

DIFFUSIONE DELLA VARIANTE DI NOROVIRUS GII.b/HILVERSUM IN MYTILUS GALLOPROVINCIALIS VENDUTI AL DETTAGLIO

DISTRIBUTION OF A NEW VARIANT GII.b/HILVERSUM OF NOROVIRUS IN RETAIL MYTILUS GALLOPROVINCIALIS

Di Pinto P., Terio V., Martella V., Tantillo G.M.
Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia - Università di Bari

SUMMARY

Norovirus is a common cause of gastroenteritis outbreaks associated with consumption of raw shellfish. The majority of norovirus infections world-wide are due to genogroup II noroviruses. Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) at the end of the commercial chain, the points of purchase, were sampled and screened by an hemi-nested RT-PCR specific for genogroup II noroviruses. Noroviral RNA was detected in 10% of the samples, with the lower frequency being observed in samples obtained from hypermarkets (8%) rather than in samples from open-air markets and fish shops (16% and 12%, respectively), suggesting more efficient systems of purification and control being enacted by shellfish producers and suppliers of large retail chains. By sequence analysis, the strains were characterized as norovirus variant GII.b/Hilversum.

Key words

PCR, n-PCR, NoV

INTRODUZIONE

I Norovirus (NoV), ascritti alla famiglia delle *Caliciviridae*, genere *Norovirus*, sono virus privi di envelope, a singolo filamento di RNA a polarità positiva. I NoV sono causa di violente epidemie di gastroenteriti non batteriche a trasmissione alimentare (1;2;3). La grande variabilità genetica dei NoV rende la loro classificazione controversa (4); finora sono stati distinti 5 genogruppi (GI-GV), in base alle differenze rilevate dal sequenziamento dei geni che codificano per le proteine capsidiche. Nonostante la grande variabilità genetica dei NoV, solo alcuni ceppi risultano di rilevanza epidemiologica su scala globale. Dall'uomo sono state isolate varianti appartenenti ai genogruppi GI, GII e GIV.

Il genogruppo GII comprende più del 90% dei ceppi di NoV, fra questi il ceppo GII.4 è quello mag-

giormente responsabile delle infezioni da Norovirus (5; 6;7).

I NoV possono essere trasmessi per via diretta da persona a persona o per via indiretta mediante acqua o alimenti contaminati (8). I molluschi bivalvi, essendo organismi filtratori, soprattutto se allevati o raccolti da acque contaminate da reflui urbani, rappresentano un importante anello di trasmissione per diversi agenti patogeni enterici. Nella Comunità Europea, la qualità igienico-sanitaria dei molluschi destinati al consumo umano è disciplinata dal Regolamento Comunitario 853 del 2004, tuttavia il rispetto dei parametri microbiologici fissati dalla normativa non garantisce l'assenza di agenti virali patogeni nei molluschi destinati al consumo umano. Tale problematica sanitaria risulta più grave in alcune zone dell'Italia meridionale dove è in uso un largo consumo di pesce e di molluschi bivalvi crudi. Questa particolare abitudine alimentare, come di-

mostrato da diversi autori, incide in modo rilevante sull'epidemiologia delle patologie a trasmissione alimentare sostenute da agenti virali (9;10;11). L'obiettivo del lavoro è quello di ricercare il NoV in *Mytilus galloprovincialis* commercializzati in Puglia e acquistati in diverse tipologie di punti vendita, quali: ipermercati, pescherie e mercati ittici.

MATERIALI E METODI

Sono stati acquistati ed analizzati 100 campioni di *Mytilus galloprovincialis*. I campioni prima dell'apertura delle valve sono stati trattati adeguatamente come previsto dal Decreto Ministeriale 31 luglio 1995 per la valutazione microbica. Successivamente si è proceduto all'estrazione dell'RNA virale secondo il metodo di Kingsley and Richards (12), detto GPTT, che comprende un primo step di lisi del tessuto con un buffer contenente glicina, seguito da uno step di precipitazione dell'RNA totale mediante PEG. Quindi il poly(A)RNA viene sottoposto a purificazione mediante l'utilizzo di oligonucleotidi poly (dT) legati a biglie magnetiche (DynaL Oslo, Norway)(13).

L'amplificazione dell' RNA di interesse è stata realizzata mediante l'utilizzo di primers specifici per il genogruppo GII (14;10) aventi come target la regione altamente conservata della RNA polimerasi RNA dipendente (RdRp) nell'ORF1 del genoma virale.

La retrotrascrizione dell'RNA virale e la successiva amplificazione del cDNA è stata condotta in unico step utilizzando la coppia di primers NVp110 e NV-4611 che amplifica un frammento di 273 bp nelle seguenti condizioni termiche: retrotrascrizione a 50°C per 60 min e amplificazione del cDNA mediante 40 cicli a 94°C per 30 sec., 48°C per 80 sec., 68°C per 60 sec, seguiti da uno step di estensione finale a 68°C per 10 min. Alla prima RT-PCR segue una eminested-PCR specifica per il genogruppo GII realizzata mediante l'utilizzo della coppia di primers NVp110 and NI che amplifica un frammento di 120 bp attraverso i seguenti step termici: 94°C per 10 min., (94°C per 30 sec., 50°C per 30 sec., 72°C per 30 sec.) per 25 cicli, 72°C per 10 min.

I prodotti della eminested-PCR sono stati purificati da gel mediante il kit Quiaquick gel extraction (Qiagen, GmbH, Germany) e successivamente sequenziati. Le sequenze ottenute sono state allineate utilizzando il software Bioedit version 7.0.9.0 (15), successivamente messe a confronto con i ceppi epidemici più rappresentativi circolanti in tutto il mondo e quindi è stata condotta un'analisi filogenetica utilizzando il software MEGA 3.

RISULTATI

Con la prima reazione di amplificazione, nessuno campione è risultato positivo; mentre con il secondo ciclo di amplificazione, 11 campioni su 100 hanno mostrato la presenza di NoV. In particolare, sono risultati positivi 4 campioni su 50 acquistati da Ipermercati, (pari all'8%), 3 campioni su 25 acquistati dalle pescherie (pari al 12%) e 4 campioni su 25 acquistati dai mercati ittici (pari al 16%). Degli undici campioni risultati positivi per NoV sottoposti al sequenziamento, ben otto hanno mostrato identità pari al 100% con il ceppo GII.b/Hilversum.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La positività riscontrata nei campioni raccolti nelle diverse tipologie di punti vendita al dettaglio ci permette di asserire che esiste un maggiore controllo dei fornitori operato dalla grande distribuzione organizzata (GDO) rispetto a quanto avviene nelle pescherie e soprattutto nei mercati ittici. La qualifica dei fornitori, insieme al rispetto delle condizioni di vendite previste dalla normativa, garantiscono infatti la sicurezza dei molluschi bivalvi, consentendo un minor rischio per i consumatori.

Il NoV GII.b/Hilversum, è una variante particolarmente incline a ricombinazioni, e spesso evidenziata nelle feci di bambini ospedalizzati (16;17;18). Studi epidemiologici su larga scala hanno documentato che il ceppo maggiormente diffuso nel mondo dal 2004 al 2006 è il GII.4 (7;19;20;21). Altri studi epidemiologici condotti su bambini ospedalizzati a Palermo hanno consentito di ricostruire la successione temporale delle varianti GII.4 e GII.b in Italia. Assieme alle varianti 2006a e 2006b, in Italia è presente la variante GII.b/Hilversum, rilevata inizialmente con una bassa frequenza (13.5%), che è andata via via aumentando negli anni successivi (17).

La nostra indagine realizzata su *Mytilus galloprovincialis*, ha rilevato la variante GII.b/Hilversum. La variante GII.b/Hilversum è in realtà data da un insieme di virus ricombinanti dotati della stessa ORF1 (complesso polimerasico) e da una varietà di ORF2 (VP1 e VP2). Tale variante è molto frequente nei pazienti pediatrici in Europa, compresa l'Italia (17).

Come è noto, diversi studi hanno dimostrato come la maggior parte delle gastroenterite acute, sono dovute al consumo di molluschi bivalvi crudi (8;22), tuttavia finora la legislazione comunitaria non ha ancora imposto la ricerca di virus nei mollu-

schii bivalvi nonostante sia stata più volte sottolineata l'inadeguatezza di indicatori di contaminazione fecale quali rivelatori anche di contaminazione virale.

I risultati dell'indagine dimostrano come la presenza di NoV nei molluschi bivalvi sia un problema sanitario non marginale che si può monitorare grazie a tecniche analitiche adeguate e sensibili. La disponibilità di sistemi diagnostici può costituire il punto di partenza per elaborare delle più efficaci strategie di controllo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Hutson, A., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2004. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol.* 12, 279-287.
- 2) Monica, B., Ramani, S., Banerjee, I., Primrose, B., Iturriza-Gomara, M., Gallimore, C.I., Brown, D.W., Moses, P.D., Gray, J.J., Kang, G., 2007. Human caliciviruses in symptomatic infections in children in Vellore, South India. *J. Med. Virol.* 79, 544-551.
- 3) Zintz, C., Bok, K., Parada, E., Barnes-Eley, M., Berke, T., Staat, M.A., Azimi, P., Jiang, X., Matson, D.O., 2005. Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. *Infect. Genet. Evol.* 5, 281-290.
- 4) Zheng, D.P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312-323.
- 5) Bull, R.A., Tu, E.T., McIver, C.J., Rawlinson, W.D., White, P.A., 2006. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 44, 327-333.
- 6) Ramirez, S., De Grazia, S., Giammanco, G.M., Milici, M., Colomba, C., Ruggeri, F.M., Martella, V., Arista, S., 2006. Detection of the norovirus variants GGII.4 Hunter and GGIIb/Hilversum in Italian children with gastroenteritis. *J. Med. Virol.* 78, 1656-1662.
- 7) Siebenga, J.J., Vennema, H., Renckens, B., de Bruin, E., van der Veer, B., Siezen, R.J., Koopmans, M., 2007. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J. Virol.* 81, 9932-9941.
- 8) Widdowson, M.A., Cramer, E.H., Hadley, L., Bresee, J.S., Beard, R.S., Bulens, S.N., Charles, M., Chege, W., Isakbaeva, E., Wright, J.G., Mintz, E., Forney, D., Massey, J., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2004. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus- United States, 2002. *J. Infect. Dis.* 190, 27-36.
- 9) Chironna, M., Lopalco, P., Prato, R., Germinario, C., Barbuti, S., Quarto, M., 2004. Outbreak of infection with hepatitis A virus (HAV) associated with a foodhandler and confirmed by sequence analysis reveals a new HAV genotype IB variant. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2825-2828.
- 10) Le Guyader, F., Neil, F.H., Estes, M.K., Monroe, S.S., Ando, T., Atmar, R.L., 1996. Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oyster implicated in outbreak of acute gastroenteritis. *Appl. Environm. Microbiol.* 62, 4268-4272.
- 11) Rizzo, C., Di Bartolo, I., Santantonio, M., Coscia, M. F., Monno, R., De Vito, D., Ruggeri, F.M., Rizzo, G. 2007. Epidemiological and virological investigation of a Norovirus outbreak in a resort in Puglia, Italy. *BMC Infect. Dis.* 7, 135.
- 12) Kingsley, D.H. and Richards, G., 2001. Rapid and Efficient Extraction Method for Reverse Transcription-PCR Detection of Hepatitis A and Norwalk-Like Viruses in Shellfish. *Appl. Environm. Microbiol.* 67, 4152-4157.
- 13) Kingsley, D.H., Meade, G.K., Richards, G., 2002. Detection of both Hepatitis A Virus and Norwalk-like Virus in imported clams associated with food-borne illness. *Appl. Environm. Microbiol.* 68, 3914-3918.
- 14) Yuen, L.K., Catton, M.G., Cox, B.J., Wright, P., Marshall, J.A., 2001. Heminested multiplex reverse-transcription-PCR for detection and differentiation of Norwalk-like virus genogroups 1 and 2 in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2690-2694.
- 15) Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- 16) Ramirez, S., Giammanco, G. M., De Grazia, S., Colomba, C., Martella, V., Arista, S., 2008. Genotyping of GII.4 and GIIB norovirus RT-PCR amplicons by RFLP analysis. *J. Virol. Methods* 147, 250-256.
- 17) Ramirez, S., Giammanco, G. M., De Grazia, S., Colomba, C., Martella, V., Arista, S., 2009. Emerging GII.4 norovirus variants affect children with diarrhea in Palermo, Italy in 2006. *J. Med. Virol.* 81, 139-45.
- 18) Reuter, G., Krisztalovics, K., Vennema, H., Koopmans, M., Szucs, G., 2005. Evidence of the etiological predominance of norovirus in gastroenteritis outbreaks—emerging new-variant and recombinant noroviruses in Hungary. *J. Med. Virol.* 76, 598-607.
- 19) Gallimore, C.I., Iturriza-Gomara, M., Xerry, J., Adigwe, J., Gray, J.J., 2007. Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: Emergence and selection of virus variants. *Arch. Virol.* 152, 1295-1303.

20) Kroneman, A., Vennema, H., van Duijnhoven, Y., Duizer, E., Koopmans, M., 2004. High number of norovirus outbreaks associated with a GGII.4 variant in the Netherlands and elsewhere: does this herald a worldwide increase? *Euro. Surveill.* 8, 2606.

21) Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negredo, A., Buesa, J., Schreier, E., Reacher, M., Brown, D., Gray, J., Iturriza, M., Gallimore, C., Bottiger, B., Hedlund, K.O., Torven, M., von Bonsdorff, CH., Maunula, L., Poljsak-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szucs, G., Melegh, B., Svennson, L., van Duijnhoven, Y., Koopmans, M., 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet.* 363, 682-688.

22) Shieh, Y.S.C., Monroe, S.S., Frankhauser, R.L., Langlois, G.W., Burkhardt, W., Baric, R.S., 2000. Detection of Norwalk-like viruses in shellfish implicated in illness. *J. Inf. Dis.* 181, 360-367.