



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dip. di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

Tesi di laurea

HAV E NOROVIRUS NEGLI ALIMENTI:
UN NUOVO PERICOLO EMERGENTE
PER LA SALUTE UMANA

Relatore: Ch.mo Prof. Valerio Giaccone

Laureando: Massimo Zanutto

ANNO ACCADEMICO 2012 - 2013

INDICE

<u>Capitolo 1 - Introduzione</u>	pag. 5
<u>Capitolo 2 - I Virus</u>	pag. 9
2.1 - Caratteristiche generali.....	pag. 9
2.2 - Zoonosi.....	pag. 10
2.3 - Vie di trasmissione.....	pag. 10
<u>Capitolo 3 - Virus e trattamenti alimentari</u>	pag. 13
<u>Capitolo 4 - Norovirus</u>	pag. 15
4.1 - Caratteristiche microbiologiche.....	pag. 15
4.2 - Caratteristiche epidemiologiche.....	pag. 16
4.3 - Sintomatologia clinica.....	pag. 17
4.4 - Norovirus negli alimenti.....	pag. 18
4.5 - Trattamenti sugli alimenti.....	pag. 19
4.5.1 - Refrigerazione.....	pag. 19
4.5.2 - Congelamento.....	pag. 21
4.5.3 - Acidificazione.....	pag. 21
4.5.4 - Riduzione della frazione di acqua libera.....	pag. 22
4.5.5 - Trattamenti termici.....	pag. 23
4.6 - Epidemia in Germania.....	pag. 25
<u>Capitolo 5 - Hepatitis A Virus (HAV)</u>	pag. 27
5.1 - Caratteristiche microbiologiche.....	pag. 27
5.2 - Caratteristiche epidemiologiche.....	pag. 28
5.3 - Diagnosi e prevenzione.....	pag. 29
5.4 - Sintomatologia clinica.....	pag. 30

5.4.1 - Sintomatologia nei bambini.....	pag. 30
5.4.2 - Sintomatologia negli adulti.....	pag. 31
5.4.3 - Sintomatologia atipica.....	pag. 31
5.5 - HAV negli alimenti.....	pag. 32
5.6 - Trattamenti sugli alimenti.....	pag. 34
5.6.1 - Refrigerazione.....	pag. 34
5.6.2 - Congelamento.....	pag. 34
5.6.3 - Acidificazione.....	pag. 35
5.6.4 - Riduzione della frazione di acqua libera.....	pag. 35
5.6.5 - Trattamenti termici.....	pag. 36
5.7 - Epidemia nei Paesi nordici.....	pag. 37
5.7.1 - Epidemia in Danimarca.....	pag. 38
5.7.2 - Indagine epidemiologica del caso danese.....	pag. 39
5.7.3 - Epidemia in Finlandia, Norvegia e Svezia.....	pag. 40
5.7.4 - Risultati e ripercussioni.....	pag. 42

Capitolo 6 - Hepatitis E Virus (HEV).....pag. 45

6.1 - Caratteristiche microbiologiche.....	pag. 45
6.2 - Caratteristiche epidemiologiche.....	pag. 45
6.3 - Sintomatologia clinica.....	pag. 47
6.4 - HEV negli alimenti.....	pag. 47
6.5 - Trattamenti termici.....	pag. 49

Capitolo 7 - Conclusioni.....pag. 51

Capitolo 8 - Bibliografia.....pag. 53

Capitolo 9 - Ringraziamenti.....pag. 71

1 - INTRODUZIONE

Le infezioni e le tossinfezioni alimentari stanno diventando una frequente causa di affezioni nei Paesi industrializzati. Le infezioni di origine alimentare sono causate dal consumo di alimenti o bevande contaminati da diversi microrganismi. Gli agenti eziologici principalmente coinvolti nelle epidemie che si verificano a seguito di consumo di alimenti contaminati sono batteri, in particolare “*Campylobacter spp.*”, “*Salmonella spp.*”, ceppi patogeni di “*E.coli*” e virus enterici come *Norwalk like virus*, il virus A dell’epatite (HAV), il virus dell’epatite E (HEV) e rotavirus (RV) (Newell *et al.*, 2010).

I patogeni emergenti rappresentano un serio problema di sanità pubblica assumendo una sempre maggiore importanza epidemiologica. Questo potrebbe essere spiegato da diversi fattori quali la globalizzazione del commercio, l’aumento della popolazione a rischio (anziani e soggetti immunocompromessi), il cambiamento delle abitudini alimentari, la tendenza a consumare pasti fuori casa.

L’incremento degli scambi internazionali di prodotti alimentari ha contribuito, inoltre, alla rapida diffusione di malattie trasmesse per queste vie, incluse quelle ad eziologia virale, com’è stato segnalato sia dall’Organizzazione Mondiale della Sanità che dal Codex Alimentarius (Koopmans *et al.*, 2004).

Lo studio dei dati epidemiologici sulle infezioni alimentari degli ultimi anni ha evidenziato un’importanza crescente dei virus enterici, anche a seguito del miglioramento delle tecniche di analisi che permettono di attribuire a questi agenti patogeni molti episodi epidemici prima classificati ad eziologia sconosciuta. Fino all’inizio degli anni 70, infatti, le gastroenteriti virali nell’uomo erano diagnosticate solo sulla base di criteri epidemiologici (Koopmans *et al.*, 2004) a causa della scarsa sensibilità e disponibilità di metodi per l’identificazione dei virus enterici che non permettevano la loro determinazione diretta negli alimenti e, talvolta, neanche da campioni fecali (Ahmad, 2002).

Diversamente dai batteri, i virus non si moltiplicano negli alimenti né producono tossine in quanto parassiti intracellulari obbligati e quindi incapaci di replicare al di fuori della

cellula ospite. La dose infettante per contro è molto bassa: generalmente tra 1 e 10 unità virali (Phan T.G. *et al.*, 2007) e quindi il rischio d'infezione da virus presenti negli alimenti a parità di livello di esposizione risulta molto più alto di quello per i batteri.

I virus oggi sono tra le principali cause di infezioni alimentari. Gli USA stimano che i virus provocano 2/3 dei focolai (CDC, 2012). Si conoscono oltre 120 virus enterici classificati in diverse specie in base alle loro caratteristiche morfologiche, chimiche, fisiche, antigeniche e genetiche (Koopmans *et al.*, 2002; De Medici *et al.*, 2009), ma solo pochi sono comunemente riconosciuti come importanti patogeni di origine alimentare. Questi possono essere classificati in tre gruppi principali, in base al tipo di malattia che producono:

- Virus che provocano gastroenteriti: Rotavirus, Adenovirus tipo 40 e 41 e due generi di Calicivirus enterici umani: i Norovirus (NoV) e i Sapovirus (SV).
- Virus dell'epatite a trasmissione oro-fecale: virus dell'Epatite A (Hepatitis A Virus, HAV) e virus dell'Epatite E (Hepatitis E Virus, HEV).
- Virus che si replicano nell'intestino umano ma provocano patologie in altri organi, quali il sistema nervoso centrale o il fegato (Enterovirus) (Koopmans *et al.*, 2004; Widdowson MA *et al.*, 2005; Han MG *et al.*, 2004).

Chiaramente, i più rilevanti nelle infezioni di origine alimentare sono quei virus infettanti le cellule che rivestono il tratto intestinale e sono dispersi con la perdita nelle feci o attraverso il vomito (Koopmans *et al.*, 2004).

I virus di Epatite A (HAV) e Caliciviridae sono agenti infettanti comuni per l'uomo, mentre molti altri virus (Adenovirus, Poliovirus, Rotavirus, Coronavirus) sono infettanti occasionali. HAV e Norovirus sono attualmente riconosciuti come i più importanti patogeni di origine alimentare per quanto riguarda il numero di focolai e persone colpite in Occidente. Sono altamente infettivi e possono portare alla diffusione di epidemie (Cliver, 1997).

Le più documentate epidemie virali di origine alimentare possono essere ricondotte a cibo che è stato manipolato da un lavoratore infetto, piuttosto che i cibi trasformati industrialmente. La contaminazione virale del cibo può avvenire ovunque nel periodo tra la fattoria e la tavola, ma molte infezioni virali di origine alimentare possono essere

fatte risalire a persone infette che maneggiano il cibo che non è stato riscaldato o successivamente trattato con altre tecnologie virucide. Se i virus sono presenti nel pretrattamento, potrebbe essere presente una residua infettività virale dopo alcuni trattamenti industriali. Peraltro molte delle attuali linee-guida dell'igiene alimentare sono ottimizzate per la prevenzione delle infezioni batteriche e possono essere solo parzialmente efficaci contro i virus. Un fattore di complicazione è che i più comuni virus di origine alimentare crescono poco o per nulla nelle colture cellulari, così gli studi di inattivazione di questi patogeni non sono possibili. Per questo alcuni autori (Koopmans *et al.*, 2004) hanno esaminato le informazioni attualmente disponibili sui virus di origine alimentare e hanno provato a dare una stima dell'inattivazione virale cercando un parallelo nei virus con strutture simili che possono crescere in sistemi di coltura cellulare in laboratorio.

Dal punto di vista della prevenzione risulta molto importante il monitoraggio epidemiologico di queste infezioni, perché possono rappresentare un indice dell'efficienza delle misure di sicurezza alimentare e può fornire importanti informazioni per mantenerle sotto controllo e per prevenirne l'insorgenza.

2 - I VIRUS

2.1 - Caratteristiche generali

I virus sono microorganismi molto piccoli, hanno dimensioni che variano dai 15 ai 400 nm (0,015 – 0,4 micron, mentre i batteri misurano da 0,8 a 10 micron e i lieviti dai 15 ai 30 micron), e causano una vasta gamma di malattie nelle piante, negli animali e negli essere umani. Queste infezioni non avvengono casualmente: ogni gruppo di virus ha una propria gamma di ospiti tipici e cellule preferite (chiamato tropismo) (Koopmans *et al.*, 2004). I virus non producono enzimi e non hanno un loro metabolismo interno (cosa che invece fanno batteri, lieviti e muffe). Di conseguenza, la loro presenza in un alimento o in altra matrice organica non è segnalata da eventuali effetti di deterioramento del substrato. I virus sono parassiti intracellulari obbligati, mentre i batteri, i lieviti e le muffe sono capaci di moltiplicare autonomamente. Infatti si dice che un batterio, un lievito o una muffa “moltiplicano” mentre i virus “replicano”. Da ciò deriva che i virus per replicare devono necessariamente “infettare” una cellula vivente (di uomo, animale o pianta).

Anche i batteri possono essere “infettati” dai virus, proprio per le nette differenze di dimensione tra i due e per la natura dei virus. A differenza dei batteri, poi, i virus non sono sensibili agli antibiotici. I virus sono delle entità che non hanno struttura cellulare evidente: appaiono al microscopio elettronico come dei solidi regolari a struttura più o meno rigida in cui fondamentalmente abbiamo un filamento di materiale genomico (DNA o RNA) avvolto da una struttura rigida di natura glicoproteica, chiamata capside. Alcuni virus sono dotati anche di uno strato aggiuntivo di proteine e glucidi, chiamato *envelope*. La presenza di questo *envelope* rende il virus che lo possiede meno resistente alle condizioni avverse rispetto ad altri tipi di virus che non possiedono *envelope*. Rispetto a batteri, lieviti e muffe, i virus hanno una struttura molto più essenziale, ridotta al minimo, per cui in generale sono molto più resistenti di batteri, lieviti e muffe alle condizioni stressanti che l'ambiente impone a tutti gli esseri viventi (pH del substrato, parziale carenza di acqua disponibile, raggi UV, disinfettanti).

2.2 - Zoonosi

Un consistente gruppo di generi virali può infettare gli animali vertebrati superiori, causando malattie infettive più o meno gravi, e alcuni generi di virus sono in grado di infettare le cellule umane, provocando nell'uomo infezioni che possono sfociare in vere e proprie malattie. Un gruppo ancora più ristretto di queste infezioni può colpire senza grosse distinzioni sia gli animali sia l'uomo: queste patologie infettive virali che possono trasmigrare dagli animali all'uomo o *vice versa*, sono chiamate "zoonosi". Ciò che va sottolineato, in ogni caso, è che di rado una specie di virus è capace di infettare contemporaneamente un animale o l'uomo.

Come si è appurato in questi ultimi anni, però, alcuni virus hanno, rispetto ad altri consimili, un genoma che può facilmente ricombinarsi, ossia mutare rispetto alla sua struttura originaria. Queste modificazioni di struttura chimica del genoma virale sono dette "mutazioni", e, in qualche occasione, la mutazione che interviene può rendere il virus meno infettante o, *vice versa*, aumentarne la virulenza.

In più quando uomini e animali vivono a lungo in stretto contatto, il mix di virus che possono trovarsi contemporaneamente nello stesso ospite può indurre mutazioni del genoma di un virus che lo rendono capace di fare un "un salto di specie" ossia diventare patogeno non solo per la specie originaria, ma anche per un'altra specie (in questi casi, l'uomo). Al momento non vi è riscontro di infezioni virali trasmessa da avicoli, bovini e suini a uomo.

I virus possono passare in vario modo da un essere vivente a un suo simile sensibile: dipende da quali cellule il virus predilige per la sua replicazione. Esistono vari gruppi di virus che hanno uno specifico tropismo per le cellule della mucosa intestinale e quindi il loro "serbatoio naturale" o *reservoir* nel contenuto intestinale dell'uomo e/o degli animali (Koopmans *et al.*, 2004)

2.3 - Vie di trasmissione

Sappiamo che le principali vie di trasmissione dei virus enterici sono: per diretto contatto con feci umane (acqua contaminata da feci umane infette), per materiali imbrattati da feci di persone malate (utensili, mani di operatori), per superfici o acque in cui vi sono tracce di vomito umano, oppure per aver respirato l'aerosol di persone infette, generato nell'emesi.

Le feci e i liquami portano nell'ambiente esterno una carica di solito molto elevata del virus. In un grammo di feci di un uomo o di un animale infetto possono essere presenti 10^{10} - 10^{11} particelle virali (Leclerc H *et al.*, 2002). Una volta arrivati nell'ambiente esterno, i virus si trovano a dovere resistere ai fattori ambientali come luce solare e raggi UV, pH variabili, possibile carenza d'acqua. Questi fattori ambientali fanno sì che la carica virale che arriva nell'ambiente esterno con l'aria espirata o le feci si disperda, tanto che agli alimenti arrivano cariche virali molto contenute (anche meno di 100 o 10 virioni/gr di prodotto). La dispersione ambientale è però compensata da una capacità infettiva del virus molto elevata anche in poche decine di particelle virali. Infatti le feci disperse nelle acque fognarie possono provocare la contaminazione delle acque superficiali, incluse quelle marine, visto che i virus enterici possono sopravvivere a lungo in acqua (Koopmans *et al.*, 2002), in quanto protetti dai trattamenti di disinfezione, dall'azione inattivante della temperatura, del pH e dei raggi UV ed infine dall'antagonismo microbico grazie a due sistemi: l'aggregazione e l'adsorbimento.

L'aggregazione corrisponde alla formazione di aggregati formati da 2-10 unità virali chiamate "*Clumps*" che garantiscono una maggiore resistenza delle singole particelle alle condizioni ambientali, mentre l'adsorbimento è la grande capacità di legarsi a tutti i materiali, organici ed inorganici, e, nascosti dentro questi materiali, sono protetti dagli insulti ambientali. I virus così protetti riescono a sopravvivere per lunghi periodi nell'ambiente e possono essere trasportati dalle correnti anche a grande distanza dai punti di scarico.

I virus non replicano negli alimenti che contaminano e non producono alcun tipo di tossina. La carica dei virus rimane quella che si realizza con la contaminazione, visto

che dopo la carica virale non aumenta dopo l'arrivo nell'alimento.

3 - VIRUS E TRATTAMENTI ALIMENTARI

Come precedentemente ricordato, i virus enterici arrivano a contaminare gli alimenti e ovviamente anche tutti gli oggetti che l'uomo usa ogni giorno per molteplici vie. Possono arrivare dal contenuto intestinale degli animali da reddito (polli, bovini, suini,) o da compagnia, o dall'aria stessa che sfiora gli alimenti e gli altri oggetti, come le superfici di lavoro all'interno delle industrie alimentari, viaggiando con il pulviscolo atmosferico e il vapore acqueo. Grazie alle loro dimensioni così piccole e la loro massa ridottissima, vengono facilmente trasferiti a lunga distanza dal punto di emissione.

Per riprodursi, devono per forza infettare una cellula vivente e parassitarla obbligandola a produrre nuovi virioni dal suo interno stesso. Quando contaminano un alimento o un altro substrato, i virus non aumentano la loro carica iniziale; la carica virale che arriva a contaminare un alimento o un oggetto resta invariata, a meno che non intervenga un trattamento che la riduce inattivando una parte o tutta la carica virale iniziale.

Un trattamento sarà tanto più efficace quanto maggiore è la riduzione di carica virale che riesce a garantire. Questa riduzione di carica viene espressa con un parametro che viene chiamato "valore D".

Il valore D è un parametro usato in microbiologia che esprime in numero di secondi o di minuti che sono necessari a un certo trattamento per ridurre del 90% una carica iniziale nota di un batterio o di un virus, come nel nostro caso.

La maggior parte dei virus che sono agenti di infezione umana con gli alimenti non possono essere coltivati in laboratorio, su colture cellulari, come invece sovente è possibile per i virus agenti di malattia infettiva dei polli. Per cui i dati sulla loro sopravvivenza negli alimenti e sulla velocità di inattivazione con una tecnologia alimentare sono per lo più ottenuti da virus "surrogati". I "surrogati" dei virus patogeni per l'uomo sono dei virus che non sono pericolosi per la salute umana e che quindi possono essere manipolati in laboratorio senza adottare particolari precauzioni. Questi virus, però, sono scelti appositamente perché hanno una sensibilità al calore o ad altri agenti stressanti molto simile a quella posseduta dai virus patogeni che ci interessano. Quindi, i "surrogati" possono essere immessi intenzionalmente negli alimenti da trattare

per essere poi conteggiati al termine del trattamento e valutare, quindi, l'efficacia distruttiva di quel trattamento non solo nei confronti del virus surrogato, ma anche dei virus o dei virus patogeni che gli assomigliano.

A differenza di quanto sappiamo per i batteri agenti di malattia alimentare, non abbiamo molti dati bibliografici che documentino con precisione la sensibilità o la resistenza dei virus patogeni per l'uomo rispetto ai possibili trattamenti che l'uomo può mettere in atto con gli alimenti. La bibliografia scientifica ci aiuta con alcune importanti considerazioni per i principali trattamenti sugli alimenti.

4 - NOROVIRUS

4.1 - Caratteristiche microbiologiche

NoV è un virione di forma sferica, privo di *envelope*, di piccole dimensioni, 25-35 nm di diametro (Wobus *et al.*, 2004), e possiede un genoma a RNA a singola catena, poliadenilato, di senso positivo lungo 7.400 – 7.700 nucleotidi (Wobus *et al.*, 2006; Lin CY *et al.*, 2010). Il capsido contiene 90 dimeri che formano un involucro dal quale protrudono 90 capsomeri simili ad archi a livello locale dei doppi assi. Gli archi sono disposti in modo tale da formare, nelle posizioni tre e cinque delle pieghe icosaedriche, larghe depressioni simili a calici, da cui il nome Caliciviridae (Mans *et al.*, 2010).

I Norovirus, detti anche “*Small Round Structured Viruses*”, SRSV, o “*Norwalk-like Viruses*”, dalla prima identificazione in un'epidemia in una scuola elementare nel 1968 a Norwalk, Ohio, USA, sono il prototipo dei Calicivirus (calice dal latino *calix* = calice, coppa) (Rabenau *et al.*, 2003; Costantini *et al.*, 2006). Inizialmente descritti sulla base del loro aspetto al microscopio immuno-elettronico come dei Picornavirus o Parvovirus vennero più tardi inseriti in una nuova famiglia creata appositamente: le Caliciviridae. La famiglia Caliciviridae, virus a RNA a singola catena, poliadenilato, con senso positivo, è divisa in quattro generi: Norovirus, Sapovirus, Lagovirus e Vesivirus (Ozawa *et al.*, 2007; Bull *et al.*, 2006).

Il genere Norovirus appartiene, quindi, alla famiglia Caliciviridae e comprende virus enterici in grado di infettare l'uomo, il bovino, il suino e il topo. Geneticamente i NoV possono essere divisi in cinque genogruppi (GI, GII, GIII, GIV e GV) in base alla regione N-terminale (regione C) della regione del capsido VP1 e alla sequenza della regione RdRp (Castilho *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2001; Cox *et al.*, 2009).

In particolare I, II e IV comprendono i NoV umani mentre III e V comprendono i NoV bovini e murini, rispettivamente. La stretta correlazione genetica tra ceppi umani ed animali di NoV ha sollevato la possibilità di trasmissione zoonotica.

4.2 - Caratteristiche epidemiologiche

Nonostante la diffusione mondiale e l'alto livello d'incidenza non si conosce molto della biologia del Norovirus, del suo ciclo vitale e dei suoi punti critici per un eventuale trattamento (Preeti *et al.*, 2008). Non esistendo ad oggi dei sistemi di coltura cellulari efficaci per la replicazione dei NoV che colpiscono l'uomo, viene considerato, come modello per comprendere la replicazione, il ciclo vitale, la patogenesi e la risposta immunitaria dell'ospite, il *Murine Norovirus-1* (MNV-1) (Wu *et al.*, 2008; Ozkula *et al.*, 2011).

Wobus e collaboratori hanno dimostrato infatti che MNV-1 ed il NoV umano hanno molte caratteristiche simili, tra cui il genoma e la sua organizzazione e funzione, la grandezza del virione (da 28 a 35 nm), la modalità di trasmissione oro-fecale e la sintomatologia provocata (Henriette *et al.*, 2010). Inoltre, all'interno dei 5 genogruppi, il NoV murino è considerato l'unico ceppo in grado di replicare in colture cellulari di mammifero, così da divenire un eccellente candidato come modello sperimentale del NoV umano (Shuvra Kanti Dey *et al.*, 2010; Gustavsson *et al.*, 2011). Wobus e collaboratori nel 2004 hanno dimostrato che MNV-1 replica nelle linee cellulari ematopoietiche, incluse le cellule RAW 264.7, nelle cellule del midollo spinale che derivano da macrofagi e nelle cellule dendritiche. Altre linee cellulari di macrofagi e cellule dendritiche, che permettono la replicazione di questo virus, sono le IC21, P388D1, WBC264-9C e JAWSII. Le cellule RAW 264.7 rappresentano il modello più ampiamente utilizzato di linee cellulari per gli studi di MNV.

Il virus attacca i recettori della cellula ospite, penetra per endocitosi recettore mediata, perde il suo rivestimento e rilascia il genoma virale nel citoplasma. La proteina VPg viene rimossa dall'RNA virale, permettendo la traduzione di ORF1 in una poliproteina di cui fanno parte alcune proteine non strutturali coinvolte nella trascrizione stessa dell'RNA.

Attualmente il rischio di infezione nell'uomo con ceppi di NoV bovini è considerato basso, tuttavia la co-infezione di animali infettati da entrambi i tipi virali potrebbe portare alla produzione di un agente ricombinante con alterata virulenza. I BoNoV

hanno infatti dimostrato di andare incontro ad una estensiva ricombinazione genetica in una maniera simile ai NoVs umani (Mattison *et al.*, 2007).

Recentemente NoV è stato trovato in una grande percentuale di mandrie di vitelli e in alcuni maiali (Van der Poel *et al.*, 2000). I ceppi negli animali sono geneticamente distinti da ognuno dei virus trovati nelle persone (Sugieda *et al.*, 1998). Nessuna trasmissione vitello-uomo o suino-uomo è stata documentata finora. I virus animali, comunque, sono abbastanza simili al NoV umano e continua a cambiare come tutti i virus a RNA. Allo stesso modo, varianti di HEV sono state trovate in suini e, in questo caso, identici virus sono stati trovati anche in alcuni esseri umani (Meng *et al.*, 1997). Questa è stata presa come la prima evidenza di zoonosi da HEV. Quindi, data la flessibilità genetica dei virus a RNA, questi dovrebbero essere monitorati attentamente per i cambiamenti nel comportamento.

4.3 - Sintomatologia clinica

Recenti acquisizioni mostrano l'elevata capacità di NoV sia umani che animali di ricombinare a livello della sequenza di giunzione tra ORF1 e ORF2, attraverso un meccanismo simile al *crossing-over*, con frequenze dell'ordine del 10%, nel corso di infezioni multiple con diversi ceppi virali. Questi *shift* genetici sono stati al momento descritti solo tra virus di una stessa specie, ma i dati restano ancora parziali (Widdowson *et al.*, 2005). Il rischio di adattamento e salto di specie, soprattutto nel caso di virus ad RNA ad elevata diffusione e resistenza ambientale, deve essere considerato realistico anche alla luce di quanto riportato recentemente per altri sistemi virali, quali Coronavirus e Influenzavirus. Alcuni autori (Tirado *et al.*, 2010) hanno ritrovato sequenze GII.4 *like umane* in campioni di feci bovine suggerendo un possibile ruolo degli animali infetti come serbatoio per l'introduzione di nuovi ceppi virali con diverso tropismo o differente virulenza derivanti da ricombinazione tra NoVs bovini e umani. Inoltre questo studio evidenzia un potenziale meccanismo di trasmissione zoonotica dei NoV all'uomo attraverso carni, prodotti lattiero-caseari o contatto in stalla con animali infetti.

Recenti studi hanno dimostrato che NoV è la più comune causa unica di gastroenteriti in persone di tutte le età ed è comune allo stesso modo dei rotavirus in pazienti che si rivolgono ai loro medici di base per una gastroenterite (Wheeler *et al.*, 1999; Koopmans *et al.*, 2000).

I NoV sono i patogeni più comunemente isolati sia in casi sporadici che in episodi epidemici di gastroenterite, responsabili di più del 90% delle gastroenteriti non batteriche e di circa il 50% delle epidemie di gastroenterite nel mondo (Lopman *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2008). Si stima che il 12% dei casi di gastroenterite severa nei bambini al di sotto dei 5 anni di età ed il 12% dei casi moderati e medi di diarrea nelle persone di tutte le età siano imputabili ai NoV (Patel *et al.*, 2008). In studi condotti nei bambini sotto i 5 anni, la prevalenza di infezioni severe da NoV nei Paesi in via di sviluppo è risultata comparabile a quella nei paesi industrializzati (12%) (Patel *et al.*, 2008). Si stima, infatti, che ogni anno i NoV causino 64.000 episodi di diarrea che richiede ospedalizzazione e 900.000 visite cliniche di bambini nei paesi industrializzati e fino a 200.000 decessi di bambini sotto i 5 anni di età nei paesi in via di sviluppo (Patel *et al.*, 2008).

L'incidenza è la più elevata nei bambini, ma la malattia si manifesta regolarmente anche negli adulti. Infezioni asintomatiche sono comuni. In aggiunta, la maggioranza delle epidemie di gastroenterite in ospedali e case di cura sono causate da NoV (Codex Alimentarius, 1999).

4.4 - Norovirus negli alimenti

Anche se non è noto quale percentuale di infezioni può essere attribuito al consumo di cibi contaminati, diversi rapporti hanno dimostrato che le infezioni di NoV di origine alimentare sono comuni. Grandi epidemie, anche internazionali, di origine alimentare causate da NoV sono state descritte (Berg *et al.*, 2000). I dati dagli studi di sieroprevalenza suggeriscono che le infezioni da NoV si trovano in tutto il mondo.

Per NoV, epidemie di origine acquatica sono inusuali ma sono state riportate.

I NoVs sono stati rinvenuti in campioni ambientali (per esempio nei liquami trattati e

non trattati) così come in alimenti contaminati quali ostriche, frutti di mare, sandwich, insalata, frutti di bosco e perfino in cubetti di ghiaccio (Da Silva *et al.*, 2007; Ozawa *et al.*, 2007). Bassi livelli di trasmissione si possono verificare mediante approvvigionamento idrico per contaminazione delle falde o delle acque superficiali. Le acque dolci e marine infatti sono soggette a contaminazione a causa dell'intensa attività umana che determina apporti continui in aree specifiche. L'ingestione accidentale di acque ricreative contaminate può portare ad episodi di gastroenterite sporadici (La Rosa *et al.*, 2007), ma sono soprattutto i molluschi filtratori che vivono o vengono allevati in acque contaminate che possono diventare una fonte di contagio; si pensa infatti che i NoV possano essere concentrati nei bivalvi (La Rosa *et al.*, 2007; Nishida *et al.*, 2007). L'infezione primaria risulta dall'ingestione di alimenti o acqua contaminati da feci infette, mentre l'infezione secondaria si ha per contatto diretto da persona a persona, aerosol prodotto durante il vomito, fomenti e persone addette alla preparazione dei cibi infetti (La Rosa *et al.*, 2007).

4.5 - Trattamenti sugli alimenti

4.5.1 - Refrigerazione (H)

Mattison e collaboratori (2007) hanno valutato la sopravvivenza dei Calicivirus del gatto (FCV) inoculati in dosi di 10^5 ufp (unità formanti placche) su insalata e fragole mantenute a 4°C. La sospensione era stata preparata stemperando in soluzione fisiologica sterile il 10% di feci umane, con lo scopo di imitare il grado di contaminazione del prodotto dalla manipolazione umana. Il ceppo di virus FCV è stato preso in esame dagli Autori della ricerca per valutare la persistenza alla temperatura di refrigerazione dei Norovirus, pericolosi agenti di gastroenterite umana. Il gruppo di ricerca ha riscontrato un calo di circa 2 gradi log nell'insalata a distanza di 7 giorni a 4°C, mentre sulle fragole il calo registrato è stato di oltre 2,5 gradi log nel giro di 6 giorni (Mattison *et al.*, 2007).

Nonostante la riduzione anche piuttosto notevole, nei prodotti freschi condizionati solo con la temperatura di refrigerazione si è avuta la sopravvivenza di un numero ancora

elevato di virus, a breve termine. Quindi verosimilmente anche i Norovirus patogeni per l'uomo possono persistere a lungo sulla superficie degli alimenti, una volta che li hanno contaminati.

Dawson e collaboratori (2005) hanno usato un ceppo di Levivirus (MS2) come surrogato per i Norovirus per valutare la sopravvivenza di questi ultimi su differenti tipi di prodotti freschi. Per ciascun tipo di prodotto gli autori hanno inoculato 10 g con una sospensione di almeno 10^8 ufp di MS2 purificato. A 4°C nel giro dei successivi 7 giorni si è registrato un calo della carica virale non oltre 1 log, su prodotti quali pomodori, cavolo, carote, pepe, fragole e lattuga e un calo di meno di 2 log prima che i prodotti andassero a male. Anche questa seconda ricerca conferma che i Norovirus e altri tipi di virus analoghi non sono particolarmente sensibili alle basse temperature di refrigerazione.

Kurdziel e collaboratori (2001) riportano una riduzione di 1 LOG di poliovirus dopo 11,6 giorni di conservazione di lattuga e dopo 14,2 giorni sul cavolo bianco, a 4°C. Gli stessi autori non hanno registrato alcun calo della carica virale sulle cipolle nel giro di 15 giorni. La carica virale iniziale stimata da questi autori era di 10^4 - 10^5 ufp/g, una dose più realistica e vicina alle condizioni naturali di quanto non avessero fatto Dawson e collaboratori citati sopra, ma sostanzialmente i dati riscontrati sono stati gli stessi.

Oltre che la persistenza di FCV su vegetali freschi, Mattison e collaboratori (2007) hanno valutato la sopravvivenza di FCV anche su fette di prosciutto e hanno riscontrato all'incirca una riduzione di 1 log dopo 7 giorni di conservazione a 4°C. I ricercatori hanno notato che sul prosciutto il virus persisteva più a lungo e meglio che sulle verdure, ma non hanno saputo fornire una motivazione per questo comportamento, ipotizzando che il prosciutto in qualche modo “proteggesse” meglio il virus dalla disidratazione. Al contrario dei vegetali freschi, infatti, il prosciutto è ricco di proteine e grassi e la presenza di questi composti potrebbe offrire una protezione migliore ai virus.

Il virus FCV inoculato in molluschi bivalvi (cozze e vongole) marinati reperiti in vendita al dettaglio ha mostrato un calo di ben 7 log per FCV nel giro di 1 sola settimana (Hewitt e Greening, 2004). La marinata aveva un pH di 3,75 che potrebbe giustificare la rapida inattivazione del virus FCV.

Un altro studio ha valutato la sopravvivenza di poliovirus in yogurt del commercio (con il 3,5% di grasso e circa pH 4) trovando dei virus ancora infettanti a distanza di 24 ore sempre a 4°C (Strazynski *et al.*, 2002).

4.5.2 - Congelamento

FCV felini e quelli del cane (CaCV), sempre usati come “surrogati” per valutare la resistenza dei Norovirus patogeni per l’uomo, hanno manifestato un calo di infettività rispettivamente di $0,34 \pm 0,18$ log e di $0,44 \pm 0,12$ log dopo 5 cicli di congelamento e scongelamento (Duizer *et al.*, 2004). I Poliovirus, dal canto loro, hanno presentato un calo di 1 log in fragole congelate dopo oltre 8 giorni (Kurdziel *et al.*, 2001). *Vice versa*, non si è riscontrata alcuna significativa riduzione di infettività di Norovirus murino 1 (MNV-1) in cipolle surgelate e in spinaci surgelati nell’arco di 6 mesi (Baert *et al.*, 2008b). A differenza di HAV e rotavirus, il virus FCV ha fatto segnare 1-2 log di riduzione dopo 2 giorni di conservazione in fragole e altri frutti di bosco congelati, probabilmente per l’ambiente acido in cui si trovava il virus.

4.5.3 - Acidificazione

L’incubazione di FCV e di CaCV (surrogati dei Norovirus umani) a pH di 2 o più basso per 30 min a 37°C ha prodotto un calo della carica iniziale di oltre 5 LOG (Duizer *et al.*, 2004).

Una riduzione di meno di 1 LOG è stata registrata, invece, per il ceppo MNV-1 esposto a valori di pH di 2,0 a 37°C per 30 minuti mentre per il virus FCV il calo è stato di 4,4 log dopo esposizione alle medesime condizioni (Cannon *et al.*, 2006).

Particelle virali ancora infettanti sono state riscontrate se un filtrato di feci con Norovirus era sottoposto a valori di pH di 2,7 per 3 ore (Dolin *et al.*, 1972).

Simili bassi livelli di pH (pH 1 a 3,5) non sono tipici né degli alimenti né dei processi produttivi degli alimenti.

4.5.4 - Riduzione della frazione di acqua libera (A_w)

La sottrazione di acqua da un alimento provoca una concentrazione dei sali e un calo di quel fattore che si chiama “frazione di acqua libera” o “attività dell’acqua libera” (A_w). Un calo della A_w in un substrato rallenta la moltiplicazione di batteri, lieviti e muffe, se pure con differente intensità a seconda dei microrganismi.

Già nel 1973 Konowalchuk e Speirs avevano condotto prove sperimentali per valutare la persistenza di enterovirus (quali Coxsackievirus B5, Poliovirus, Echovirus 7) su vegetali conservati a 4°C per 8 giorni coperti, mentre i vegetali mantenuti scoperti avevano presentato un calo del 30% già dopo il primo giorno (Konowalchuk e Speirs, 1975). Gli studiosi ipotizzarono che la maggiore persistenza di virus sui campioni di vegetali fosse da ricondurre alla minore perdita di umidità superficiale nei campioni mantenuti coperti rispetto a quelli esposti direttamente all’aria.

In bibliografia troviamo anche studi che miravano a valutare l’influenza della A_w sulla persistenza di virus negli alimenti, ma sono studi limitati sebbene la sopravvivenza dei virus sia documentata in varie condizioni sulle superfici inanimate.

Doultree e collaboratori (1999) hanno osservato un calo di oltre 8 log per il virus FCV dopo 20 giorni a temperatura ambiente in condizioni di essiccamento. Nonostante il calo di FCV, un focolaio specifico di norovirosi registrato su una nave da crociera ha confermato che questi virus possono persistere bene nell’ambiente. Sequenze identiche si registrarono anche in crociere successive in cui i focolai erano da attribuire alle contaminazioni delle superfici della nave, nonostante l’accurata pulizia e disinfezione (Isakbaeva *et al.*, 2005). Il riscontro di sequenze identiche di Norovirus sulle superfici (tavoli, pulsanti di ascensori) e nei pazienti in un altro focolaio di norovirosi conferma che le superfici possono agire da veicolo di trasmissione di questi virus (Wu *et al.*, 2005).

La sopravvivenza dei virus dopo essiccazione a temperatura ambiente potrebbe anche dipendere dal terreno in cui i virus sono sospesi, come è stato già indicato per i rotavirus (Ward *et al.*, 1991).

Il trasferimento di NoV e FCV all’insalata diminuisce in caso si partisse da un *inoculum* prima disidratato (D’Souza *et al.*, 2006). Anche i virus HAV, essiccati, erano trasferiti in

misura minore alle superfici in acciaio (Mbithi *et al.*, 1992). Se l'essiccazione può agire favorendo minori contaminazioni delle superfici, la medaglia ha anche un suo rovescio: in condizioni di essiccazione i virus diventano molto più resistenti ai disinfettanti clorati come è stato segnalato per i ceppi MNV-1 e MS2 rispetto ai virus presenti in sospensione acquosa.

4.5.5 - Trattamenti termici

Gli effetti inattivanti che le alte temperature possono avere su virus e batteri non dipendono solo dall'intensità del calore, ma anche dal tempo di contatto del calore con i microrganismi. Ciò va sempre tenuto presente per valutare l'efficacia inattivante del calore nei confronti dei microrganismi.

Duizer e collaboratori (2004) hanno riscontrato tassi di inattivazione simili per i Calicivirus del gatto (FCV) e del cane (CaCV) a temperature che andavano da 37°C a 100°C. Ricordo qui che i due virus sopra indicati sono dei "surrogati" dei Norovirus, importanti agenti di malattia alimentare umana.

Tassi di inattivazione termica analoghi ai precedenti sono stati rilevati a 63 °C e 72 °C sono stati notati per i virus FCV e MNV-1 anche da Cannon e collaboratori (2006).

Dati discordanti dai precedenti erano stati invece quelli sull'abbattimento della carica virale già rilevati anni prima per il virus FCV per le medesime combinazioni tempo/temperatura da Doultree e collaboratori (1999) e questi riscontri sono stati poi confermati da Buckow e collaboratori (2008). Le differenze rilevate dai due gruppi di ricerca erano verosimilmente da attribuire alle modalità di impostazione delle due serie di prove sperimentali.

Il ceppo virale MNV-1 ha manifestato un calo di 2,81 log dopo esposizione a 75°C per 0,25 min in 10 g purea di ribes (Baert *et al.*, 2008a).

Slomka e Appleton (1998) hanno studiato sperimentalmente l'inattivazione termica di virus FCV per immersione di molluschi bivalvi in acqua bollente per 0,5 min e hanno trovato una riduzione di 1,7 log di FCV. Con quel tipo di trattamento termico si può stimare che a cuore dei molluschi la temperatura fosse arrivata all'incirca a 60°C. Dopo 1 minuto, la temperatura interna raggiunse i 78°C e ciò portò alla completa scomparsa

di oltre 4,5 log di virus FCV.

Programmando e mettendo in atto prove sperimentali molto valide sotto il profilo tecnico, alcuni autori avevano già anni fa appurato che dei Norovirus presenti in filtrati di feci umane mantenevano la loro capacità infettante anche dopo esposizione a 60°C per 30 minuti. Questo studio ha fatto emergere i risultati contraddittori se confrontati con le indagini sui surrogati degli stessi Norovirus, per cui sarebbe opportuno approfondire gli studi da questo punto di vista.

Il meccanismo di inattivazione termica sopra i 65°C potrebbe essere causato da profondi e irreversibili cambiamenti nella struttura del virione, verosimilmente dovuti allo srotolamento notevole delle proteine (Volkin *et al.*, 1997).

Nuanualsuwan e Cliver (2003b) hanno ipotizzato che il trattamento termico non causi perdita della infettività dell'RNA dei poliovirus, ma che il bersaglio presumibile dovrebbe essere il capsido virale. Inoltre, la struttura quaternaria dei Norovirus resta invariata se si sale di temperatura fino a 60°C. Occorre superare i 65°C perché le particelle virali comincino a diventare irregolari di forma con una significativa rottura della loro tipica struttura icosaedrica (Ausar *et al.*, 2006).

Siccome il calore colpisce primariamente il capsido virale, emerge una discrepanza tra infettività del virus e il suo rilevamento con tecniche PCR. Il ceppo MNV-1 esposto a 80°C per 2,5 min ha fatto segnare un calo di 6,5 Log mentre il segnale di PCR, che rappresenta il numero di copie genomiche, non era ridotto anche dopo 1 ora di trattamenti a questa temperatura (Baert *et al.*, 2008c). Le copie genomiche del ceppo MNV-1 sono state individuate su spinaci cotti a vapore mediante real-time RT-PCR (Baert *et al.*, 2008b). I segnali ottenuti con RT-PCR da campioni trattati col calore dovrebbero essere quindi interpretati con cautela perché si rischia di fare una sovrastima dell'infettività del virus e di conseguenza di aumentare il rischio virale per la salute umana.

4.6 - Epidemia in Germania

Nel Settembre/Ottobre 2012, un'epidemia di gastroenteriti da Norovirus è stata registrata nella parte orientale della Germania. Sono state colpite un totale di 390 strutture, molte scuole, dislocate in cinque degli Stati Federali della Germania. Sono stati registrati 10.950 casi di gastroenterite, con 38 ricoveri (Made *et al.*, 2010).

I risultati delle indagini epidemiologiche e di rintracciabilità suggeriscono che una consegna di fragole congelate importate dalla Cina fosse l'origine della epidemia. Gli studi caso-controllo hanno rivelato una forte correlazione tra le gastroenteriti e il consumo di composti di fragole servite fredde nelle mense (Anonymous, 2012b). Questa è stata la più grande epidemia di origine alimentare che sia mai stata riportata in Germania.

La tipizzazione dei norovirus ha rivelato tre differenti genotipi che includevano una combinazione di genotipo II.16 (polimerasi virale) e II.13 (capside virale). Il genotipo ricombinato II.16/II.13 che è stato trovato, non era mai stato riportato in Germania. Un genotipo ricombinato II.16/II.13 da Kolkata, in India, è stato depositato recentemente nel database GenBank (Made *et al.*, 2010).

Anche se la fonte della contaminazione è in molti casi sconosciuta, è stata più volte considerata come causa di contaminazione da virus nei frutti di bosco l'acqua di irrigazione contaminata da liquami umani. Da questo ci si può aspettare la contaminazione con un mix di virus diversi. La varietà riscontrata di genotipi di norovirus nelle fragole analizzate durante le indagini, è in linea con questa ipotesi (Made *et al.*, 2010).

5 - Hepatitis A Virus

5.1 - Caratteristiche microbiologiche

Nel 1947, McCollum ha introdotto i termini "Epatite A" per le epatiti infettive e "Epatite B" per le epatiti da siero (Purcell *et al.*, 2005). L'infezione da Epatite A è endemica in molti Paesi in via di sviluppo, e c'è un graduale spostamento nell'età in cui si contrae l'infezione dalla prima infanzia all'età adulta in diverse parti del mondo. Questo ha dei riflessi nella sintomatologia clinica, che da infezione asintomatica o blanda nei bambini sta aumentando l'incidenza di malattia grave e sintomatica. Negli ultimi anni, sta aumentando il numero di casi con una sintomatologia atipica di Epatite A nei bambini (Hussain *et al.*, 2006; Barzagna, 2000).

HAV è un piccolo virus a singolo filamento di RNA, con un genoma pari a 7500 nucleotidi, lineare, senza *envelop*, con tropismo epatico, classificato nel genere Hepatovirus nella famiglia dei Picornaviridae. I genotipi sono definiti basandosi su un'analisi di 900 nucleotidi del completo capsido della proteina VP1. Basandosi su questa sequenza, sono stati definiti 6 genotipi di HAV: genotipo I, II, III, IV, V, VI.

I genotipi I, II e III, divisi in sottotipi A e B, colpiscono gli esseri umani. Informazioni sulla distribuzione del genotipo I mostrano che è il più prevalente in tutto il mondo, con IA più frequentemente riportato di IB, e il sottogenotipo IIIA è prevalente in Asia Centrale. In aree con bassa endemicità, come gli USA e l'Europa Occidentale, il sottogenotipo IA domina, ma tutti i genotipi e i sottotipi sono stati riportati (Desbois *et al.*, 2010).

HAV, a differenza degli altri membri della famiglia Picornaviridae, è stabile a pH 1 e resiste al calore (56° per 30 min), al congelamento, ai detergenti e agli acidi, ma è inattivato da formalina e cloro. Il virus è resistente, sopravvive sulle mani delle persone e negli oggetti inanimati. L'escrezione di particelle virali nelle feci può durare dai 3 agli 11 mesi (Cuthbert *et al.*, 2001; WHO, 2000).

5.2 - Caratteristiche epidemiologiche

L'infezione da HAV è una malattia autolimitante che non causa epatite cronica. Ha quattro fasi:

- un periodo di incubazione che dura tra i 10 e i 50 giorni (media di 28 giorni), che è asintomatico ma durante il quale avviene l'escrezione virale.
- una fase prodromale, caratterizzata da malessere, febbre, mal di testa, disturbi gastrointestinali, urine scure e feci chiare.
- una fase itterica quando si sviluppa ittero, che avviene entro 10 giorni della fase prodromale.
- una fase di convalescenza con lenta ripresa dall'infezione acuta (WHO, 2000).

HAV può essere trasmesso attraverso acqua contaminata, cibo, e per via oro-fecale nei contatti ravvicinati (contatti domestici, contatti sessuali, asili nido o scuole). Non esiste una cura (Blystad *et al.*, 2004; Hanna *et al.*, 2005; Pebody *et al.*, 1998).

L'epatite A ha una distribuzione mondiale, con circa 1.4 milioni di casi all'anno. In molte aree del mondo è un'infezione endemica, tra cui parti del subcontinente indiano, America Centrale e del Sud, Africa e Medio Oriente. La diffusione di epatite A è inversamente correlata con i livelli di igiene e dei servizi sanitari (WHO, 2000).

La frequenza di notifica di casi di HAV nell'Unione Europea sta diminuendo consistentemente negli ultimi 15 anni, da 14.0 nel 1997 a 2.6 per 100 000 persone nel 2010. Questo più probabilmente riflette il miglioramento delle condizioni di vita poiché i tassi di sieroprevalenza di HAV sono altamente correlati con lo status socio economico e all'accesso ad acqua pulita e alla sanificazione. I più alti tassi di notifica nella UE sono riportati tra i giovani (sotto i 15 anni) (ECDC, 2011; Jacobsen *et al.*, 2000).

HAV generalmente segue uno di questi tre *pattern epidemiologici*: nei Paesi dove le condizioni igieniche sono scarse, molti bambini sono contagiati in tenera età. Uno studio condotto sui bambini di una scuola a Delhi ha trovato che tutti i bambini di 16 anni avevano anticorpi contro l'epatite A. Un diverso *pattern* è stato visto nei Paesi industrializzati, dove la diffusione di infezioni da HAV è bassa fra i bambini e i giovani

adulti. Negli USA, la diffusione di anti-HAV è approssimativamente del 10% nei bambini ma del 37% negli adulti. Un terzo *pattern* si è osservato in comunità chiuse o semi-chiuse, come le comunità isolate nel Sud Pacifico, in cui una epidemia di HAV è capace di contagiare l'intera popolazione, che poi diventa immune. Da quel momento in poi, i nuovi nati rimangono suscettibili fino a che il virus non è reintrodotto nella comunità (Acharya *et al.*, 2003; Sjorgen *et al.*, 2006).

Vi è un chiaro andamento stagionale con un picco in autunno, che può riflettere aumenti a seguito di viaggi in Paesi endemici durante le vacanze. La bassa incidenza nella popolazione europea può risultare in una alta percentuale di individui suscettibili se la copertura vaccinale è insufficiente (ECDC, 2011).

5.3 - Diagnosi e Prevenzione

L'epatite A è diagnosticata da un insieme di sintomi e dalla presenza di immunoglobuline M anti-HAV nel siero. Questo è riscontrabile nel siero da 2 settimane a 6 mesi dopo l'infezione. IgG anti-HAV è riscontrabile 5-6 settimane dopo l'esposizione e permane per anni. Conferisce immunità per il virus (Alazawi *et al.*, 2011).

Rigorose misure di controllo come far rispettare l'igiene personale, rintracciare i rapporti e somministrare i vaccini alle persone esposte sono risultati efficaci. Attualmente, sono disponibili due tipi di vaccini contro l'epatite A: pool di globulina sierica umana (ISG) e il vaccino inattivato contro l'epatite A (Stapleton JT, 1995). Le popolazioni target per la vaccinazione contro l'epatite A comprendono personale e bambini che frequentano asili nido; i membri della famiglia di una persona contagiata; viaggiatori in una area endemica; e personale delle forze armate. Se il gruppo di studio include individui che sono stati vaccinati contro l'HAV, questo porterebbe ad un errore di classificazione dell'esposizione al virus. Persone che hanno ricevuto dosi standard di ISG mostreranno negatività all'IgG di HAV indipendentemente dall'esposizione al virus perché sono protetti dall'essere contagiati. La risposta immunologica ai vaccini inattivati è molto simile all'infezione acquisita naturalmente (Stapleton JT, 1995; Sandman *et al.*, 1995). Gli attuali test sierologici non possono differenziare anticorpi sviluppatisi in risposta a

questo vaccino da anticorpi sviluppati in risposta all'infezione da HAV (Stapleton JT, 1995). Così, qualche individuo che era sieropositivo per HAV a causa della vaccinazione può non essere stato esposto alla via di trasmissione dell'HAV. L'immunizzazione attiva e passiva è efficace se somministrata entro due settimane dopo l'esposizione.

L'immunoglobulina HAV è efficace come profilassi post-esposizione in quelli che non sono immuni e in quelli esposti da meno di 2 settimane. I vaccini con HAV inattivato sono raccomandati per tutti quelli che possono essere a rischio di infezione da HAV (viaggiatori in zone endemiche, droghe illecite, sesso tra uomini) e coloro che hanno un maggiore rischio di grave patologia epatica da HAV, come quelli con virus da epatite C (HCV) cronico. In alcuni Paesi, come gli USA, viene ora incoraggiata la vaccinazione generale dei bambini. Il richiamo del vaccino è raccomandato ogni 10 anni (Martin *et al.*, 2006).

5.4 - Sintomatologia clinica

La malattia, spesso asintomatica o blanda, particolarmente in bambini con meno di 5 anni, è una malattia altamente trasmissibile con una media come periodo di incubazione dai 28 ai 30 giorni (range tra i 15 e i 50 giorni), con un periodo prodromico tra i 7 e i 12 giorni che inizia con con anoressia, nausea, vomito e malessere per arrivare all'ittero (Heymann, 2008). Quando la fase itterica inizia, i sintomi spesso si risolvono e ritorna l'appetito nei bambini piccoli, ma i bambini più grandi possono provare un peggioramento transitorio nei sintomi della fase prodromale di anoressia, malessere e debolezza (Bell *et al.*, 2004).

5.4.1 - Sintomatologia nei bambini

Nei bambini può essere inapparente (asintomatica, con nessun aumento del livello di aminotransferasi sierica), sub clinica (asintomatica, con aumento del livello enzimatico) o clinicamente evidente. Sintomi specifici di disfunzione epatica sono l'ittero e le urine scure da iperbilirubinemia. Sono stati segnalati casi di epatite A senza ittero (Bell *et al.*,

2004). Per i bambini è meno probabile avere un'infezione sintomatica degli adulti e si verifica raramente l'ittero nei bambini con meno di 6 anni. Meno del 10% dei bambini con meno di 6 anni diventeranno itterici con infezione da HAV rispetto al 40% dei bambini tra i 6 e i 14 anni e il 70% dei bambini che hanno superato i 14 anni, mentre negli adulti il 75-95% delle infezioni sono sintomatiche. Nelle aree endemiche tra il 73 e il 100% dei bambini hanno dimostrato di essere stati infettati in tenera età (Denson *et al.*, 2004).

5.4.2 - Sintomatologia negli adulti

Negli adulti, l'insorgenza della sintomatologia è solitamente brusca con febbre, malessere e dolori addominali. L'ittero è il sintomo predominante. I sintomi possono durare una o due settimane, fino ad un mese. L'epatite recidivante per fino ad un anno avviene nel 15 % dei casi. Nessuna infezione cronica è conosciuta e l'infezione conferisce una immunità permanente (Heymann, 2008).

La mortalità è bassa (0,1 - 0,3%) ma può diventare elevata (1,8%) negli adulti con più di 50 anni o in persone con una malattia epatica cronica sottostante (Heymann, 2008; Koff, 1998). Il picco di infettività è nella seconda metà del periodo di incubazione (mentre è asintomatico) e molti casi sono considerati non infettivi dopo la prima settimana di ittero.

5.4.3 - Sintomatologia atipica

Samanta T e collaboratori hanno riportato un'incidenza del 14% di manifestazione atipica in 229 bambini con epatite A nei loro studi dal 2004 al 2008. I sintomi più comuni sono colestasi prolungata, insufficienza epatica acuta, ascite recidivante e complicazioni ematologiche. I sintomi e le complicazioni cliniche atipiche del virus dell'epatite A possono variare considerevolmente:

- Epatite A recidiva: decorso clinico bifasico o polifasico può essere osservato dopo 1-4 mesi dal primo episodio di epatite A. Frequenza simile in bambini e adulti.
- Epatite fulminante: complicazione rara ma può essere più comune nei Paesi in

via di sviluppo. Nella parte orientale dell'India è la causa più comune di insufficienza epatica acuta. L'epatite A fulminante non ha caratteristiche cliniche distintive che la distinguono da insufficienza epatica fulminante dovuta ad altre cause.

- Epatite A colestasica: si manifesta in una piccola percentuale di bambini. Sono molto itterici e possono avere prurito, stanchezza, febbre, perdita di feci, anoressia, urine scure e perdita di peso (Samanta T *et al.*, 2010).

5.5 - HAV negli alimenti

La trasmissione di HAV di origine alimentare è stato implicato in alcune epidemie negli ultimi anni. EFSA e ECDC hanno riportato 11 epidemie tra il 2007 e il 2011, con una forte evidenza di HAV come agente eziologico. I mezzi alimentari coinvolti erano: pesce e prodotti a base di pesce, crostacei, vongole, molluschi e prodotti che li contenevano, vegetali, succhi e pomodori secchi (EFSA e ECDC, 2011).

L'incidenza di infezioni da HAV variano considerevolmente tra e all'interno dei Paesi (Mast and Alter, 1993). In gran parte dei Paesi in via di sviluppo, dove l'infezione da HAV è endemica, la maggioranza delle persone sono infettate in tenera età e virtualmente tutti gli adulti sono immuni. In queste aree, la trasmissione di HAV è primariamente da persona a persona. Le epidemie sono rare perché molte infezioni avvengono tra bambini che generalmente rimangono asintomatici.

Nei Paesi sviluppati, tuttavia, le infezioni da HAV diventano meno comuni come risultato degli aumentati livelli di benessere. Veramente poche persone sono infettate nell'infanzia, e la maggioranza degli adulti rimane suscettibile all'infezione di HAV. Siccome la diffusione del virus inizia 10-14 giorni prima dell'insorgenza dei sintomi, vi è un periodo per la diffusione del virus. Come risultato, il rischio di (grandi) epidemie di HAV aumenta in queste regioni.

Inoltre, gli adulti hanno più probabilità di sviluppare sintomi al momento dell'infezione, causando un maggior riconoscimento delle epidemie. Anzi, epidemie di origine alimentare sono state riportate in molte parti del mondo e possono essere di grande

dimensione.

A livello europeo, la Francia ha segnalato un' epidemia infettiva da HAV coinvolgente 59 casi (Gallot *et al.*, 2011); pomodori secchi congelati sono stati identificati come mezzo dell'infezione in tutti i casi primari. Pomodori secchi sono stati anche implicati in un'epidemia coinvolgente 144 casi da HAV in Australia nel 2009 (Donnan *et al.*, 2012) e furono sospettati in un gruppo di casi in UK nel 2011 (Carvalho *et al.*, 2012).

In Agosto e Novembre, l'Olanda ha segnalato due gruppi di infezioni da HAV IA con una grande percentuale di casi che sono stati precedentemente esposti alle fragole (indagine urgente in EPIS-FWD). I frutti di bosco sono anche implicati in epidemie infettive da HAV: nel 1987, 24 casi da HAV, associati al consumo di lamponi congelati, sono stati riportati in Scozia, UK (Reid *et al.*, 1987) ; nel 1997, un'epidemia che interessava 153 persone, associate con il consumo di fragole congelate, è stato segnalato in Michigan, USA (CDC, 1997). Il succo di arancia era implicato nel 2004 in una grande epidemia con più di 300 casi di infezioni da HAV in viaggiatori da nove Paesi europei, ritornanti dall'Egitto (Frank *et al.*, 2007).

Secondo il database del *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF), 18 campioni di alimenti sono stati trovati essere contaminati con HAV tra il 1999 e il 2013. HAV è stato trovato in sei Paesi europei (Belgio, Repubblica Ceca, Germania, Italia, Olanda e Spagna) nei seguenti cibi: crostacei (ostriche, cozze, vongole, capesante), pomodori secchi, datteri, fragole congelate, e la torta di yogurt alla fragola.

Per quanto riguarda i Paesi extraeuropei, sappiamo che a Shanghai, Cina, nel 1988, 250,000 persone ebbero un'infezione da HAV dopo aver consumato vongole contaminate (Halliday *et al.*, 1991). L'indagine di casi sporadici o piccoli gruppi di epatite A di origine alimentare è problematica perché il periodo di incubazione può essere lungo. In seguito, una possibile associazione con cibo consumato settimane prima può essere raramente investigato nel momento della comparsa della malattia. Come per il NoV, anche per HAV le epidemie di origine acquatica sono inusuali ma sono state riportate.

5.6 - Trattamenti sugli alimenti

5.6.1 - Refrigerazione

Croci e collaboratori (2002) hanno inoculato verdure pre-tagliate (carote, finocchio, insalata) per immersione in una sospensione contenente virus dell'epatite infettiva di tipo A (HAV) invece che effettuare l'inoculazione con metodo per aspersione, come fatto dagli autori prima citati e in altri studi (Mattison *et al.*, 2007; Dawson *et al.*, 2005; Kurdziel *et al.*, 2001). Inoltre hanno appurato che dopo 9 giorni di conservazione a 4°C delle verdure, si otteneva una riduzione di circa 2 gradi LOG di HAV. Il virus sopravviveva più a lungo sull'insalata rispetto al finocchio o alle carote, probabilmente per la struttura e la superficie dei differenti tipi di vegetali.

In sostanza, considerati i dati raccolti, sembrerebbe che i virus MS2 abbiano una maggiore persistenza sui vegetali rispetto ai Calicivirus, ai poliovirus e al virus HAV, ma questo comportamento potrebbe essere attribuito anche alla notevole carica inquinante che gli autori delle ricerche hanno inoculato nei campioni studiati, rispetto alle condizioni di contaminazione che si registrano nella realtà quotidiana dei fatti.

Il virus HAV inoculato in molluschi bivalvi (cozze e vongole) marinati reperiti in vendita al dettaglio ha mostrato un calo di circa 1,7 log di HAV dopo 4 settimane di conservazione a 4°C (Hewitt e Greening, 2004). La marinata aveva un pH di 3,75 che potrebbe giustificare la rapida inattivazione del virus FCV.

Possiamo concludere che le indagini sperimentali condotte sui prodotti refrigerati (sia di origine animale sia di origine vegetale) hanno permesso di accertare che i virus possono persistere in numero considerevole sui prodotti nell'arco della loro vita commerciale se i prodotti sono conservati solo con l'impiego delle temperature di refrigerazione.

5.6.2 - Congelamento

Butot e collaboratori (2008) riferiscono che il numero dei rotavirus (altri pericolosi agenti di gastroenterite umana, sovente veicolati da alimenti e acque poco potabili) e di HAV resta stabile durante i 90 giorni di conservabilità di lamponi e altri frutti di bosco congelati, ma anche su prezzemolo e basilico, ad eccezione dei rotavirus che hanno fatto

segnare un calo di 1 log sui ribes e basilico dopo 2 giorni di congelamento.

5.6.3 - Acidificazione

Unità infettanti di HAV erano ancora presenti a distanza di 5 ore di esposizione a pH di 1 a temperatura ambiente mentre ceppi di Coxsackievirus A9 e B1, enterovirus 9 e poliovirus scomparivano del tutto nel giro di 2 ore alle condizioni sopra specificate (Scholz *et al.*, 1989). A 38°C, il virus dell'epatite infettiva A è rimasto infettante fino a 90 minuti a pH 1 (Scholz *et al.*, 1989).

5.6.4 - Riduzione della frazione di acqua libera (A_w)

Mbithi e collaboratori (1991) riferiscono che i tassi di decadimento del virus dell'epatite infettiva A sono maggiori a elevata umidità relativa dell'aria (80%), rivelando una sopravvivenza del 34% rispetto a tassi di umidità relativa più bassa (25%), dove registriamo un 52% di sopravvivenza su superfici non inerti non porose. Però Abad e collaboratori (1994) segnarono una migliore sopravvivenza del virus HAV se l'umidità relativa era alta (90%) rispetto a una bassa umidità relativa del 50% su superfici non porose nel corso di 60 giorni a 20°C. Il calo massimo registrato è stato di 2 log nell'arco di 60 giorni.

In un'altra nutrita serie di indagini, è stata studiata l'inattivazione di virus alle condizioni di essiccamento o la loro sopravvivenza in quelle condizioni. Dopo essiccamento per circa 4 ore a temperatura ambiente, il 7% dei rotavirus e tra il 16% e il 30% dei virus HAV poteva ancora persistere ed essere ritrovato (Ansari *et al.*, 1988; Mbithi *et al.*, 1992).

I Poliovirus hanno fatto segnare riduzioni tra 3,1 e 3,5 log dopo un'essiccazione di 3-5 ore su superfici non porose con un calo da 0,1-0,5 log e 0,3-1,1 rispettivamente per virus HAV e rotavirus su quelle stesse superfici (Abad *et al.*, 1994). L'essiccazione può giocare un ruolo di primo piano nella capacità dei virus di sopravvivere nell'ambiente esterno.

Il virus dell'epatite infettiva A e i rotavirus hanno manifestato maggiore stabilità rispetto ai poliovirus confermando la maggiore trasmissibilità dei predetti due gruppi di virus

tramite superfici di lavoro contaminate da materiale fecale. Inoltre, HAV infettanti sono stati ancora rilevati dopo essiccamento in una sospensione di feci per 30 giorni a 25°C e con un'umidità relativa del 43% (McCaustland *et al.*,1982).

5.6.5 - Trattamenti termici

Bidawid e collaboratori (2000b) hanno studiato l'inattivazione termica del virus dell'epatite infettiva A (HAV) in latte magro sterile, in latte omogeneizzato e in panna da cucina. A 71°C l'esposizione dei virus per tempi di 0,16 – 0,18 – 0,52 minuti è stata la minima necessaria per ridurre di almeno 1 log la carica iniziale di HAV mentre per arrivare a un calo di 4 log si doveva salire a 6,55 minuti (latte magro), 8,31 minuti per latte intero e 12,67 minuti per la panna da cucina.

Questa variabilità di efficacia del trattamento termico nei confronti dei virus citati è da attribuire alla differente composizione dell'alimento e in particolare il suo tenore di lipidi, che influenza certamente la resistenza termica o l'inattivazione termica dei virus. Per esempio nella panna da cucina si è dovuti arrivare a un trattamento ancora più lungo per ottenere un'efficace riduzione del virus HAV analoga a quella ottenuta nel latte. Verosimilmente gli elevati tassi di lipidi della panna proteggevano il virus HAV dal calore.

Analogamente, i poliovirus perdono la loro infettività se esposti nel latte ad almeno 72°C nel giro di 0,25 minuti, tempi maggiori rispetto alla sola acqua, sempre a motivo dei componenti del latte (Strazynski *et al.*, 2002).

Un effetto protettivo analogo nei confronti dei virus è stato descritto per i molluschi eduli (cozze e vongole) da Croci e collaboratori (1999). Inoculando del virus HAV in un omogenato di molluschi eduli, infatti, gli studiosi hanno ottenuto una riduzione di 2 del virus HAV dopo esposizione di 10 minuti a 60°C o di 3 minuti a 80°C (Croci *et al.*, 1999).

Bidawid e collaboratori (2000b) hanno osservato un calo non lineare del virus HAV in latte se trattato tra 65°C e 75°C. La rapida inattivazione osservata nella fase iniziale del trattamento e il “rallentamento” dell'inattivazione nella parte finale potrebbe essere spiegata dalla presenza di molti virioni in sospensione e al di fuori degli aggregati che in

genere i virus formano.

Anche Floyd e Sharp (1979) hanno stabilito che una sottopopolazione di microrganismi può diventare più resistente ai disinfettanti per la formazione di “aggregati” (*clumps*). L’aggregazione virale è influenzata dalla composizione ionica del mezzo in cui si trovano, dal pH della matrice e dal punto isoelettrico del virus. Le condizioni che inducono la formazione di aggregate virali, quindi, può essere influenzata dalla matrice alimentare come pure dal tipo di virus.

Deboosere e collaboratori (2004) hanno studiato la termo-resistenza del virus dell’epatite infettiva (HAV) inoculato in terreni sintetici che simulavano le caratteristiche chimiche di fragole e simili (Deboosere *et al.*, 2004). I loro esperimenti hanno dimostrato che la concentrazione di saccarosio (espressa in gradi Brix) e il pH influenzavano l’inattivazione termica del virus HAV. In 1 g di fragole il virus HAV calava di 1 log dopo un trattamento termico di 2 minuti per raggiungere gli 85°C e poi seguito da 0,96 minuti a 85°C (Deboosere *et al.*, 2004).

Sebbene sembri che il virus HAV sia più termoresistente del virus MNV-1, la composizione del ribes (vale a dire alte concentrazioni di saccarosio associata ad altri possibili componenti), il periodo di pre-riscaldamento di 2 minuti e l’alta carica dell’*inoculum* virale (10^7 ufp/ml HAV contro 10^5 ufp/ml MNV-1), potrebbero essere parzialmente responsabili dei differenti tassi di inattivazione.

5.7 - Epidemia nei Paesi nordici

Nel Febbraio 2013, la Danimarca ha registrato un numero di pazienti segnalati con un’infezione da virus dell’epatite A più alto del normale, che non avevano fatto viaggi nelle 2-6 settimane precedenti alla comparsa dei sintomi e non avevano altri fattori di rischio conosciuti per le infezioni da HAV. Allo stesso tempo, i virus da sei pazienti con epatite A, che sono stati comunicati fin dall’Ottobre 2012, hanno mostrato di essere di genotipo 1B (numero di accesso in GenBank KC876797).

Un’indagine epidemica è stata iniziata ed è stata inviata una richiesta urgente attraverso l’*Europe Epidemic Intelligence Information System for food- and waterborne diseases* (EPIS-FWD) il 1 Marzo 2013, chiedendo se altri Paesi avessero notato un aumento di

loro connazionali con infezione da HAV (MacDonald *et al.*, 2013).

Anche Finlandia, Norvegia e Svezia riportarono un aumento nel numero di pazienti con HAV senza aver viaggiato all'estero. Ogni Paese ha identificato uno o più casi con genotipo IB di HAV che ha sequenza identiche agli HAV dei casi danesi. L'epidemia è ancora in corso (Gillesberg Lassen *et al.*, 2013).

In Danimarca furono stabilite le seguenti definizioni dei casi di epidemia e sono stati applicati in tutti e quattro i Paesi, ad eccezione della Svezia che include solo casi dal 1 Dicembre 2012 in avanti e la Finlandia che non esclude casi con altri fattori di rischio:

- Un *caso probabile* viene definito come una persona che vive in Danimarca, Finlandia, Norvegia o Svezia con malattia clinica compatibile con infezione da HAV e positività per gli anticorpi IgM di HAV; nessuna storia di viaggi fuori dai Paesi nordici due o sei settimane prima dalla comparsa dei sintomi; o avendo altri fattori di rischio conosciuti per HAV e la comparsa dei sintomi il 1 Ottobre 2012 o più tardi.
- Un *caso confermato* viene definito come un probabile caso con un genotipo IB di HAV con una sequenza che non differisce più del 2% dalla sequenza KC876797.
- Sono stati *esclusi* tutti i pazienti con altro genotipo di HAV che non sia IB, o pazienti con una sequenza di genotipo IB che differisce più del 2% dalla sequenza KC876797, o pazienti con un HAV atipico da familiari di un paziente escluso con infezione da HAV.
- Un *caso secondario* viene definito come un caso probabile o confermato con contatto ravvicinato a un caso probabile o confermato e avendo la comparsa dei sintomi due o più settimane dopo il caso primario (Gillesberg Lassen *et al.*, 2013).

5.7.1 Epidemia in Danimarca

La malattia da HAV viene denunciato in Danimarca: i medici di base riportano i pazienti direttamente al *Statens Serum Institute* (SSI). I test diagnostici vengono svolti nei

laboratori locali e nel SSI, usando la sierologia. La tipizzazione del virus è avvenuta solo al SSI Microbiological Diagnostics and Virology Department, che ha ricevuto i campioni diagnostici IgM positivi per la conferma dell'identificazione dell'RNA virale grazie alla PCR, e ulteriori caratteristiche da genotipizzazione e sequenziamento. L'RNA virale viene estratto, tipizzato e sequenziato alla regione VP1, usando un protocollo fornito da H. Norder (comunicazione personale, 21 Dicembre 2006), compreso alcune sequenze di *primer* precedentemente pubblicato (Tallo *et al.*, 2003).

Al 17 Aprile 2013, sono stati identificati in Danimarca un totale di 35 casi, di cui 13 confermati e due casi secondari: 21 erano donne e l'età media era 22 anni (*range* tra i 4 e i 66 anni). La data della comparsa dei sintomi spazia tra il 1 Ottobre 2012 e il 27 Marzo 2013. Sono state identificate due famiglie con, rispettivamente, due e tre casi, oltre a un gruppo di quattro amici che sono stati esposti nel medesimo periodo.

In 10 casi è stato identificato il ceppo HAV con numero KC876797 (sequenza 1). Il ceppo HAV con numeri KC876798 e KC876799 (sequenza 2), che differiscono del 1,7% su 847 coppie di basi dalla sequenza 1, è stato identificato in tre dei quattro amici.

Il 4 marzo 2013, Olanda e Francia hanno comunicato, via l'EPIS-FWD e la rete di laboratori di HAV, che la sequenza 1 assomiglia alle sequenze di HAV trovate nei casi di epatite A di ritorno dall'Egitto. La sequenza 1 ha mostrato anche di essere per il 98,7% identica a sequenze di HAV da una epidemia canadese associata a semi di melograno importati dall'Egitto nel 2012 (Dr. Anton Andonov, comunicazione personale, 19 Marzo 2013). Inoltre, i ceppi dell'epidemia sono strettamente correlati al ceppo trovato in turisti europei di ritorno dall'Egitto. La sequenza 1 ha mostrato anche un 99% di omologia con il numero HQ401265 dalla Spagna nel 2010 e il 98% di omologia con il numero EF190998 dall'Ungheria nel 2006 (Gillesberg Lassen *et al.*, 2013).

5.7.2 Indagine epidemiologica del caso danese

Un totale di 11 casi sono stati intervistati usando un'intervista informativa per identificare possibili comuni esposizioni, quali eventi comuni o il consumo di cibi implicati in altre epidemie di epatite A di origine alimentare (per esempio molluschi, pomodori semi-secchi, frutta secca, frutti di bosco e fagioli).

Per corroborare l'ipotesi che un alimento su un elenco di prodotti a lunga conservazione potesse essere l'origine dell'infezione, è stato istituito uno studio caso-controllo. Lo studio includeva 25 casi probabili e confermati e 50 controlli, ed è stata effettuata con questionari in interviste telefoniche dal 6 al 13 Marzo 2013. I casi secondari non sono stati inclusi nell'indagine. I casi sono stati interrogati sulle esposizioni nelle sei settimane prima della comparsa dei sintomi e i controlli nelle sei settimane precedenti all'intervista. Un caso è stato escluso successivamente dalle analisi, visto che la persona aveva un genotipo IA di HAV.

Dei 24 casi, 18 avevano mangiato frutti di bosco congelati, usati per frullati preparati al momento e 20 avevano mangiato fragole. Solo in sei casi è stato segnalato il consumo di pomodori secchi, datteri o fichi. Per gli ultimi due alimenti, un'associazione distorta potrebbe derivare dal fatto che il periodo di esposizione dei casi, non dei controlli, in alcuni casi includeva Natale, periodo in cui datteri e fichi sono tradizionalmente mangiati in Danimarca. Nessuna catena specifica di supermercati è stata associata ai casi di malattia.

I risultati sono stati inviati direttamente al *Danish Food and Veterinary Administration* (DFVA) e al pubblico attraverso notizie sul sito della SSI. La comunità internazionale è stata informata il 14 Marzo 2013 attraverso l'*European Early Warning and Response System* (EWRS). Il DFVA ha raccomandato alla popolazione di bollire tutti i frutti di bosco congelati per almeno un minuto prima di consumarli (Gillesberg Lassen *et al.*, 2013).

5.7.3 Epidemia in Finlandia, Norvegia e Svezia

Al 17 Aprile 2013, 36 casi sono stati identificati in Finlandia, Norvegia e Svezia, di cui 15 erano confermati. In totale sono stati trovati 71 casi in quattro Stati. Finlandia e la Norvegia hanno riportato casi confermati con sequenza 1 e 2. In Svezia, due degli otto casi confermati avevano sequenza IB di HAV (chiamata sequenza 3), con un 2% di differenza dalla sequenza 1 e un 1% dalla sequenza 2. L'età media complessiva dei casi confermati era 25 anni (tra i 3 e i 78 anni); 43

casi sono donne. In Norvegia e Svezia (ma non in Finlandia), erano contagiate più donne che uomini. Al 17 Aprile, la Svezia era il solo Paese con casi la cui insorgenza dei sintomi è avvenuta in Aprile. Un aumento del numero di pazienti con epatite A collegata ai viaggi può essere spiegata in parte da persone contagiate in Egitto (MacDonald *et al.*, 2013).

Le indagini sull'epidemia sono in corso in Svezia, Finlandia e Norvegia. In Svezia, il questionario danese è stato inviato a tutti i casi. Di 12 casi, che hanno risposto al questionario entro il 15 Aprile, nove risposero di aver mangiato frutti di bosco congelati al tempo dell'infezione. Tra i sette casi confermati che hanno risposto al questionario, cinque avevano mangiato frutti di bosco congelati.

In Finlandia, sette casi avevano mangiato frutti di bosco congelati al tempo dell'infezione. Tutti e tre i casi confermati in Finlandia avevano mangiato fragole congelate; due avevano anche mangiato altri tipi di frutti di bosco (lamponi, mirtilli e mix di vari frutti di bosco).

In Norvegia, tutti i sei casi riportati avevano mangiato frutti di bosco congelati al tempo dell'infezione e i quattro casi confermati avevano mangiato fragole congelate. La Norvegia, tra il 18 e il 21 Marzo 2013, ha condotto uno studio caso-controllo, includendo 10 pazienti e 25 controlli. I casi erano pazienti con infezione da HAV o persone epidemiologicamente collegate a casi di HAV confermati, e che avevano sintomi simili senza viaggi nei due mesi precedenti all'insorgenza dei sintomi, che hanno contratto un'infezione primaria e hanno avuto un'insorgenza dei sintomi tra il 1 Novembre 2012 e il 21 Febbraio 2013. Nessun prodotto alimentare è stato statisticamente e in modo significativo collegato con la malattia; però, questo studio ha sofferto di un limitato potere a causa del basso numero di casi. Comunque sei dei casi riportati avevano mangiato frutti di bosco congelati. La tipizzazione successivamente ha mostrato che solo quattro degli 11 "casi" nello studio corrispondevano alla definizione di caso da epidemia (Gillesberg Lassen *et al.*, 2013).

I test di laboratorio sui frutti di bosco presi dalle case di sette casi confermati da Danimarca, Svezia e Norvegia sono risultati negativi a HAV. Si stanno ancora

aspettando i risultati di campioni di frutti di bosco presi da due casi confermati in Finlandia.

5.7.4 Risultati e ripercussioni

Questa è la prima epidemia da HAV di origine alimentare dei Paesi nordici. I risultati dello studio caso-controllo indicano chiaramente i frutti di bosco congelati (in particolare le fragole) come il probabile veicolo dell'epidemia. I frutti di bosco surgelati sono già stati in precedenza identificati come veicolo in epidemie da HAV. Le indagini epidemiologiche negli altri tra Paesi nordici confermano questa informazione (Hutin *et al.*, 1999; Reid *et al.*, 1987; Niu *et al.*, 1992).

Come le prove disponibili hanno stabilito che il consumo di frutti di bosco congelati è il probabile dell'infezione, l'indagine in corso è ora volta a identificare il tipo e la marca di frutti di bosco responsabili per l'epidemia.

Nell'epidemia sono implicate tre sequenze di genotipo IB di HAV con una massima differenza del 2%, corrispondente a una differenza di pochi nucleotidi. Una possibile spiegazione di questo è che i frutti di bosco sono stati contaminati con diversi ceppi strettamente correlati. Mentre le epidemie da infezioni di HAV sono spesso causate da un singolo genotipo e sequenza virale (Schwarz *et al.*, 2008), le epidemie di origine alimentare causate da molteplici ceppi HAV (Fournet *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2011), a causa di alimenti importati da regioni endemiche (Nygard *et al.*, 2001; Pebody *et al.*, 1998).

Peraltro, data la lunga durata di conservazione dei prodotti surgelati, il lungo periodo di incubazione del virus dell'epatite A da 28 ai 30 giorni (*range*: 15-50 giorni) (Heymann, 2008) e il potenziale ritardo nelle comunicazioni, probabilmente più casi saranno comunicati nei quattro Paesi.

Per questo l'11 Aprile, le autorità alimentari in Danimarca, Finlandia e Svezia hanno emesso la raccomandazione di, prima di consumarli, trattare termicamente tutti i frutti di bosco congelati o di origine non domestica. Il 12 Aprile, il *Norwegian Food Authorities* e il *Norwegian Institute of Public Health* hanno

informato la popolazione che, per ridurre il rischio di contrarre HAV attraverso i frutti di bosco congelati importati, è sufficiente bollire i frutti di bosco prima di mangiarli. Il 16 Aprile 2013, l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) ha pubblicato una rapida valutazione dell'epidemia, informando gli altri Paesi europei, oltre alla Commissione Europea (EFSA-ECDC, 2013).

6 - HEPATITIS E VIRUS

Il virus dell'epatite E è un'importante causa di morbilità nei Paesi in via di sviluppo (Teshale *et al.*, 2010) e recentemente è stato riscontrato in molti Paesi industrializzati. Questo virus dovrebbe essere preso in considerazione nei casi di epatite acuta, soprattutto nei viaggiatori che ritornano a casa (Meng *et al.*, 2011). Non essendo argomento specifico della tesi, verrà data solo un breve inquadramento, con particolare attenzione alla trasmissione alimentare.

6.1 - Caratteristiche microbiologiche

HEV è un virus di RNA a singolo filamento della famiglia Herpesveridae, senza *envelope*, con delle dimensioni tra i 27 e i 34 nm (Panda *et al.*, 2013; Kamar *et al.*, 2012). Sono stati descritti quattro genotipi: i genotipi 1 e 2 sono stati trovati unicamente negli umani e sono associati con i focolai epidemici in Africa, Asia e Messico (Aggarwal, 2013; Kmush *et al.*, 2013), mentre i genotipi 3 e 4 sono coinvolti con casi sporadici e sono stati trovati sia negli umani che negli animali, oltre che in Asia (Banks *et al.*, 2004).

6.2 - Caratteristiche epidemiologiche

Il virus HEV viene trasmesso primariamente per via oro-fecale ed è globalmente la più comune causa di epatite virale acuta (AVH). Il contagio è seguito da un periodo di incubazione variabile, tra le 2 e le 8 settimane. Causa epidemie di AVH su larga scala nei Paesi a basso e medio reddito in Asia e Africa, e provoca anche casi sporadici nelle stesse regioni (Purcell *et al.*, 2008).

Una percentuale significativa di individui sani nei Paesi industrializzati è sieropositiva per HEV, e un'alta diffusione di anticorpi anti-HEV di più del 20% è stata segnalata in alcune aree degli USA (Kuniholm *et al.*, 2009). Sono stati individuati anticorpi anti-HEV su molte specie animali, e HEV RNA è stato isolato da suini domestici e animali selvatici (cinghiali, cervi e manguste). HEV è il solo virus che da un'epatite che infetta

gli animali oltre che i primati (Pavio *et al.*, 2010), però non è una causa di malattia nei suini. Un'indagine sui macelli suini sarà intrapresa nei primi mesi del 2013 per meglio comprendere il possibile ruolo dell'infezione nei suini sull'incidenza della malattia negli esseri umani. (Zoonoses Report UK, 2012)

In Gran Bretagna, il 9% dei casi diagnosticati tra il 1996 e il 2003 era in pazienti che non avevano viaggiato nella fase precedente alla malattia, con la possibilità che fossero collegati a *reservoir* di HEV in suini e, forse, altri animali (Meng, 2011). Nel 2003 i casi di zoonosi umana confermati in laboratorio erano 129 (di cui 124 solo in Inghilterra e Galles) (Zoonoses Report UK, 2012). Negli ultimi anni i casi da HEV sono significativamente aumentati ed è sempre di più riconosciuto come una delle principali zoonosi. C'erano 657 casi (di cui 579 sono in Inghilterra e Galles) riportati in Gran Bretagna nel 2012, un aumento del 39% dal 2011. I casi autoctoni oggi rappresentano la maggior parte dei casi in Inghilterra e Galles e questa sembra essere la principale ragione dell'aumento recente. Più del 50% dei casi sono uomini con più di 50 anni, con nessun raggruppamento geografico. Gli studi hanno dimostrato che i casi non legati a viaggi sono contagiati dal genotipo 3 di HEV, simile a quello trasmesso dai suini britannici (Zoonoses Report UK, 2012).

Il periodo di infettività è sconosciuto e delle buone misure generali di igiene sono fondamentali per limitare la diffusione. L'isolamento non è stato indicato visto che la diffusione da persona a persona non è stata riportata. Le epidemie sono più frequenti in Paesi in via di sviluppo con scarsa igiene e tendono a seguire i Monsoni o i disastri naturali dove l'igiene è ulteriormente compromessa. Il consiglio ai viaggiatori è di usare le precauzioni standard per l'igiene degli alimenti. Non ci sono vaccini autorizzati.

Nelle Paesi industrializzati, anche se l'incidenza clinica di epatite E nelle persone è bassa, la sieroprevalenza di anticorpi anti-HEV è relativamente alta, il che sta a segnalare un'alta percentuale di malattia subclinica e/o sottodiagnosticata. Una piccola percentuale di esposizione all'HEV è probabilmente il risultato di viaggi in regioni endemiche o migrazioni da queste aree (Zhu FC *et al.*, 2010).

6.3 - Sintomatologia clinica

L'epatite virale acuta causata da HEV è solitamente una malattia acuta, autolimitante, simile nella sintomatologia clinica manifestata all'epatite virale acuta causata da HAV. Tuttavia, in due situazioni può causare grave malattia che può portare ad un'alta mortalità: quando l'epatite virale acuta si presenta in donne incinte può portare a un rapido peggioramento come l'insufficienza epatica acuta (Shalimar *et al.*, 2013), e quando avviene in pazienti con malattia epatica cronica che può peggiorare in una insufficienza epatica acuta su epatopatia cronica (ACLF) (Jalan *et al.*, 2012).

I sintomi e i segni non sono specifici e sono tipici di altre epatiti virali con ittero, sofferenza e dolorabilità addominale, febbre, nausea e vomito. C'è una grande gamma di gravità che include insufficienza epatica acuta, con una mortalità fino al 4% nella popolazione generale e arriva al 20% nelle donne in gravidanza al terzo trimestre.

Le particelle virali possono essere trovate nella bile e nelle feci per circa 2 settimane dopo la comparsa dei sintomi, ed è stato segnalato anche a 52 giorni. L'RNA virale viene individuato usando la PCR per circa 4 settimane dopo la comparsa della sintomatologia e, anche se uno stato realmente cronico non esiste, può essere riscontrato dopo 16 settimane dai primi sintomi (Alazawi *et al.*, 2011).

Non c'è una terapia ottimale per le infezioni acute da HEV, ma la Ribavirina può avere qualche efficacia (Kamar *et al.*, 2013). L'interferone peghilato è stato usato con successo nel trattamento di epatite E cronica (Kamar *et al.*, 2010).

6.4 - HEV negli alimenti

Nelle regioni dove l'infezione è endemica, la principale via di trasmissione del virus di epatite E è attraverso il consumo di acqua o cibo contaminato. Invece, nelle aree non endemiche, casi sporadici di epatite E acuta negli esseri umani sono ricondotti all'aver consumato carne contaminata di cinghiale e cervo cruda o poco cotta (Masuda *et al.*, 2005; Tei *et al.*, 2003). Per di più, in diversi Paesi, tra il 2 e l'11% dei fegati suini nel negozio o nei macelli sono contaminati da HEV, e alcuni contengono particelle infettive (Bouwknegt *et al.*, 2007; Feagins *et al.*, 2007; Rose N *et al.*, 2013; Wenzel *et al.*, 2011).

In Giappone, è stata dimostrata la trasmissione con gli alimenti attraverso il consumo di carni di cervi Sika (*Cervus nippon*), cinghiali selvatici, e suini (Tei S *et al.*, 2003). La scoperta di HEV in fegati suini nella vendita al dettaglio è stata provata in Giappone (1,9%), Usa (14%) e Olanda (6,5%) (Bouwknegt *et al.*, 2007; Feagins *et al.*, 2007). La PCR ha indicato che 1 su 76 (1,3%) dei fegati suini presi nei negozi al dettaglio nella parte sudoccidentale dell'Inghilterra erano positivi all'HEV (Banks *et al.*, 2010).

Uno studio ha dimostrato che in Gran Bretagna il 10% dei campioni di salsicce con carne di maiale nei punti di vendita al dettaglio erano positive al virus, e simili riscontri sono stati affermati da altri laboratori europei (Berto *et al.*, 2009; Di Bartolo *et al.*, 2012).

La malattia di origine alimentare è stata associata al consumo di fegato suino e tessuto muscolare suino. Tra Settembre 2009 e Ottobre 2010, Berto e collaboratori hanno raccolto campioni da suini macellati, mani delle persone, e i punti critici per la contaminazione del virus nel macello di suini, impianto di trasformazione, e tre punti di vendita al dettaglio. Al macello sono risultati positivi a HEV 5 (13%) dei 40 campioni di feci, 1 (3%) di 40 fegati, e 1 (25%) di 4 tamponi su mani dei lavoratori. All'impianto di trasformazione, ognuno dei 40 campioni di muscolo suino era negativo per HEV, e un tampone superficiale da una punta metallica usata per agganciare le carcasse era positiva. Al punto vendita, 6 (10%) di 63 salsicce e 2 (25%) di 8 campioni superficiali (coltello e affettatrice) erano positive. Il loro studio ha dimostrato che in Gran Bretagna, i prodotti di carne suina con grande quantità di consumo a livello nazionale potrebbe essere positivo all'HEV. Non c'erano prove di contaminazione fecale umana nei punti della catena di lavorazione, che sta a significare come gli standard di igiene del personale fossero alti e che fosse improbabile che il virus trovato derivasse dalla contaminazione umana dei campioni (Berto *et al.*, 2012).

Più recentemente, in Francia, diversi casi di epatite E sono stati collegati al consumo di salsicce fatte da fegato di maiale (Berto *et al.*, 2013).

Il potenziale zoonosico è stato confermato usando i modelli animali. Il genotipo 3 di HEV, isolato dal suino, può superare la barriera di specie e infettare i primati dopo inoculo sperimentale (Meng *et al.*, 2011).

Durante l'infezione da HEV nel suino, il virus replica all'interno degli epatociti, che si traduce in un alto titolo di HEV nella bile; il virus poi viene perso nelle feci. Quindi, i prodotti alimentari contenenti fegato infetto sono internamente contaminati e non sono contaminati solo sulla superficie (Bernaud *et al.*, 2012).

6.5 - Trattamento termico

Da quando HEV è stato associato con il consumo di prodotti fatti con suino crudo, è importante determinare se riscaldare il prodotto sarebbe un metodo efficace per inattivare il virus e ridurre il rischio di esposizione a HEV. Come osservato per altri virus trasmessi attraverso gli alimenti come HAV (Crocì *et al.*, 1999), il grasso ha un ruolo protettivo e probabilmente contribuisce alla stabilità di HEV al calore. Quindi, la composizione dell'alimento e in particolare la percentuale di grasso sono importanti nel determinare la temperatura e il tempo di trattamento per inattivare HEV (Bernaud *et al.*, 2012).

Pochi dati sono disponibili sulla resistenza del virus al trattamento termico. I due studi disponibili sull'inattivazione termica di HEV hanno usato differenti modelli *in vitro* o *in vivo*. Il primo studio era basato sul riscaldamento a una temperatura tra i 45 e i 70°C di una sospensione fecale contenente i genotipi 1 e 2 di HEV e l'inoculo in una coltura cellulare tollerante all'HEV (Emerson *et al.*, 2005). Il secondo studio ha usato suini in cui è stato inoculato un omogeneizzato di fegato suino contenente il genotipo 3 di HEV riscaldato a 56°C friggendolo o bollendolo (Feagins *et al.*, 2008). Entrambi gli studi mostrano che è più probabile che HEV resista a un riscaldamento fino a 56°C ed è inattivato a temperature più grandi di 71°C.

L'inoculo di suini con differenti preparazioni ha dimostrato che solo un trattamento termico di 70°C per 20 min. porta alla mancanza di infezione da HEV negli animali inoculati (Bernaud *et al.*, 2012).

Possiamo concludere dicendo che i prodotti dovrebbero consumati dopo che sono stati cotti per almeno 20 minuti a un temperatura al cuore del prodotto di 71°C.

7 - CONCLUSIONI

Le conclusioni che possiamo trarre da questa rassegna critica si possono così sintetizzare:

- i virus agenti di malattia alimentare umana (o i loro “surrogati” non patogeni) hanno una resistenza termica variabile da un ceppo all’altro,
- i dati riscontrati con prove sperimentali più o meno precise e appropriate portano a concludere che oltre i 65°C si ottiene un’efficace inattivazione dei virus nel giro di 30 minuti,
- la composizione della matrice alimentare o del substrato nel quale i virus sono immersi incide in modo decisivo sulla resistenza termica dei virus,
- il tenore di lipidi della matrice è decisivo per aumentare la resistenza termica dei virus perché i grassi proteggono i virus dall’azione inattivante del calore.

Anche le indagini sperimentali condotte sui prodotti refrigerati (sia di origine animale sia di origine vegetale) hanno permesso di accertare che i virus possono persistere in numero considerevole sui prodotti nell’arco della loro vita commerciale se i prodotti sono conservati solo con l’impiego delle temperature di refrigerazione.

Inoltre i virus enterici quali Norovirus e virus dell’epatite infettiva A potranno verosimilmente sopravvivere all’acidificazione o ai processi di fermentazione microbica come trattamento. La resistenza all’acido di questi virus potrebbe spiegare la loro associazione con frutta e altri vegetali implicati nei focolai di malattia alimentare per es. da fragole (Cotterelle *et al.*, 2005; Hjertqvist *et al.*, 2006).

Tutti questi studi hanno evidenziato che anche il congelamento non assicura un’adeguata riduzione decimale della carica virale iniziale di un alimento, il che coincide con quanto sappiamo per i batteri, i lieviti e le muffe. Possiamo, quindi, affermare che il trattamento di congelamento così come è fatto oggi (a bassissime temperatura di -40°C e anche inferiori) blocca l’attività metabolica dei microrganismi, ma non ne inattiva più di tanto la sopravvivenza e, nel caso dei virus, l’infettività.

L’unico metodo attualmente efficace nel settore alimentare resta il trattamento termico superiore ai 70°C.

Le recenti epidemie di HAV e Norovirus nei Paesi europei ha dimostrato come questi

patogeni saranno sempre più presenti nel commercio internazionale e che nessun Paese potrà essere considerato indenne. Molte volte i casi di gastroenteriti infettive restano però non diagnosticati o non riportati, quindi il numero potrebbe crescere esponenzialmente nei prossimi anni con la maggiore consapevolezza della popolazione. Le norme di igiene nella manipolazione, nel trasporto e nel consumo degli alimenti saranno sempre di più il cardine della prevenzione di queste epidemie. Nel 2012 il *Codex Alimentarius Committee* ha pubblicato delle linee guida sull'applicazione di principi generale di igiene alimentare sul controllo dei virus negli alimenti includendo i frutti di bosco. Gli operatori di commercio alimentare devono essere consapevoli del rischio di contaminazione degli alimenti. La contaminazione virale può, in genere, essere prevenuta dalla applicazione adeguata di principi di igiene a tutte le fasi della produzione.

L'aumento delle dimensioni di un lotto di prodotti freschi, ristoratori operativi a livello nazionale e la globalizzazione della produzione primaria richiedono nuovi strumenti per affrontare la sicurezza alimentare. Ci deve essere una maggior focalizzazione sulle condizioni locali della produzione primaria nei Paesi di origine, specialmente nelle regioni dove è limitata la disponibilità di acqua pulita.

I Norovirus, i virus dell'epatite A e, ora, i virus dell'epatite E causano spesso patologie asintomatiche ma non devono essere in alcun modo sottovalutati, visto che potrebbero essere causa di zoonosi pandemiche e causare problemi di ordine mondiale, specialmente in caso di comparsa di varianti genomiche ad alta virulenza, date dalla commistione genomica di ceppi virali di origine umana e animale.

8 - BIBLIOGRAFIA

- 1) Acharya SK, Batra Y, Bhatkal B. "*Sero epidemiology of hepatitis A virus infection among children in Delhi; implications for HAV vaccination*". J gastroenterol Hepatol 2003;18:822-827
- 2) Abad FX, Pintó RM, Bosch A. "*Survival of enteric viruses on environmental fomites*". Appl Environ Microbiol. 1994 Oct;60(10):3704-10.
- 3) Aggarwal R. "*Hepatitis E: epidemiology and natural history*". J Clin Exp Hepatol. 2013;3:125–133.
- 4) Ahmad K.: "*Norwalk-like virus attacks troops in Afghanistan*", Lancet Infect. Dis . 2 (2002) : 391.
- 5) Alazawi W., Heather L., Foster R G. "*Other liver viruses*", Elsevier Ltd. Medicine 39:9
- 6) Anonymous, (2012b). Großer Gastroenteritis-Ausbruch durch eine Charge mit Noroviren kontaminierter Tiefkühlherdbeeren in Kinderbetreuungseinrichtungen und Schulen in Ostdeutschland, 09–10/2012. Epidemiologisches Bulletin, 41(2012), 414–417.
- 7) Ansari SA, Sattar SA, Springthorpe VS, Wells GA, Tostowaryk W. "*Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces*". J Clin Microbiol. 1988 Aug;26(8):1513-8.
- 8) Ausar SF, Foubert TR, Hudson MH, Vedvick TS, Middaugh CR. "*Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature*". J Biol Chem. 2006 Jul 14;281(28):19478-88. Epub 2006 May 4.

- 9) Baert L, Uyttendaele M, Vermeersch M, Van Coillie E, Debevere J. "*Survival and transfer of murine norovirus 1, a surrogate for human noroviruses, during the production process of deep-frozen onions and spinach*". J Food Prot. 2008 Aug;71(8):1590-7.
- 10) Baert L, Uyttendaele M, Van Coillie E, Debevere J. "*The reduction of murine norovirus 1, B. fragilis HSP40 infecting phage B40-8 and E. coli after a mild thermal pasteurization process of raspberry puree*". Food Microbiol. 2008 Oct;25(7):871-4.
- 11) Banks M, Martelli F, Grierson S, Fellows HJ, Stableforth W, Bendall R, et al. "*Hepatitis E virus in retail pig livers*". Vet Rec. 2010;166:29.
- 12) Barzagna BN. "*Hepatitis A shifting epidemiology in South-East and China*". Vaccine 2000;18 (suppl):561-564.
- 13) Bell PB , Shapiro CN , Margalio H . "*Hepatitis A Virus*". In Feigin RD. Textbook of pediatric infectious diseases . 5th ed. Saunders, Philadelphia, 2004; pp 2069-2085.
- 14) Benenson AS, "*Viral hepatitis A*". Control of communicable diseases manual.; 1995, p. 217-20.
- 15) Berg DE, Kohn MA, Farley TA, McFarland LM. "*Multi-state outbreaks of acute gastroenteritis traced to fecal-contaminated oysters harvested in Louisiana*". J Infect Dis. 2000 May;181 Suppl 2:S381-6.
- 16) Bernaud E, Rogée S, Garry P, Rose N, Pavio N. "*Thermal Inactivation of Infectious Hepatitis E Virus in Experimentally Contaminated Food*". Applied and Environmental Microbiol. 2012 Aug; 15 (78); pp 5153-5159.

- 17) Berto A *et al.* "Hepatitis E virus in pork food chain, United Kingdom, 2009–10". *Emerg Infect Dis* 2012;18(8): 1358–60.
- 18) Berto A, Grierson S, Hakze-van der Honing R, Martelli F, Johne R, Reetz J, Ulrich RG, Pavio N, Van der Poel WH, Banks M. "Hepatitis E virus in pork liver sausage, France". *Emerg Infect Dis.* 2013 Feb;19(2):264-6.
- 19) Bidawid S, Farber JM, Sattar SA. "Contamination of foods by food handlers: experiments on hepatitis A virus transfer to food and its interruption". *Appl Environ Microbiol.* 2000 Jul;66(7):2759-63.
- 20) BinSaeed AA. "Is there a link between seropositivity to *Helicobacter pylori* and hepatitis A virus? A systematic review". *Int J Infect Dis.* 2010 Jul;14(7):e567-71.
- 21) Blystad, H.K., H; Stene-Johansen, K; Steen, T., "Hepatitis A outbreak in men who have sex with men", Oslo and Bergen in Norway. *Euro Surveill*, 2004. 8(43).
- 22) Bouwknecht M, Lodder-Verschoor F, van der Poel WH, Rutjes SA, de Roda Husman AM. "Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in the Netherlands". *J Food Prot.* 2007;70:2889–95.
- 23) Buckow R, Isbarn S, Knorr D, Heinz V, Lehmacher A. "Predictive model for inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate, by heat and high hydrostatic pressure". *Appl Environ Microbiol.* 2008 Feb;74(4):1030-8.
- 24) Bull R.A., Tu E.T.V., McIver C.J., Rawlinson W.D., White P.A.:" Emergence of a new Norovirus Genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis", *Journal of Clinical Microbiology* 44-2 (2006): 327-333.
- 25) Butot S, Putallaz T, Sánchez G. "Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs". *Int J Food Microbiol.* 2008 Aug 15;126(1-2):30-5.

- 26) Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA, Vinjé J. "*Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus*". J Food Prot. 2006 Nov;69(11):2761-5.
- 27) Carvalho, C., et al., "*A possible outbreak of hepatitis A associated with semi-dried tomatoes*", England, July-November 2011. Euro Surveill, 2012. 17(6).
- 28) Castilho J.G., Munford V., Resque H.R., Fagundes-Neto U., Vinjé J., Racz M.L.: "*Genetic diversity of Norovirus among children and gastroenteritis in São Paulo State, Brazil*", Journal of Clinical Microbiology 44-11 (2006): 3947-3953.
- 29) Cliver DO : "*Virus transmission via food*", World Health Stat Q. 1997; 50(1-2):90-101.
- 30) Constantini V., Loisy L., Le Guyader F.S., Saif L.J.: "*Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of United States*", Applied and Environmental Microbiology 72-3 (2006): 1800-1809.
- 31) Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, et al. "*Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans*". J Infect Dis. 2010;202:825–34.
- 32) Cox C., Cao S., Lu Y.: "*Enhanced detection and study of murine norovirus-1 using a more efficient microglial cell line*", Virol. J. 6 (2009): 196.
- 33) Croci L et al. 1999. "*Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels*". J. Appl. Microbiol. 87:884–888.
- 34) Croci L, De Medici D, Scalfaro C, Fiore A, Toti L. "*The survival of hepatitis A virus in fresh produce*". Int J Food Microbiol. 2002 Feb 25;73(1):29-34.

- 35) Cuthbert AJ. "*Hepatitis A: Old and New. Clinical microbiology reviews*", American society for microbiology, Jan 2001; pp 38-58.
- 36) D'Souza DH, Sair A, Williams K, Papafragkou E, Jean J, Moore C, Jaykus L. "*Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food*". Int J Food Microbiol. 2006 Apr 15;108(1):84-91. Epub 2006 Feb 13.
- 37) Dawson DJ, Paish A, Staffell LM, Seymour IJ, Appleton H. "*Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for norovirus*". J Appl Microbiol. 2005; 98(1):203-9.
- 38) Da Silva A.K., Le Saux J.-C., Parnaudeau S., Pommepuy M., Elimelech M., Le Guyader F.S.: "*Evaluation of removal of Norovirus during wastewater treatment, using Real-time Reverse Transcription – PCR: Different behaviors of Genogroups I and II*", Applied and Environmental Microbiology 73-24 (2007):7891-7897.
- 39) De Medici D., Paniconi M.: "*Virus trasmessi con i prodotti ittici*" in B. Pasolini, E Alessi e D. De Medici, Workshop di aggiornamento su problematiche emergenti nel settore dei prodotti ittici, Rapporto Istisan 05/24: 65-72.
- 40) Deboosere N, Legeay O, Caudrelier Y, Lange M. "*Modelling effect of physical and chemical parameters on heat inactivation kinetics of hepatitis A virus in a fruit model system*". Int J Food Microbiol. 2004 May 15;93(1):73-85.
- 41) Denson LA. "*Other viral infections*". In W.A. Walker, Philip MS, Benjamin LS, Oliver G, Ronald EK, Ian RS (e d s) . Pediatric gastrointestinal disease. 4th ed. BC Decker Inc, Hamilton, 2004; pp 1170-1178.
- 42) Desbois D, Couturier E, Mackiewicz V, Graube A, Letort MJ, Dussaix E, Roque-Afonso AM. "*Epidemiology and genetic characterization of hepatitis A virus genotype IIA*". J Clin Microbiol. 2010 Sep;48(9):3306-15.

- 43) Di Bartolo I *et al.* "Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain , 2010". *Emerg Infect Dis* 2012; 18(8).
- 44) Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA, Hornick R, Chanock RM. "Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis". *Proc Soc Exp Biol Med.* 1972 Jun;140(2):578-83.
- 45) Doultree JC, Druce JD, Birch CJ, Bowden DS, Marshall JA. "Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate". *J Hosp Infect.* 1999 Jan;41(1):51-7.
- 46) Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M. "Inactivation of aliciviruses". *Appl Environ Microbiol.* 2004 Aug;70(8):4538-43.
- 47) European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009". *EFSA Journal*, 2011. 9(3):2090, 378 pp
- 48) European Centre for Disease Prevention and Control, "Annual Epidemiological Report 2012". Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. . 2013, ECDC: Stockholm.
- 49) Emerson SU, Arankalle VA, Purcell RH. 2005. "Thermal stability of hepatitis E virus". *J. Infect. Dis.* 192:930 –933.
- 50) Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. "Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA". *J Gen Virol.* 2007;88:912–7.
- 51) Floyd R, Sharp DG. "Viral aggregation: buffer effects in the aggregation of poliovirus and reovirus at low and high pH". *Appl Environ Microbiol.* 1979 Sep;38(3):395-401.

- 52) Fournet N, Baas D, van Pelt W, Swaan C, Ober H, Isken L, et al. "*Another possible food-borne outbreak of hepatitis A in the Netherlands indicated by two closely related molecular sequences, July to October 2011*". Euro Surveill.2012;17(6):pii=20079.
- 53) Frank, C., et al., "*Major outbreak of hepatitis A associated with orange juice among tourists*", Egypt, 2004. Emerg Infect Dis, 2007. 13(1): p. 156-8.
- 54) Gallot, C., et al., "*Hepatitis A associated with semidried tomatoes*", France, 2010. Emerg Infect Dis, 2011. 17(3): p. 566-7.
- 55) Gillesberg Lassen S, Soborg B, Midgley SE, Steens A, Vold L, Stene-Johansen K, Rimhanen-Finne R, Kontio M, Löfdahl M, Sundqvist L, Edelstein M, Jensen T, Vestergaard HT, Fischer TK, Mølbak K, Ethelberg S. "*Ongoing multi-strain food-borne hepatitis A outbreak with frozen berries as suspected vehicle: four Nordic countries affected, October 2012 to April 2013*". Euro Surveill. 2013;18(17):pii=20467.
- 56) Green K.Y., Chanock R.M., Kapikian A.Z.:” *Human Caliciviruses*” (2001): 841-874. In: Knipe DM, Howley PM Fields Virology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia Pa. In
- 57) Gustavsson L., L.-M. Andersson, M. Lindh, J. Westin:” *Excess mortality following community-onset norovirus enteritis in the elderly*”, Journal of Hospital Infection 79 (2011): 27-31.
- 58) Halliday ML, Kang LY, Zhou TK, Hu MD, Pan QC, Fu TY, Huang YS, Hu SL." *An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China*". J Infect Dis. 1991 Nov;164(5):852-9.

- 59) Han MG., Smiley JR., Thomas C., Saif LJ.:“ *Genetic recombination between two gwnotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequenze among BoNVs and Nebraska-like-bovine enteric caliciviruses*”, J. Clin. Microbiol. 42 (2004) :5214-5224.
- 60) Hanna, J.N., et al., "*Recognising and responding to outbreaks of hepatitis A associated with child day-care centres*". Aust N Z J Public Health, 2001. 25(6): p. 525-8.
- 61) Hazarika Dipangkar "*Clinical spectrum of hepatitis A infection in children: an overview*" India. Pediatric Infectious Disease, Vol.III- Jan - June 2011.
- 62) Henriëtte L.G. ter Waarbeeka, Nicole H.T.M. Dukers-Muijrersa, Harry Vennemac, Christian J.P.A. Hoebea:” *Waterborne gastroenteritis outbreak at a scouting camp caused by two norovirus genogroups: GI and GII*”, Journal of Clinical Virology 47 (2010): 268–272.
- 63) Hewitt J, Greening GE. "*Survival and persistence of norovirus, hepatitis A virus, and feline calicivirus in marinated mussels*". J Food Prot. 2004 Aug;67(8):1743-50.
- 64) Heymann, D., "*Control of communicable diseases manual, 18th edition, Official report of the American Public Health Association*". 2008.
- 65) Hjertqvist M, Johansson A, Svensson N, Abom PE, Magnusson C, Olsson M, Hedlund KO, Andersson Y. "*Four outbreaks of norovirus gastroenteritis after consuming raspberries, Sweden, June-August 2006*". Euro Surveill. 2006 Sep 7;11(9):E060907.1.

- 66) Hussain Z, Das BC, Husain SA, Murthy NS, Kar P. "*Increasing trend of acute hepatitis A in north India: need for identification of high-risk population for vaccination*". J Gastroenterol Hepatol 2006; 21:689-693.
- 67) Hutin YJ, Pool V, Cramer EH, Nainan OV, Weth J, Williams IT, et al. "*A multistate, foodborne outbreak of hepatitis A*". N Engl J Med. 1999;340(8):595-602.
- 68) Isakbaeva ET, Widdowson MA, Beard RS, Bulens SN, Mullins J, Monroe SS, Bresee.
- 69) J, Sassano P, Cramer EH, Glass RI. "*Norovirus transmission on cruise ship*". Emerg Infect Dis. 2005 Jan;11(1):154-8.
- 70) Jacobsen, K.H. and J.S. Koopman, "*Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis*". Epidemiol Infect, 2004. 132(6): p. 1005-22.
- 71) Jalan R, Gines P, Olson JC, et al. "*Acute-on chronic liver failure*". J Hepatol. 2012;57:1336–1348.
- 72) Kamar N, Abravanel F, Garrouste C, et al. "*Three-month pegylated interferon-alpha-2a therapy for chronic hepatitis E virus infection in a haemodialysis patient*". Nephrol Dial Transplant. 2010;25:2792–2795.
- 73) Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, et al. "*Hepatitis E*". Lancet. 2012;379:2477–2488.
- 74) Kamar N, Izopet J, Dalton HR. "*Chronic hepatitis E virus infection and treatment*". J Clin Exp Hepatol. 2013;3:134–140.

- 75) Kmush B, Wierzba T, Krain L, Nelson K, Labrique AB. "*Epidemiology of hepatitis E in low- and middle-income countries of Asia and Africa*". *Semin Liver Dis.* 2013;33:15–29.
- 76) Koff, R.S., "Hepatitis A. *Lancet*", 1998. 351(9116): p. 1643-9.
- 77) Koopmans M, Vinjé J, de Wit M, Leenen I, van der Poel W, van Duynhoven Y. "*Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands*". *J Infect Dis.* 2000 May;181 Suppl 2:S262-9.
- 78) Koopmans M., von Bonsdorff C.H., Vinje J., De Medici D., Monroe S.: "*Foodborne viruses*", *FEMS Microbiol Rev.* 26-2 (2002): 187-205.
- 79) Koopmans M., Duizer E.: "*Foodborne viruses: an emerging problem*", *Intern. J. Food Microbiol.* 90 (2004) : 23-41.
- 80) Konowalchuk J, Speirs JI. "*Enterovirus recovery with vegetable floc*". *Appl Microbiol.* 1973 Oct;26(4):505-7.
- 81) Kuniholm MH, et al. 2009. "*Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey*", 1988-1994. *J. Infect. Dis.* 200:48 –56.
- 82) Kurdziel AS, Wilkinson N, Langton S, Cook N. "*Survival of poliovirus on soft fruit and salad vegetables*". *J Food Prot.* 2001 May;64(5):706-9.
- 83) La Rosa G., Fontana S., Di Grazia A., Iaconelli M., Pourshaban M., Muscillo M.: "*Molecular identification and genetic analysis of Norovirus genogroups I and II in water environments: comparative analysis of different reverse transcription –PCR Assays* ", *Applied and Environmental Microbiology* 73-13 (2007): 4152-4161.

- 84) Leclerc H., Schwartzbrod L., Dei-Cas E.:” *Microbial agents associated with waterborne diseases*”, Crit. Rev. Microbiol. 28 (2002): 371-409.
- 85) Lin CY, Nan-Chang Chiu, Hung-Chang Lee, Chih-Kuang Chuang, Shuan-Pei Lina, Chun-Yan Yeung:” *The Emerging Importance of Norovirus as the Etiology of Pediatric Gastroenteritis in Taipei*”, J Microbiol Immunol Infect 43-2 (2010): 105–110.
- 86) Lopman B., Zambon M., Brown D.W.:” *The evolution Norovirus, the “Gastric flu”* , Plos Medicine 5-2 (2008): 187-189.
- 87) MacDonald E, Steens A, Stene-Johansen K, Gillesberg Lassen S, Midgley SE, Lawrence J, et al. "*Increase in hepatitis A in tourists from Denmark, England, Germany, the Netherlands, Norway and Sweden returning from Egypt*", November 2012 to March 2013. Euro Surveill. 2013;18(17):pii=20468.
- 88) Made, D., Kahle, S., Trübner, K., & Stark, R. (2005). "*Detection of norovirus in food and environmental samples by RT-PCR. Application in routine diagnostics*". Archiv für Lebensmittelhygiene, 56, 1–24. (in German).
- 89) Mans J., J. Corrie de Villiers, Nicolette M. du Plessis, Theunis Avenant, Maureen B. Taylor:” *Emerging norovirus GII.4 2008 variant detected in hospitalised paediatric patients in South Africa*”, Journal of Clinical Virology 49 (2010): 258–264.
- 90) Martin A, Lemon SM. "*Hepatitis A virus: from discovery to vaccines*". Hepatology 2006 Feb; 43(2 suppl 1): S164e72.
- 91) Masuda J, et al. 2005. "*Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan*". Hepatol. Res. 31:178–183.

- 92) Mattison K., Shukla A. Cook A., Pollari F., Friendship R., Kelton D., Bidawid S. Farber JM.: “ *Human noroviruses in swine and cattle*”, *Emerg. Infect. Dis.* 13 (2007) : 1184-1188.
- 93) Mbithi JN, Springthorpe VS, Sattar SA. "*Effect of relative humidity and air temperature on survival of hepatitis A virus on environmental surfaces*". *Appl Environ Microbiol.* 1991 May;57(5):1394-9.
- 94) Mbithi JN, Springthorpe VS, Boulet JR, Sattar SA. "*Survival of hepatitis A virus on human hands and its transfer on contact with animate and inanimate surfaces*". *J Clin Microbiol.* 1992 Apr;30(4):757-63.
- 95) McCaustland KA, Bond WW, Bradley DW, Ebert JW, Maynard JE. "*Survival of hepatitis A virus in feces after drying and storage for 1 month*". *J Clin Microbiol.* 1982 Nov;16(5):957-8.
- 96) Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU. "*A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus*". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 2;94(18):9860-5
- 97) Meng XJ, et al. 1998. "*Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus*". *J. Virol.* 72:9714 –9721.
- 98) Meng XJ." *From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety*". *Virus Res* 2011 Feb 21.
- 99) Newell Diane G., Marion Koopmans, Linda Verhoef, Erwin Duizer, Awa Aidara-Kane, Hein Sprong, Marieke Opsteegh, Merel Langelaar, John Threlfall, Flemming Scheutz, Joke van der Giessen, Hilde Kruse:" *Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge*", *International Journal of Food Microbiology* 139 (2010): 3–15.

- 100) Nygård K, Andersson Y, Lindkvist P, Ancker C, Asteberg I, Dannetun E, et al. "*Imported rocket salad partly responsible for increased incidence of hepatitis A cases in Sweden*", 2000-2001. Euro Surveill. 2001;6(10):pii=380.
- 101) Nishida T., Nishio O., Kato M., Chuma T., Kato H., Iwata H., Kimura H.: "*Genotyping and quantitation of Noroviruses in oyster from two distinct sea areas in Japan*", Microbiology and Immunology 51-2 (2007): 177-184.
- 102) Niu MT, Polish LB, Robertson BH, Khanna BK, Woodruff BA, Shapiro CN, et al. "*Multistate outbreak of hepatitis A associated with frozen strawberries*". J Infect Dis. 1992;166(3):518-24.
- 103) Nuanualsuwan S, Cliver DO. "*Infectivity of RNA from inactivated poliovirus*". Appl Environ Microbiol. 2003 Mar;69(3):1629-32.
- 104) Ozawa K., Oka T., Takeda N., Hansman G.S.: "*Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan*", Journal of Clinical Microbiology 45-12 (2007): 3996-4005.
- 105) Ozkula, Bekir S. Kocazeybekb, Nuri Turanc, Gábor Reuterd, Kamil Bostane, Aysun Yilmazf, Eda Altanc, Gulsah Uyunmazc, Ali Riza Karaköseb, Karlo Muratoglue, Murat Elevli, Christopher R. Helpsh, Huseyin Yilmazc: "*Frequency and phylogeny of norovirus in diarrheic children in Istanbul, Turkey*", Journal of Clinical Virology 51 (2011): 160– 164.
- 106) Panda SK, Varma SP. "*Hepatitis E: molecular virology and pathogenesis*". J Clin Exp Hepatol. 2013;3:114–124.

- 107) Pebody RG, Leino T, Ruutu P, Kinnunen L, Davidkin I, Nohynek H, et al. "Foodborne outbreaks of hepatitis A in a low endemic country: an emerging problem?" *Epidemiol Infect.* 1998;120(1):55-9.
- 108) Patel M.M., Widdowson M.-A., Glass R.I., Akazawa K., Vinjé J., Parashar U.D.: "Systematic literature review of role Norovirus in sporadic Gastroenteritis", *Emerging Infectious Diseases* 14-8 (2008): 1224-1231.
- 109) Pavio N, Meng XJ, Renou C. 2010. "Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks". *Vet. Res.* 41:46.
- 110) Pebody RG, Leino T, Ruutu P, Kinnunen L, Davidkin I, Nohynek H, et al. "Foodborne outbreaks of hepatitis A in a low endemic country: an emerging problem?" *Epidemiol Infect.* 1998;120(1):55-9.
- 111) Phan T.G., Kaneshi K., Ueda Y., Nakaya S., Nishimura S., Yamamoto A., Sugita K., Takanashi S., Okitsu S., Ushijima H.: "Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in Noroviruses", *J. Med. Virol.* 79 (2007) : 1388-400.
- 112) Preeti Chhabra, Shobha D. Chitambar: "Norovirus genotype IIb associated acute gastroenteritis in India", *Journal of Clinical Virology* 42 (2008): 429–432.
- 113) Purcell RH, Emerson SU. 2008. "Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease". *J. Hepatol.* 48:494 –503.
- 114) Rabenau H.F., Stürmer M., Buxbaum S., Walczok A., Preser W., Doerr H.W.: "Laboratory diagnosis of Norovirus: which method is the best?" *Intervirology* 46 (2003): 232-238.
- 115) Reid, T.M. and H.G. Robinson, "Frozen raspberries and hepatitis A". *Epidemiol Infect.* 1987. 98(1): p. 109-12.

- 116) Rose N, et al. 2011. "*High prevalence of hepatitis E virus in French domestic pigs*". *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34:419–427.
- 117) Samanta T, Das A, Ganguly S. "*Profile of hepatitis A infection with atypical manifestations in children*". *Indian J Gastroenterol* 2010; 29(1):31-33.
- 118) Sandman L, Davidson M, Krugman S. "*Inactivated hepatitis A vaccine: a safety and immunogenicity study in health professionals*". *J Infect Dis* 1995;171(Suppl1):S2–50.
- 119) Scholz E, Heinrich U, Flehmig B. "*Acid stability of hepatitis A virus*". *J Gen Virol.* 1989 Sep;70 (Pt 9):2481-5.
- 120) Shalimar, Acharya SK. "*Hepatitis E and acute liver failure in pregnancy*". *J Clin Exp Hepatol.* 2013;3, in this issue.
- 121) Shuvra Kanti Dey, Tuan Anh Nguyen, Tung Gia Phan, Osamu Nishio, Abul Faiz Mohammad Salim, Majibur Rahman, Fumihiko Yagyu, Shoko Okitsu, Hiroshi Ushijima." "*Molecular and epidemiological trend of norovirus associated gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh*", *Journal of Clinical Virology* 40 (2007): 218–223.
- 122) Sjogren HM. "*Hepatitis A. In Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver disease: Pathophysiology/Diagnosis/Management*". 8th edition, Saunders Elsevier, 2006:1639-1646.
- 123) Stapleton JT. "*Host immune response to hepatitis A virus*". *J Infect Dis* 1995;171(Suppl 1):S9–14.
- 124) Strazynski M, Krämer J, Becker B. "*Thermal inactivation of poliovirus type 1 in water, milk and yoghurt*". *Int J Food Microbiol.* 2002 Mar 25;74(1-2):73-8.

- 125) Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S. "*Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs*". Arch Virol. 1998;143(6):1215-21.
- 126) Tallo T, Norder H, Tefanova V, Ott K, Ustina V, Prukk T, et al. "*Sequential changes in hepatitis A virus genotype distribution in Estonia during 1994 to 2001*". J Med Virol. 2003;70(2):187-93.
- 127) Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. "*Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings*". Lancet. 2003;362:371–3.
- 128) Teshale EH, Hu DJ, Holmberg SD. "*The two faces of hepatitis E virus*". Clin Infect Dis 2010 Aug 1; 51: 328e34.
- 129) Tirado M.C., R. Clarke, L.A. Jaykus, A. McQuatters-Gollop, J.M. Frank :"*Climate change and food safety: A review*", Food Research International 43 (2010): 1745–1765.
- 130) Van Der Poel WH, Vinjé J, van Der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MP. "*Norwalk-like calicivirus genes in farm animals*". Emerg Infect Dis. 2000 Jan-Feb;6(1):36-41.
- 131) Volkin DB, Mach H, Middaugh CR. Degradative covalent reactions important to protein stability. Mol Biotechnol. 1997 Oct;8(2):105-22.
- 132) Ward RL, Bernstein DI, Knowlton DR, Sherwood JR, Young EC, Cusack TM, Rubino JR, Schiff GM. "*Prevention of surface-to-human transmission of rotaviruses by treatment with disinfectant spray*". J Clin Microbiol. 1991 Sep;29(9):1991-6.
- 133) Wenzel JJ, et al. 2011. "*Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates*". J. Clin. Virol. 52:50 –54.

- 134) Wheeler JG, Sethi D, Cowden JM, Wall PG, Rodrigues LC, Tompkins DS, Hudson MJ, Roderick PJ. "*Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance*". The Infectious Intestinal Disease Study Executive. BMJ. 1999 Apr 17;318(7190):1046-50.
- 135) WHO. "*Hepatitis A*". 2000 http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisA_whoedscsredc2000_7.pdf
- 136) Widdowson MA., Rochx B., Schepp R., van der Poel WHM., Vinjé J., van Duynhoven t., Koopmans P.: "*Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands*", J. Med. Virol. 76 (2005): 119-128.
- 137) Widdowson MA., Sulka A., Bulens N., Beard RS., Chaves SS., Hammond R., Salesi ED., Swanson J., Totano R., Woron P., Mead S., Bresee JS., Monroe SS., Glass Ri.: "*Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000*", Emerg. Infect Dis. 11 (2005): 95-102.
- 138) Wobus C.E., Karst S.M., Thackray L.B., Chang K.O., Sosnovtsev S.V., Belliot G., Krug A., Mackenzie J.M., Green K.Y., Virgin H.W.: "*Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages*", PLoS Biology 2-12 (2004): 2076 – 2084.
- 139) Wobus C.E., Thackray L.B., Virgin H.W.I.: "*Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis*", J. Virol. 80 (2006) :5104–12.
- 140) Wu HM, Fornek M, Schwab KJ, Chapin AR, Gibson K, Schwab E, Spencer C, Henning K. "*A norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination*". Infect Control Hosp Epidemiol. 2005 Oct;26(10):802-10.

- 141) Wu Tzee-Chung, Hsiao-Hui Liu, Yann-Jang Chen, Ren-Bin Tang, Be-Tau Hwang, Han-Chih Yuan." *Comparison of Clinical Features of Childhood Norovirus and Rotavirus Gastroenteritis in Taiwan*", [*J Chin Med Assoc* 71-11 (2008): 566–570.
- 142) Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, et al. "*Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial*". *Lancet* 2010 Sep 11; 376: 895e902.
- 143) <http://www.cdc.gov/foodborneburden/estimates-overview.html>
- 144) <http://www.codexalimentarius.org/>
- 145) www.gov.uk/government/organisations/department-for-environment-food-ruralaffairs/series/zoonoses-reports

9 - RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il mio relatore, Prof. Valerio Giaccone, che mi ha sempre seguito e sostenuto nel mio lavoro, rendendosi disponibile a qualsiasi ora, compresi i week-end. La sua grande pazienza e i suoi preziosi consigli hanno reso il mio lavoro ancora più interessante e stimolante.

Un infinito grazie lo voglio dare ai miei genitori, Marinella e Bruno. Solo con il loro sostegno e aiuto sono riuscito in questo compito. Non smetterò mai di ringraziarli.

Un ringraziamento anche ai miei amici, ai miei parenti e a tutti quelli che mi hanno sostenuto e aiutato. Questo lavoro è merito anche vostro.