



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali
e Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

Il virus dell'epatite A negli alimenti:
strategie di controllo per il consumatore e
l'industria

Relatore
Prof. Alessio Giacomini

Laureando
Samuele Fabris
Matricola n.
1192168

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

Riassunto	5
Abstract	7
1 I virus dell'epatite	9
2 Il virus dell'epatite A (HAV – Hepatitis A Virus)	13
2.1 Cenni storici	14
2.2 Struttura e genoma del virus dell'epatite A	14
3 Infezione nell'uomo	17
3.1 Vie di trasmissione	17
3.2 Patogenesi e manifestazioni cliniche	17
4 Diffusione di HAV nel mondo e in Europa	21
5 HAV negli alimenti	27
5.1 Fonti di contaminazione nella filiera produttiva	27
5.2 Prevenzione della diffusione di HAV	28
5.3 Molluschi bivalvi	31
5.4 Altri alimenti	34
5.5 Attuale legislazione	36
6 Modalità di identificazione del virus	39
6.1 Identificazione di HAV mediante Real-Time PCR	39
7 Eliminazione del virus dell'epatite A	43
7.1 Pascalizzazione o trattamento ad alta pressione idrostatica	43
7.1.1 Fattori che influenzano l'efficacia del trattamento	45
7.2 Effetto dell'uso degli estratti vegetali su HAV	48
7.3 Efficacia del trattamento di cottura	51
8 Conclusioni	55
9 Bibliografia	57

Riassunto

Il virus dell'epatite A (Hepatitis A Virus, HAV) è un piccolo virus a RNA, a trasmissione oro-fecale, responsabile di un'infezione acuta a carico del fegato. La malattia, spesso asintomatica, ha un periodo di incubazione di 15-50 giorni e un decorso in genere autolimitante. Vi sono importanti differenze geografiche nella sua distribuzione dovute alle diverse condizioni igienico-sanitarie e anche i focolai virali di origine alimentare testimoniano uno scarso livello di igiene nella produzione. La contaminazione può aver luogo in un qualsiasi punto della filiera produttiva: per questo è fondamentale prestare attenzione all'applicazione dei manuali di corretta prassi operativa, valido supporto per i sistemi di autocontrollo, e allo sviluppo di un piano HACCP.

In Europa, l'epatite A è una malattia soggetta ad obbligo di notifica; i casi segnalati vengono studiati dai dipartimenti di sanità pubblica e le informazioni ottenute riportate nei sistemi di sorveglianza nazionale e all'interno del sistema europeo di sorveglianza. Per questo devono essere sviluppati metodi standard per l'analisi dei campioni alimentari, i quali prevedono l'uso della RT-PCR. Dalle indagini epidemiologiche, gli addetti alla manipolazione degli alimenti sono spesso segnalati come una delle principali fonti di contaminazione perciò, l'accento dovrebbe essere posto sull'uso di una rigorosa igiene personale. Inoltre, al fine di ridurre il rischio di contaminazione nell'industria alimentare, l'OMS ha proposto soluzioni di disinfezione alternative che si basano sull'uso di composti fitochimici, tra cui l'estratto di tè verde. È stata valutata anche l'efficacia del trattamento ad alta pressione, quale metodo innovativo di conservazione e sterilizzazione, il quale consente di indurre l'inattivazione di HAV pur conservando le qualità organolettiche e nutrizionali della matrice alimentare che a sua volta può influenzare l'efficacia del trattamento. Infine, spesso il contagio si verifica in seguito al consumo di alimenti non adeguatamente cotti; pertanto, sono state fornite indicazioni chiare su tempi e temperature di cottura. Con tali accorgimenti è possibile ridurre il rischio di infezione alimentare.

Lo studio vuole presentare i dati sulla diffusione del virus nel mondo e in Europa, valutando quali siano gli alimenti maggiormente a rischio e più frequentemente coinvolti, fornendo indicazioni in merito a quali siano gli effetti delle tecnologie di lavorazione e conservazione da adottare per ridurre i rischi di contaminazione e l'infettività di HAV.

Abstract

Hepatitis A virus is a small RNA virus, with fecal-oral transmission, responsible for an acute liver infection. The disease, often asymptomatic, has a range of incubation between 15 and 50 days and generally is self-limited. There are significant geographical differences in its distribution due to hygienic and sanitary conditions and also food-borne viral outbreaks show a low hygienic standard in the production. Contamination of food can occur at any point of the production chain: for this reason, is necessary paying attention to the implementation of manuals of good operating practices, efficient support for self-control systems, and the development of a HACCP plan.

In Europe, hepatitis A is a notifiable disease. The reported cases are studied by public health departments and the information is reported in national and European surveillance systems. So, standard methods for the analysis of food samples, which include the use of RT-PCR, must be developed. From epidemiological investigations, food handling workers are reported as one of the primary sources of contamination. Therefore, the emphasis should be placed on the use of strict personal hygiene. To reduce the risk of contamination in the food industry, WHO has proposed alternative disinfection solutions based on the use of phytochemical compounds, including Green Tea Extract. The high-pressure treatment is an innovative and effective method of conservation and sterilization for the inactivation of HAV. This does not change the organoleptic and nutritional qualities of the food matrix that can influence the efficacy of the treatment. Often, inadequately cooked food causes infection. To avoid infection caused by inadequately cooked food, indication of cooking times and temperatures should be introduced. With these precautions is possible to reduce the risk of food infection.

The study wants to present data on the spread of the virus in the whole world and Europe, evaluating which foods are most at risk and frequently involved, providing information on the effects of processing and conservation technologies to be adopted to reduce the risk of contamination and infectivity of HAV.

1 I virus dell'epatite

Le epatiti virali sono infezioni a carico del fegato che differiscono dal punto di vista epidemiologico e immuno-patogenetico. Ad oggi, sono noti cinque tipi di epatite virale quali epatite A, epatite B, epatite C, epatite D ed epatite E. Oltre a questi, definiti virus epatitici maggiori, esistono altri virus che, oltre alla malattia di base, possono essere responsabili di epatiti di varia gravità. Questi sono definiti virus epatitici minori e prevalentemente sono il Citomegalovirus, il virus di Epstein-Barr, il virus Coxsackie ed Herpesvirus.

Tabella 1-1. Principali caratteristiche dei virus dell'epatite (epicentro.iss.it)

	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV
Famiglia	Picornaviridae	Hepadnaviridae	Flaviviridae	(subvirione)	Caliciviridae
Trasmissione	Oro-fecale	Parenterale	Parenterale	Parenterale	Oro-fecale
Periodo d'incubazione	15-50 giorni	45-180 giorni	14-180 giorni	14-240 giorni	15-64 giorni
Cronicizzazione	Raro	Si	Si	Si	Raro
Patologie associate	Molto rare: colestasi e colecistite, insufficienza epatica	Cirrosi epatica ed epatocarcinoma	Cirrosi epatica ed epatocarcinoma	Cirrosi epatica ed insufficienza epatica acuta	Molto rare: epatite fulminante
Diagnosi	Sintomi e IgM anti-HAV	Sintomi e IgM anti-HBV	Sintomi, IgM anti-HCV e rilevazione di HCV RNA	IgM anti-HDV e rilevazione di HDV RNA	Sintomi, IgM anti-HEV e rilevazione di HEV RNA
Prevenzione	Vaccino	Vaccino	Nessun vaccino. Generali norme igieniche.	Vaccino epatite B	Gammaglobuline e vaccino, entrambi in fase di sperimentazione.

Il virus dell'epatite B è un virus a DNA appartenente alla famiglia degli Hepadnaviridae la cui trasmissione avviene per via parenterale apparente attraverso il contatto con fluidi corporei contaminati ma, poiché persiste sulle superfici per almeno sette giorni, il contagio può avvenire anche per via parenterale inapparente tramite veicoli contaminati e minime lesioni della cute. Un'ulteriore modalità di trasmissione, comune nelle aree altamente endemiche, è quella perinatale. Il periodo di incubazione varia fra 45 e 180 giorni ma solitamente è compreso tra i 60 e i 90 giorni e nella maggior parte dei casi l'infezione è asintomatica ma in caso contrario presenta un esordio insidioso con stanchezza, perdita di appetito, disturbi addominali, nausea, vomito, febbre e talvolta ittero. Il rischio di cronicizzazione aumenta al diminuire dell'età dell'individuo infetto: nei neonati si verifica 9 volte su 10 mentre nell'adulto la malattia cronicizza nel 5-10% dei casi e può progredire in cirrosi epatica o in epatocarcinoma. Il tasso di letalità è dell'1% ma può aumentare nelle persone di età superiore ai 40 anni e in caso di insufficienza epatica acuta. Il cardine della prevenzione dell'epatite B si fonda sul vaccino: considerato sicuro ed efficace, fornisce immunità a lunga durata. In Italia è obbligatorio per i nuovi nati dal 1991.

Il virus dell'epatite C appartiene alla famiglia dei Flaviviridae e anche in questo caso la trasmissione avviene per via parenterale ma raramente avviene anche per via perinatale. Nella maggior parte dei casi l'infezione è asintomatica e anitterica ma in coloro che si manifesta l'esordio è insidioso con affaticamento, nausea, disturbi addominali e ittero. Nell'85% dei casi l'infezione acuta evolve in infezione cronica e i sintomi che si sviluppano anche decenni dopo l'infezione sono una conseguenza di gravi danni al fegato: l'epatite cronica progredisce nell'arco di circa di 10-20 anni in cirrosi e in successivo epatocarcinoma. Ad oggi non esiste un vaccino contro l'epatite C e l'uso di immunoglobuline non si è mostrato efficace; perciò, la prevenzione dipende esclusivamente dalla riduzione del rischio di esposizione al virus che si concretizza tramite l'applicazione di generali norme igieniche.

Il virus dell'epatite D è stato classificato tra i virus satelliti i quali, per la loro replicazione, richiedono la presenza di un virus chiamato "Helper". In particolar modo, per infettare le cellule epatiche il virus dell'epatite D richiede l'ausilio del virus dell'epatite B. L'infezione dei due virus può essere simultanea oppure può verificarsi una sovrainfezione. In entrambi i casi l'infezione può evolvere nella forma cronica e mostrare un decorso più grave rispetto all'infezione da solo virus B. Mentre i sintomi della coinfezione possono variare da lievi a gravi

ma nella maggior parte dei casi la coinfezione è autolimitante, la sovrainfezione da HDV accelera la progressione dell'infezione cronica da HBV con conseguente cirrosi ed insufficienza epatica, risultando talvolta anche fatale. La modalità di trasmissione è la stessa dell'epatite B e il periodo di incubazione varia da 2 a 8 settimane. Non è disponibile alcun trattamento specifico e vaccino per il virus dell'epatite D; tuttavia il vaccino contro l'epatite B fornisce protezione anche contro l'epatite D.

Infine, l'agente infettivo dell'epatite E è stato classificato nella famiglia dei Caliciviridae. La trasmissione avviene per via oro-fecale e l'acqua contaminata dalle feci rappresenta il principale veicolo dell'infezione; infatti, si riscontrano casi soprattutto in aree con livelli igienici inadeguati. Il periodo di incubazione della malattia varia dai 15 ai 64 giorni. L'epatite E è una malattia acuta spesso anitterica e autolimitante, molto simile all'epatite A e in rari casi può evolvere in una forma fulminante fino al decesso (il tasso di letalità è pari all'1%). I casi più gravi si verificano nelle donne gravide con un tasso di letalità che raggiunge il 20%. Rari sono i casi di cronicizzazione che coinvolgono per lo più soggetti immunodepressi. Per la prevenzione è stata proposta la somministrazione di gammaglobuline; tuttavia, la loro efficacia deve essere dimostrata. Inoltre, sono in corso ulteriori studi clinici sperimentali per la distribuzione di due vaccini.

I virus dell'epatite hanno quindi modalità di trasmissione e gravità differenti e non tutti sono di interesse alimentare. Infatti, è l'epatite A la forma principale di epatite che si contrae con il cibo. Pertanto, lo studio vuole fornire informazioni in merito alla diffusione del virus dell'epatite A nel mondo e in Europa, individuando gli alimenti più frequentemente coinvolti e le strategie da adottare per ridurre il rischio di infezione alimentare.

2 Il virus dell'epatite A (HAV – Hepatitis A Virus)

Il virus dell'epatite A è un piccolo virus a RNA appartenente alla famiglia dei Picornavirus: Picornaviridae è un'ampia famiglia di virus di dimensioni comprese tra i 25 e i 30nm, presentano simmetria icosaedrica, sono privi del rivestimento lipidico e sono in possesso di un genoma a RNA a singolo filamento positivo. Inoltre, i virus membri della famiglia dei Picornavirus rientrano nella classe IV della classificazione di Baltimore, proposta dal biologo David Baltimore (premio Nobel per la medicina, 1975) dove è possibile distinguere sette classi virali suddivise a seconda della natura del loro genoma e del loro tipo di replicazione.

Il virus dell'epatite A (HAV) è un virus di forma sferica con dimensioni che variano dai 27 ai 28nm di diametro e, come detto in precedenza per i Picornavirus, appare privo di pericapside e con una struttura superficiale del capsido che presenta simmetria icosaedrica. Sebbene condivida con i Picornavirus struttura e organizzazione genomica, il virus dell'epatite A presenta alcune caratteristiche distintive che lo inseriscono all'interno del genere Hepatovirus nel quale rientrano nove specie, tra cui Hepatovirus A, ossia l'agente eziologico dell'epatite A.

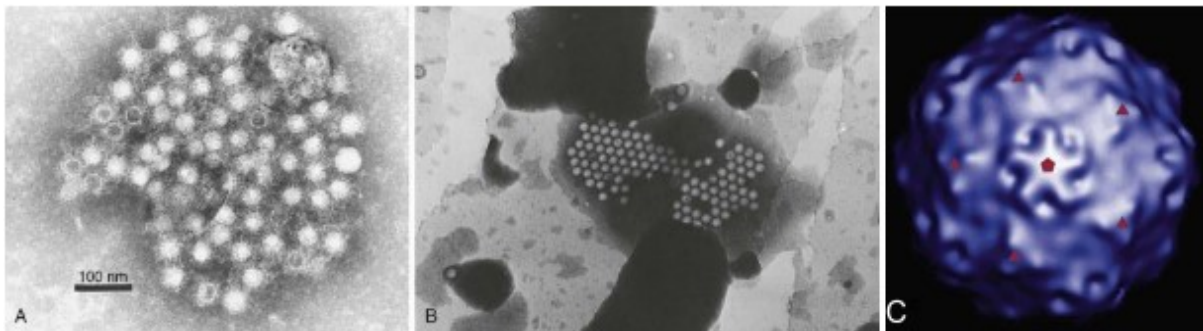


Figura 2-1. (A) particelle virali di HAV al microscopio elettronico; (B) particelle virali di virus HAV purificato e concentrato da feci umane; (C) struttura superficiale del virus dell'epatite A (Averhoff et al., 2015).

HAV è stabile in una varietà di condizioni ambientali e il capsido è particolarmente resistente rispetto ad altri Picornavirus: resiste al calore, alla maggior parte dei solventi organici e detergenti e anche ad ambienti molto acidi. La completa inattivazione negli alimenti richiede il riscaldamento ad una temperatura superiore agli 85 °C per almeno un minuto. Nonostante ciò, si sono verificati casi di epatite A anche in seguito a trattamenti termici di questo tipo suggerendo che, in tali circostanze, la carica virale venga abbassata ma non completamente inattivata. Di norma, il virus viene inattivato mediante bollitura o sterilizzazione in autoclave (a 121 °C per 30 minuti) ma può essere anche inattivato mediante l'uso di sostanze chimiche disinfettanti tra cui l'ipoclorito di sodio.

2.1 Cenni storici

I primi casi di ittero contagioso furono documentati tra le popolazioni dell'antica Cina e dei greci, al tempo di Ippocrate. Ad ogni modo, sebbene i sintomi descritti da queste antiche testimonianze siano simili a quelli attualmente riscontrati, non possiamo affermare con certezza che le patologie descritte fossero una conseguenza dell'infezione da HAV.

Le prime epidemie di epatite, quasi certamente di epatite A, furono segnalate in Europa nel XVII e nel XVIII secolo ma fu McDonald nel XX secolo ad ipotizzare che forme sporadiche ed epidemiche di ittero contagioso fossero dovute ad un agente virale. In seguito, ulteriori studi scientifici condotti su volontari infetti hanno dimostrato che l'agente eziologico della malattia poteva essere trasmesso sia per via orale che parenterale e che all'infezione seguiva un'immunità a lungo termine. Per di più, tali lavori indicarono che l'infezione poteva essere prevenuta o attenuata somministrando immunoglobuline umane normali (IgG). Le prime evidenze scientifiche si ottennero durante la Seconda guerra mondiale quando, durante una epidemia di epatite A, furono somministrate immunoglobuline a più di 2700 soldati americani riducendo il tasso di incidenza della malattia dell'86% fra le truppe immunizzate (Averhof et al., 2018). Tra gli anni '50 e '60, furono approfondite queste conoscenze, conducendo una serie di studi su volontari umani, precisando il periodo di incubazione dell'agente virale, l'infettività degli individui malati e il periodo di viremia. Nel 1973, attraverso l'uso della microscopia elettronica, furono rilevate particelle di 27nm di diametro simili a virus, individuando in queste l'agente casuale della malattia. Inoltre, venne confermata la distinzione proposta nel 1950 da MacCallum e adottata nel 1953 dal *World Health Organization's First Expert Committee on Viral Hepatitis*, tra epatite infettiva ed epatite sierica.

Le ricerche sul virus dell'epatite A culminarono con lo sviluppo e l'autorizzazione dei vaccini, avvenuta a partire dal 1995.

2.2 Struttura e genoma del virus dell'epatite A

Il virus dell'epatite A è composto da ssRNA a polarità positiva di 7478 nucleotidi di lunghezza. Il genoma è organizzato in due regioni non codificanti poste a ciascuna delle estremità e da un singolo frame di lettura (ORF – *Open Reading Frame*) di 6681 nucleotidi che codifica per una

poliproteina lunga 2227 amminoacidi che mediante tagli auto-catalitici verrà scissa in proteine più piccole.

L'estremità 5' dell'RNA virale è legata in modo covalente ad una piccola proteina chiamata VPg che agisce come primer durante la replicazione dell'RNA virale e aiuta quest'ultimo ad associarsi ai ribosomi dell'ospite. Inoltre, possiede una lunga regione non tradotta che si ripiega in una struttura secondaria necessaria per le fasi di replicazione e traduzione del genoma. L'estremità 3' presenta una regione non codificante di 63 nucleotidi a cui è legata una coda poli(A).

La regione codificante è stata suddivisa in tre parti, denominate P1, P2 e P3. La regione P1 è composta dai primi 2373 nucleotidi e codifica per le proteine strutturali del capsido mentre i restanti nucleotidi nelle regioni P2 e P3 codificano per proteine non strutturali associate alla sintesi dell'RNA e all'assemblaggio del virione.

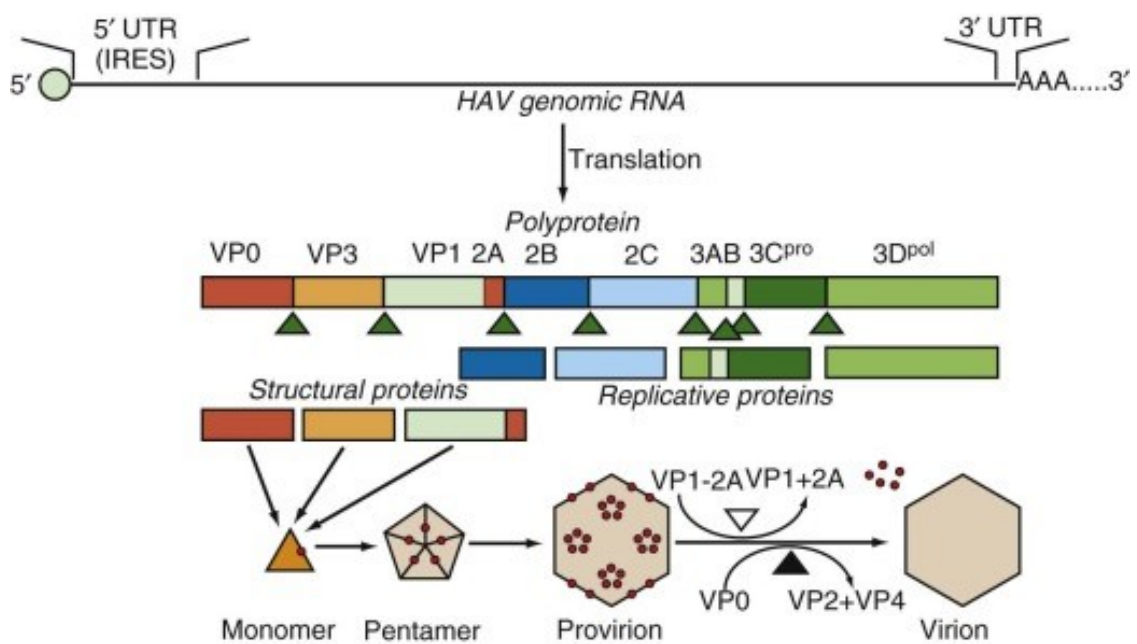


Figura 2-2. RNA virale di HAV, scissione della poliproteina e assemblaggio del virione (Averhoff et al., 2015).

L'assemblaggio del virione avviene in diversi passaggi, rappresentati in Figura 2-2. Dalla scissione della poliproteina tradotta ad opera di una singola proteasi virale 3C, codificata nella regione P3, si otterranno le proteine strutturali del capsido: VP0 (precursore di VP2 e VP4), VP3 e VP1-2A. In un primo momento, queste rimangono associate come monomero e successivamente si assemblano a formare una subunità pentamerica. Dodici coppie della subunità pentamerica si associano a formare un procapside mentre l'RNA, una volta terminata la sua replicazione, migra all'interno del capsido a formare un provirione. In seguito, l'estensione 2A del precursore proteico VP1-2A, essenziale per il corretto assemblaggio delle subunità pentameriche, viene rimossa dalle proteasi cellulari mentre VP0 viene scissa per produrre le proteine strutturali VP2 e VP4, completando lo sviluppo del capsido. Il virione maturo non è citolitico ma viene rilasciato per esocitosi dagli epatociti.

Sulla base dell'analisi di un segmento di 168 nucleotidi della regione VP1-2A, il virus dell'epatite A è stato classificato in sei genotipi: i primi tre, suddivisi a loro volta nei sottotipi A e B, infettano l'uomo. I genotipi e i sottotipi di HAV mostrano una particolare distribuzione geografica; nello specifico, dai dati sulla distribuzione è emerso che il genotipo I è il più diffuso nel mondo. In particolar modo, il genotipo IA è diffuso in aree a bassa endemicità come Europa e Stati Uniti. Inoltre, sebbene sia stata individuata una varietà di genotipi, sembra esserci un unico sierotipo. Il sito attivo nel quale avviene il legame dell'anticorpo con il virione si trova sulle proteine strutturali VP1 e VP3 ed è composto da epitopi sovrapposti che si combinano per formare un sito antigenico a cui sono indirizzati gli anticorpi neutralizzanti che bloccano la capacità di penetrazione del virus nelle cellule bersaglio.

3 Infezione nell'uomo

3.1 Vie di trasmissione

La trasmissione avviene per via oro-fecale attraverso il contatto di individui infetti e non infetti o per mezzo del consumo di alimenti di origine animale o vegetale e acqua contaminati da materiale fecale.

Studi sperimentali hanno dimostrato che il virus è presente nelle feci già dai 14 ai 21 giorni prima dell'esordio dei sintomi, facendo dell'uomo un eccellente serbatoio per la crescita e la diffusione del virus. Inoltre, la presenza del virus nelle feci sia di bambini che adulti è stata rilevata da 1 a 3 mesi dopo la malattia dimostrando come, soprattutto nei neonati e nei bambini più piccoli, la diffusione si possa protrarre per lunghi periodi. Tuttavia, è molto probabile che il periodo di infettività sia molto più breve rispetto al periodo in cui l'RNA di HAV è rilevabile mediante test immunoenzimatici o PCR nelle feci, nel siero e nella saliva. Infatti, ulteriori studi sperimentali ed epidemiologici hanno dimostrato che il periodo di infettività prosegue per otto giorni dalla comparsa dell'ittero.

3.2 Patogenesi e manifestazioni cliniche

La malattia ha un periodo di incubazione di 15-50 giorni, con una media di 28 giorni. Il periodo di incubazione è indipendente dalla via di inoculazione del virus benché alcune osservazioni suggeriscano che potrebbe dipendere dalla dose infettante.

L'epatite A è una malattia infettiva acuta a carico del fegato: il virus è in grado di attraversare l'ambiente acido dello stomaco e raggiungere l'intestino, dove inizierà a moltiplicarsi. Una volta attraversato l'epitelio intestinale raggiunge il circolo ematico che lo trasporta al fegato; qui il virus si lega agli epatociti, penetra nel loro citoplasma e inizia la sua replicazione. In seguito, viene diffuso dalle cellule epatiche infette e attraverso la bile passa nuovamente all'intestino dove viene eliminato dall'organismo attraverso le feci.

Alcuni studi, condotti su animali da laboratorio e su individui infetti, hanno permesso di ipotizzare che il danno alle cellule epatiche sia dovuto ad una risposta immunitaria cellulo-mediata causata sia dalla secrezione di interferoni che limitano la replicazione virale, sia dall'apoptosi di cellule infette ad opera di una classe di linfociti citotossici appartenenti al

gruppo dei linfociti T mentre gli anticorpi circolanti, IgM e IgG, contengono la diffusione del virus, proteggendo cellule epatiche non infette e altri organi.

Generalmente la malattia ha un decorso autolimitante e benigno e spesso è asintomatica, soprattutto se contratta in età infantile. Al contrario, negli adulti è tipicamente sintomatica; l'esordio è improvviso con sintomi simil-influenzali molto comuni nei primi giorni della malattia come mancanza di appetito, febbre, nausea, vomito e malessere generale. I primi segni specifici compaiono dopo alcuni giorni e sono urine scure e ittero, cioè colorito giallognolo della pelle, delle mucose e delle sclere dovuto ad un aumento della concentrazione di bilirubina nel sangue, conseguenza dell'ostruzione dei condotti epatici e della ritenzione della bile che passa in circolo. Il fegato appare ingrossato e talvolta dolente. La durata è variabile (1 - 2 settimane) ma in genere dopo la terza settimana la maggior parte degli individui infetti inizia a migliorare: si riduce l'epatomegalia e ricompaiono valori normali di alanina aminotransferasi (ALT) e aspartato aminotransferasi che durante la fase acuta della malattia sono presenti nel sangue a livelli molto più elevati di quanto normale. Questi enzimi provengono dalle cellule epatiche danneggiate.

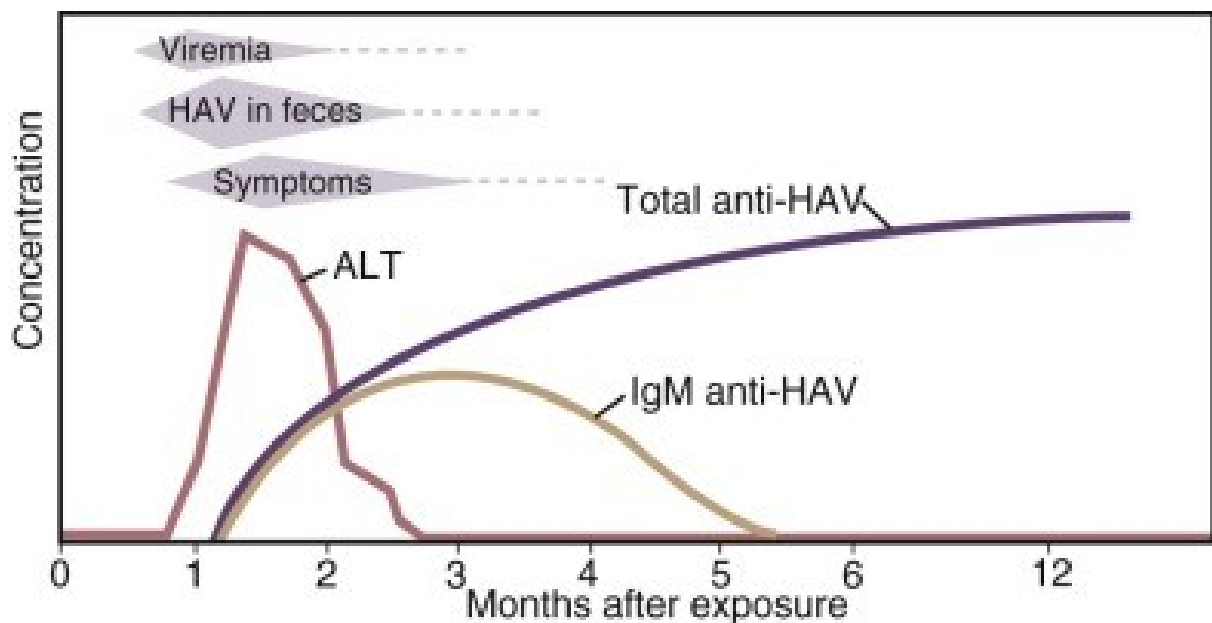


Figura 3-1. Decorso temporale dell'epatite A (Averhoff et al. 2015).

Come è possibile osservare in Figura 3-1, i soggetti infetti si riprendono completamente entro 3 mesi dall'inizio della malattia e gli anticorpi anti-HAV (Ig-G) permangono a vita a seguito dell'infezione fornendo una protezione permanente contro il virus dell'epatite A. Non sono state osservate conseguenze a lungo termine nei pazienti guariti ma possono verificarsi alcune complicanze. Ad esempio, sono stati riportati casi di colestasi e colecistite acuta, segnalati come complicanza occasionale, oltre a rischi di recidiva. Un evento particolarmente eccezionale è stato quello verificatosi a Memphis (USA) nel 1995 quando durante un'epidemia di epatite A, il 14% dei pazienti ospedalizzati ha riportato gravi complicazioni. Forme con andamento grave o forme fulminanti caratterizzate da insufficienza epatica sono state osservate soprattutto in soggetti adulti affetti da patologie debilitanti o da malattie epatiche croniche. Sebbene avvengano molto raramente, manifestazioni extraepatiche possono includere il coinvolgimento cardiaco: in effetti, i pazienti affetti da epatite acuta possono mostrare bradicardia. Altre complicanze extraepatiche meno comuni sono la sindrome di Guillan-Barré, pancreatite acuta, insufficienza renale e anemia emolitica.

Da un rapporto del 2017 dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) è emerso che nel 2016, l'epatite A è stata la causa di 7134 decessi che rappresentano lo 0,5% della mortalità totale dovuta alle epatiti virali. La malattia è letale in una percentuale di casi che si attesta fra lo 0,1 e lo 0,3% ma negli adulti sopra ai 50 anni, il tasso di letalità può aumentare fino all'1,8%.

Non è clinicamente distinguibile da altre forme di epatite virale. I test degli enzimi epatici (ALT) sono sensibili ad un eventuale danno epatico ma non sono specifici per l'epatite A. La diagnosi viene confermata dal rilevamento di IgM specifiche nel siero. Spesso si fa ricorso anche a tecniche di PCR, utili nello studio di campioni alimentari. Inoltre, non esiste una terapia specifica. In genere si segue una terapia sintomatica di supporto volta a trattare gli effetti della malattia e al recupero dei liquidi persi, mentre è da evitare l'assunzione di farmaci antiemetici; il ricovero in ospedale non è indicato a meno di necessità, per prevenire la diffusione del virus in un ambiente dove molti sono i soggetti immunodepressi.

4 Diffusione di HAV nel mondo e in Europa

Ogni anno il cibo non sicuro causa 600 milioni di casi di malattie trasmesse dagli alimenti (MTA) e 420.000 decessi. I virus sono tra gli agenti patogeni più coinvolti e, pertanto, rappresentano un grave problema di salute pubblica. Gli alimenti contaminati funzionano da veicolo per i patogeni virali con i quali sono venuti in contatto senza che questi debbano moltiplicarsi nell'alimento: si parla dunque di malattie veicolate dagli alimenti, tra le quali una delle più frequenti è l'epatite A.

A livello globale, si stima che ogni anno il virus dell'epatite A sia responsabile di circa 1 milione di casi ma considerando anche le infezioni asintomatiche, il numero di individui infetti potrebbe essere di alcune decine di milioni.

Nonostante sia presente in tutto il mondo, vi sono importanti differenze geografiche nella sua distribuzione; tali differenze sono dovute per lo più alle diverse condizioni igienico-sanitarie.

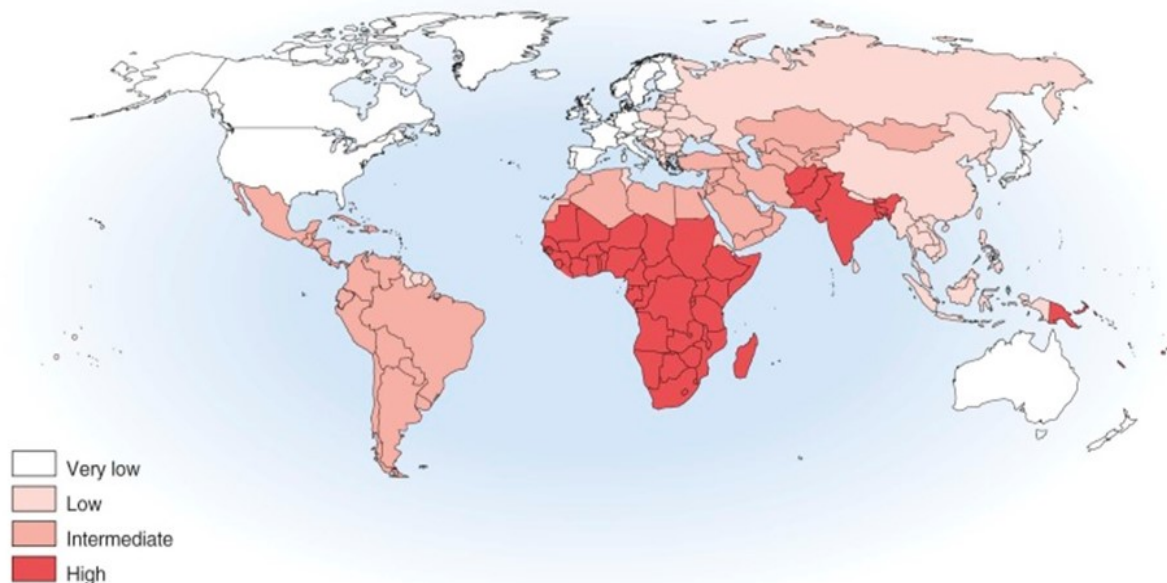


Figura 4-1. Diffusione della malattia in relazione alle categorie di endemicità (Averhoff et al., 2015).

Solitamente si riconoscono tre categorie geografiche di endemicità: i) aree ad alta endemicità, evidenziate in Figura 4-1 nell’Africa subsahariana e in Asia meridionale che presentano scarse condizioni igienico-sanitarie, ii) aree ad endemicità intermedia che includono quei Paesi in via di sviluppo caratterizzati da condizioni igienico-sanitarie variabili e iii) aree a bassa endemicità che comprendono i Paesi industrializzati caratterizzati da condizioni igienico-sanitarie ottimali (Gossner et al., 2015).

Nelle aree in cui l’infezione è endemica sono, oltre alle scarse condizioni igienico-sanitarie, l’accesso limitato all’acqua potabile e la mancanza di una rete fognaria efficiente a favorire la diffusione della malattia. In queste aree sono i bambini ad essere coinvolti in misura maggiore, i quali non manifestano una sintomatologia evidente. Inoltre, poiché la malattia induce una immunità permanente, almeno il 90% della popolazione entro i 10 anni di età possiede anticorpi diretti contro il virus dell’epatite A. Pertanto, dato che la maggior parte degli adulti è immune al virus, i tassi di prevalenza entro questa fascia d’età sono bassi; tuttavia, gli adulti non ancora immunizzati sono più suscettibili e dunque a rischio anche considerando le limitate possibilità di accesso a cure mediche efficienti.

Nelle aree a moderata endemicità, con almeno il 50% di sieroprevalenza entro i 15 anni di età e meno del 90% entro i 10 anni di età, a bassa endemicità, con almeno il 50% di sieroprevalenza entro i 30 anni e inferiore al 50% entro i 15 anni e ad endemicità molto bassa, con sieroprevalenza inferiore al 50% entro i 30 anni di età, il virus non si diffonde così facilmente grazie a migliori condizioni igienico-sanitarie. In queste aree l’incidenza dei casi e l’età media dei soggetti infettati è spesso più elevata rispetto ad aree altamente endemiche in conseguenza ad una società nella quale sono presenti molti più soggetti sensibili non ancora immunizzati che, non avendo sviluppato la malattia in età pediatrica, hanno maggiori probabilità di manifestare i sintomi dell’infezione in età adulta. Tuttavia, nonostante il virus dell’epatite A sia altamente trasmissibile e l’insorgenza di epidemie sia spesso segnalata proprio in quei paesi dove l’immunità di gregge è bassa, l’incidenza della patologia mostra un andamento in diminuzione grazie ai costanti miglioramenti delle condizioni igieniche e socioeconomiche ma soprattutto grazie all’adozione di efficaci programmi di immunizzazione ottenuti con l’autorizzazione del vaccino.

Negli Stati Uniti, tra il 1980 e il 1990, furono segnalati ogni anno al *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) tra i 25.000 e i 35.000 casi di epatite A, anche se il numero effettivo di

infezioni potrebbe essere stato circa dieci volte maggiore. I tassi più elevati si sono riscontrati nei bambini di età compresa tra i 5 e i 14 anni, con oltre la metà delle infezioni che si è verificata nei bambini di età inferiore ai 10 anni. Con la disponibilità del vaccino a partire dal 1995, i tassi di incidenza sono diminuiti del 95% al 2010, raggiungendo un minimo di 0,5 casi ogni 100.000 abitanti. Quello stesso anno furono segnalati 1670 casi contro i 31.000 del 1995 (Averhoff et al., 2015).

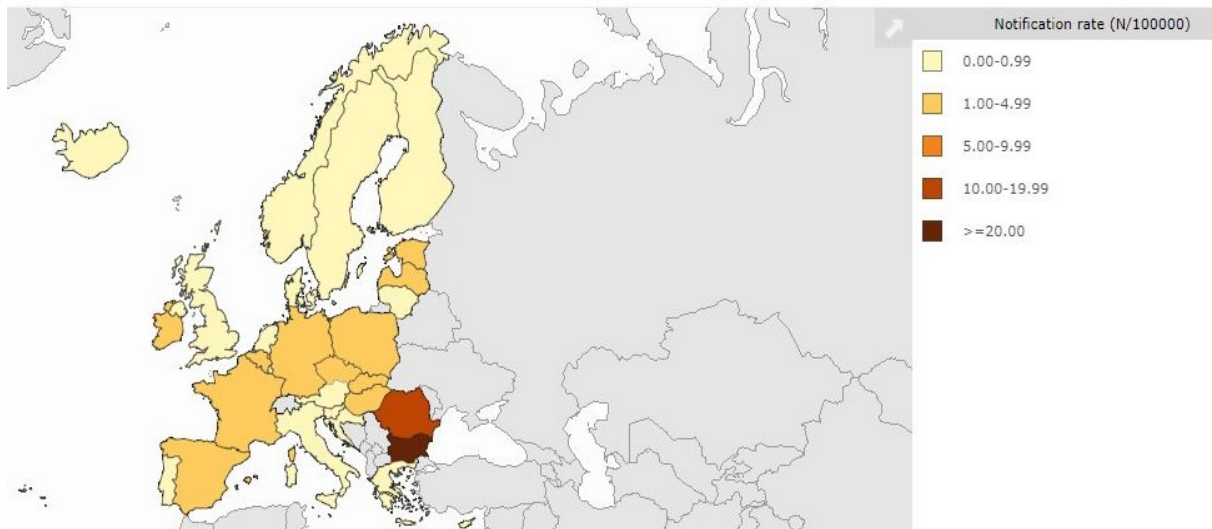


Figura 4-2. Numero di casi di epatite A ogni 100.000 abitanti segnalati all'interno dell'Unione Europea nel 2019 (ECDC, 2021).

In Europa l'incidenza complessiva è diminuita da 10 casi ogni 100.000 abitanti nel 1997 a 2,5 casi ogni 100.000 abitanti nel 2011 (Gossner et al., 2015). Nel 2019, il tasso di incidenza è stato di 2,19 casi ogni 100.000 abitanti con un andamento in calo rispetto all'anno precedente. Come evidenziato in Figura 4-2, le aree maggiormente interessate sono quelle orientali: i tassi più elevati sono stati riscontrati in Romania (17,26 casi/100.000 abitanti) e Bulgaria (21,60 casi/100.000 abitanti). Complessivamente i casi confermati dall' *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) sono stati 11370, mentre nel 2020 sono scesi a 4397. Anche in territorio europeo, la fascia d'età più coinvolta è quella tra i 5 e i 14 anni (ECDC, 2021).

Negli ultimi anni sono stati segnalati diversi focolai di epatite A all'interno dell'UE: alcuni hanno coinvolto soggetti ad alto rischio, altri si sono diffusi nella popolazione. Questi focolai sono stati suddivisi in tre gruppi. Nel primo gruppo rientrano le epidemie che coinvolgono i residenti UE che hanno soggiornato in aree ad alta endemicità: in questi casi è plausibile una

trasmissione per via alimentare e/o idrica. Al secondo gruppo appartengono le epidemie avvenute all'interno del territorio comunitario per le quali la principale modalità di trasmissione è il contatto stretto tra individui infetti e non infetti. Il terzo gruppo riguarda le epidemie di origine alimentare dove gli alimenti contaminati rappresentano il principale veicolo del virus dell'epatite A (Gossner et al., 2015).

Come già segnalato, anche in Europa la quota della popolazione suscettibile al virus sta crescendo rapidamente a causa della diminuzione dell'incidenza dell'epatite A. Questo porta ad un numero sempre maggiore di adulti suscettibili all'infezione e l'età media più elevata potrebbe favorire lo sviluppo di forme gravi della malattia conducendo di conseguenza a tassi di letalità più elevati. D'altro canto, i miglioramenti nelle condizioni igienico-sanitarie conducono ad un'incidenza minore, compensando i più alti tassi di letalità. Per questi motivi, ad oggi, nonostante il numero totale di casi sia in continua diminuzione, l'epatite A rimane ancora un importante problema di salute pubblica, il che evidenzia la necessità di una maggiore consapevolezza sia del rischio di infezione per il singolo individuo sia per la possibilità che si sviluppino epidemie che possano coinvolgere una porzione abbastanza ampia della popolazione. Ragion per cui, l'Organizzazione Mondiale della Sanità raccomanda la vaccinazione infantile nei paesi ad endemicità intermedia mentre nei paesi dove l'endemicità è bassa o molto bassa, la raccomandazione è di vaccinare solo i gruppi a rischio. Alcuni paesi dell'UE come la Grecia dal 2008 e altre regioni all'interno del territorio europeo, come la Catalogna (Spagna) e la Puglia (Italia) dal 1998, raccomandano la vaccinazione di tutta la popolazione. Al contrario, la vaccinazione non è raccomandata nei paesi ad alta endemicità dato l'alto tasso di immunizzazione.

In Italia, il modello epidemiologico dell'infezione è notevolmente cambiato negli ultimi decenni, grazie a miglioramenti igienici e progressi socioeconomici. Di conseguenza, l'Italia è passata da uno stato di endemicità elevato ad uno stato di endemicità relativamente basso. I dati, provenienti dal Sistema Epidemiologico Integrato per l'Epatite Virale Acuta (SEIEVA) indicano che il tasso di incidenza è sceso da 4/100.000 abitanti nel 1991 a 0,7/100.000 abitanti

nel 2011 con un picco di 19 casi ogni 100.000 abitanti avvenuto nel 1997 in seguito ad un'epidemia di epatite A verificatasi in Puglia (EpiCentro, 2021).

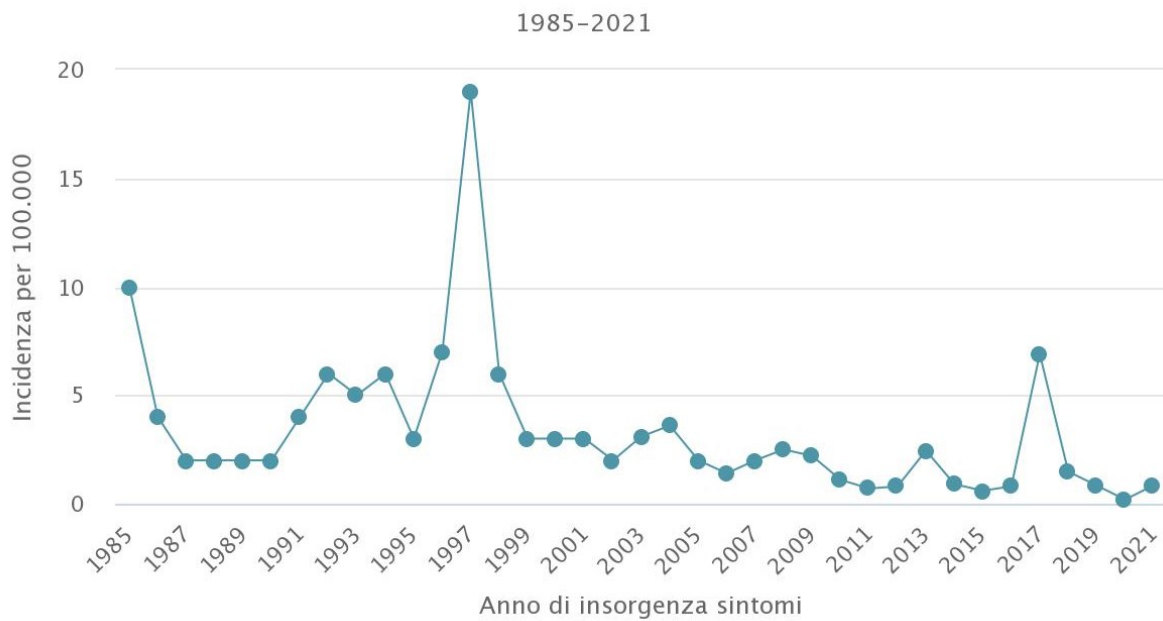
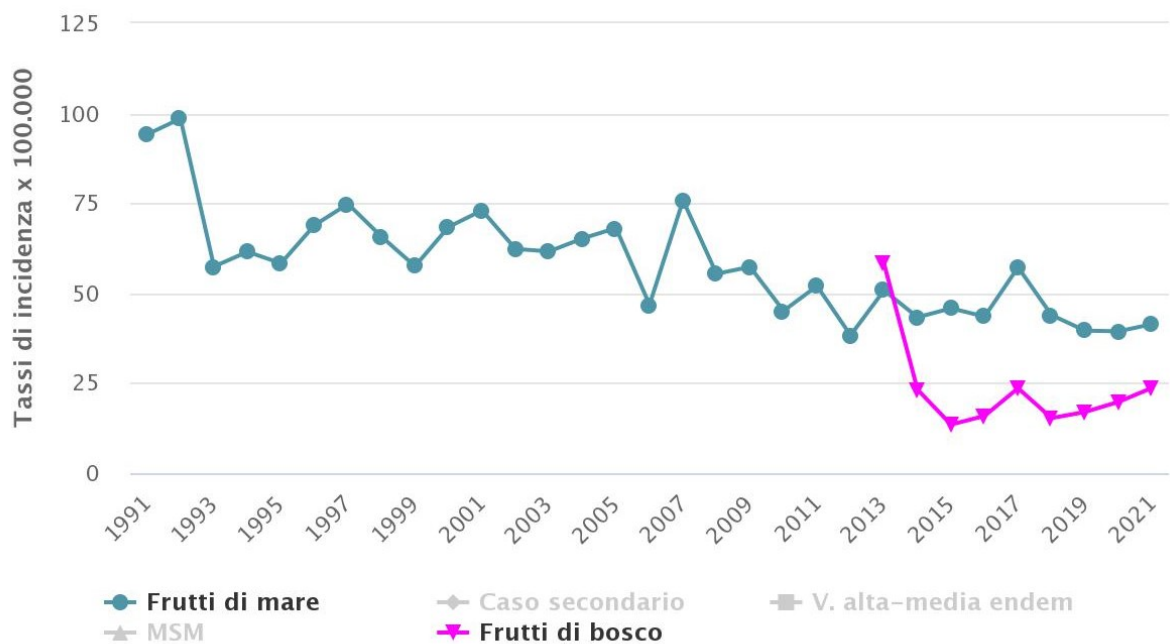


Figura 4-3. Andamento temporale del virus dell'epatite A dal 1985 al 2021 rilevato dal Sistema Epidemiologico Integrato per l'Epatite Virale Acuta in Italia (epicentro.iss.it/epatite/dati-seieva).

Nel corso del 2020, il numero di casi notificati è stato in netta diminuzione, molto probabilmente a causa delle misure di contenimento adottate nel corso dell'epidemia di SARS-CoV-2. Il tasso di incidenza è stato di 0,19 casi ogni 100.000 abitanti rispetto ai 0,84 casi ogni 100.000 abitanti nel 2019. Nel 2021 si è registrato un lieve aumento dell'incidenza (0,25/100.000) rispetto al 2020: sono stati 126 i casi notificati al SEIEVA e, rispetto agli anni precedenti, gli adulti sono stati la fascia d'età più colpita (35-54 anni e >55 anni). Inoltre, dai dati SEIEVA è emerso che nel 41,4% e nel 23,7% dei casi confermati nel 2021 il contagio si è verificato rispettivamente in seguito al consumo di molluschi crudi o poco cotti e frutti di bosco congelati.



Seieva

Figura 4-4. Percentuale di casi di epatite A sul totale in seguito al consumo di frutti di mare e frutti di bosco contaminati nel periodo 1991-2021 (epicentro.iss.it/epatite/dati-seieva).

5 HAV negli alimenti

5.1 Fonti di contaminazione nella filiera produttiva

La contaminazione degli alimenti può aver luogo in un qualsiasi punto della filiera produttiva secondo la stessa logica *from farm to fork*: molti sono i fattori che concorrono al rischio di contaminazione durante la produzione primaria, la lavorazione post-raccolta e la distribuzione. Tuttavia, gli attuali sistemi di sorveglianza non sempre permettono di identificare gli alimenti come potenziali veicoli del virus dell'epatite A, poiché i lunghi tempi di incubazione non permettono di risalire agli alimenti coinvolti. Infine, è necessario ricordare che spesso i sintomi non richiedono particolari cure; pertanto, sono pochi gli episodi di denuncia e questo limita ulteriormente la possibilità di individuare le fonti di contaminazione lungo la filiera produttiva.

Le indagini epidemiologiche hanno spesso indicato gli addetti alla manipolazione degli alimenti presenti nella linea di produzione o nel punto vendita come una delle principali fonti di contaminazione; un singolo individuo infetto può facilmente contaminare i prodotti finiti sia cotti che crudi da destinare al mercato e trasmettere la malattia a decine se non centinaia di persone nelle due settimane antecedenti i sintomi. Inoltre, durante la lavorazione gli alimenti subiscono numerosi processi di manipolazione che aumentano il rischio di una contaminazione crociata a partire da superfici e attrezzature contaminate.

Focolai di epatite A sono stati associati anche al consumo di prodotti freschi contaminati non solo dagli addetti durante le fasi di manipolazione. Ad esempio, le materie prime di origine vegetale possono essere contaminate dal contatto con le acque di irrigazione a loro volta inquinate da acque reflue o dal contatto con biosolidi non trattati mentre i prodotti ready-to-eat potrebbero essere contaminati in azienda durante le fasi di lavaggio che portano al loro confezionamento. Per i molluschi bivalvi, l'allevamento e la raccolta in prossimità di fonti note di liquami o scarichi industriali rappresentano un evidente fattore di rischio. Al contrario, le epidemie trasmesse dall'acqua sono insolite nei paesi sviluppati poiché i processi di disinfezione come la clorazione sono sufficienti a rendere l'HAV non infettivo.

L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority - EFSA*) e il Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (*European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC*) hanno individuato alcune potenziali categorie di alimenti che

rappresentano un veicolo per la diffusione del virus dell'epatite A. Gli alimenti più frequentemente coinvolti sono pesce e prodotti a base di pesce, crostacei, molluschi, vegetali, succhi, frutti di bosco misti sia freschi che congelati, come anche riportato in una nota del Ministero della Salute. In generale, si stima che i casi di epatite A attribuibili al consumo di alimenti contaminati siano pari al 2-7% del totale (Randazzo e Sánchez, 2020).

È bene sottolineare che i virus di origine alimentare possono persistere per mesi nei prodotti alimentari o nell'ambiente e la maggior parte di essi è più resistente dei batteri alle abituali misure di controllo utilizzate dall'industria alimentare. Ad esempio, le condizioni di conservazione in regime di refrigerazione, con temperature comprese tra i 3 e i 10 °C, non garantiscono l'inattivazione del virus che anzi, a seconda della matrice alimentare, può persistere e mantenere la sua infettività per tempi variabili. Allo stesso modo il congelamento previene l'inattivazione di HAV che si può ritrovare su fragole, mirtilli e lamponi congelati per oltre tre mesi. Inoltre, il virus dell'epatite A persiste in condizioni di bassa umidità – su lattuga e pomodori secchi - e nemmeno l'attuale rapporto di concentrazione anidride carbonica: azoto utilizzato nelle tecnologie di confezionamento in atmosfera modificata (MAP – *Modified Atmosphere Packaging*) risulta efficace nel ridurre la carica virale (Randazzo e Sánchez, 2020). Pertanto, l'insorgenza di epidemie di epatite A è correlata anche alla persistenza e alla stabilità dei virioni in ambienti e condizioni fisico-chimiche diverse. Per questi motivi, numerosi studi si sono concentrati sull'effetto delle tecnologie di lavorazione e conservazione adottate dall'industria su matrici ad alto rischio in una prospettiva di sicurezza alimentare.

5.2 Prevenzione della diffusione di HAV

Bidawid et al. (2000) hanno osservato il trasferimento del virus dell'epatite A da polpastrelli – contaminati artificialmente - di individui infetti a foglie di lattuga fresca per valutare gli effetti dei pretrattamenti utilizzati al fine di interrompere il suo trasferimento e fornire utili informazioni sulle tecniche da adottare per migliorare la sicurezza alimentare. Lo studio ha permesso di evidenziare un trasferimento del $9,2\% \pm 0,9\%$ del virus prima dei trattamenti con acqua e/o agenti topici. Successivamente è stato valutato il trasferimento del virus dopo i) risciacquo con acqua, ii) applicazione di un detergente domestico e iii) uso di un gel detergente senza risciacquo a base alcolica. Il lavaggio con acqua e/o agenti topici seguito da risciacquo ha permesso di ridurre il numero di particelle virali trasferite alla lattuga ad un valore compreso tra lo 0,3% e lo 0,6% a seconda dell'agente topico utilizzato. Il lavoro ha dimostrato

che il lavaggio con acqua e agenti topici riduce significativamente la probabilità che il virus venga trasferito dagli addetti alla manipolazione degli alimenti durante le varie fasi di produzione.

Come si può osservare dalla Tabella 5-2, non è stato rilevato alcun trasferimento quando i polpastrelli sono stati risciacquati con un volume di acqua pari a 15 ml. Tuttavia, volumi d'acqua più piccoli non sono risultati efficaci nel rimuovere completamente il virus; pertanto, è possibile concludere che banalmente anche il volume d'acqua utilizzato e di conseguenza il tempo di lavaggio influenza l'efficacia di quest'ultimo.

Tabella 5-2. Percentuale di recupero del virus HAV da polpastrelli contaminati artificialmente e da lattuga senza e con procedure di lavaggio e disinfezione (Bidaway et al., 2000).

Surface ^a	Drying	Disinfection procedure ^b	Lettuce touched	% Virus recovery (mean ± SE) from:	
				Fingers	Lettuce
Finger	-	None	-	77.5 ± 6.9	
Lettuce	-	None	-		88.5 ± 3.7
Finger	+	None	-	70.5 ± 3.5	
Lettuce	+	None	-		75.8 ± 3.1
Finger	+	Water, towel	-	3.7 ± 0.6	
	+	None	+	53.4 ± 4.9	7.0 ± 0.6 (9.2 ± 0.9) ^c
	+	Water (15 ml), towel	+	6.2 ± 0.7	0
	+	Water (1 ml), towel	+	5.9 ± 0.8	0.23 ± 0.05 (0.31 ± 0.07)
	+	P1, water, towel	-	6.5 ± 1.2	
	+	P1, water, towel	+	2.0 ± 0.4	0.30 ± 0.06 (0.39 ± 0.08)
	+	P2, water, towel	-	4.1 ± 0.8	
	+	P2, water, towel	+	5.2 ± 0.8	0.26 ± 0.05 (0.34 ± 0.7)
	+	62% ethanol (gel), dry	-	64.3 ± 4.0	
	+	62% ethanol (gel), dry	+	45.7 ± 5.0	0.49 ± 0.07 (0.64 ± 0.09)
	+	75% ethanol, dry	-	24.1 ± 2.8	
	+	75% ethanol, dry	+	18.8 ± 3.5	0.35 ± 0.06 (0.46 ± 0.08)

Per l'appunto, Hollinger e Ticehurst (1996) hanno osservato che il numero di particelle virali escreto con le feci di individui infetti variava da 10^6 a 10^9 particelle virali/g di materiale fecale. Come per molti altri virus, la dose infettante è di 10-100 particelle virali e di conseguenza, una quantità pressoché impercettibile di materiale fecale è pienamente in grado di favorire la diffusione del virus e l'insorgenza della malattia. Alla luce di tali risultati, l'accento dovrebbe essere posto sul corretto lavaggio delle mani nonché sull'uso di guanti monouso per la preparazione di alimenti come i prodotti di IV gamma che non richiedono alcuna lavorazione (lavaggio o cottura) prima del loro consumo.

L'Operatore del Settore Alimentare (OSA) deve quindi prestare attenzione alle buone pratiche agricole (GAP – *Good Agricultural Practices*) e alle norme di buona fabbricazione (GMP – *Good Manufacturing Practices*), ossia ad un insieme di norme, procedure e linee guida essenziali per la produzione di alimenti ritenuti sani e sicuri, in quanto costituiscono un valido supporto per l'applicazione dei sistemi di autocontrollo così da prevenire la contaminazione di materie prime e superfici di lavoro. Tuttavia, i sistemi di autocontrollo non sempre sono sufficienti, perciò le industrie alimentari devono prestare attenzione anche allo sviluppo di un adeguato sistema di analisi dei pericoli e punti critici di controllo (HACCP - *Hazard Analysis and Critical Control Points*) per garantire un'adeguata gestione del rischio associato ai virus potenzialmente presenti nel processo produttivo (Koopmans e Duizer, 2004).

Oltre a porre in evidenza l'importanza dei manuali di corretta prassi operativa, altre misure di prevenzione alla diffusione di HAV sono fornite dalle autorità sanitarie locali. Ad esempio, il Ministero della Salute precisa che in ambiente domestico il lavaggio e la cottura sono le uniche misure efficaci per eliminare il virus dagli alimenti considerati a rischio, tra i quali molluschi bivalvi e altri prodotti freschi consumati crudi come frutta e verdura, mentre per le aree di natura endemica è raccomandato il consumo di solo cibi cotti e acqua in bottiglia. Inoltre, la vaccinazione è consigliata dalle autorità locali prima della partenza verso aree in cui il virus ha natura endemica.

Negli Stati Uniti, nel 1996, l'*Advisory Committee on Immunization Practices* ha proposto la vaccinazione anche per gli operatori del settore alimentare sebbene sia improbabile che questa influisca sull'incidenza complessiva della malattia. Attualmente la maggior parte dei paesi preferisce sottolineare l'uso di una rigorosa igiene personale per prevenire la diffusione del virus nella popolazione (Koopmans e Duizer, 2004).

5.3 Molluschi bivalvi

I molluschi bivalvi appartengono alla classe Bivalvia, phylum Mollusca e per quanto riguarda il numero di specie sono uno dei gruppi più numerosi del regno animale. Il loro nome è associato alla presenza di due valve di materiale calcareo, unite da un legamento elastico, che racchiudono il corpo dell'animale. Le specie più allevate e pescate in Italia sono le cozze, le vongole veraci e i lupini, seguite da altre specie minori.

I molluschi bivalvi sono animali filtratori; vengono allevati nelle aree costiere di diversi paesi del mondo dove si nutrono assumendo l'alimento disciolto nell'acqua, introducendo quest'ultima attraverso due sifoni, uno inalante ed uno esalante. Filtrando grandi quantità di acqua possono di conseguenza accumulare le particelle presenti in essa, diventando eccellenti veicoli di patogeni batterici e virali. A tal proposito, è scientificamente dimostrato che i molluschi bivalvi siano in grado di concentrare i virus fino a 99 volte rispetto all'acqua nella quale essi si trovano.

Da un'indagine condotta su sei database, tra il 1980 e il 2012, sono stati segnalati 368 focolai associati al consumo di molluschi bivalvi (Bellou et al., 2013). Questi outbreak si sono verificati in Asia orientale, seguita da Europa, America, Oceania e Nord Africa. In totale, il virus dell'epatite A è risultato responsabile del 12,8% delle segnalazioni mentre la specie più coinvolta è stata l'ostrica (segnalata nel 58,4% dei casi) seguita dalla vongola (nel 22,6% dei casi). L'epidemia più grande documentata dallo studio si è verificata a Shanghai nel 1988: ha coinvolto 290.000 persone e provocato 47 decessi. Inoltre, il 9,5% dei focolai segnalati ha avuto luogo durante i mesi invernali: questo potrebbe essere correlato ai cambiamenti fisiologici stagionali che riducono l'attività metabolica dei molluschi, influenzando l'efficienza dei loro naturali sistemi di purificazione. È stata quindi valutata la capacità delle ostriche di accumulare microrganismi indicatori quali coliformi fecali, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e F+ Colifagi, un gruppo eterogeneo di batteriofagi la cui sopravvivenza nell'acqua di mare è simile a quella del virus HAV. Dallo studio di Burkhardt e Calci (2000) è stata evidenziata un'influenza stagionale, osservabile in Figura 5-3: è emerso che il periodo di iperaccumulo inizia quando la temperatura dell'acqua diminuisce in autunno e si conclude quando la temperatura dell'acqua inizia nuovamente a risalire. Perciò, l'accumulo dei microrganismi indicatori appare inversamente proporzionale alla temperatura. È dunque

possibile concludere affermando che la cinetica di bioaccumulo vari a seconda della specie, del tipo di microrganismo ma anche a seconda delle condizioni ambientali e della stagione.

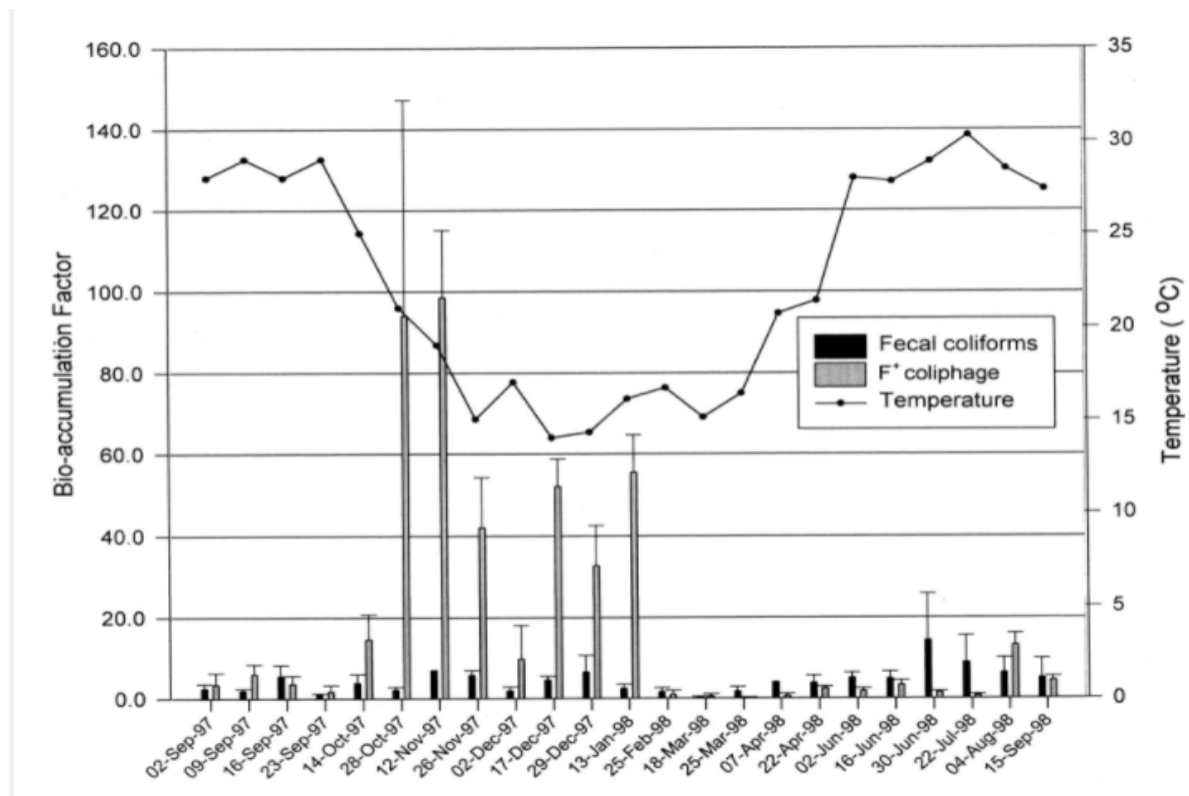


Figura 5-3. Relazione tra temperatura e accumulo di microrganismi indicatori (Burkhardt e Calci, 2000).

Fino ad oggi, i molluschi positivi al virus dell'epatite A sono stati rilevati in tutti i paesi europei con risultati variabili nel tempo e nei luoghi: ad esempio, è stato segnalato che nei molluschi bivalvi distribuiti commercialmente all'interno del territorio europeo la prevalenza di HAV varia dallo 0% al 43% (EFSA, 2011).

Nel 2007, in Francia, si è verificato un grande focolaio nazionale di epatite A associato al consumo di molluschi bivalvi crudi, in particolar modo ostriche (nell'81% dei casi) che ha coinvolto in totale 111 individui. Le indagini di tracciabilità hanno permesso di individuare il sito di allevamento coinvolto dove molto probabilmente si è verificata la contaminazione. Questa potrebbe aver avuto luogo nelle aree di allevamento o stabulazione dalla traccimazione delle acque reflue o dal rilascio di acque reflue da fognature inquinate situate vicino all'allevamento. Perciò, al fine di prevenire ulteriori focolai dovrebbero essere attuate misure per migliorare la qualità igienico-sanitaria dei molluschi, tra cui il miglioramento generale degli

impianti di raccolta e depurazione, la valutazione dei rischi negli allevamenti, individuando pericoli e le possibili misure di controllo (Guillois-Bécel et al., 2009).

In Italia, nella regione Puglia, l'epatite A è stata endemica tra il 1989 e il 1995 con un'incidenza variabile tra 5 e 70 casi ogni 100.000 abitanti. Le epidemie del 1992 e del 1994 hanno coinvolto rispettivamente 2805 e 1349 individui. Tra il 1996 e il 1997 è stata segnalata un'ulteriore epidemia di dimensioni maggiori con oltre 5000 casi e tassi di incidenza che hanno raggiunto in alcune aree un massimo di 130 casi ogni 100.000 abitanti. Il consumo di molluschi bivalvi crudi è stata la fonte di esposizione più rilevante sia nei periodi endemici sia nei periodi epidemici della malattia. Per tali motivi, nel 1998 (anno in cui il tasso di incidenza era di 14,8 casi/100.000 abitanti) in Puglia è stata introdotta la vaccinazione obbligatoria. L'incidenza della malattia è drasticamente diminuita, tuttavia l'abitudine al consumo di pesce crudo e la mancanza di interventi nei centri urbani per efficaci impianti di depurazione non possono escludere un suo peggioramento. Pertanto, i livelli di copertura vaccinale appaiono ancora inadeguati e l'aumento della suscettibilità della popolazione europea suggerisce che le autorità sanitarie locali dovrebbero effettuare un monitoraggio rigoroso e continuo, oltre a implementare un programma di recupero volto a migliorare la copertura vaccinale e rivolto in particolare a bambini e adolescenti (Chironna et al., 2012).

A dimostrazione di quanto appena detto, l'abitudine al consumo di frutti di mare non adeguatamente cotti in alcune regioni dell'Italia meridionale ha determinato l'insorgenza, in anni recenti, di importanti focolai di epatite A: nel 2004 nuovamente in Puglia, nel 2007 in Campania e nel 2009 in Sardegna.

5.4 Altri alimenti

Come si può osservare in Figura 5-4, negli ultimi anni, numerosi focolai associati al consumo di alimenti diversi dai molluschi bivalvi si sono verificati all'interno del territorio europeo (e non solo). Gli alimenti più frequentemente coinvolti sono i frutti di bosco congelati ma sono stati responsabili di casi di epatite A anche pomodori secchi ed alimenti pronti rispetto alla predominanza dei frutti di mare come principale causa di epidemie nel passato.

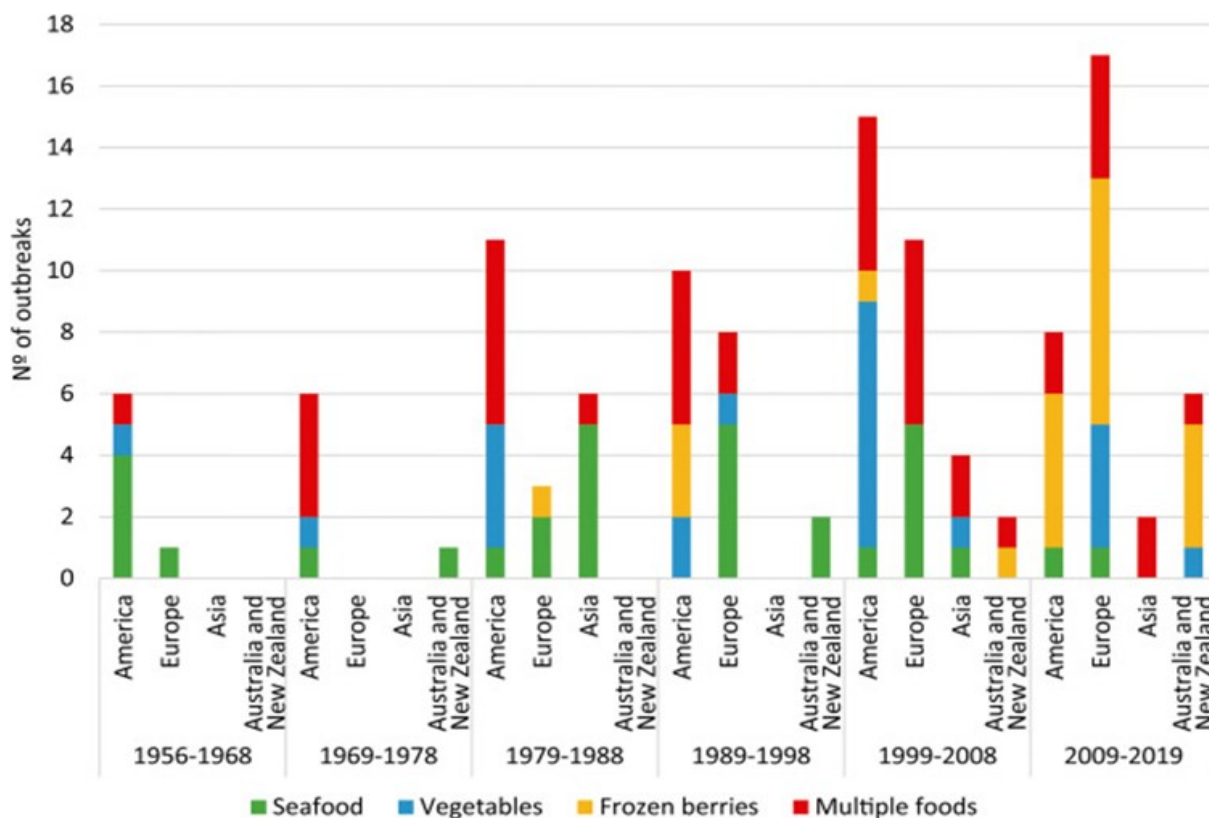


Figura 5-4. Focolai di HAV di origine alimentare registrati fino ad oggi in diverse regioni del mondo e che hanno coinvolto diversi alimenti (frutti di mare, verdure, frutti di bosco congelati e più alimenti, tra cui panini, bevande, carne, gelati, formaaggi e prodotti da forno) (Di Cola et al., 2021).

All'interno dell'Unione Europea, l'epatite A è una malattia soggetta ad obbligo di notifica: i casi segnalati sono studiati dai dipartimenti di sanità pubblica locali e le informazioni ottenute riportate nei sistemi di sorveglianza nazionale e all'interno del Sistema Europeo di Sorveglianza - TESSy (*The European Surveillance System*). Dal 1985, in Italia, oltre al sistema di sorveglianza nazionale, è in vigore il Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta che monitora i fattori di rischio associati alla malattia, contribuisce a fissare le misure preventive da intraprendere e a monitorare gli effetti dei diversi programmi di prevenzione.

L'infezione viene confermata in laboratorio attraverso test sierologici IgM anti-HAV o mediante PCR. Fu così che nel maggio 2013 la Germania segnalò attraverso il sistema di allarme rapido e di risposta per le malattie trasmissibili (*Early Warning and Response System* – EWRS) alla Commissione europea, sette casi di epatite A provenienti dal Nord Italia. Contemporaneamente altri paesi segnalavano ulteriori casi provenienti dall'Italia che dovette dichiarare la presenza di un focolaio nazionale. Dalla caratterizzazione molecolare, eseguita mediante il sequenziamento di un frammento genomico, si appurò che i vari soggetti fossero stati infettati dallo stesso ceppo. Il sequenziamento è stato eseguito seguendo i protocolli nazionali e regionali per l'Italia in cui, subito dopo la dichiarazione di epidemia nazionale, si sono ottenute prove microbiologiche che indicarono i frutti di bosco come principale veicolo del virus dell'epatite A.

Dal 1° gennaio 2013 al 31 agosto 2014 sono stati segnalati un totale di 1589 casi di epatite A associati allo stesso focolaio e provenienti da 13 paesi UE. Di questi 1589 casi il 90% si è verificato in Italia.

Ad oggi, questo sembra essere stato il più grande focolaio di epatite A di origine alimentare che abbia coinvolto una vasta area all'interno dell'Unione Europea. Tuttavia, è molto probabile che molti altri casi associati a questo focolaio non siano stati considerati soprattutto in quei paesi che non eseguono il sequenziamento come analisi di routine su campioni di individui infetti. Allo stesso modo, è plausibile che dopo una così lunga circolazione del virus, alcuni dei casi confermati siano stati infettati attraverso meccanismi di trasmissione diversi da quello alimentare o da ceppi di HAV non associati a tale focolaio.

Sulla base delle prove epidemiologiche e microbiologiche che vedono i frutti di bosco come veicolo dell'infezione, la Commissione Europea ha affidato all'EFSA l'incarico di condurre un'indagine di tracciabilità per individuare il prodotto coinvolto e il luogo di produzione. La tracciabilità dell'EFSA non ha potuto indicare un'unica fonte di contaminazione e non è nemmeno stato possibile risalire al tipo di bacca prevalentemente contaminata. Tuttavia, le indagini hanno portato ad una serie di misure per contenere l'epidemia attraverso la comunicazione del rischio mediante il sistema di allerta rapido per alimenti e mangimi (RASFF - *Rapid Alert System for Food and Feed*) e il ritiro o il richiamo di lotti di cibo contaminati o sospettati di essere contaminati. Inoltre, a seguito dell'epidemia un gruppo di esperti (HAV – NET) ha deciso di promuovere l'uso di un protocollo di sequenziamento standard per campioni

umani e alimentari in modo tale da non ostacolare il confronto dei ceppi e dei risultati di sequenziamento tra laboratori di diversi paesi.

Dai risultati raccolti da questa ed altre epidemie avvenute di recente è stato evidenziato come i frutti di bosco debbano essere considerati alimenti potenzialmente ad alto rischio in Europa, tant'è che negli ultimi anni la frequenza di epidemie associate al consumo di questo alimento è notevolmente aumentata (Severi et al., 2015).

5.5 Attuale legislazione

Nel 1999 la Commissione del Codex Alimentarius ha iniziato a preoccuparsi dell'importanza della trasmissione dei virus attraverso gli alimenti così da sviluppare raccomandazioni utili per il loro controllo pubblicando il documento *Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment*, cercando di raccogliere e standardizzare le metodologie proposte da diversi organismi. Nel 2008, dalla riunione di FAO/OMS si è ottenuto il rapporto intitolato *Viruses in Food: Scientific advice to support risk management activities*. Questo documento sottolineava l'importanza di valutare lo stato di conoscenze sui virus alimentari e il loro impatto sulla salute pubblica e sul commercio. Nel 2012, dopo un ulteriore incontro di FAO/OMS è stato concordato che il virus dell'epatite A è una delle maggiori preoccupazioni per quanto riguarda la sicurezza alimentare ed è stata proposta una bozza di linee guida per il controllo dei virus negli alimenti.

Al momento, in Europa non esiste un criterio microbiologico che fissi dei limiti quantitativi relativi alla presenza del virus dell'epatite A negli alimenti. Tuttavia, per immettere sul mercato i prodotti alimentari è necessario che l'OSA rispetti i requisiti generali e specifici previsti rispettivamente dal Reg. CE 852/2004 e dal Reg. CE 853/2004, oltre ad osservare i principi del Reg. CE 178/2002, denominato "Pacchetto igiene" a tutela del consumatore. Per i molluschi bivalvi le attuali misure igienico-sanitarie per la produzione e il trattamento post-raccolta si basano sul monitoraggio e sulla riduzione del microrganismo indicatore *E. coli*, inteso come criterio di sicurezza alimentare come previsto dal Reg. CE 2073/2005.

Il più recente Reg. CE n. 627/2019, Titolo V, suddivide le aree di produzione e stabulazione dei molluschi bivalvi in tre classi in funzione dei livelli di contaminazione fecale misurati facendo uso di una tecnica di conteggio nota come *Most Probable Number* (MPN) in cui i microrganismi vengono contati sulla base di una manifestazione visibile della loro crescita.

I campioni provenienti dalla zona di classe A non devono superare, nell'80% dei campioni raccolti, i 230 MPN di *E. coli* per 100 g di polpa e liquido intervalvare. Il restante 20% non deve superare i 700 MPN di *E. coli* in 100 g di polpa e liquido intervalvare. Per le aree di classe B, i molluschi bivalvi non devono superare i 4.600 MPN di *E. coli*/100 g di polpa e liquido intervalvare per almeno il 90% dei campioni raccolti; il restante 10% non deve superare i 46.000 MPN di *E. coli*/100 g di polpa e liquido intervalvare. Per le aree di classe C, tutti i campioni raccolti non devono superare i 46.000 MPN di *E. coli*/100 g di polpa e liquido intervalvare.

I molluschi appartenenti alle zone di classe A sono classificati come idonei al consumo umano diretto. I bivalvi vivi raccolti da aree di classe B possono essere immessi nel mercato solo dopo aver subito un opportuno trattamento in vasche situate nei centri di depurazione o previa stabulazione mentre i molluschi raccolti nelle zone di produzione di classe C possono essere immessi nel commercio dagli operatori del settore alimentare soltanto previa stabulazione di lunga durata o in seguito a trattamenti di cottura. Il centro depurazione molluschi (CDM) è un impianto in cui i bivalvi vengono immersi per 12-36 ore in particolari vasche dove circola acqua di mare pulita, precedentemente trattata con cloro, luce UV o ozono, in modo che i molluschi si liberino del particolato che hanno accumulato, raggiungendo le stesse caratteristiche sanitarie dei molluschi provenienti dalle aree di tipo A. Inoltre, tutti i bivalvi devono passare attraverso un centro di spedizione prima della loro commercializzazione. Questa fase prevede l'apposizione sulla confezione di un cartellino indicante la data di confezionamento, il numero di riconoscimento del CDM di provenienza e la specie venduta (Arcangeli e Dalla Pozza, 2020).

Tuttavia, sebbene queste misure siano efficaci contro i patogeni batterici a trasmissione oro-fecale, sono meno efficaci contro i patogeni virali: il tasso di riduzione dei virus è notevolmente inferiore, pertanto sono richiesti tempi di depurazione prolungati. I risultati degli esperimenti di depurazione pubblicati suggeriscono che il processo richieda più di nove giorni per ottenere una riduzione di un logaritmo della carica virale di HAV (Dirks et al., 2021). Focolai di epatite A associati al consumo di alimenti conformi agli standard microbiologici ne sono la conferma.

Perciò acquisire dati sui livelli di contaminazione virale nei molluschi bivalvi e sulla prevalenza di HAV in aree diverse è diventato sempre più importante, soprattutto nei paesi con produzioni rilevanti come l'Italia, settimo produttore mondiale e terzo produttore europeo. Infatti, facendo riferimento a quanto avvenuto in Puglia tra il 1996 e il 1997, la malattia non

ha avuto effetti dannosi solo sulla salute delle persone ma anche sull'economia locale che, oggi come allora, si basa sul turismo e sul commercio di prodotti alimentari.

6 Modalità di identificazione del virus

I virus sono parassiti intracellulari obbligati motivo per cui non sono in grado di replicare autonomamente ma possono crescere solo all'interno di una cellula vivente, nota come cellula ospite. Essi dipendono dall'energia prodotta dalla cellula ospite, dai suoi prodotti metabolici e dal suo meccanismo di replicazione. Pertanto, il cibo rappresenta solo un veicolo per la trasmissione dei virus. Nonostante la contaminazione negli alimenti sia spesso limitata a poche particelle virali, la bassa dose infettante presuppone comunque un rischio elevato per la salute dei consumatori. Per questo è necessario sviluppare metodi sensibili e riproducibili che consentano di garantire la sicurezza alimentare nonostante il loro sviluppo possa risultare impegnativo data l'ampia gamma di matrici, la presenza di sostanze interferenti con i metodi di analisi e le basse concentrazioni del virus che possono complicare ulteriormente la rilevazione nei campioni alimentari di HAV. Per questi motivi, è stata proposta l'adozione di un criterio di presenza/assenza di HAV RNA nell'alimento che è considerato come il più appropriato per tutelare la salute del consumatore.

6.1 Identificazione di HAV mediante Real-Time PCR

La rilevazione del virus mediante PCR tradizionale end-point appare ancora utile nonostante l'elevata sensibilità della Real Time-PCR, il relativo basso costo dell'analisi e la maggiore specificità e precisione abbiano reso questa tecnica il metodo più utilizzato per la rilevazione del virus dell'epatite A negli alimenti.

Non è sempre stato disponibile un unico protocollo che assicurasse l'applicabilità dei metodi di analisi a matrici alimentari diverse e allo stesso tempo garantisse l'assenza di potenziali inibitori che impedissero il corretto funzionamento dell'analisi. Perciò, dato il numero elevato di protocolli per la rilevazione di HAV, lo sviluppo di metodi standard efficienti, accurati e altamente sensibili per l'isolamento dei virus negli alimenti è stato oggetto di studio fino al 2013 quando il Comitato Europeo di Normazione (CEN - *Comité Européen de Normalisation*) e l'Organizzazione Internazionale per la Normazione (ISO - *International Organization for Standardization*) hanno pubblicato una prima metodologia standard, la ISO 15216:2013 suddivisa a sua volta in due parti: la ISO 15216-1:2013 che descrive un metodo per la quantificazione dei livelli di HAV da campioni di prodotti alimentari o dalla superficie alimentare e la ISO 15216-2:2013 che descrive un metodo per la ricerca qualitativa di HAV. Più

recentemente la ISO 15216-1:2013 è stata revisionata e sostituita prima nel 2017 e poi nel 2021 (procedura attualmente in vigore) mentre la ISO 15216-2:2013 è stata revisionata e sostituita nel 2019.

La procedura prevede, dopo aver ottenuto una quantità appropriata del campione da sottoporre ad analisi, una prima fase di estrazione virale ottenuta con metodi diversi a seconda della matrice alimentare. La separazione e concentrazione delle particelle virali dalla matrice alimentare è una delle fasi più critiche e solitamente consiste in una fase di eluizione del virus, seguita da una fase di concentrazione e purificazione. In seguito, si procede con l'estrazione dell'RNA virale che avviene sfruttando il principio della lisi virale ottenuta con l'impiego di un reagente caotropico, il tiocianato di guanidina, ed adsorbimento su particelle di silice. Solo in seguito alla purificazione dell'RNA estratto è possibile rilevare la presenza di ceppi di virus di epatite A mediante l'amplificazione di specifiche sequenze della regione non codificante in 5' del genoma virale.

La norma ISO prevede alcuni controlli durante tutta la procedura, tra cui l'uso del mengovirus per determinare il livello di recupero, in quanto le perdite di HAV possono verificarsi in più fasi durante l'estrazione dell'RNA virale. È richiesto anche un controllo di amplificazione per monitorare l'effetto inibitorio derivato dalla matrice sulla procedura PCR.

Più recentemente, la RT-PCR digitale (dPCR) è emersa come metodo alternativo per il rilevamento di HAV negli alimenti. Funziona come una RT-PCR con lo stesso metodo di rivelazione ma il campione utilizzato viene diluito e ripartito in centinaia di camere di reazione, in modo tale che in ogni partizione si troverà una sola molecola di acido nucleico o nessuna, aumentando di conseguenza la sensibilità nei confronti del DNA target. Il principale vantaggio è la minore propensione agli inibitori della PCR, che porta a tassi di recupero più elevati e migliora la rilevazione di HAV. Tuttavia, quest'ultima è una procedura complessa e non ben descritta (Randazzo e Sánchez, 2020).

In seguito ad un risultato positivo, viene spesso eseguita la quantificazione e la tipizzazione virale. In particolar modo, la quantificazione dei virus nelle matrici alimentari rappresenta un grande progresso nelle indagini epidemiologiche e nel monitoraggio di routine, in quanto può fornire utili informazioni sui criteri microbiologici da adottare nei prodotti alimentari, oltre a favorire lo sviluppo di valutazioni quantitative del rischio. Tuttavia, non essendoci normative

che definiscono con precisione i criteri di accettabilità dei virus nei prodotti alimentari, la maggior parte degli Operatori del Settore Alimentare e le autorità competenti che eseguono i controlli ufficiali sugli alimenti richiedono risultati qualitativi come parte delle analisi sull'igiene della produzione o sulle indagini dei focolai.

Sebbene il rilevamento di HAV RNA con RT-PCR sia un metodo affidabile ed accurato ha generato dibattiti tra la comunità scientifica per quanto riguarda l'interpretazione dei risultati positivi. Un risultato positivo indica che un segmento intatto di RNA virale è stato rilevato nel campione ma questo non fornisce alcuna informazione sull'infettività del virus. Per questo motivo, è stato proposto di integrare i risultati positivi della RT-PCR con colture cellulari in grado di determinare la presenza di particelle virali infettive nel campione alimentare. Tuttavia, dal momento che è particolarmente difficile far crescere i virus enterici in vitro, per raggiungere questo obiettivo sono state sviluppate alcune strategie alternative che consentono di differenziare tra particelle virali infettive e non infettive basate sull'utilizzo di marcatori in grado di determinare l'integrità del capsido virale quali trattamenti con nucleasi e/o enzimi proteolitici che consentono di rimuovere qualsiasi segnale proveniente dai capsidi danneggiati o trattamenti con coloranti intercalanti in grado di inserirsi nei filamenti di RNA esposti. Questi marcatori vengono utilizzati per pretrattare il campione prima dell'estrazione dell'RNA virale (Di Cola et al., 2021).

7 Eliminazione del virus dell'epatite A

7.1 Pascalizzazione o trattamento ad alta pressione idrostatica

L'alta pressione idrostatica o pascalizzazione è una tecnologia di conservazione degli alimenti che prevede la loro immersione in un fluido, spesso acqua, che agisce come mezzo di pressurizzazione in un recipiente a pressione, esponendo la matrice ad una compressione di diverse centinaia di Megapascal (Mpa). Il trattamento avviene ad una pressione compresa tra i 100 e i 1.000 Mpa a temperature comprese tra 0 e 120 °C per tempi variabili fino alla decompressione. Solitamente per applicazioni alimentari equivalenti alla pastorizzazione commerciale viene applicata una pressione tra i 200 e i 600 MPa a temperatura ambiente e per un tempo massimo di 5 minuti mentre per trattamenti equivalenti alla sterilizzazione vengono impiegate temperature comprese tra 90-120 °C e pressioni comprese tra i 500 e i 600 Mpa (Aganovic et al., 2021).

I risultati ottenuti dagli studi sull'uso di questa tecnologia hanno dimostrato che il trattamento ad alta pressione idrostatica è in grado di eliminare i microrganismi presenti ed estendere la shelf-life del prodotto alimentare pur conservando caratteristiche organolettiche e nutrizionali paragonabili a quelle di prodotti non trattati o comunque migliori rispetto a quelle di prodotti trattati termicamente. Infatti, durante la pascalizzazione vengono alterati i legami ad idrogeno, ponti disolfuro e legami ionici di molecole complesse mentre non vengono influenzati i legami covalenti. Inoltre, non favorisce la formazione di composti chimici indesiderati quali, ad esempio, i radicali liberi.

La pascalizzazione è un metodo adatto alla maggior parte degli alimenti, di solito preconfezionati, tra cui prodotti a base di carne, prodotti ortofrutticoli e acquatici, succhi e bevande e prodotti RTE, a condizione che abbiano un contenuto in acqua sufficiente (EFSA, 2022). Tuttavia, essendo una tecnologia relativamente costosa è applicata prevalentemente su prodotti di alta qualità, il cui obiettivo è preservare un'elevata qualità nutrizionale e sensoriale.

Nonostante sia stata riconosciuta come una tecnologia in grado di fornire alimenti sicuri, ci sono ancora alcuni rischi associati alla sua applicazione che devono essere considerati e possono includere i) la sopravvivenza dei microrganismi patogeni, ii) eventuali reazioni biochimiche indesiderate e iii) effetti indesiderati sulla potenziale allergicità.

Sono stati pubblicati diversi studi sull'uso della processazione ad alta pressione idrostatica al fine di ottenere l'inattivazione di diverse specie virali (Pavoni et al., 2015). Lo studio di questa tecnologia si è reso necessario poiché spesso i trattamenti termici non sono sufficienti ad inattivare il virus dell'epatite A che è caratterizzato da una certa resistenza alle alte temperature rispetto agli altri membri della famiglia Picornaviridae. I meccanismi di inattivazione non sono stati ancora completamente chiariti anche se è stato dimostrato che l'inattivazione virale potrebbe dipendere da un effetto della pressione sulla conformazione delle proteine del virus, alterando di conseguenza la struttura del capside. Ad ogni modo, non viene invece danneggiato il genoma virale.

Nella maggior parte degli studi, un trattamento a 400 Mpa per 5 minuti a 4 °C si è rivelato efficace per inattivare i virus (Aganovic et al., 2021). Tuttavia, l'efficienza del trattamento, e dunque l'inattivazione virale, dipendono da diversi fattori che portano a differenti combinazioni di pressione e tempo.

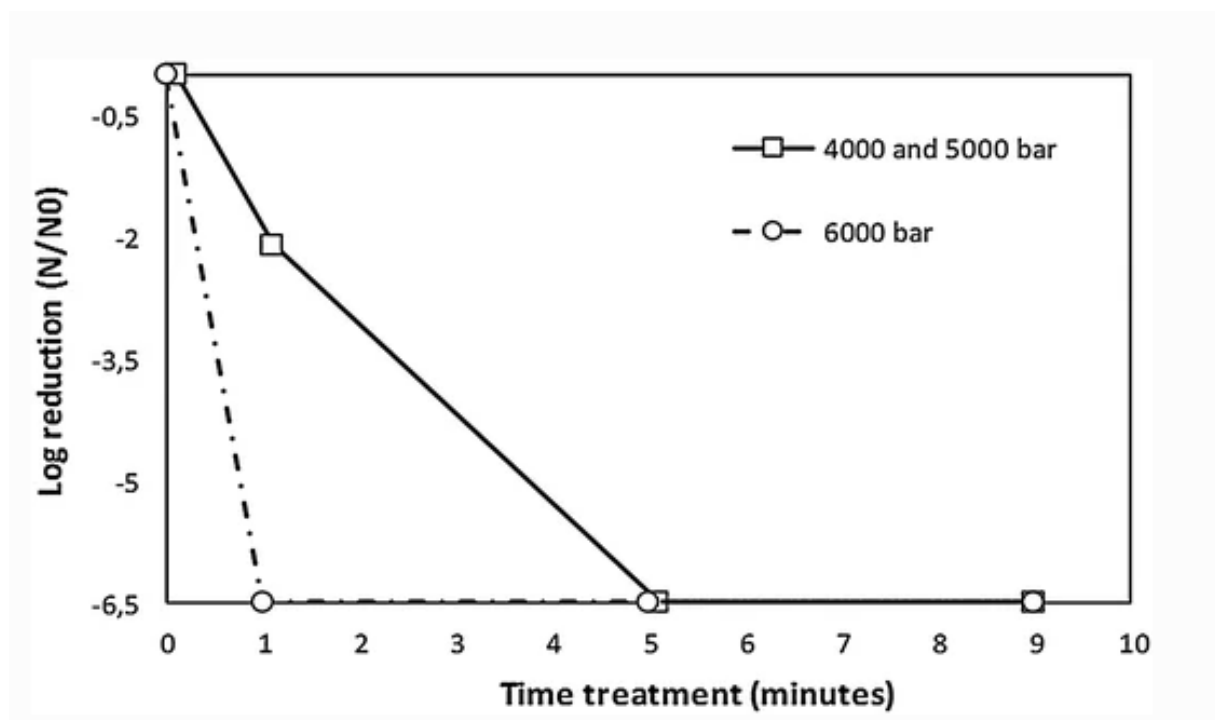


Figura 7-1. Effetto della pressione e del tempo di esposizione sull'inattivazione del virus HAV (Pavoni et al., 2015).

Ad esempio, un recente studio si è proposto di valutare gli effetti del trattamento sui molluschi bivalvi e il suo effetto sinergico con il processo di marinatura, procedura in due fasi che prevede prima un trattamento termico seguito dall'immersione del prodotto in una soluzione a base di acido acetico per tempi variabili.

Come riportato in Figura 7-1, i dati ottenuti dallo studio hanno dimostrato che l'infettività di HAV nei campioni infetti e non marinati diminuisce con l'avanzare del tempo di trattamento: dopo un minuto ad una pressione pari a 4.000 bar e 5.000 bar il titolo virale era sceso di 2 unità Log mentre dopo rispettivamente 9 e 5 minuti, il titolo iniziale di HAV era stato totalmente inattivato. La pressione a 6.000 bar ha invece interrotto l'infettività di HAV dopo solo un minuto di trattamento con una riduzione del virus di 6,5 unità Log. I risultati hanno confermato una prima facile osservazione secondo cui il valore di pressione applicato ha un'influenza maggiore sull'efficienza del trattamento rispetto al tempo di applicazione. Un trattamento a 4.000 bar per 5 minuti potrebbe essere il più consigliato per trattare i bivalvi non marinati; tuttavia, a causa dei suoi tempi di applicazione e dei costi a livello industriale, risulta poco conveniente mentre una pressione di 6.000 bar, nonostante i tempi ridotti di applicazione, potrebbe avere conseguenze negative sulla qualità organolettica e nutrizionale della matrice alimentare. Il processo di marinatura combinato con la pascalizzazione è il più efficace per inattivare i virus: l'effetto sinergico ha permesso di inattivare il virus a 4000 bar dopo solo un minuto, riducendo i tempi di trattamento e i costi di pressurizzazione da parte delle aziende. Poiché si tratta di una tecnologia relativamente costosa, ricordiamo che le applicazioni industriali mirano a tempi di ciclo brevi al fine di massimizzare la produttività e aumentare il rendimento e la competitività commerciale.

7.1.1 Fattori che influenzano l'efficacia del trattamento

L'efficacia del trattamento ad alta pressione idrostatica dipende dall'entità e dal tempo di mantenimento, dalla temperatura utilizzata ma anche dalla variabilità e complessità degli alimenti e dalle loro caratteristiche fisico-chimiche, come aW, pH e concentrazione di sale. Comprendere l'influenza di questi fattori potrebbe essere utile per la definizione di parametri di elaborazione appropriati.

Come dimostrato nello studio di Kingsley e Chen (2009), nei campioni non trattati, il virus dell'epatite A è stabile nell'intervallo di pH compreso tra 3 e 7 mentre nei campioni trattati, l'ambiente acido aumenta significativamente l'inattivazione pressoria alle tre temperature testate (5 °C, 20 °C e 50 °C). Nello studio è stata evidenziata una maggiore inattivazione virale a temperature più elevate mentre a temperature più basse è stata osservata una ridotta inattivazione del titolo virale. Tuttavia, l'effetto della temperatura dipende anche dai livelli di pH: un aumento da 20 °C a 50 °C ha migliorato l'inattivazione a pH 7 ma non a pH 3 (Figura 7-2). Non è chiaro perché il pH acido aumenti l'efficacia del trattamento anche se l'effetto potrebbe essere correlato ai cambiamenti conformazionali associati al capsido.

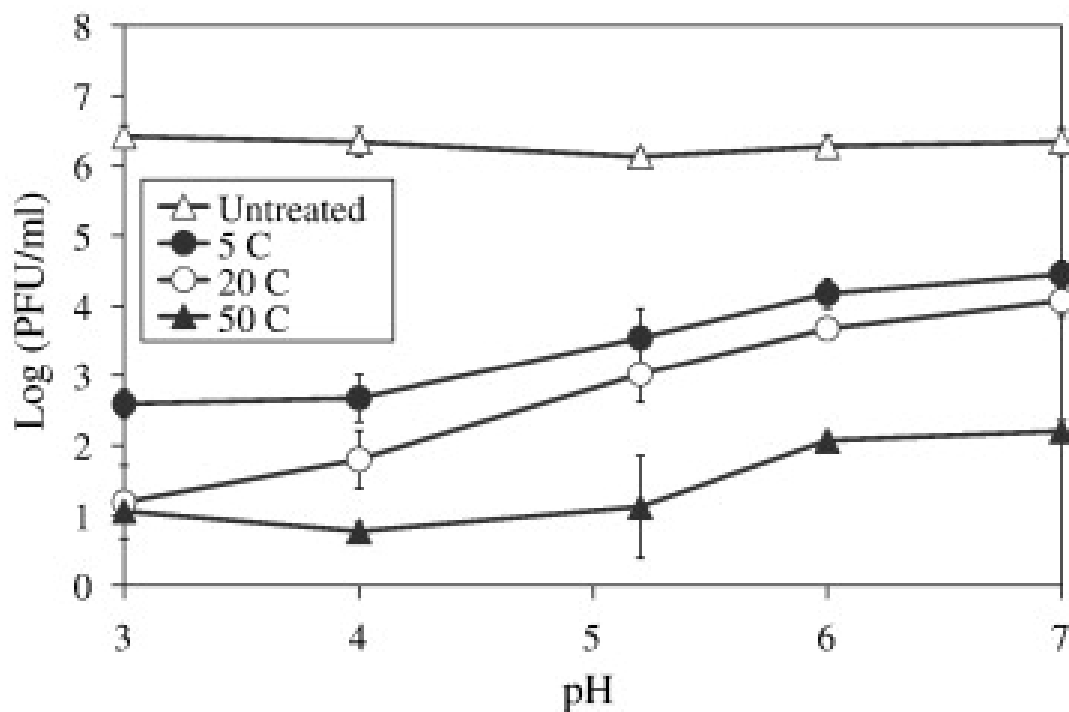


Figura 7-2. Effetto del pH sull'inattivazione virale (Kingsley e Chen, 2009).

Inoltre, nei campioni non trattati, l'HAV risulta stabile in una soluzione contenente una percentuale di cloruro di sodio (NaCl) compresa tra lo 0% e il 6%. Nei campioni trattati, concentrazioni elevate di sale hanno mostrato un significativo effetto baroprotettivo. Ad esempio, ad una concentrazione del 6% di NaCl, il trattamento più estremo (400 Mpa per 1 minuto a 50 °C) ha ridotto il titolo di HAV di solo 0,4 Log rispetto ad una riduzione di 3,9 Log senza supplemento di NaCl. I motivi per cui si verifica tale effetto baroprotettivo non sono noti. Anche in questo caso, l'effetto della temperatura sull'inattivazione virale dipende dalle concentrazioni di sale: un aumento da 20 °C a 50 °C ha migliorato significativamente l'inattivazione di HAV ad una concentrazione pari allo 0% ma non ad una concentrazione del 6% (Figura 7-3).

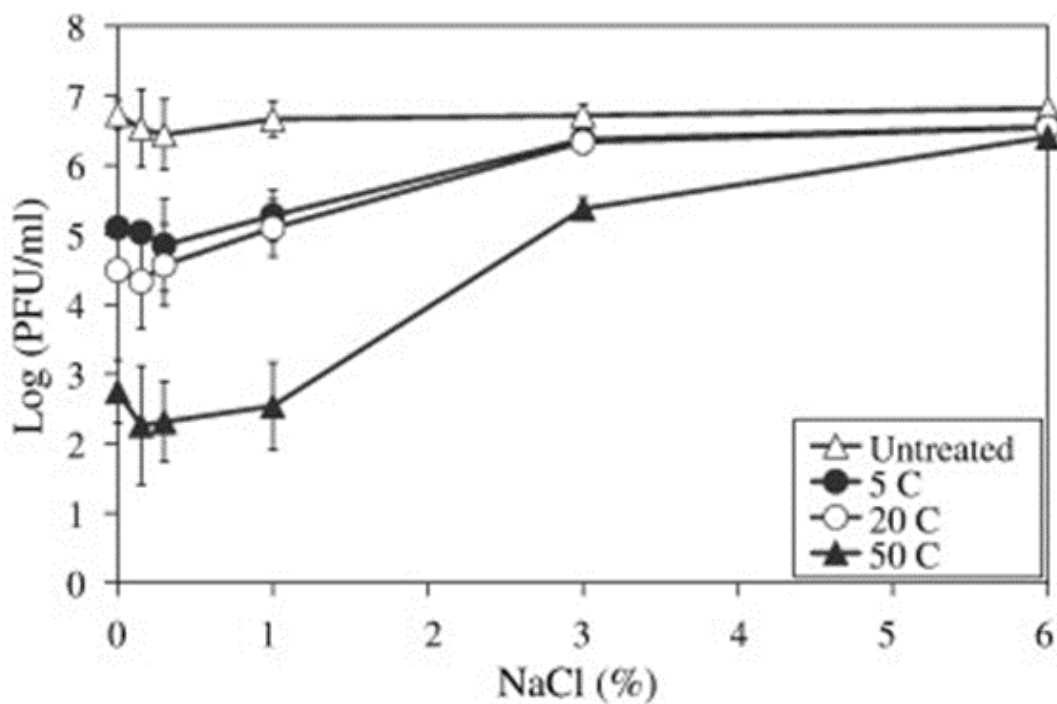


Figura 7-3. Effetto della concentrazione di NaCl sull'inattivazione virale (Kingsley e Chen, 2009).

Infine, a causa del lavoro di compressione sulle forze intermolecolari, la temperatura del prodotto e del mezzo di pressurizzazione aumentano all'aumentare della pressione. Questo fenomeno, noto come riscaldamento adiabatico, potrebbe contribuire all'inattivazione virale osservata ad una temperatura iniziale del campione di 50 °C che a 400 Mpa raggiunge i 65 °C.

Ad ogni modo, mentre le temperature elevate non sembrano apportare molti benefici, la scoperta che il pH acido aumenta l'efficacia del trattamento può essere utilizzata anche in

prodotti tendenzialmente acidi a base di frutta e verdura o in trattamenti volti alla combinazione di più fattori limitanti nello sviluppo di una tecnologia ad ostacoli o *Hurdle technology*.

7.2 Effetto dell'uso degli estratti vegetali su HAV

La resistenza e la stabilità dei virus in diverse condizioni fisico-chimiche permette loro di persistere sulle superfici degli alimenti ma anche su ambienti molto diversi quali superfici di lavoro e attrezzature che possono diventare eccellenti fonti di trasmissione secondaria e veicoli per la diffusione delle particelle virali.

Si pensi, ad esempio, all'industria alimentare delle verdure di IV gamma, le quali presentano un rischio elevato di contaminazione crociata; per la loro sanificazione è previsto l'uso di sostanze come peracidi, ozono o derivati del cloro, uno dei disinfettanti alimentari più diffusi, il cui utilizzo è stato limitato in alcuni paesi a causa della formazione di sostanze chimiche indesiderate quali i trialometani. Inoltre, a livello industriale si stanno abbandonando i derivati del cloro a causa dell'alterazione delle caratteristiche organolettiche del prodotto finito (IZSVE, 2015). Vi è dunque la necessità di soluzioni di disinfezione alternative, il cui sviluppo è stato promosso dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. A questo proposito, i composti fitochimici stanno riscuotendo un particolare interesse tra la comunità scientifica, le industrie alimentari e i consumatori poiché la maggior parte di questi è considerata sicura per le applicazioni alimentari. Inoltre, rappresentano delle alternative economiche ai prodotti di sintesi e l'attuale tendenza all'ecosostenibilità stimola l'uso di prodotti naturali.

Tra gli estratti vegetali, l'estratto di tè verde (GTE – *Green Tea Extract*), un derivato della pianta del tè, ricco in polifenoli, è ampiamente utilizzato in varie applicazioni per le sue proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e anticancerogene. Inoltre, ha mostrato proprietà inibitorie contro un'ampia gamma di patogeni batterici di origine alimentare grazie al suo contenuto in catechine, un gruppo di flavonoidi con proprietà antimicrobiche su batteri Gram positivi e Gram negativi. Tra le catechine contenute nell'estratto di tè verde, l'epigallocatechina-3-gallato (EGCG) e l'epicatechina gallato (ECG) hanno mostrato attività antivirale. Per questi motivi è stato studiato il loro impiego come disinfettanti nel lavaggio di verdure e superfici a contatto con gli alimenti.

I risultati ottenuti nello studio, riportati in Figura 7-4, hanno dimostrato che il trattamento dei virus con GTE in concentrazione di 5 mg/ml ha ridotto il titolo di HAV di oltre 1 Log TCID₅₀ /ml dopo due ore di esposizione a 37 °C a pH 6,5; la stessa concentrazione ha completamente inattivato le particelle virali a pH 7,2 e 8-8,5. Al contrario, una concentrazione di GTE pari a 0,5 mg/ml ha mostrato un'insufficiente inattivazione dei virus nell'intervallo di pH testato.

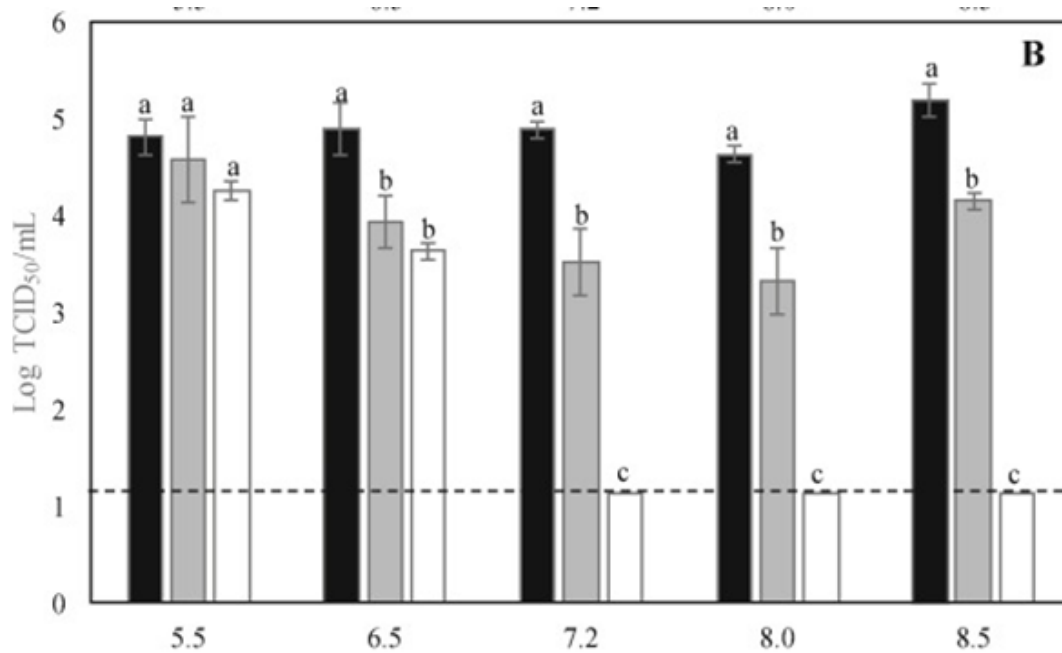


Figura 7-4. Riduzione del titolo di HAV dopo 2 ore a 37 gradi in diverse condizioni di pH. Lettere diverse tra le colonne denotano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) - Barre nere: controllo; barra grigia: 0,5 mg/ml; barra bianca: 5 mg/ml (Randazzo et al., 2017).

Anche le temperature e i tempi di esposizione hanno influenzato i tassi di inattivazione. Come si può vedere in Figura 7-5, dopo due ore di esposizione a 37 °C, una concentrazione di GTE pari a 5 mg/ml ha ridotto di 1,08 Log l'infettività di HAV mentre temperature più basse hanno ridotto l'efficacia del trattamento.

Temperature	GTE (mg/ml)	Exposure time	
		2 h	
		Recovered titer	Log reduction
37 °C	0	6.49 ± 0.14a	–
	0.5	6.07 ± 0.12b	0.42
	5	5.41 ± 0.14c	1.08
25 °C	0	5.82 ± 0.00a	–
	0.5	5.62 ± 0.14a	0.20
	5	5.12 ± 0.79b	0.70
4 °C	0	6.32 ± 0.12a	–
	0.5	6.32 ± 0.12a	0.00
	5	6.07 ± 0.21a	0.25

Figura 7-5. Effetto dell'estratto di tè verde a diverse temperature. Lettere diverse denotano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) (Randazzo et al., 2017).

Esperimenti simili sono stati condotti per valutare l'efficacia degli estratti di tè verde sulle superfici di lavoro e dei vegetali di IV gamma (inoculati con basso titolo virale di HAV). Le prove hanno riportato che, in entrambi i casi, è possibile ottenere una completa inattivazione dei titoli di HAV dopo 30 minuti di esposizione ad una soluzione con 10 mg/ml di GTE.

In questi studi è stato evidenziato un effetto antivirale dell'estratto di tè verde dose, temperatura e tempo dipendente, oltre ad un chiaro effetto antivirale dipendente dal pH poiché sono state osservate riduzioni più elevate a pH basico. Molti altri composti naturali sono già stati valutati per la loro attività antimicrobica; tuttavia, sono disponibili informazioni limitate per le loro proprietà antivirali. Tra questi, l'estratto di semi d'uva (GSE- *Grape Seed Extract*), ricco in composti fenolici, è considerato efficace nel ridurre l'infettività di HAV e a differenza dell'estratto di tè verde vede potenziato il suo effetto contro HAV in condizioni acide. Inoltre, l'attività antivirale di GTE mostra tendenze simili agli effetti antivirali osservati con altri composti naturali come l'olio essenziale di origano o carvacrolo.

I meccanismi antivirali di molti degli estratti vegetali non sono stati ancora del tutto ben chiariti anche se EGCG, il principale componente dell'estratto di tè verde, potrebbe ridurre l'infettività di HAV interrompendo l'attacco del virione ai recettori della membrana cellulare sulla cellula ospite grazie alla sua elevata affinità per le proteine di superficie virale.

Per concludere, l'uso di questi composti antivirali sui materiali da imballaggio o nei detergenti per la disinfezione delle mani e delle superfici di lavoro può fornire risultati promettenti e un'ampia gamma di applicazioni.

7.3 Efficacia del trattamento di cottura

Secondo le linee guida della commissione del Codex Alimentarius "una temperatura interna di 85-90 °C per almeno 90 secondi è da considerarsi un trattamento virucida" ma non sempre le temperature e i tempi di cottura indicati nelle linee guida del Codex Alimentarius vengono rispettati dai consumatori. Tuttavia, qualsiasi procedura di cottura è in grado di ridurre i livelli di contaminazione virale e prevenire molte delle malattie di origine alimentare. Come già riportato in precedenza, per quanto qualsiasi alimento possa essere potenzialmente contaminato, i molluschi bivalvi sono tra quelli più frequentemente coinvolti a causa della loro attività di filtraggio. Per questo, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare consiglia di riportare in etichetta la dicitura "da consumarsi previa cottura", senza però fornire alcuna indicazione in merito ai tempi di trattamento e alle temperature da raggiungere (EFSA, 2011). Studi precedenti avevano dimostrato che dopo solo 1 minuto di immersione in acqua bollente o mediante cottura a vapore per 1,5 minuti, era possibile raggiungere temperature di 85-90 °C che se mantenute per un minuto sarebbero state sufficienti ad inattivare completamente il virus dell'epatite A (Millard et al., 1987). Studi più recenti hanno evidenziato la necessità di trattamenti più lunghi e temperature più elevate: ad esempio, il trattamento industriale di pastorizzazione, il quale raggiunge una temperatura di 90 °C al cuore del prodotto per 10 minuti, è considerato efficace nel disattivare completamente il virus.

A partire da questa limitazione, Pascoli et al. (2016) hanno realizzato uno studio, finanziato dal Ministero della Salute, finalizzato a valutare la resistenza del virus dell'epatite A in vongole contaminate artificialmente in relazione alle temperature e ai tempi tradizionalmente impiegati per la cottura, al fine di fornire utili informazioni a consumatori e produttori.

I risultati ottenuti dalle analisi di vongole non trattate termicamente hanno confermato che queste ultime avevano filtrato e concentrato il virus nelle loro ghiandole digestive e non essendo sufficiente il trattamento di depurazione, è stata valutata l'efficacia dell'inattivazione termica dopo diversi tempi di trattamento. In particolar modo, dopo un'infezione ad alto titolo virale, la crescita del virus è stata osservata in T0 (momento di apertura delle valve), in T2 e T4 (rispettivamente dopo 2 e 4 minuti dall'apertura delle valve), nonostante una riduzione del titolo virale, mentre non è stata osservata crescita virale ai tempi T6 e T8 (rispettivamente dopo 6 e 8 minuti dall'aperture delle valve). Sono stati dunque registrati i tempi di apertura di ogni singola vongola e il tempo di cottura è stato fatto iniziare al momento dell'apertura delle valve. In questo modo è stato possibile verificare se, al momento dell'apertura delle valve, il virus fosse ancora infettivo e fino a quanti minuti dopo fosse in grado di resistere.

Tabella 7-6. Risultati della prova preliminare di cottura dopo un'infezione ad alto titolo virale. A diversi tempi di cottura è stata registrata la temperatura, attraverso l'impiego di due sonde termometriche, e la presenza del virus HAV (Pascoli et al., 2016).

Time point	Probe 1 (°C) open clam	Probe 2 (°C) closed clam	Viral isolation 1° passage	Viral isolation 2° passage	Viral isolation 3° passage
T0	87.53 ± 5.62	74.90 ± 8.03	10 ^{5.80}	10 ^{6.13}	10 ^{6.40}
T2	100.41 ± 0.06	100.32 ± 0.11	No presence of culturable virus	10 ^{3.67}	10 ^{4.96}
T4	100.63 ± 0.29	100.46 ± 0.23	No presence of culturable virus	No presence of culturable virus	10 ^{2.33}
T6	100.83 ± 0.07	100.86 ± 0.12	No presence of culturable virus	No presence of culturable virus	No presence of culturable virus
T8	103.06 ± 2.31	101.57 ± 1.47	No presence of culturable virus	No presence of culturable virus	No presence of culturable virus

Nella seconda prova di cottura è stato considerato uno scenario il più simile possibile a quello domestico. La crescita è stata osservata solo a T50% e T100% (che indicano il tempo in cui si sono aperte rispettivamente il 50% e il 100% delle valve) mentre non è stata osservata a tempi di cottura diversi (T2, T4 e T6).

Tabella 7-7. Risultati della prova finale di cottura dopo un'infezione ad alto titolo virale. Considerato uno scenario più simile a quello domestico, è stata valutata la capacità del virus HAV di resistere a diversi tempi di trattamento (Pascoli et al., 2016).

Time point	Time (mm:ss)	Probe 1 (°C) open clam	Probe 2 (°C) closed clam	Viral isolation 1° passage	Viral isolation 2° passage	Viral isolation 3° passage
T50%	07:58 ± 00:11	99.66 ± 0.14	95.46 ± 0.35	No presence of culturable virus	(5/6) 10 ^{-2.33}	(6/6) 10 ^{-2.33}
T100%	09:58 ± 00:09	99.35 ± 1.48	98.07 ± 2.72	No presence of culturable virus	(1/6) 10 ^{-2.5}	(3/6) 10 ^{-2.17}
T2	/	100.53 ± 0.01	100.04 ± 0.69	No presence of culturable virus	No presence of culturable virus	No presence of culturable virus
T4	/	100.54 ± 0.13	100.39 ± 0.26	No presence of culturable virus	No presence of culturable virus	No presence of culturable virus
T6	/	100.15 ± 0.46	98.91 ± 2.25	No presence of culturable virus	No presence of culturable virus	No presence of culturable virus

Nella terza prova è stata utilizzata una bassa dose infettante, più simile ai livelli di positività presenti in natura e in nessuno dei due precedenti test, al momento dell'apertura delle valve, è stata osservata crescita virale.

I risultati ottenuti dallo studio hanno dimostrato che è necessario cuocere i bivalvi per 12 minuti, di cui due minuti ad una temperatura di circa 100 °C al cuore del prodotto, per inattivare il virus dell'epatite A e di conseguenza ridurre il rischio di causare infezioni virali. Tuttavia, è necessario considerare le diverse condizioni di cottura dei bivalvi in ambiente domestico che potrebbero accelerare o rallentare la trasmissione del calore. Ad esempio, in presenza di acqua, olio o sugo la temperatura necessaria all'apertura di tutte le vongole viene raggiunta più velocemente. Tali informazioni andrebbero comunque riportate sull'etichetta di tutti i prodotti (anche diversi dai bivalvi) al fine di fornire informazioni chiare e trasparenti e tutelare la salute dei consumatori.

8 Conclusioni

Dalle indagini epidemiologiche realizzate dai dipartimenti di sanità pubblica è emerso che solo il 2-7% del totale dei casi di epatite A sono attribuibili al consumo di alimenti contaminati. L'EFSA e l'ECDC hanno indicato i molluschi bivalvi, i frutti di bosco congelati e i prodotti di IV gamma come potenziali veicoli del virus dell'epatite A.

Quest'ultimo è un virus a trasmissione oro-fecale; pertanto, l'insorgenza della malattia testimonia uno scarso livello di igiene nella filiera produttiva. Per questo motivo, è necessario rimarcare l'importanza della cura della propria igiene personale, specie delle mani, da parte degli addetti alla manipolazione degli alimenti e dei consumatori. Inoltre, le aziende coinvolte nella produzione dei prodotti di IV gamma dovrebbero prevedere l'uso di guanti monouso durante le fasi di manipolazione così da ridurre il rischio di contaminazione.

La contaminazione può verificarsi in un punto qualsiasi della filiera produttiva; di conseguenza, l'industria alimentare deve seguire ed applicare in un'ottica di autocontrollo un insieme di norme, procedure e linee guida essenziali per la produzione di alimenti ritenuti sani e sicuri, prima e durante l'attuazione del sistema HACCP. Infatti, anche le superfici di lavoro e le attrezzature possono risultare contaminate e diventare eccellenti veicoli per la diffusione del virus dell'epatite A. A livello industriale, la sanificazione di questi ambienti si ottiene con l'impiego di sostanze quali peracidi, ozono e derivati del cloro. Tuttavia, la recente necessità di sviluppare metodi alternativi di disinfezione promossa dall'OMS ha permesso ai composti fitochimici di riscuotere particolare interesse tra la comunità scientifica e l'industria alimentare. Come osservato, l'estratto di tè verde e l'estratto di semi d'uva hanno segnalato proprietà antivirali e il loro impiego si è dimostrato efficace in un'ottica di tutela della salute del consumatore ma anche dell'ambiente, garantendo al contempo un risparmio, visti i costi ridotti dei composti fitochimici rispetto ai prodotti di sintesi.

Le aziende alimentari sono comunque alla continua ricerca di trattamenti innovativi meno impattanti che consentano di offrire ai consumatori prodotti sicuri e di qualità elevata. Ad esempio, il trattamento ad alta pressione è considerato efficace per inattivare il virus dell'epatite A e l'effetto sinergico con il trattamento di marinatura consente di ridurre sia i tempi di lavorazione che i costi di pressurizzazione. Infatti, il pH acido aumenta l'efficacia del trattamento che può essere dunque utilizzato su prodotti diversi dai molluschi bivalvi citati

nello studio, quali prodotti tendenzialmente acidi a base di frutta e verdura (ad esempio, succhi di frutta).

A livello domestico, la cottura è considerata l'unica misura efficace: è necessario cuocere i bivalvi per 12 minuti, di cui due ad una temperatura di 100 °C per inattivare completamente il virus dell'epatite A. Tali indicazioni sono valide anche per alimenti diversi dai molluschi bivalvi. Per le verdure è il lavaggio l'unico mezzo efficace per la sanificazione, sia a livello industriale che a livello domestico.

Numerosi studi si sono dunque concentrati sull'effetto delle tecnologie di lavorazione e conservazione adottate dall'industria alimentare su matrici ad alto rischio in una prospettiva di sicurezza alimentare. Allo stesso tempo però, la crescente globalizzazione consente l'esportazione delle derrate commerciali da paesi in via di sviluppo ponendo nuove sfide alla prevenzione con la creazione di barriere basate su principi di sicurezza alimentare e controllo dell'origine dei prodotti.

Infine, per prevenire la diffusione del virus dell'epatite A nella popolazione, l'OMS ha raccomandato la vaccinazione infantile o la vaccinazione di gruppi a rischio, a seconda del grado di endemicità. Tuttavia, i livelli di copertura vaccinale appaiono ancora inadeguati, soprattutto se si tiene conto dell'aumento della suscettibilità della popolazione, una conseguenza del continuo miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie e socioeconomiche.

In conclusione, dai risultati ottenuti confrontando diversi lavori relativi alla diffusione del virus dell'epatite A è emerso che, sebbene il numero di infezioni sia in continua diminuzione, la malattia rappresenta ancora oggi un problema di salute pubblica diffuso sia nei paesi sviluppati ma soprattutto nei paesi in via di sviluppo, il cui impatto potrebbe aggravare le disparità socioeconomiche già esistenti.

9 Bibliografia

- Aganovic, K., Hertel, C., Vogel, R. F., Johne, R., Schlüter, O., Schwarzenbolz, U., . . . Knorr, D. (2021). Aspects of high hydrostatic pressure food processing: Perspectives on technology and food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3225-3266.
- Arcangeli, G., & Dalla Pozza, M. (2020). Molluschi Bivalvi... frutti del nostro mare. Appunti di scienza. *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*.
- Averhoff, F., Khudyakov, Y., & Bell, B. P. (2015). Hepatitis A Virus. In J. E. Bennett, R. Dolin, & M. J. Blaser, *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)* (Vol. 2, 2095-2112). W.B. Saunders.
- Averhoff, F., Khudyakov, Y., & Nelson, N. P. (2018). Hepatitis A Vaccines. In *Plotkin's Vaccines (Seventh Edition)* (319-341). Elsevier.
- Bellou, M., Kokkinos, P., & Vantarakis, A. (2013). Shellfish-Borne Viral Outbreaks: A Systematic Review. *Food and Environmental Virology*, 5(1), 13-23.
- Bidawid, S., Farber, J. M., & Sattar, S. A. (2000). Contamination of Foods by Food Handlers: Experiments on Hepatitis A Virus Transfer to Food and Its Interruption. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2759-2763.
- Burkhardt, W., & Calci, K. R. (2000). Selective Accumulation May Account for Shellfish-Associated Viral Illness. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1375-1378.
- Chironna, M., Prato, R., Sallustio, A., Martinelli, D., Tafuri, S., Quarto, M., & Germinario, C. (2012). Hepatitis A in Puglia (South Italy) after 10 years of universal vaccination: need for strict monitoring and catch-up vaccination. *BMC Infectious Diseases*, 12(1), 271.
- Di Cola, G., Fantilli, A. C., Pisano, M. B., & Ré, V. E. (2021). Foodborne transmission of hepatitis A and hepatitis E viruses: A literature review. *International Journal of Food Microbiology*, 338, 108986.
- Dirks, R. A., Jansen, C. C., Hägele, G., Zwartkruis-Nahuis, A. J., Tijmsma, A. S., & Boxman, I. L. (2021). Quantitative levels of norovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs collected along the food chain in the Netherlands, 2013–2017. *International Journal of Food Microbiology*, 344, 109089.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA Journal*, 9(7), 1-96.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2022). The efficacy and safety of high-pressure processing of food. *EFSA Journal*, 20(3), 1-195.
- EpiCentro - Istituto Superiore di Sanità. (2021). *Epatite Virale*. Tratto da <https://www.epicentro.iss.it/epatite/>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2021). *Disease data from ECDC Surveillance Atlas - hepatitis A*. Tratto da <https://www.ecdc.europa.eu/en/hepatitis-a/surveillance/atlas>

- Gossner, C. M., Severi, E., Danielsson, N., Hutin, Y., & Coulombier, D. (2015). Changing hepatitis A epidemiology in the European Union: new challenges and opportunities. *Eurosurveillance*, *20*(16), 21101.
- Guillois-Bécel, Y., Couturier, E., Le Saux, J. C., Roque-Afonso, A. M., Le Guyader, F. S., Le Goas, A., . . . Vaillant, V. (2009). An oyster-associated hepatitis A outbreak in France in 2007. *Euro Surveillance*, *14*(10), 19144.
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe). (2015). *L'insalata confezionata e pronta al consumo è sicura? L'efficacia dei metodi di lavaggio domestici e industriali*. Tratto da IZSVenezie: <https://www.izsvenezie.it/insalata-confezionata-pronta-al-consumo-sicura/>
- Kingsley, D. H., & Chen, H. (2009). Influence of pH, salt, and temperature on pressure inactivation of hepatitis A virus. *International Journal of Food Microbiology*, *130*(1), 61-64.
- Koopmans, M., & Duizer, E. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, *90*(1), 23-41.
- Millard, J., Appleton, H., & Parry, J. V. (1987). Studies on heat inactivation of hepatitis A virus with special reference to shellfish: Part 1. Procedures for infection and recovery of virus from laboratory-maintained cockles. *Epidemiology & Infection*, *98*(3), 397-414.
- Pascoli, F., Pezzuto, A., Buratin, A., Fortin, A., Arcangeli, G., & Toffan, A. (2016). Efficacy of domestic cooking inactivation of human hepatitis A virus in experimentally infected manila clams (*Ruditapes philippinarum*). *Journal of Applied Microbiology*, *121*(4), 1163-1171.
- Pavoni, E., Arcangeli, G., Dalzini, E., Bertasi, B., Terregino, C., Montesi, F., . . . Losio, M. N. (2015). Synergistic Effect of High Hydrostatic Pressure (HHP) and Marination Treatment on the Inactivation of Hepatitis A Virus in Mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Food and Environmental Virology*, *7*(1), 76-85.
- Randazzo, W., & Sánchez, G. (2020). Hepatitis A infections from food. *Journal of Applied Microbiology*, *129*(5), 1120-1132.
- Randazzo, W., Falcó, I., Aznar, R., & Sánchez, G. (2017). Effect of green tea extract on enteric viruses and its application as natural sanitizer. *Food Microbiology*, *66*, 150-156.
- Severi, E., Verhoef, L., Thornton, L., Guzman-Herrador, B. R., & Faber, M. (2015). Large and prolonged food-borne multistate hepatitis A outbreak in Europe associated with consumption of frozen berries, 2013 to 2014. *Eurosurveillance*, *20*(29), 21192.
- World Health Organization (WHO). (2020). *Food Safety*. Tratto da <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>