'1,8% negli adulti oltre i 50 anni e nei pazienti immunocompromessi

31

Pintó, R.M., Costafreda, M.I., Bosch, A., 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. Applied and Environmental Microbiology, 75, 7350–7355.

• Studio su livelli di HAV in molluschi bivalvi coinvolti in epidemie di epatite A VS il rischio per la salute umana

• Determinando come, a partire dalle cariche virali finali riscontrate nei bivalvi, la probabilità di infezione (Pi) vari da **0.37 a 0.95 per le cozze crude**, da **0.005 a 0.63 per le cozze leggermente cotte/sbollentate** e da **0.00001 a 0.01 per le cozze ben cotte**.

• In termini di rischio per il consumatore, una riduzione media pari al 90% (1 log) insieme a un'adeguata preparazione dei bivalvi, **potrebbe ridurre**, almeno in alcuni casi, il rischio d'infezione. Queste stime sottolineano, secondo gli Autori, l'importanza di stabilire un limite critico di particelle virali sia prima sia dopo il processo di depurazione dei bivalvi.

32

Polo, D, Varela, M.F., Romalde, J.L., 2015.

Detectio and quantification of hepatitis A virus and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas. International Journal of Food Microbiology, 193, 43-50.

• **in uno studio sulla prevalenza di norovirus e virus dell'epatite a in molluschi allevati in Galizia (NW Spagna), che è la più grande area di produzione di molluschi d'Europa, hanno trovato per HAV una prevalenza pari al 10,1%;**

33

Virus dell'Epatite E genotipi 1 e 2

1° epidemia a Dehli nel 1955,
coinvolte 52.000 persone, 1560 decessi

34

HEV

Clinicamente indistinguibile da HAV
tassonomicamente non correlato a HAV

Famiglia Hepeviridae, genere Orthohepevirus

I casi umani sono sostenuti dalla specie Orthohepevirus A
Orthohepevirus A ulteriormente suddiviso in genotipi da 1 a 8

Solo i genotipi 1 e 2 sono considerati patogeni primari per l'uomo

Trasmissione: via oro-fecale.

35

HEV

Molto resistente nell'ambiente

Smith DB, Paddy JO, Simmonds P.

The use of human sewage screening for community surveillance of hepatitis E virus in the UK.

J Med Virol. 2016;88:915–8. <https://doi.org/10.1002/jmv.24403>

Dalton HR, Seghatchian J.

Hepatitis E virus: emerging from the shadows in developed countries. Transfus Apher Sci. 2016;55:271–4. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2016.10.016>.

**Nell'Europa occidentale episodi da HEV-1 o 2
sono generalmente considerati *imported or travel disease***

36

Epatite E Virus – genotipi 3 e 4

Tossinfezione zoonotica virale emergente

37

Epatite E Virus – genotipi 3 e 4

Garbuglia AR, Scognamiglio P, Petrosillo N, Mastroianni CM, Sordillo P, Gentile D, et al.
Hepatitis E virus genotype 4 outbreak, Italy, 2011
Emerg Infect Dis. 2013;19:110–4. <https://doi.org/10.3201/eid1901.120983>.

Tessé S, Lioure B, Fornecker L, Wendling M-J, Stoll-Keller F, Bigaillon C, et al.
Circulation of genotype 4 hepatitis E virus in Europe: first autochthonous hepatitis E infection in France.
J Clin Virol. 2012;54:197–200

38

Italia

In Italia, è stato registrato l'aumento di casi autoctoni di HEV con **sospetta trasmissione zoonotica** da cinghiali, cervi e suini domestici

In Italia la sieroprevalenza nei suini varia tra il 31,0% e il 50,2%, nell'uomo oscilla tra l'1% e il 5%

Studi condotti in Paesi europei e negli Stati Uniti hanno rilevato una sieroprevalenza umana più elevata

39

Di Bartolo et al.

Serological and virological survey of HEV in wild boar populations in northwestern Italy: detection of HEV subtypes 3e and 3f. Archives of Virology
DOI: 10.1007/s00705-014-2246-5

*During the hunting season, 594 serum and 320 liver samples were collected and screened for antibodies to HEV and HEV RNA. Overall, the **seroprevalence was 4.9%**, and HEV RNA was detected in 12 liver samples ($p = 3.7\%$).*

*Phylogenetic analysis of the ORF2 region revealed that **the isolates clustered within genotype 3, subtypes 3e and 3f, and were closely related to HEV strains previously detected in domestic pigs farmed in the same geographic area. Although the routes of viral transmission are still poorly understood, our data show that HEV genotypes 3e and 3f circulate in wild boars in northwestern Italy.***

40

EFSA PANEL Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen -
ADOPTED: 8 June 2017

doi: 10.2903/j.efsa.2017.4886

**una piccola percentuale (< 10%) di suini
risulterebbe viremica durante la macellazione e
rappresenterebbe quindi la principale causa di
“carne di primo taglio”
infetta da HEV**

La percentuale di animali viremici alla macellazione varia a seconda della tipologia produttiva, età di macellazione e contesto epidemiologico

41

Di Bartolo I, et al.
Detection of hepatitis E virus in pork liver sausages.
Int J Food Microbiol. 2015
Jan 16;193:29-33. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.005. Epub 2014 Oct 13.

• **La presenza, dunque, di HEV in carne suina potrebbe essere l'esito di una viremia transitoria associata a disseminazione del virus in muscolo e altri tessuti (suini viremici al macello), piuttosto che l'esito di una cross-contaminazione durante le fasi di macellazione e lavorazione.**

Epatite E Virus – genotipi 3 e 4

42

Epatite E Virus – genotipi 3 e 4

Suinetti nati da scrofe sieropositive acquisiscono immunità passiva tramite le IgG colostrali che persistono fino a 9 settimane di vita circa.

Negli allevamenti intensivi i suinetti possono infettarsi quando l'immunità passiva decresce (circa 2 mesi), sieroconvertendo ad 1-2 settimane post infezione.

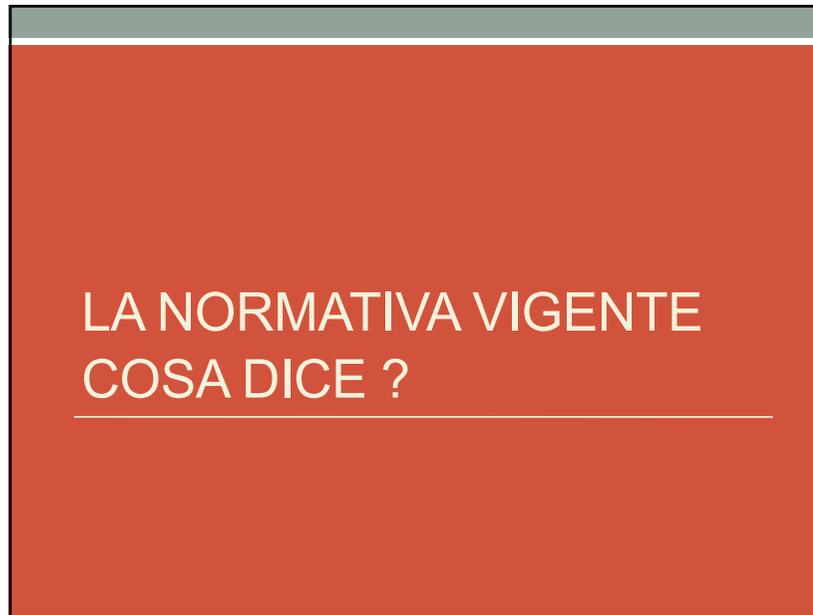
43

Considerazione!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

l'allevamento italiano :
l'orientamento produttivo verso il suino pesante (≥ 160 kg / macellazione a 10-12 mesi),

agli altri Paesi UE ed Extra-UE dove suino a 90-110 kg (suino magro).

44



LA NORMATIVA VIGENTE
COSA DICE ?

45



Virus dell'Epatite E - HEV

46

Chi è HEV (Hepatitis E virus)?

- È una "foodborne zoonosis".
- Famiglia: *Hepeviridae*.
- Specie: *Paslahepevirus balayani*.
- Quasi-enveloped RNA virus.
- Il genoma di HEV è caratterizzato da tre Overlapping Open Reading Frame (ORF):
 - ORF 1 → proteina non strutturale.
 - **ORF 2 → proteina capsidica (pORF 2).**
 - ORF 3 → proteine multifunzionali di piccole dimensioni.

47

Chi è HEV (Hepatitis E virus)?

- Specie animali reservoir: cinghiale e suino domestico.

48

Geographical distribution

HEV1 e HEV2

Paesi in via di sviluppo:

- Africa;
- Asia.

Principale fonte: **acque contaminate «wastewater management»**.
Acute hepatitis cases.

HEV3

Paesi industrializzati:

- Europa → Italia HEV3 subtypes c, f, l, m;
- Nord America.

Ingestione di **alimenti contaminati**.
Causa **casi sporadici di ospedalizzazione**.
Immunocompetenti → asintomatici ma sieropositivi.

HEV4

Genotipo prevalentemente Asiatico «**mixed farm genotype**».

Identificato anche in Europa.

49

Viral life-cycle

- Patogeno a carattere “**circolare**”.

- **Ambiente.**
- **Attività antropiche.**
- **Consumatore finale.**
- **One-Health issue.**

50

HEV peculiarities

Dose infettante stimata: $3.6 \cdot 10^4$ IU (soggetti immunocompromessi).

Viremia (da 8 fino a 28 giorni post infezione) → **masse muscolari**.

Sintomatologia GE ...

51

HEV peculiarities

72°C per 20 minuti a cuore del prodotto → **VIRUCIDA** (Barnaud et al., 2012).

Carica virale iniziale nel prodotto → **fattore cruciale**.

Case report: paziente infettato da ingestione carne cruda-poco cotta (Spagna)
(Rivero-Juarez A, Frias M, Martinez-Peinado A, Rivalde MA, Rodriguez-Cano D, Camacho A, García-Bocanegra I, Cuenca-López F, Gomez-Villamandos JC, Rivero A. Familial hepatitis E outbreak linked to wild boar meat consumption. Zoonoses Public Health 2017;64:561–565).

52

Categorie lavorative a rischio

Medici Veterinari, allevatori, personale del mattatoio e cacciatori.

Fattori cruciali: corretto uso dei **DPI**, **cross contaminazioni** (attrezzature e degli operatori), non corretta applicazione delle **GHP**.

Fasi a rischio: **evisceraton phase** e **bile waste dispersion**.

Rilevati **elevati titoli anticorpali** (IgM e IgG): **stesso genotipo** riscontrato nelle matrici alimentari.

Asintomatici.

Non solo il suino domestico e cinghiale, ma anche altre specie quali: **capra e coniglio**.

53

Pazienti immunocompromessi

Sintomatici.

Spesso a causa di talune patologie gravi sono necessarie **trasfusioni**.

Blood and Blood products found positive for high immunoglobulin titers e/o HEV RNA detection.

Trasmissione **interumana** (soprattutto HEV3 e HEV4).

Canada e USA hanno introdotto HEV tra i patogeni da monitorare nella **medicina trasfusionale**.

In **Italia**, Spada et al., 2019 ha valutato i titoli di anti-HEV in **Sardegna e Abruzzo** → il **30%** positivi con anti-HEV IgG elevate.

Stretta correlazione ad una **attività venatoria spinta**.

54

Diagnostica biomolecolare

La biologia molecolare ha un ruolo chiave.

Diagnosi di certezza mediante **Nested RT-PCR** e/o **RT-qPCR**.

Risultati ottenuti in tempi brevi.

Importanza delle attività di **sequencing** e **phylogenetic analysis**.