



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE PER LA PROMOZIONE DELLA SALUTE E MATERNO INFANTILE "G. D'ALESSANDRO"  
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA  
VIA DEL VESPRO 133, 90127 PALERMO

# Le gastroenteriti batteriche: diagnosi di laboratorio, tipizzazione fenotipica e molecolare

Giovanni Giammanco

Ragusa, 25 Settembre 2015

# La gastroenterite

La gastroenterite è una condizione di infiammazione ("ite") del tratto gastrointestinale.

Essa è caratterizzata da diarrea, vomito, dolori e crampi addominali.

La disidratazione può rappresentare la complicanza più preoccupante.

La trasmissione può avvenire tramite il consumo di cibi preparati in modo improprio o acqua contaminati o attraverso uno stretto contatto con le persone infette.

# Impatto delle gastroenteriti acute

L'impatto delle GA sulla salute pubblica è sottostimato a causa di diversi fattori:

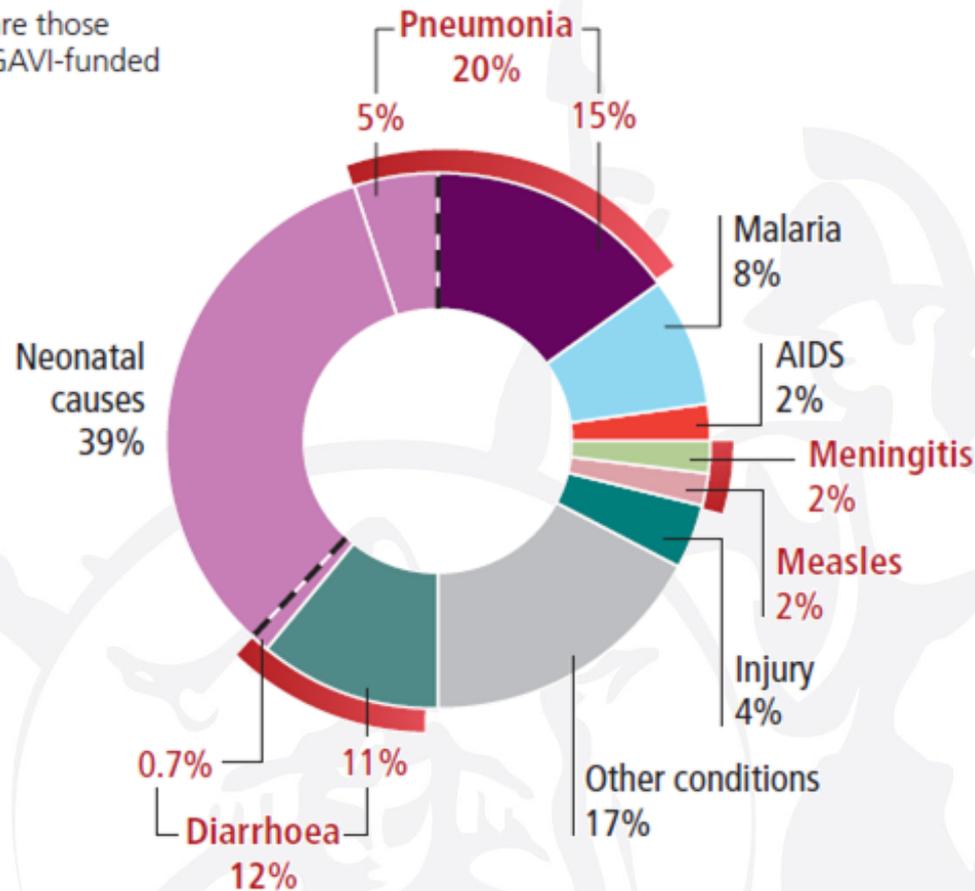
1. la maggior parte dei casi si manifesta in forma clinica lieve che non motiva il malato a rivolgersi ad un medico;
2. non sempre è prescritto un esame coprologico o si raggiunge una diagnosi definitiva;
3. le capacità diagnostiche e i protocolli utilizzati nei vari laboratori non sono uniformi;
4. la notifica da parte delle strutture sanitarie è, in generale, fortemente disattesa.

*Rapporti ISTISAN 12/38*

# Impatto delle gastroenteriti acute

## Causes of under-five child deaths in GAVI-eligible countries

Diseases in red are those preventable by GAVI-funded vaccines



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

Source: CHERG 2010, WHO and UNICEF 2012

# Impatto delle gastroenteriti acute

Benché nei Paesi europei la mortalità associata sia estremamente bassa, la morbilità è piuttosto elevata e le conseguenze possono essere rilevanti (sindrome di Guillain-Barré in caso di campilobatteriosi, sindrome emolitico uremica in caso di *E. coli* VTEC).

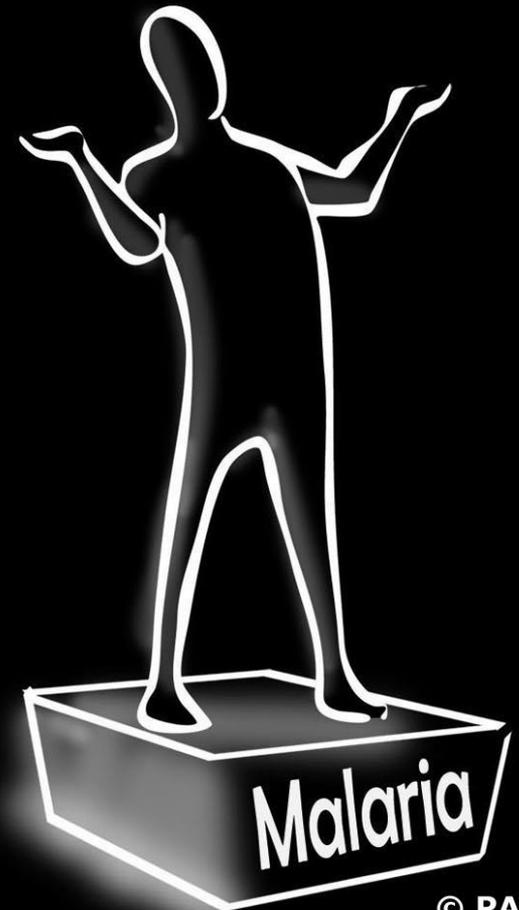
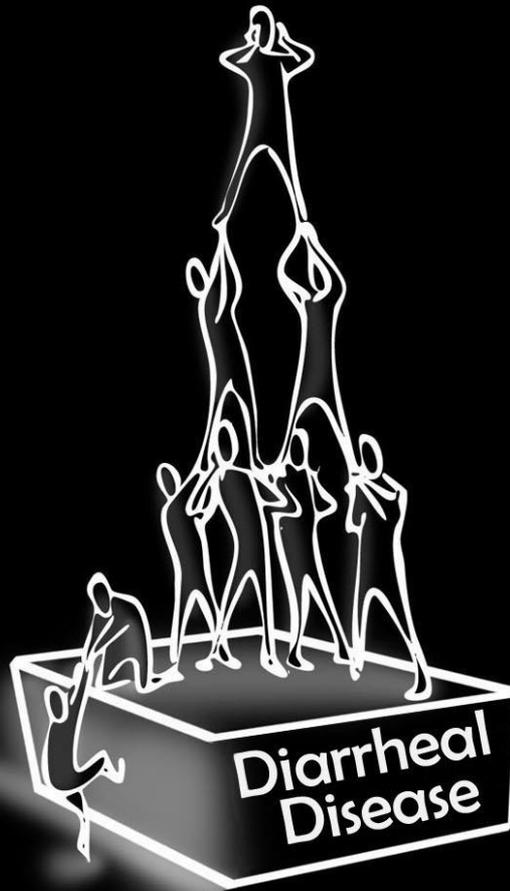
Un altro aspetto di rilievo riguarda i costi sanitari:

- *diretti*, a carico del SSN:

- ricoveri,
- accessi al PS,
- visite ambulatoriali;

- *indiretti*, a carico dei soggetti coinvolti e della società in generale: assenza dal lavoro, terapie domiciliari.

# What Will It Take to Put Diarrheal Disease Back on the Public Health Stage?



# Microrganismi patogeni causa di gastroenterite

Microrganismo	Agente patogeno di gastroenterite
<b>Virus</b>	Norovirus Astrovirus Rotavirus Adenovirus
<b>Batteri</b>	<i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>E. coli</i> produttori di verocitotossina <i>E. coli</i> O157 <i>E. coli</i> enteroinvasivi <i>E. coli</i> enterotossigenici <i>E. coli</i> enteropatogeni <i>E. coli</i> enteroaggregativi <i>Vibrio</i> spp. <i>Aeromonas</i> spp. <i>Yersinia</i> spp. <i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>S.aureus</i> enterotossigenico <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Shigella</i> spp.
<b>Parassiti</b>	<i>Cryptosporidium</i> Microsporidi <i>Giardia</i> <i>Cyclospora cajetanensis</i> <i>Entamoeba histolytica</i>



# Epidemiologia delle gastroenteriti

Tabella 1. Tasso di notifica per 100.000 abitanti dei principali agenti in Europa nel 2010

Malattia	Tasso di notifica per 100.000 abitanti
Campilobatteriosi	48,60
Salmonellosi	21,50
Yersiniosi	1,58
VTEC	0,83
Listeriosi	0,35
Echinococcosi	0,23
Brucellosi	0,07
Trichinellosi	0,05
Tubercolosi da <i>M. bovis</i>	0,03

## Italia

[rapporti ISTISAN 12/38]

In Italia la notifica delle gastroenteriti acute nell'uomo viene effettuata attraverso il Sistema Informativo delle Malattie Infettive (SIMI) (DM 15/12/1990 e DM 29/07/1998), il Sistema di Sorveglianza Speciale per le Tossinfezioni Alimentari (DGR 1944 Regione Lazio del 6 aprile 1999 e DGR 2902 Regione Lazio del 1° giugno 1999) e il Sistema di Sorveglianza di Laboratorio per le Diarree Infettive (DGR 4259 Regione Lazio del 4 agosto 1998).

Gli organi coinvolti nella sorveglianza sono le Aziende Sanitarie Locali (ASL), le Regioni (Agenzie di Sanità Pubblica Regionali), il Ministero della Salute, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e l'Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT).

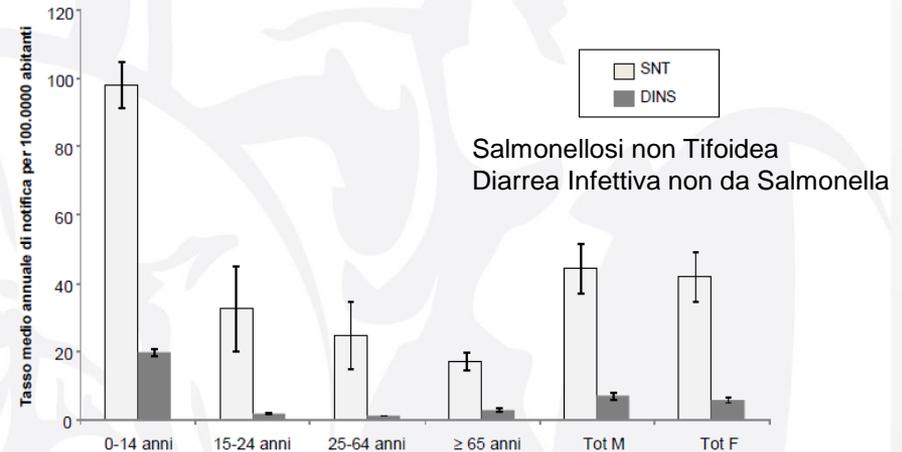


Figura 1. Distribuzione per età e sesso dei casi di SNT e DINS



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

# Sorveglianza



# Quando eseguire gli esami coprologici

La maggior parte dei casi di diarrea acuta è lieve e autolimitante (durata  $\leq 3-5$  giorni) e non necessita di accertamenti diagnostici microbiologici.

Gli esami coprologici sono invece raccomandati in presenza di:

- *Dati clinico-anamnestici*

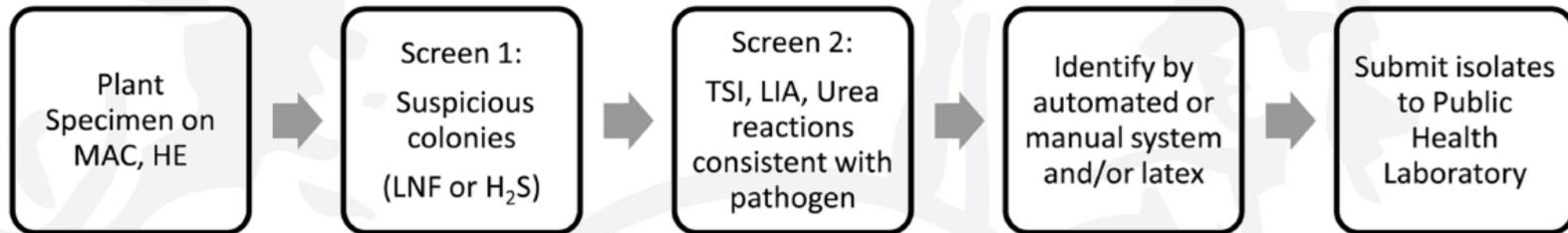
- diarrea acuta severa, specie in presenza di ipertermia significativa ( $> 38,5^{\circ}\text{C}$ );
- diarrea acuta protratta ( $> 5$  giorni) o persistente;
- diarrea con presenza di sangue nelle feci;
- diarrea accompagnata da dolore addominale intenso e ipertermia;
- diarrea in paziente ricoverato in ospedale o dimesso di recente;
- diarrea in paziente in trattamento chemioantibiotico;
- diarrea in paziente proveniente da aree endemiche;
- diarrea associata a probabile evento epidemico.

- *Fattori di rischio individuali*

- età avanzata;
- deficit immunitari congeniti/acquisiti.

# Algoritmo diagnostico *Salmonella/Shigella*

## A: Approccio colturale tradizionale



# Identificazione di *Salmonella* spp.

Il campione fecale viene seminato in brodocoltura di arricchimento (**brodo selenito**) ed incubato a 37°C per 18-24h (arricchimento selettivo)



strisciare un'ansata del brodo di arricchimento su una piastra di terreno agarizzato selettivo

Hektoen enteric (HE)

Selective medium for Gram-negative rods, differentiates lactose fermenters (yellow-orange) from nonfermenters (blue or green), H<sub>2</sub>S production can be detected (black precipitate)

MacConkey (MAC)

Selective medium for Gram-negative rods, differentiates lactose fermenters (pink) from nonfermenters (colorless)

Salmonella-shigella (SS)

Selective medium for Gram-negative rods, differentiates lactose fermenters (pink/red) from nonfermenters (colorless), H<sub>2</sub>S production can be detected (black precipitate)

Xylose-lysine-deoxycholate (XLD)

Selective medium for Gram-negative rods, differentiates lactose fermenters (yellow) from nonfermenters (red), H<sub>2</sub>S production can be detected (black precipitate)



Quadro colturale: colonie incolore con centri neri (produzione di H<sub>2</sub>S)



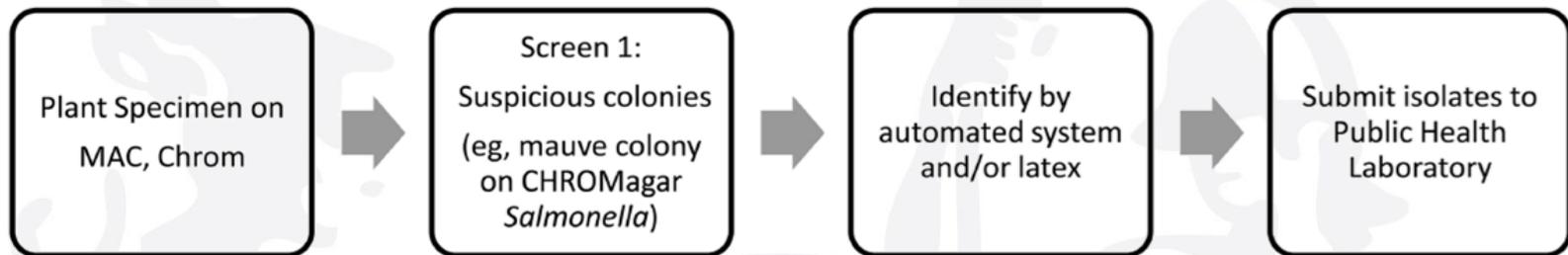
Prove di conferma: TSI, LIA, Urea;

Sistemi di identificazione manuali o automatici: API, Enterotube, BD Phoenix, Vitek, ecc.



# Algoritmo diagnostico *Salmonella/Shigella*

## B: Terreni cromogeni



# Identificazione di *Salmonella* spp.

Il campione fecale viene seminato in brodocoltura di arricchimento (**brodo selenito**) ed incubato a 37°C per 18-24h (arricchimento selettivo)



strisciare un'ansata del brodo di arricchimento su una piastra di terreno cromogeno

Bismuth sulfite  
Brilliant green

CHROMagar *Salmonella*  
HardyChrom SS

Isolation of *Salmonella*, including *Salmonella* Typhi (black on this medium)

Isolation of *Salmonella* (red, pink, or white with red halo on this medium), inhibits *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi

Isolation of *Salmonella* (mauve-rose on this medium)

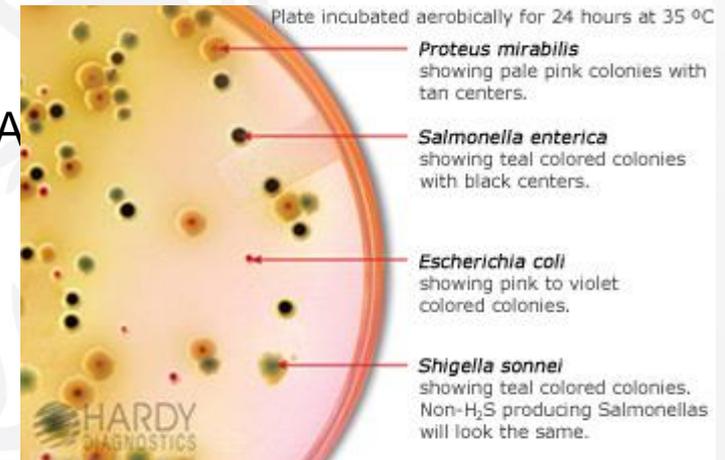
Isolation of *Salmonella* (black on this medium) and *Shigella* (teal on this medium)



Quadro colturale: colonie con caratteristico colore



Sistemi di identificazione manuali o automatici: A  
Enterotube, BD Phoenix, Vitek, ecc.



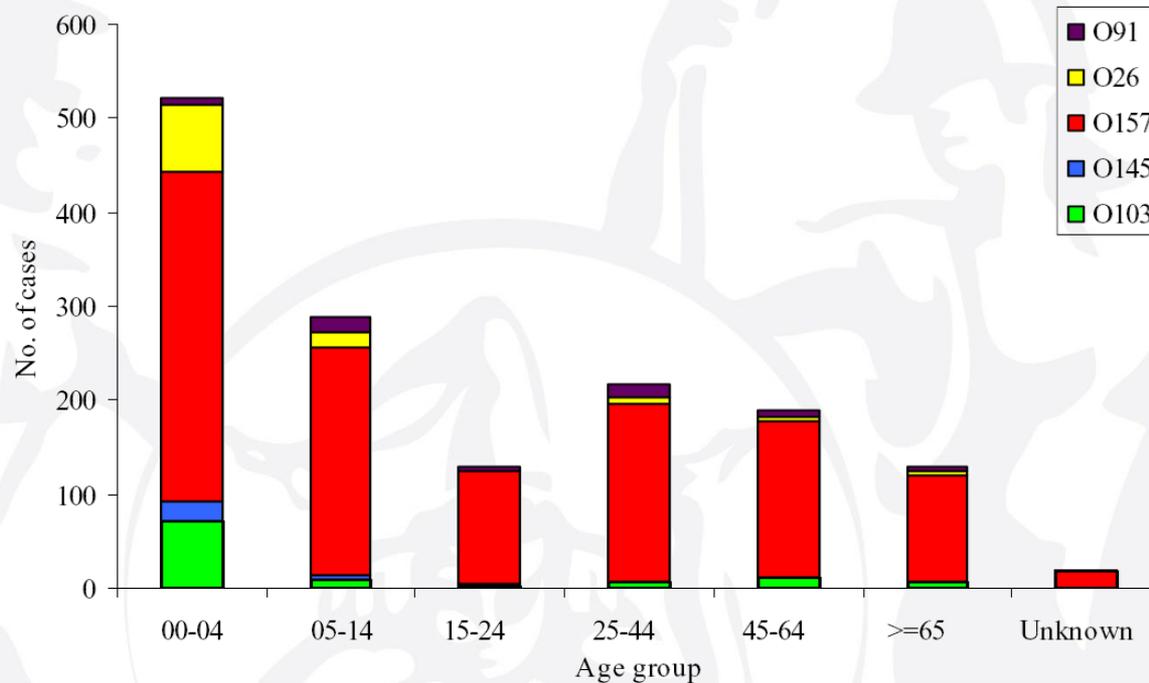
UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

# Identificazione di *E. coli* enteroemorragici (EHEC, VTEC, STEC)

- Usualmente O157:H7
- Ma anche: O26:H11, O103:H2 e O145



Figure VT1. Distribution of confirmed VTEC cases in humans by serogroup and age group, 2005 (BSN)



# Identificazione di *E. coli* STEC

Il campione fecale viene seminato in brodocoltura di arricchimento per Gram-negativi (**GN broth**) ed incubato a 37°C overnight per la ricerca di Stx1 e Stx2 mediante immunoassay



strisciare un'ansata del campione fecale o del brodo di arricchimento su una piastra di terreno agarizzato selettivo

MacConkey agar with sorbitol (SMAC) or cefixime-tellurite SMAC (CT-SMAC)

CHROMagar O157  
CHROMagar STEC

Isolation of *E. coli* O157 (colorless on this medium)

Isolation of O157 STEC (mauve on this medium)

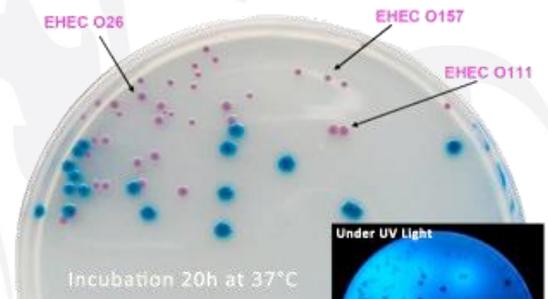
Isolation of 6 most common STEC serogroups (mauve on this medium)



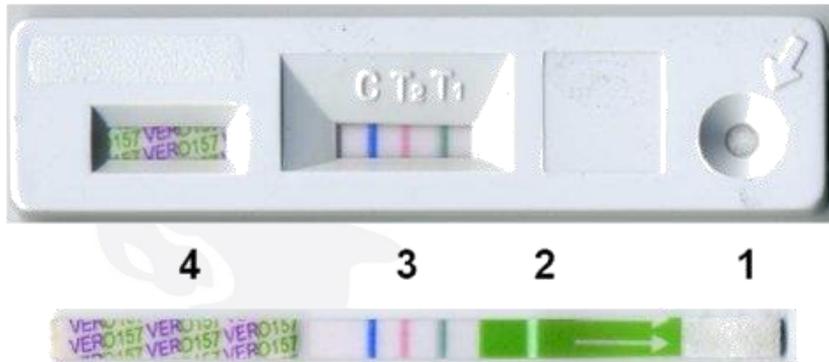
Quadro colturale: colonie con caratteristico colore



ricerca di Stx1 e Stx2 mediante immunoassay



# Test antigenici

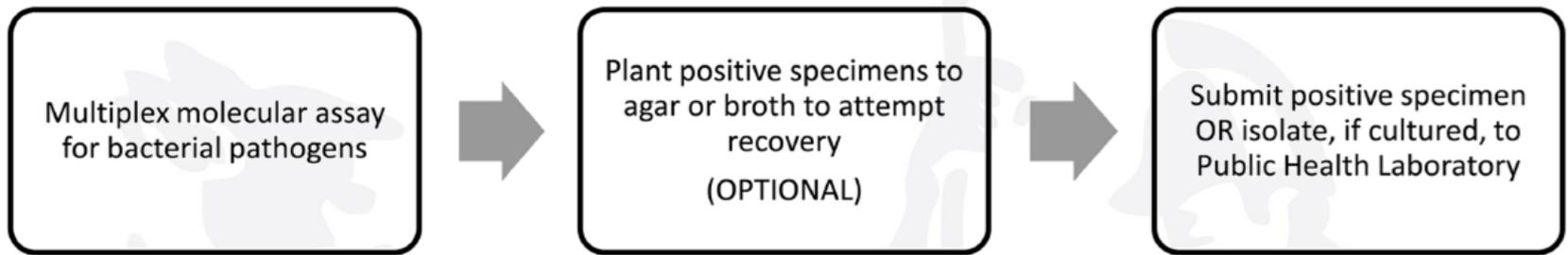


Immuno-cromatografia

Immuno-enzimatica (ELISA)



# Algoritmo diagnostico biomolecolare



# Impatto delle tecniche non colturali

TABLE. Number of culture-confirmed cases and positive culture-independent diagnostic test (CIDT) reports (N = 38,666), by selected pathogens and culture results — FoodNet, United States, 2012–2013

Pathogen	Culture-positive only		Positive CIDT reports						Total culture-confirmed infections and positive CIDT reports
	No.	(%)	CIDT-positive and culture-positive	CIDT-positive and culture-negative	CIDT-positive and no culture	No.	(%)	No.	(%)
<i>Campylobacter</i>	12,894	(83.8)	539	(3.5)	1,099	(7.1)	859	(5.6)	15,391
<i>Salmonella</i>	15,034	(98.0)	115	(0.7)	8	(0.1)	185	(1.2)	15,342
<i>Shigella</i>	4,312	(91.8)	160	(3.4)	27	(0.6)	197	(4.2)	4,696
STEC*†	34	(1.4)	2,205	(90.3)	110	(4.5)	94	(3.8)	2,443
<i>Vibrio</i>	446	(98.0)	0	—	5	(1.1)	4	(0.9)	455
<i>Yersinia</i>	332	(98.0)	0	—	2	(0.6)	5	(1.4)	339
<b>Total</b>	<b>33,052</b>	<b>(85.5)</b>	<b>3,019</b>	<b>(7.8)</b>	<b>1,251</b>	<b>(3.2)</b>	<b>1,344</b>	<b>(3.5)</b>	<b>38,666</b>

Abbreviation: STEC = Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*.

\* Excludes 274 Shiga toxin-positive reports from clinical laboratories that were Shiga toxin-negative at a public health laboratory.

† Excludes 53 positive reports of detection of O157 antigen without testing for Shiga toxin.



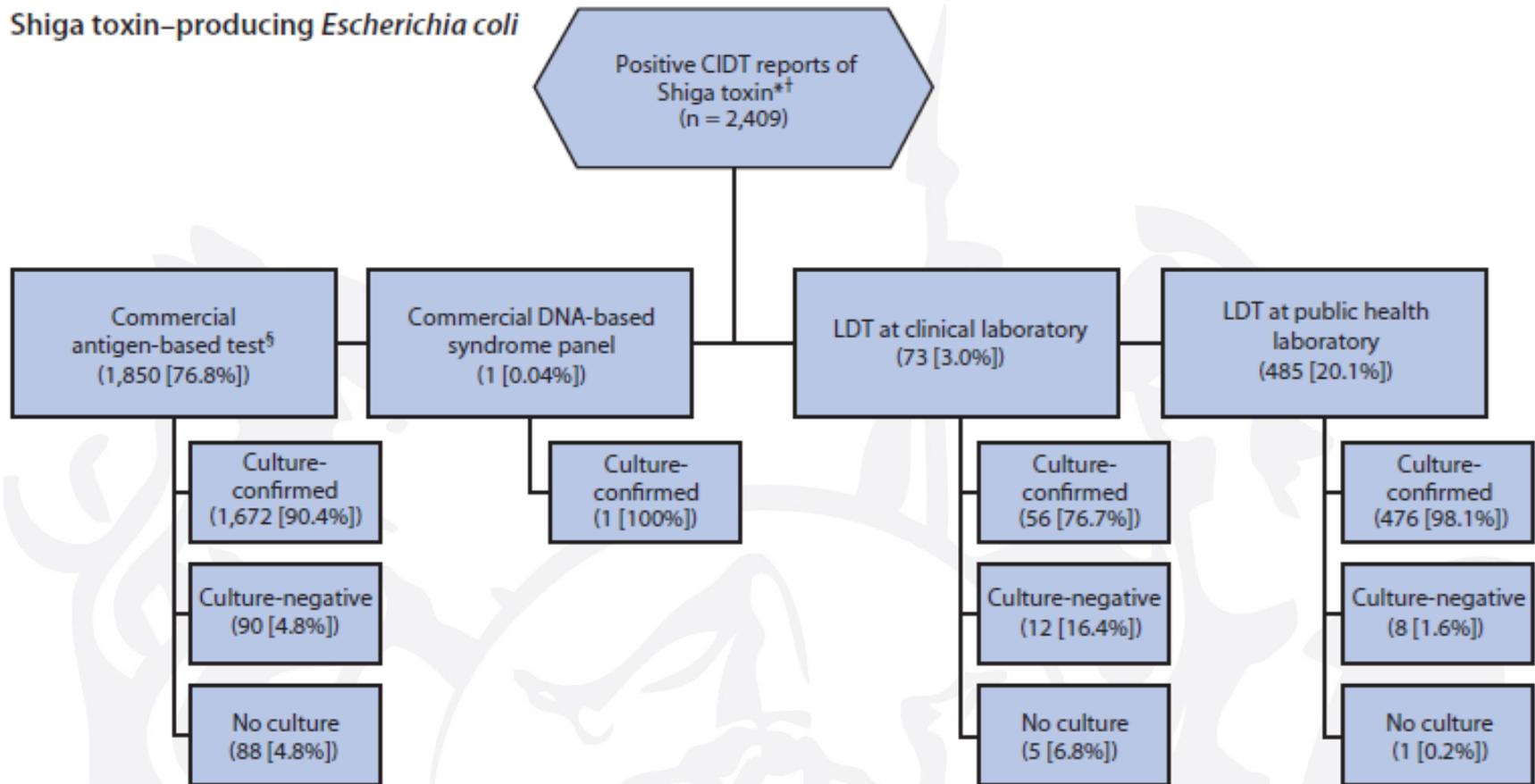
# FDA-approved CIDTs

Pathogen	FDA-approved CIDTs by test type	Laboratories offering CIDTs (2014), %	Additional cases, %
<i>Campylobacter</i>	AntigenBT <sup>ISEP</sup>	14	13
	NAT multiplex	1	
<i>Salmonella</i>	NAT multiplex	1	1.3
<i>Shigella</i>	NAT multiplex	0.5	5
<i>Vibrio</i>	NAT multiplex	0.6	2
<i>Yersinia</i>	NAT multiplex	0.5	2
<i>Cryptosporidium</i>	AntigenBT	88	Not applicable
	NAT multiplex	2	
Shiga toxin–producing <i>Escherichia coli</i>	AntigenBT	57	8
	NAT multiplex	1	



# CIDTs per STEC

## Shiga toxin-producing *Escherichia coli*



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

**Abbreviations:** CIDT = culture-independent diagnostic test; LDT = laboratory-developed test.

\* Excludes 274 Shiga toxin-positive reports from clinical laboratories that were Shiga toxin-negative at a public health laboratory and 53 reports of detection of O157 antigen without a test result for Shiga toxin.

† For instances in which a positive result from a single specimen was reported from more than one laboratory (e.g., clinical laboratory and public health laboratory), test type was categorized according to the test type used for initial detection.

<sup>‡</sup> Conducted at a clinical laboratory or public health laboratory.

# *Campylobacter jejuni e coli*

Negli ultimi anni, grazie a idonei metodi di esame (terreni di coltura arricchiti e selettivi), si è potuto dimostrare che esso probabilmente rappresenta la prima causa di gastroenterite nei paesi sviluppati.

Nei paesi in cui la ricerca di *Campylobacter* viene eseguita routinariamente risulta essere in prima o seconda posizione fra i batteri enteropatogeni isolati da soggetti affetti da diarrea (testa a testa con *Salmonella*).



# Accertamenti microbiologici per *Campylobacter*

Opzione (tempo richiesto)	Procedura	Vantaggi	Svantaggi
Esame colturale (2-4 gg)	Semina in terreni selettivi. Incubare a 42°C in microaerofilia per 48-72 h	Permette di ottenere un isolato da sottoporre a tipizzazione e test di sensibilità agli antibiotici (macrolidi, fluorochinoloni)	Richiede attrezzature dedicate (incubatore a 42°C in microaerofilia). Richiede 2-4 gg. Bassa sensibilità se le condizioni di crescita non sono ideali.
Ricerca di antigeni fecali (in giornata)	Secondo le istruzioni del produttore	Rapido, semplice	Specificità dubbia (i positivi dovrebbero essere confermati in coltura). Non consente di avere un isolato.
Ricerca del genoma nelle feci (1-2 gg)	Estrazione dell'acido nucleico e amplificazione del bersaglio (PCR)	Sensibile, consente di cercare contestualmente altri patogeni enterici	Non consente di avere un isolato.



# Terreni selettivi per *Campylobacter*

Terreno	
Butzler (Agar sangue di cavallo)	Novobiocina e colistina inibiscono gli enterobatteri Gram-negativi, cefazolina e bacitracina inibiscono i batteri Gram-positivi. La cicloeximide inibisce numerosi funghi.
Skirrow (Agar sangue lisato di cavallo)	La vancomicina inibisce i batteri Gram-positivi, mentre trimethoprim e polimixina B inibiscono numerosi microrganismi Gram-negativi.
Campy-BAP (Agar sangue di montone)	Il sangue di montone fornisce nutrienti. Amfotericina B, cefalotina, polimixina B, trimetoprim e vancomicina sopprimono la crescita della flora microbica.
Charcoal Desossicolato Cefoperazone Agar	Il carbone agisce da neutralizzante per molte sostanze tossiche. Per inibire la normale flora intestinale si usano desossicolato e cefoperazone.
Campylobacter Blood Free Medium	Carbone vegetale, desossicolato, cefoperazone e amfotericina B

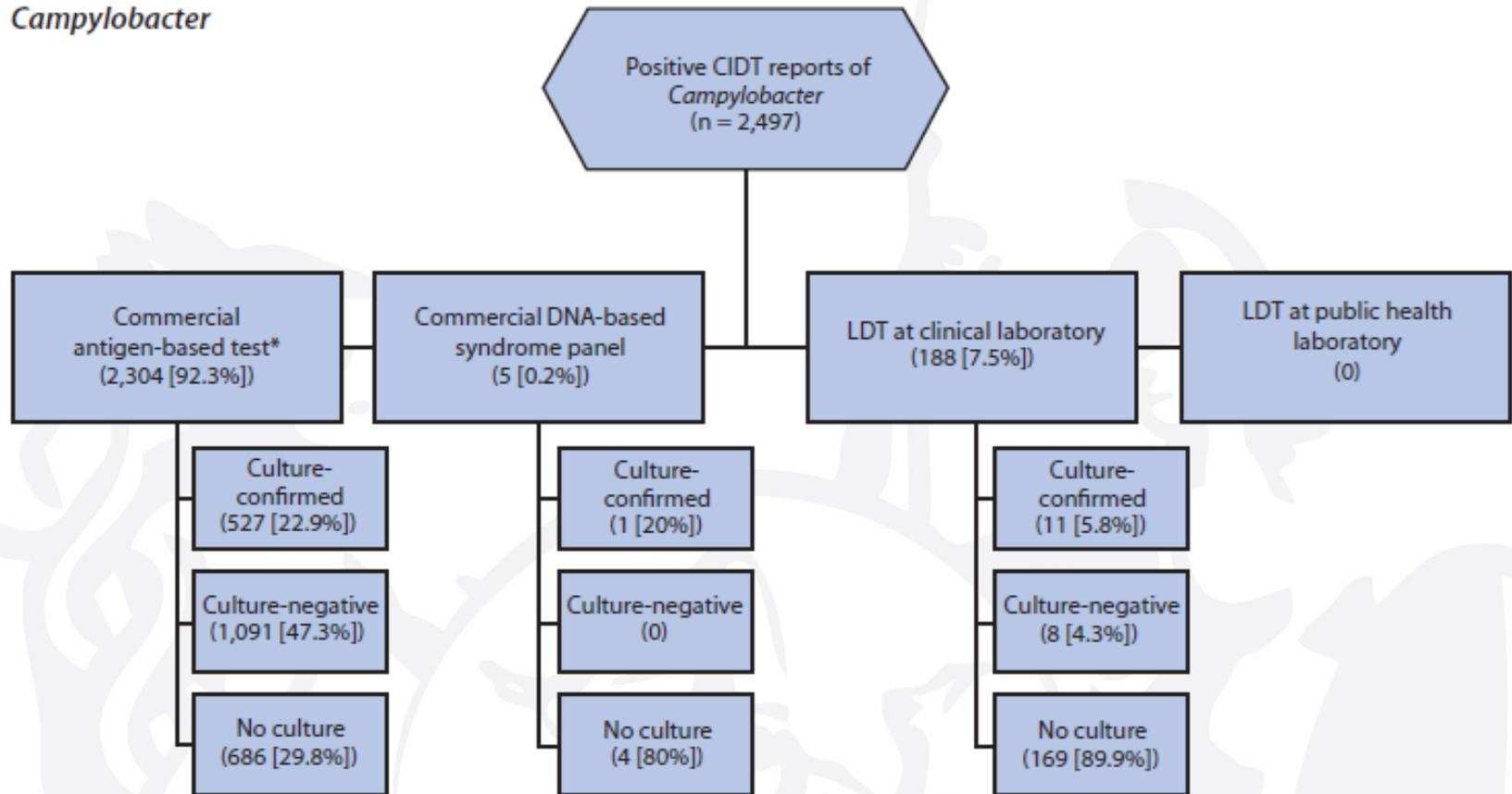
## L'identificazione degli isolati si basa su:

- Morfologia alla colorazione di Gram
- Crescita selettiva a 42°C
- Positività al test della catalasi
- Positività al test dell'ossidasi
- Latex agglutinazione



# CIDTs per *Campylobacter*

## *Campylobacter*



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

**Abbreviations:** CIDT = culture- independent diagnostic test; LDT = laboratory-developed test.

# Culture-Independent Diagnostic Tests (CIDTs)

## Vantaggi

- 1) Rapidità di esecuzione (rapida diagnosi),
- 2) possono essere più sensibili della coltura, in particolare quando sono stati somministrati farmaci antimicrobici prima della raccolta dei campioni,
- 3) la relativa facilità di uso può aumentare il numero di pazienti testati,
- 4) possono consentire l'individuazione di un più ampio range di microrganismi (non-O157 STEC),
- 5) Potenziali economie di scala.

## Svantaggi

- 1) test per ricerca di antigeni poco specifici possono produrre falsi-positivi,
- 2) test molecolari altamente sensibili possono produrre falsi-positivi (non distinguono fra infezione e colonizzazione),
- 3) mutazioni molecolari nel microrganismo possono provocare una diminuzione della sensibilità,
- 4) Non sempre consentono di valutare la sensibilità ai farmaci.

# Svantaggi dei CIDTs

## Eccessiva sensibilità/scarsa specificità

- Spreco di risorse per follow-up inutili;
- Stime instabili, alterazione dei trend.

## Perdita dell'isolato in coltura pura

- Difficoltà di tipizzazione: perdita della capacità di tracciare gli outbreak o spreco di risorse per indagare pseudo-outbreak;
- Minore monitoraggio dell'emergenza di sottotipi e serovar (*Salmonella*);
- Mancanza dei test di sensibilità agli antibiotici.

## Incremento dei costi



# Tipizzazione di *Salmonella*

>2500 differenti sierotipi o serovar

200 di essi causano infezioni alimentari ogni anno in Europa

30 di essi rappresentano il 90% degli isolati

**TABLE.** Number and incidence\* of top 10 *Salmonella* serotypes† in 2008 - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, United States

Rank	<i>Salmonella</i> serotype	Number of cases	Incidence per 100,000 persons
1	Enteritidis	1,356	2.95
2	Typhimurium	1,077	2.34
3	Newport	681	1.48
4	Javiana	423	0.92
5	Saintpaul	403	0.88
6	14,[5],12:i-	269	0.59
7	Muenchen	213	0.46
8	Heidelberg	198	0.43
9	Montevideo	194	0.42
10	Braenderup	108	0.24

\* Per 100,000 persons

† Among 6,750 *Salmonella* isolates that were fully serotyped

UPDATED March 2009

**Tabella 1.** Frequenze dei principali sierotipi di *Salmonella* isolati da casi umani per anno di isolamento

Sierotipi	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
S. Typhimurium	32,0	40,0	41,4	34,8	35,8	42,9	36,9	38,5	36,9	33,4	29,4
S. Enteritidis	31,5	20,0	23,2	27,5	25,8	19,1	24,1	21,6	17,2	14,7	10,4
S. 4,5,12:i-	0,0	0,0	0,0	1,3	3,3	3,6	5,2	4,6	6,5	14,5	15,5
S. Derby	2,9	3,1	2,5	2,8	3,0	3,6	4,2	3,4	3,6	3,5	4,3
S. Infantis	5,6	4,8	2,6	2,7	3,3	3,6	3,8	2,8	2,7	1,9	1,9
S. Napoli	1,1	1,4	1,4	1,9	2,7	2,6	3,0	2,6	1,9	3,7	4,1
Altro	26,7	30,8	28,9	29,0	26,1	24,6	22,9	26,5	31,1	28,3	34,4
<b>Totale</b>	<b>2711</b>	<b>2563</b>	<b>2366</b>	<b>3195</b>	<b>2929</b>	<b>2338</b>	<b>2315</b>	<b>2086</b>	<b>1932</b>	<b>3474</b>	<b>3550</b>

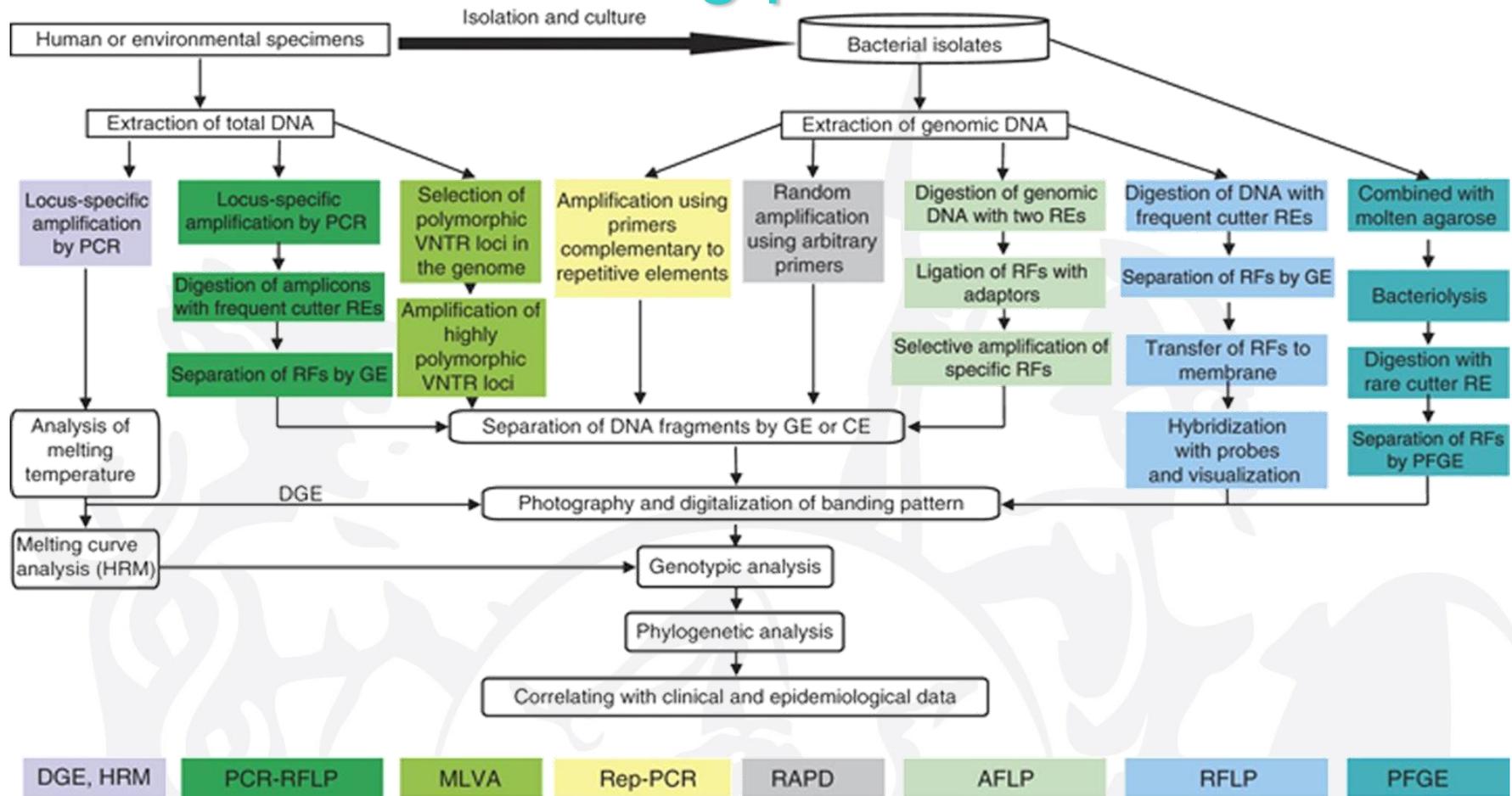


# UK outbreaks of foodborne disease associated with prepared salads in international trade



Year	Imported salads	Country of Origin	Organism	No. Cases
2007	Fresh basil	Israel	<i>S. Senftenberg</i>	48+
2005	Lettuce	Spain	<i>S. Typhimurium</i> DT104 (ACSSuSpT)	96
2004	Lettuce	Spain	<i>S. Newport</i>	375
2003	Lettuce	Spain	<i>S. Braenderup</i>	40+
2001	Salad leaf (Iceberg)	Spain	<i>S. Newport</i> PT33	19
2000	Lettuce	Not Known (Not UK)	<i>S. Typhimurium</i> DT104 (ACSSuSpT)	361
2000	Lettuce	Not Known (Not UK)	<i>S. Typhimurium</i> DT204b (ACGNeKSSuTTmNxCp <sub>L</sub> )	294
1994	Iceberg lettuce	Spain	<i>Shigella sonnei</i>	218

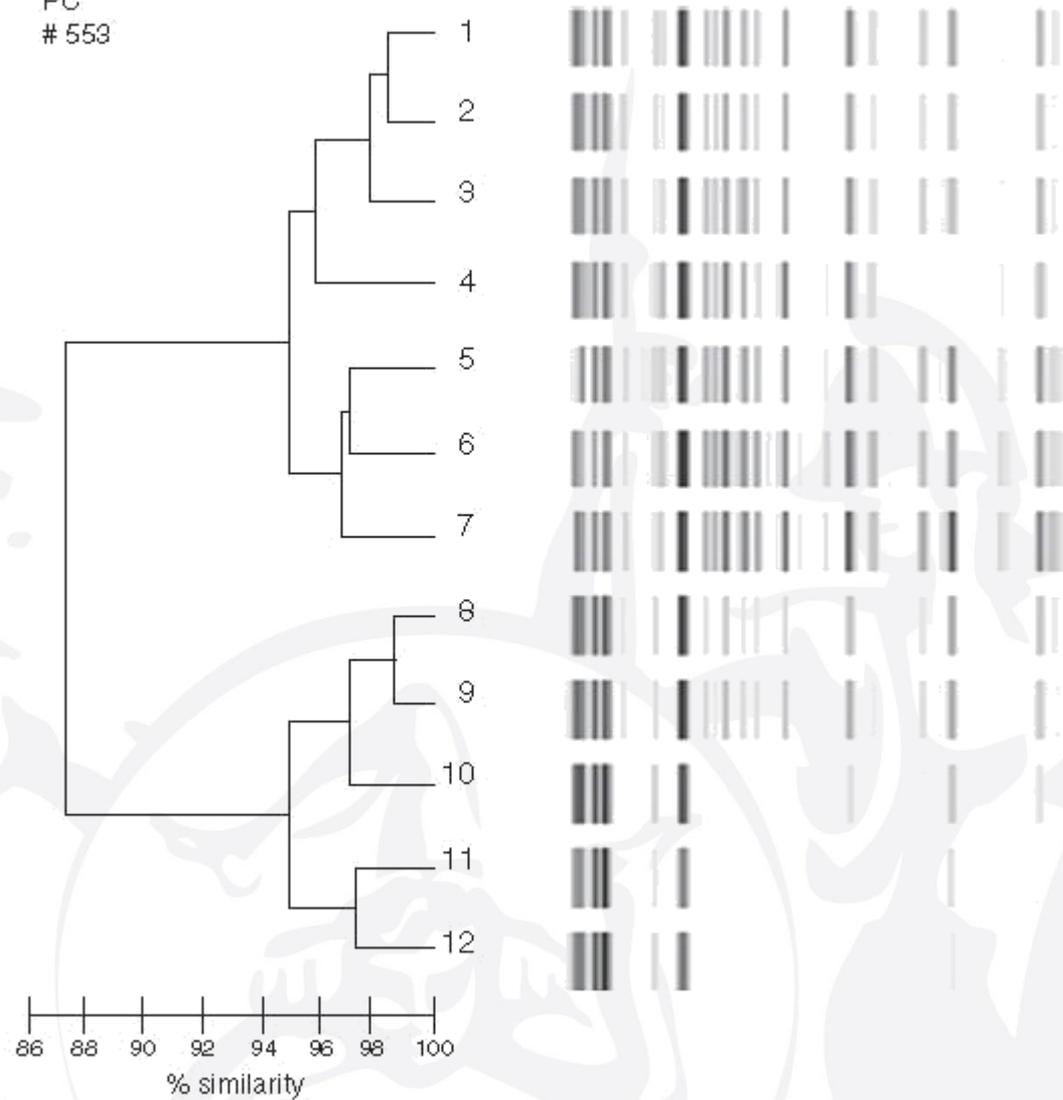
# Molecular typing DNA banding pattern based



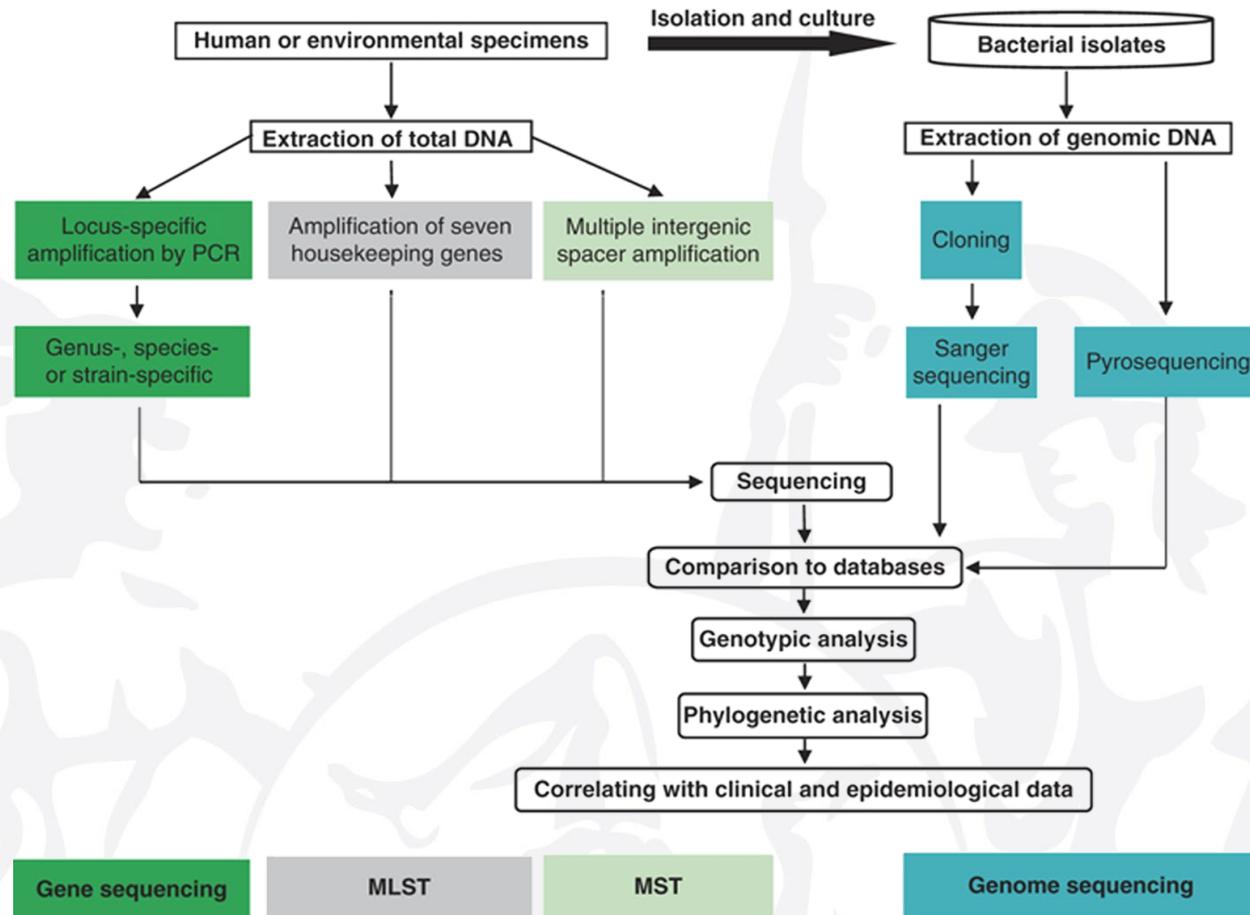
# Phylogenetic analysis of banding patterns

Diversilab v 3.4  
PC  
# 553

Key



# Molecular typing DNA sequence based



# Phylogenetic analysis of DNA sequences

## 4. Estimate relationships based on extent of DNA similarity.

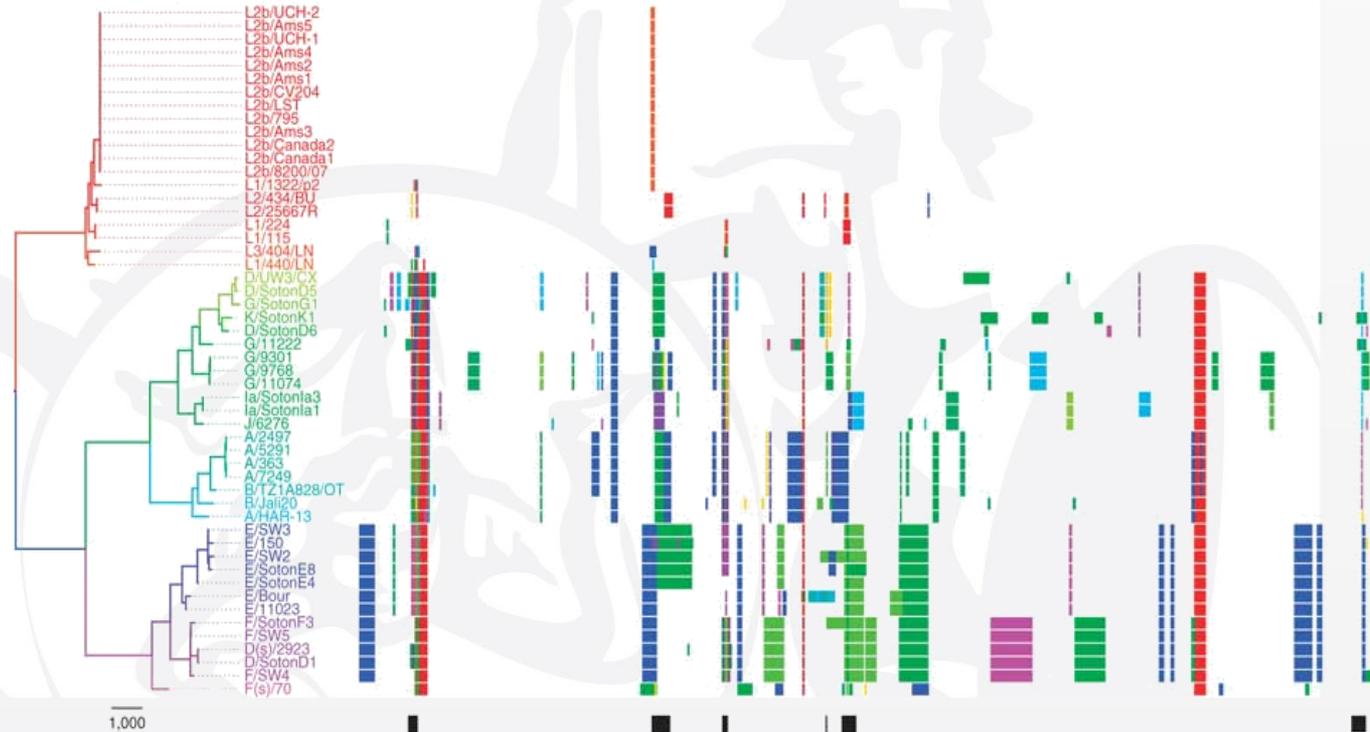
At variable DNA positions, related groups will tend to share the same nucleotide.

The sheer number of characters is helpful to distinguish the 'phylogenetic signal' from noise.



**Molecular phylogeny** of taxa A-I.

Colored letters = different from top sequence (taxon G)



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE PER LA PROMOZIONE DELLA SALUTE E MATERNO INFANTILE “G. D’ALESSANDRO”  
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA  
VIA DEL VESPRO 133, 90127 PALERMO

# Le gastroenteriti virali : diagnosi di laboratorio e tipizzazione molecolare

Giovanni Giammanco

Ragusa, 25 Settembre 2015

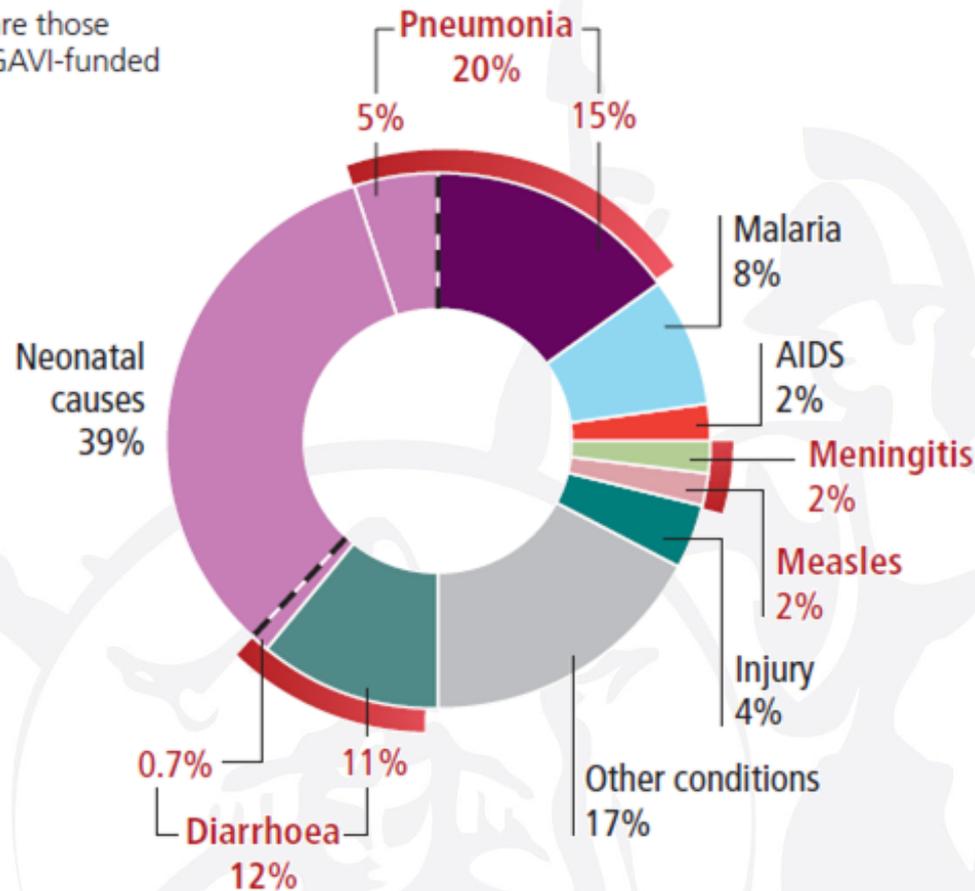


UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

# DIARRHEA IS CERTAINLY NOT A GLAMOROUS DISEASE BUT IT IS A SERIOUS KILLER

## Causes of under-five child deaths in GAVI-eligible countries

Diseases in red are those preventable by GAVI-funded vaccines

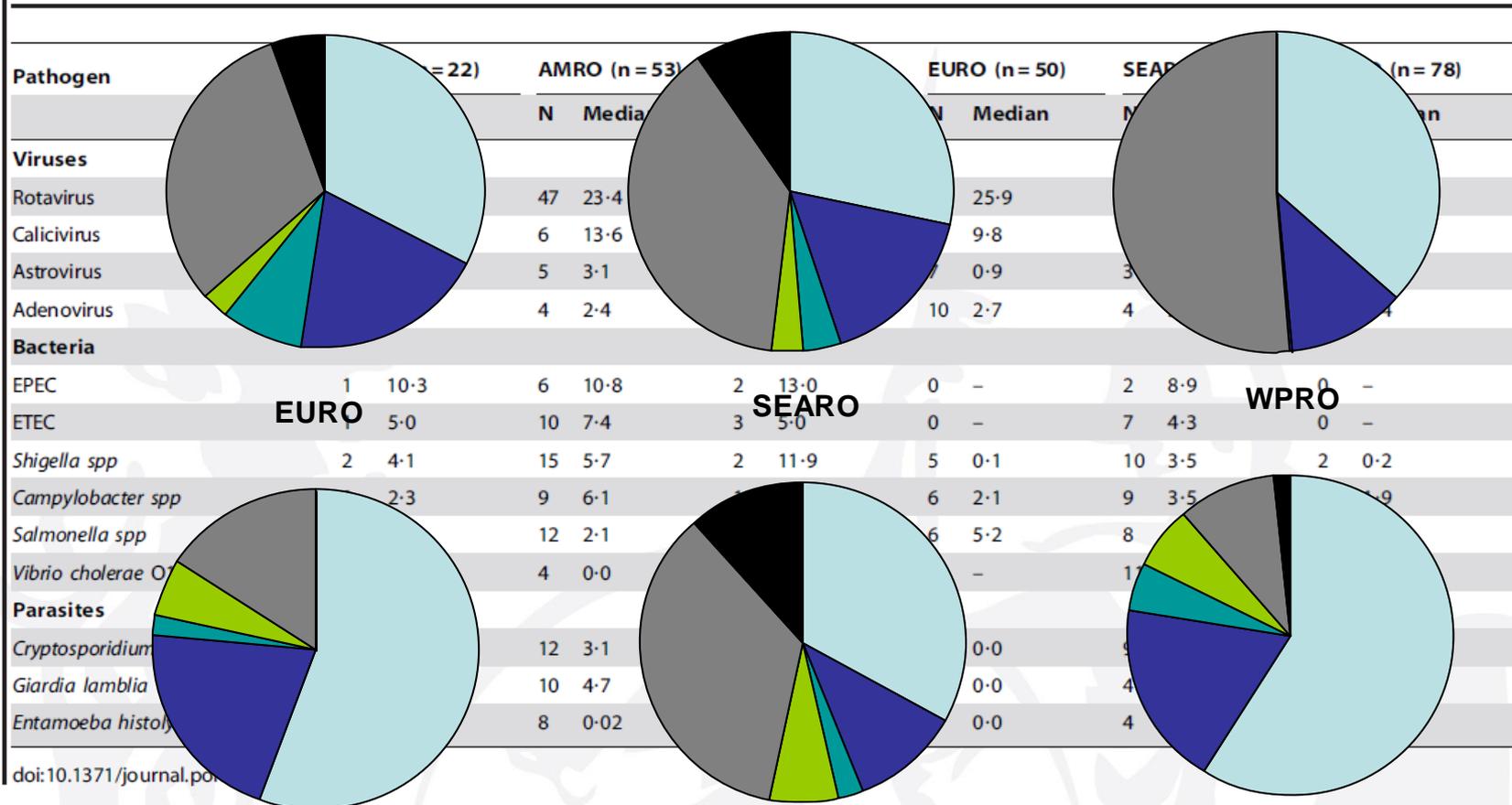


UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

Source: CHERG 2010, WHO and UNICEF 2012

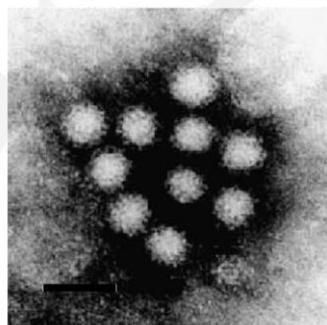
# Microrganismi causa di diarrea in bambini <5 anni

**Table 5.** Median age-adjusted proportions of causes of diarrhea, constrained to fit 100%, in 286 inpatient studies of children <5 years of age published between 1990–2011, by WHO region.

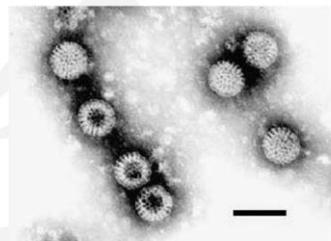


## Differentiating features among viral causes of gastroenteritis

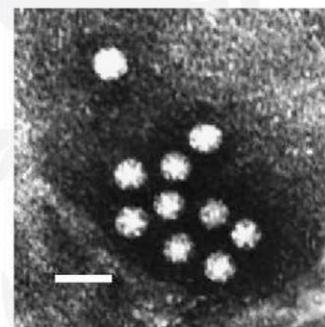
Viruses	Predominant season	Age	Duration, days	Lactose intolerance	Common modes of transmission in order of frequency
Rotaviruses	Fall/winter	6 to 24 months	5 to 7	Yes	Fecal-oral; respiratory?
Caliciviruses	All year (winter)	All ages	1 to 4	No	Fecal-oral, water; shellfish, foods, respiratory?
Astroviruses	Winter	All ages	3	Yes	Fecal-oral, water
Enteric adenoviruses	Summer	Children	6 to 9	Yes	Fecal-oral



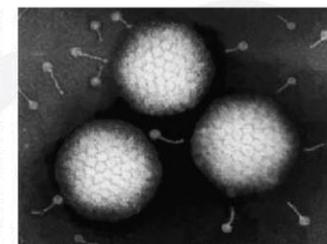
NoV  
30-38 nm  
ssRNA  
no envelope\*



HRV  
90 nm  
dsRNA  
no envelope\*

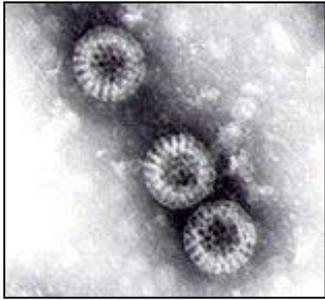


Astrovirus  
28-30 nm  
ssRNA  
no envelope\*



Adenovirus  
80-110 nm  
dsDNA  
no envelope\*\*\*





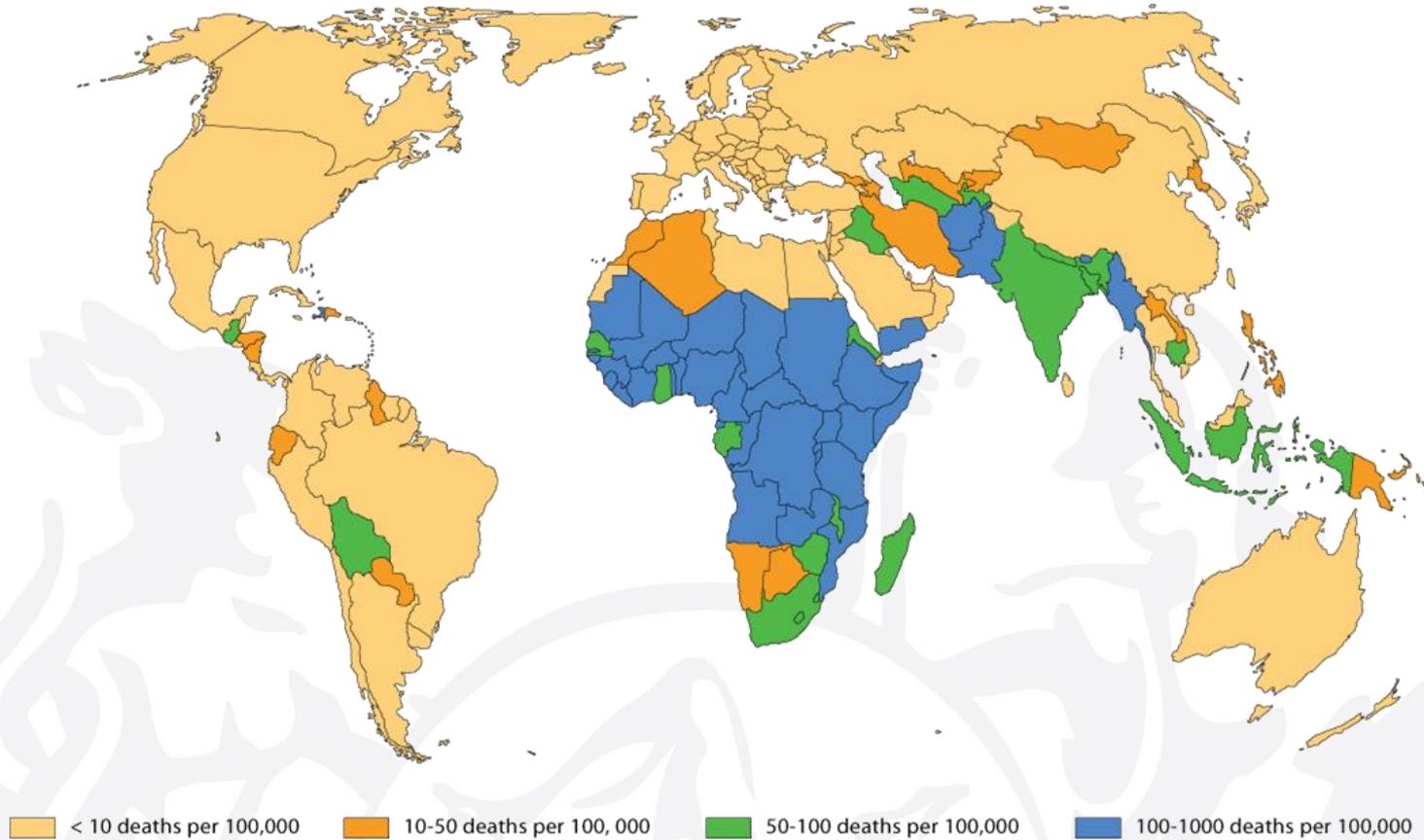
# Rotavirus



Virus ad RNA provvisti di un doppio capsid, ma privi di involucro. Sono notevolmente resistenti agli agenti chimici e fisici.

- Causano enteriti soprattutto nei bambini di età compresa fra i sei mesi e i cinque anni.
- Sono responsabili del 30-40% di tutte le enteriti infantili.
- Si presentano, generalmente, come casi sporadici.
- Negli adulti la malattia ha un decorso blando e poco appariscente, ma essi possono fungere da portatori.

# Rotavirus deaths among children under 5

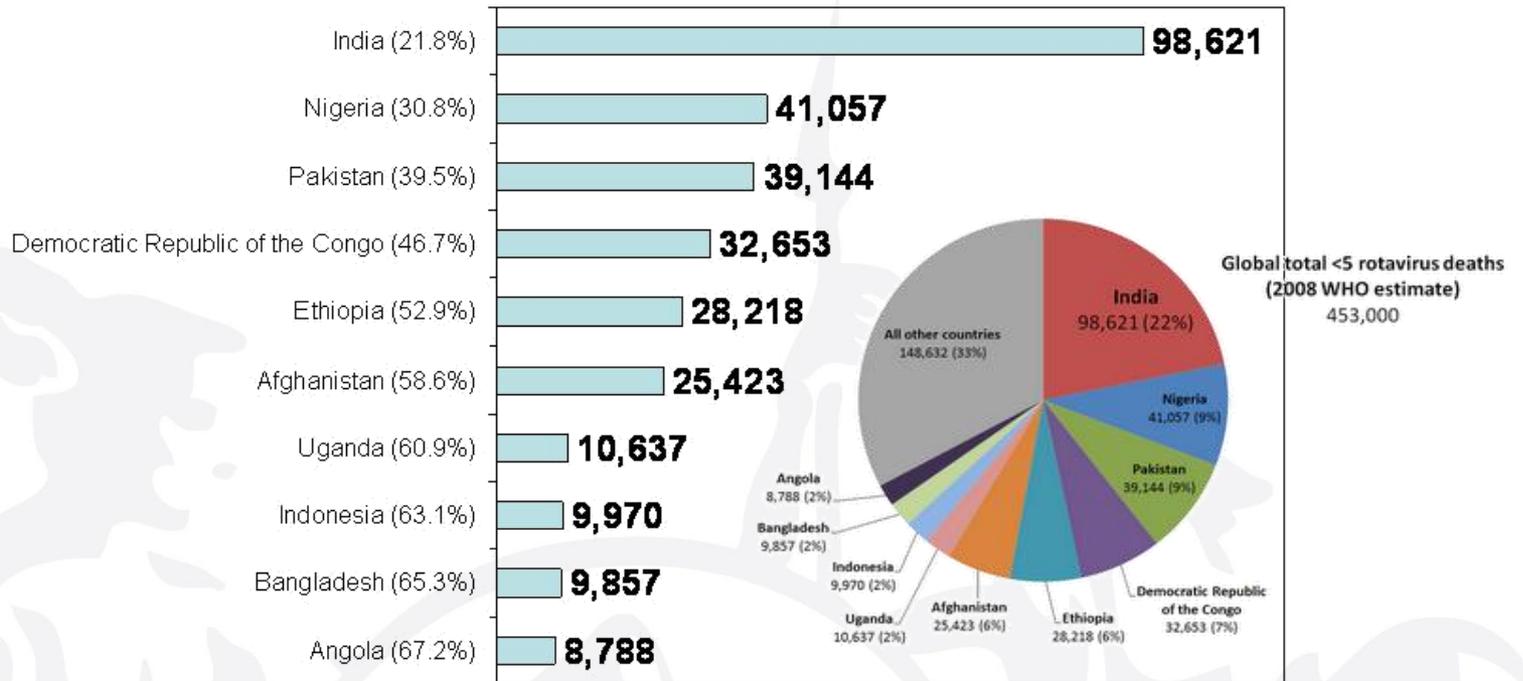


Source: Tate, et al. *JID*. 12(2).

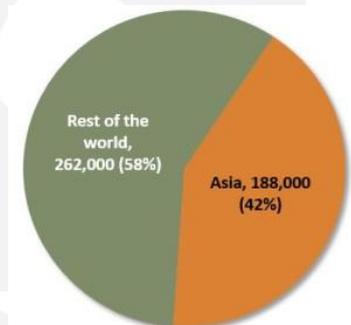
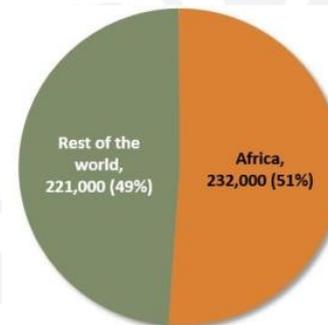


UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

# Number (and percent global total) child rotavirus deaths by country: global total=453 000



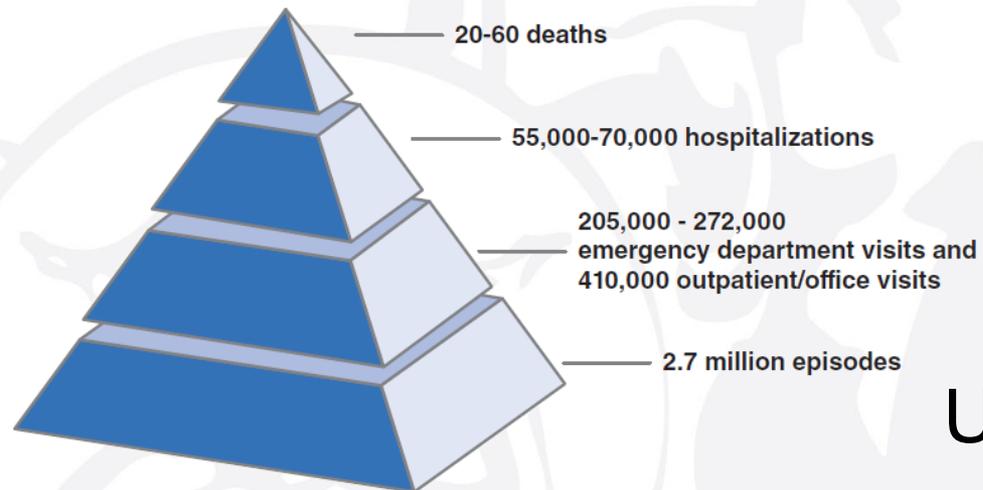
Source: Estimated rotavirus deaths 2008, WHO IVB as of January 2012



# Prevalenza globale della malattia da rotavirus



World

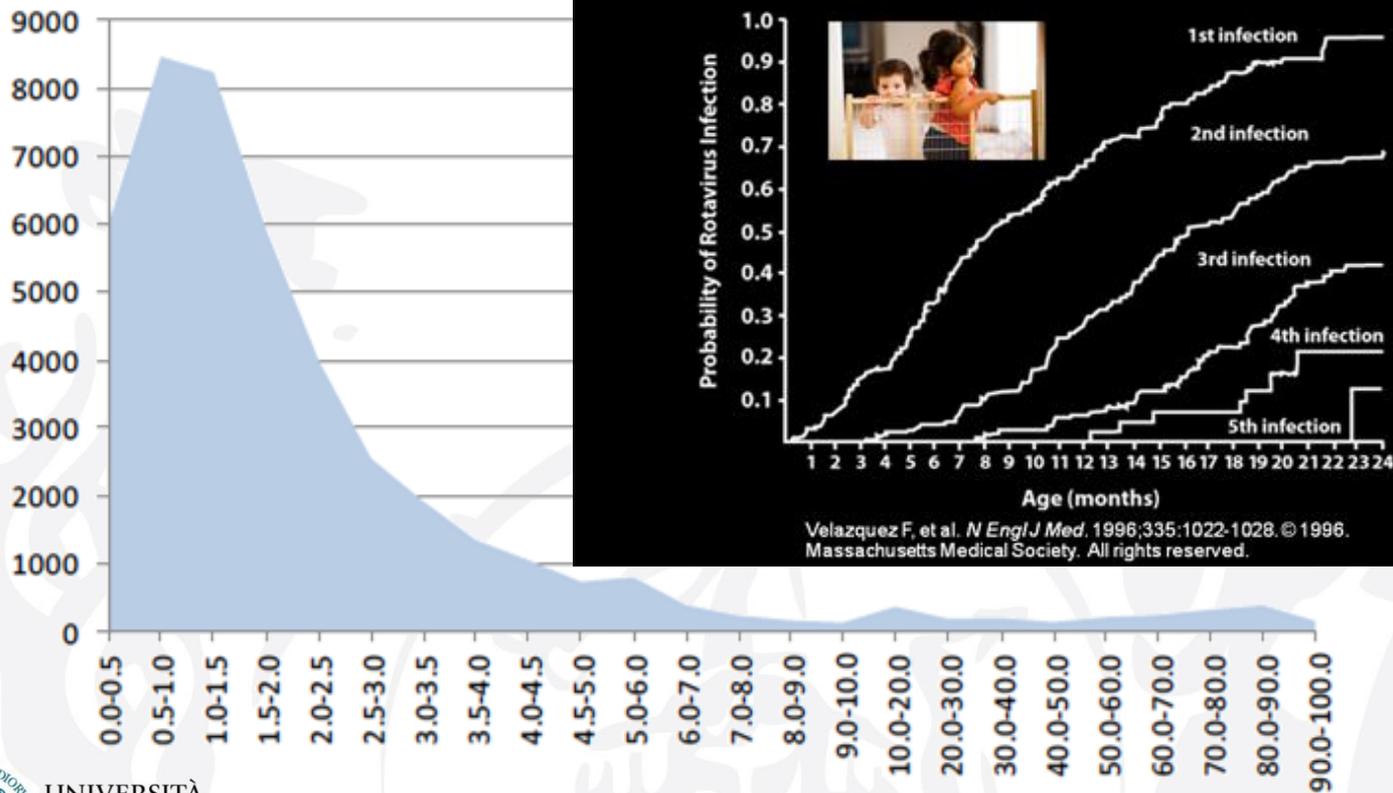


USA

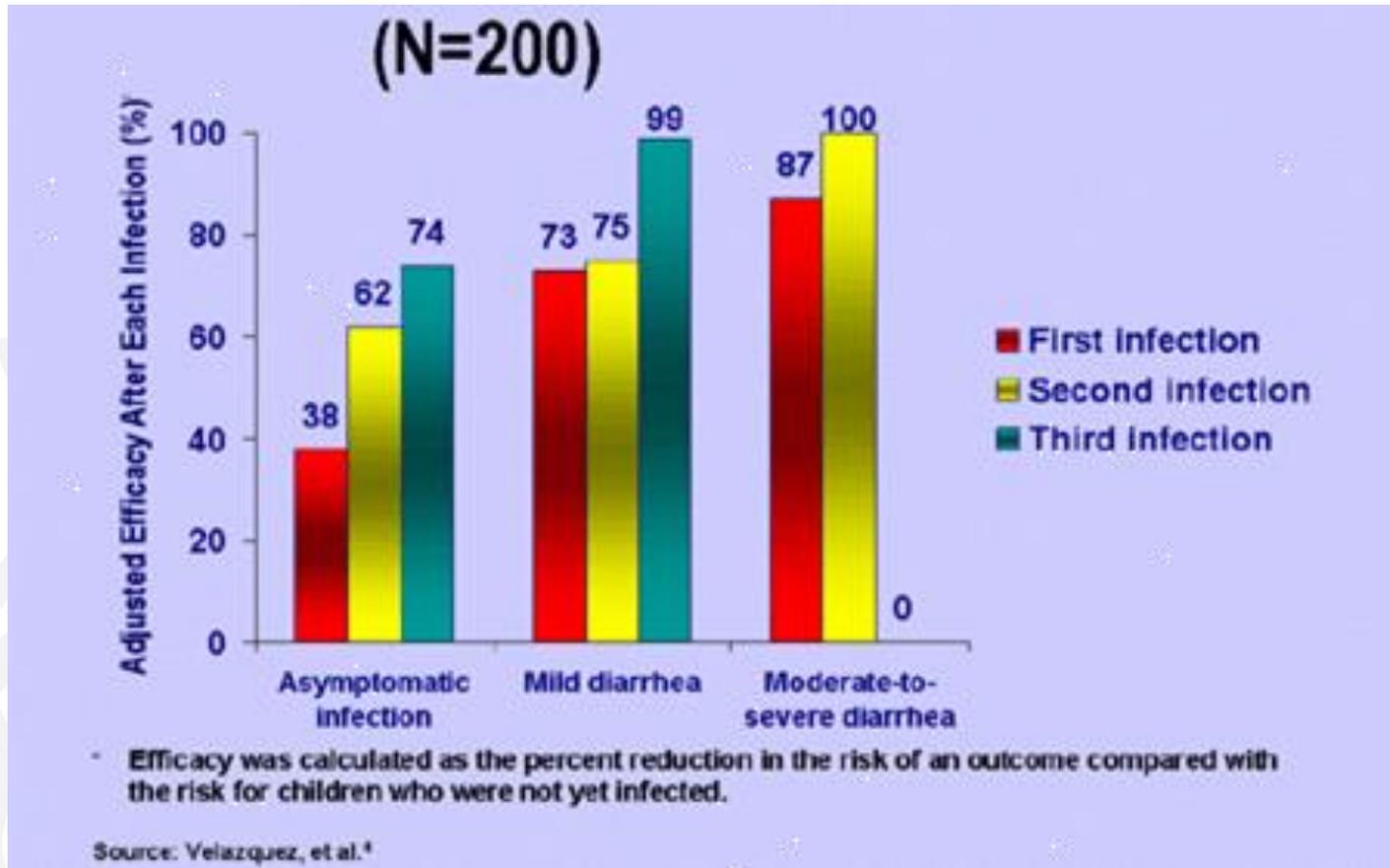


# RV cases by age in Europe, 2006-13

**Figure 10:** Rotavirus infections by age group in all countries between September 2006 and August 2012 (n=44,129). Y axis; Total numbers, X axis Age (in 6 months increments in those between 0 months and 5 years of age, 1 year increments in those between 5 and 10 years of age, and in 10 year intervals for those older than 10 years)



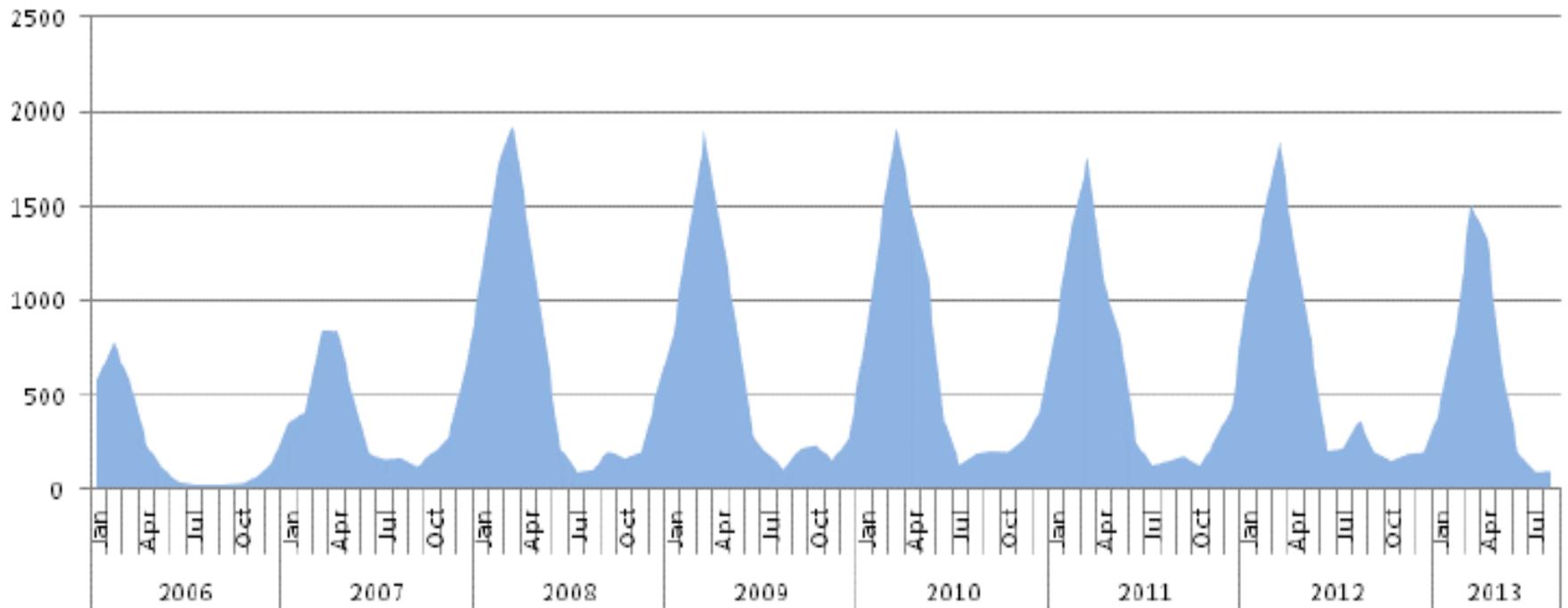
# Protection by natural infection



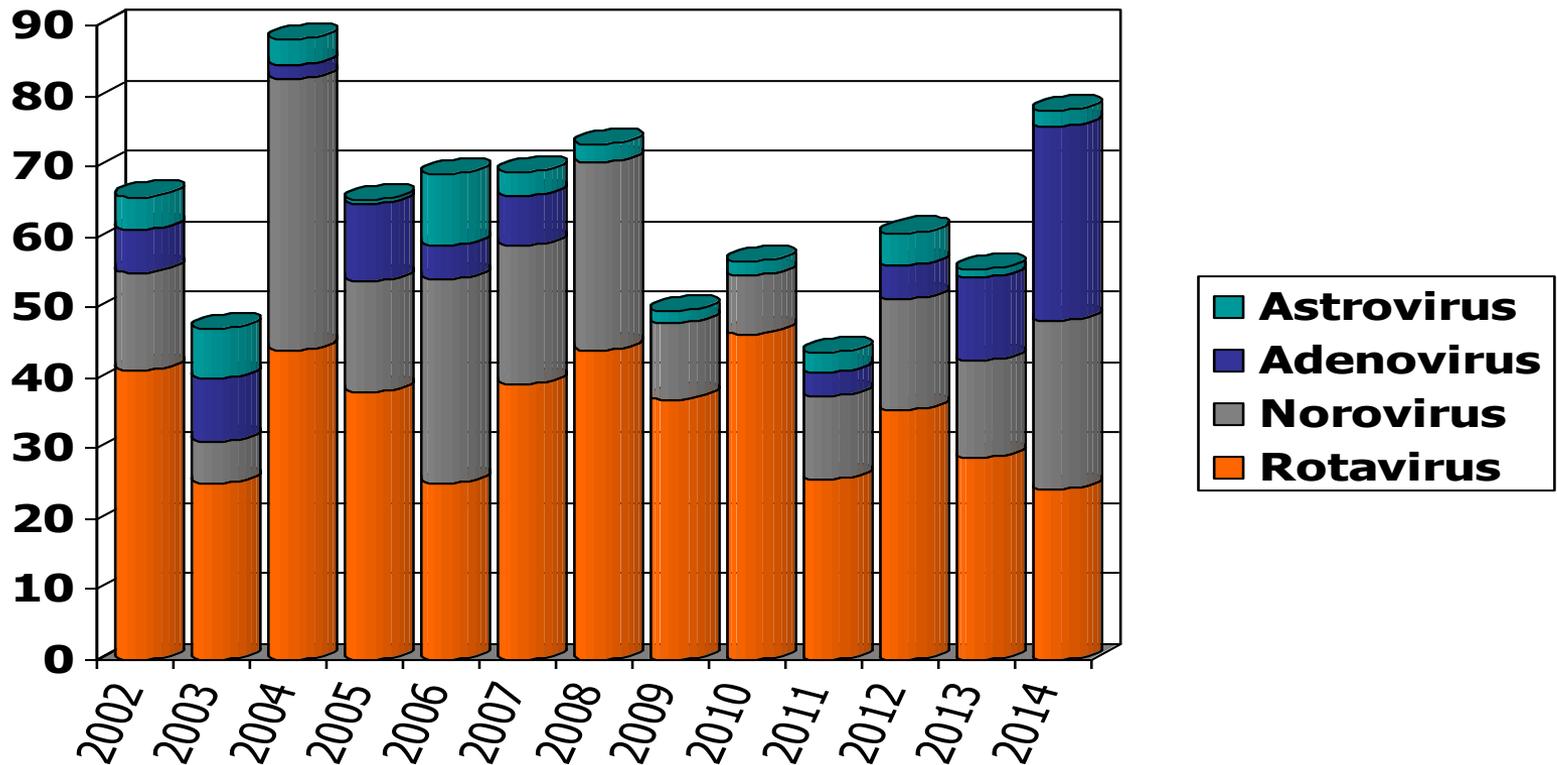
# RV seasonality in Europe, 2006-13

**Figure 4:** Temporal distribution of rotavirus infections in the EuroRotaNet database in consecutive seasons between September 2006 and August 2013.

a) Numbers by month and year



## Prevalenza di virus enterici in bambini palermitani ospedalizzati per diarrea dal 2002 al 2014



**ISGEV**

Italian Study Group for Enteric Viruses

<http://isgev.net/>



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

# Immunization against Rotavirus

2013, 88, 49–64

No. 5



World Health  
Organization

Organisation mondiale de la Santé

## Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire

1ST FEBRUARY 2013, 88th YEAR / 1<sup>er</sup> FÉVRIER 2013, 88<sup>e</sup> ANNÉE

No. 5, 2013, 88, 49–64

<http://www.who.int/wer>

### Contents

49 Rotavirus vaccines

WHO position paper – January  
2013

### Rotavirus vaccines

#### WHO position paper – January 2013

### WHO recommendations

Rotavirus vaccines should be included in all national immunization programmes and considered a priority, particularly in countries with high RVGE-associated fatality rates, such as in south and south-eastern Asia and sub-Saharan Africa.

The use of rotavirus vaccines should be part of a comprehensive strategy to control diarrhoeal diseases with

<http://www.who.int/wer/2013/wer8805.pdf>

<http://www.who.int/immunization/sage/previous/en/>



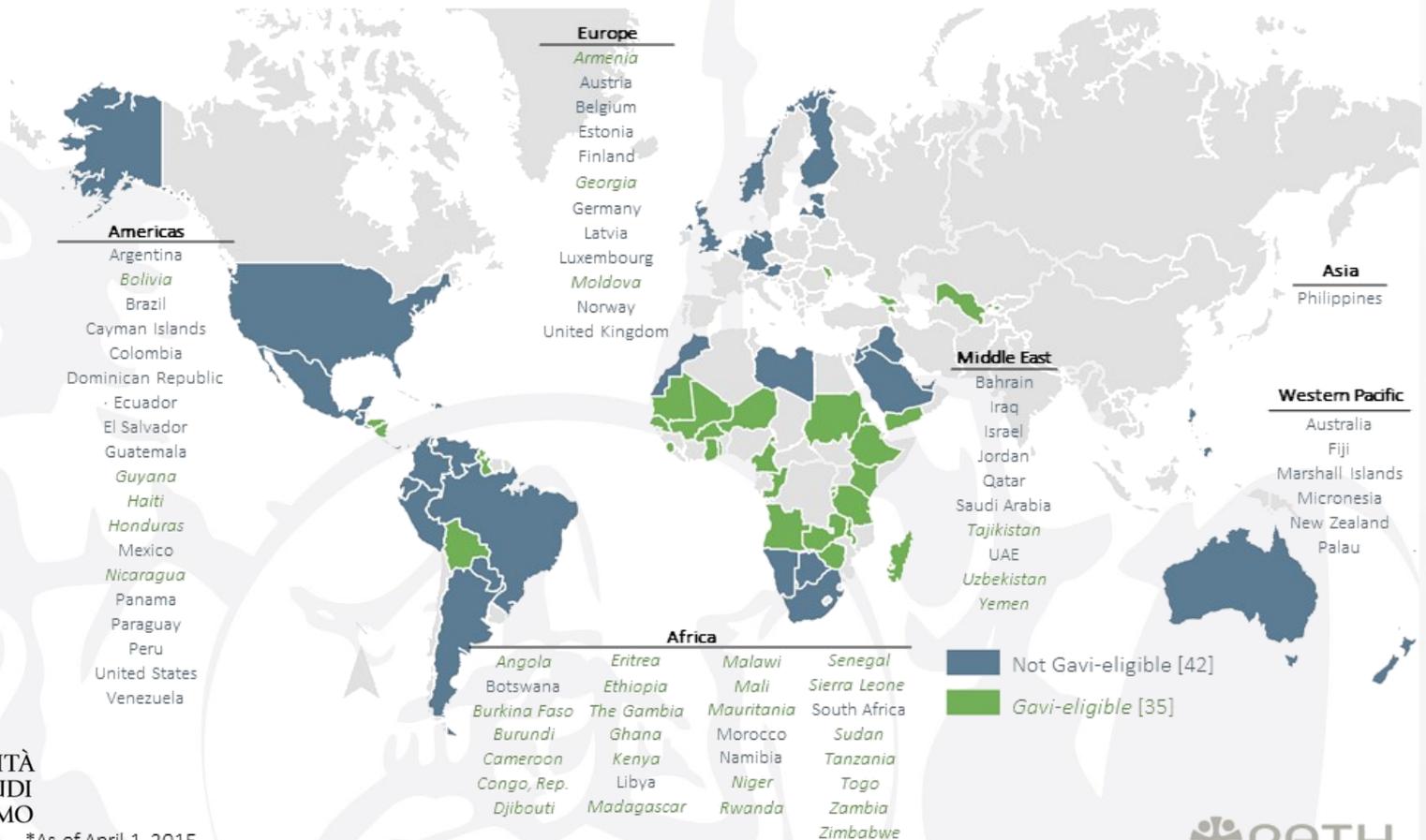
UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

# Immunization against Rotavirus

## Rotavirus Vaccine



National RV introductions by geographic region: 77 countries\*

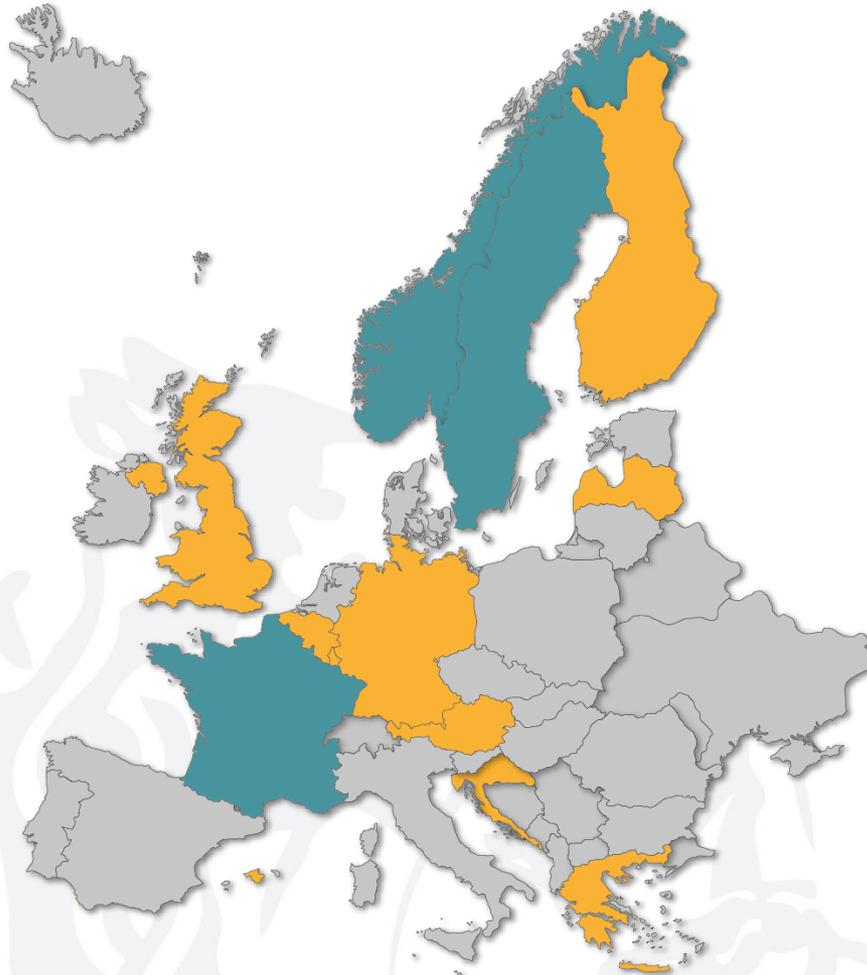


UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

\*As of April 1, 2015  
RV = rotavirus vaccine



# ■ Vaccinazione anti-rotavirus: situazione europea



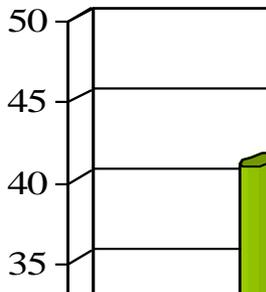
## ■ Paesi con vaccinazione universale di massa già avviata

- Belgio (2006) <sup>(1)</sup>
- Lussemburgo
- Austria (2007) <sup>(2)</sup>
- Finlandia (2009) <sup>(3)</sup>
- Grecia (2011, in co-pagamento) <sup>(4)</sup>
- Regno Unito (2013) <sup>(5)</sup>
- Lettonia (2013)
- Croazia (2011, per alcuni gruppi a rischio) <sup>(6)</sup>
- Germania (2012) <sup>(7)</sup>

## ■ Paesi che stanno valutando l'inserimento della vaccinazione universale di massa

- Francia <sup>(8)</sup>
- Norvegia
- Stoccolma – pilota per Svezia (2013)

Annual prevalence



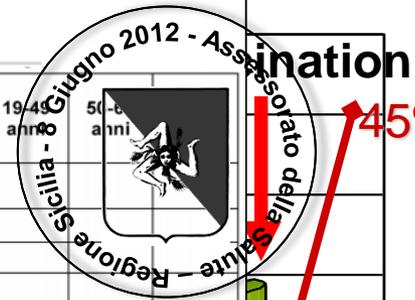
REPUBBLICA ITALIANA

Anno 66° - Numero 23

# GAZZETTA UFFICIALE

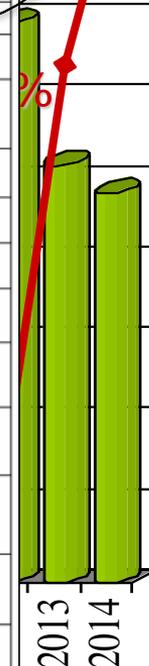
DELLA REGIONE SICILIANA

Vaccino	Nascita	3° mese <sup>1</sup> (dal 61° giorno)	5° mese	6° mese	11°-12° mese	13°-15° mese	5 - 6 anni	12° anno	14°-15° anno	19-45 anni	50-60 anni
DTP		DTP	DTP		DTP						
IPV		IPV	IPV		IPV						
HBV	HBV <sup>2</sup>	HBV	HBV		HBV						
Hib		Hib	Hib		Hib						
PCV13		PCV13	PCV13		PCV13						
Anti-Rotavirus		Rotavirus <sup>3</sup>									
MenC <sup>6</sup> coniugato						MenC			MenC		
MPR <sup>4***</sup>						MPR + Var	MPR + Var				
Anti-Varicella <sup>4</sup>								Var <sup>10</sup>			
dTp										dTp <sup>8</sup>	
DTP**** + IPV							DTP <sup>5</sup> + IPV/ DTpIPV				
dTp**** + IPV									dTp <sup>5</sup> + IPV/ dTpIPV		
Meningo ACW135Y coniugato									Men ACW135Y <sup>***</sup>		
HPV <sup>9</sup>								HPV	fino a 45 anni		
Anti-Influenzale								Influenza			
Anti-Pneumococco								PPV23		PCV13 / PPV23	PCV13 / PPV23



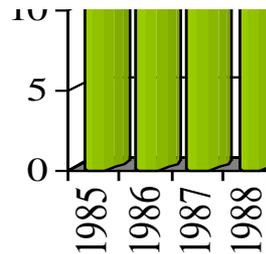
inazione

45%



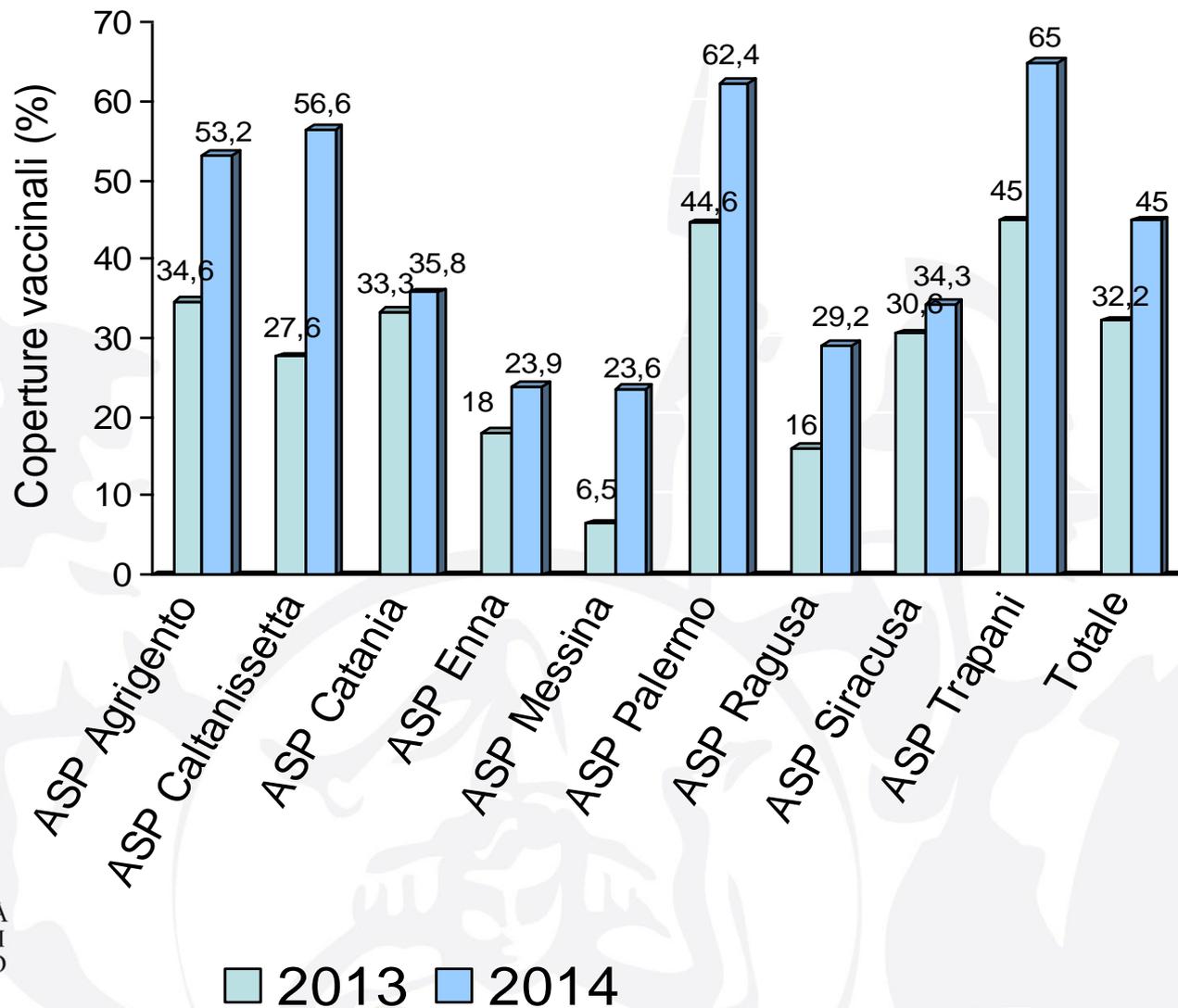
GAZZETTA UFFICIALE DELLA REGIONE SICILIANA

PARTE PRIMA



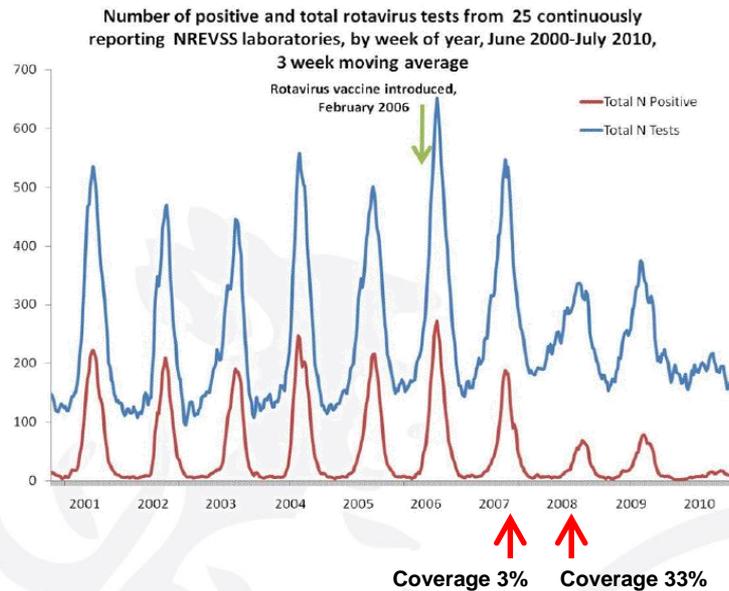
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

# Coperture vaccinali rota in Sicilia

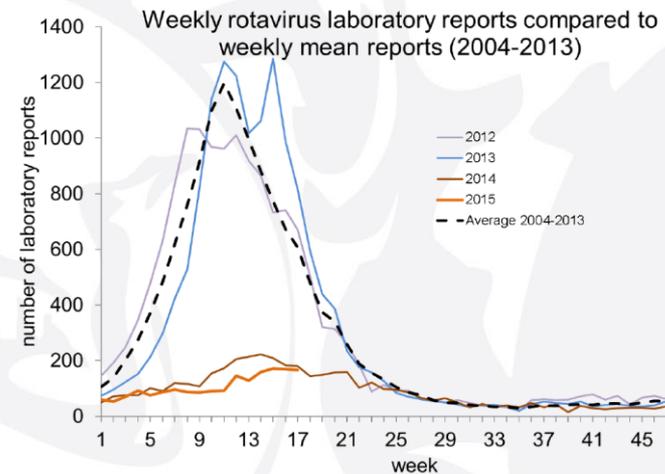
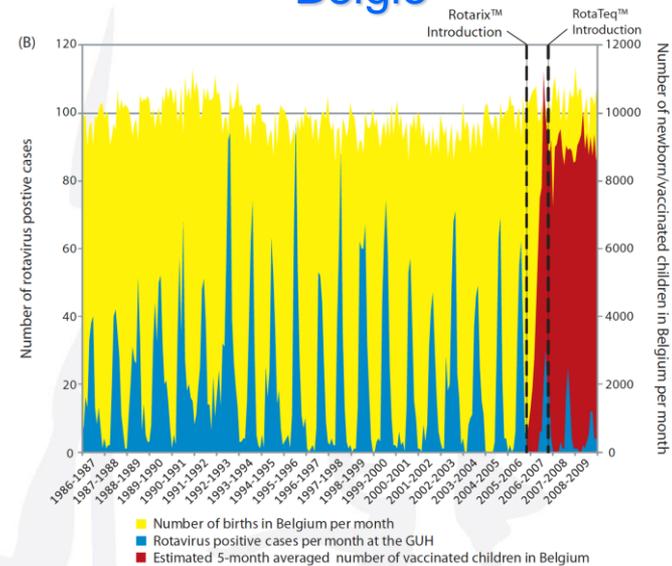


# Impatto della vaccinazione

## USA



## Belgio



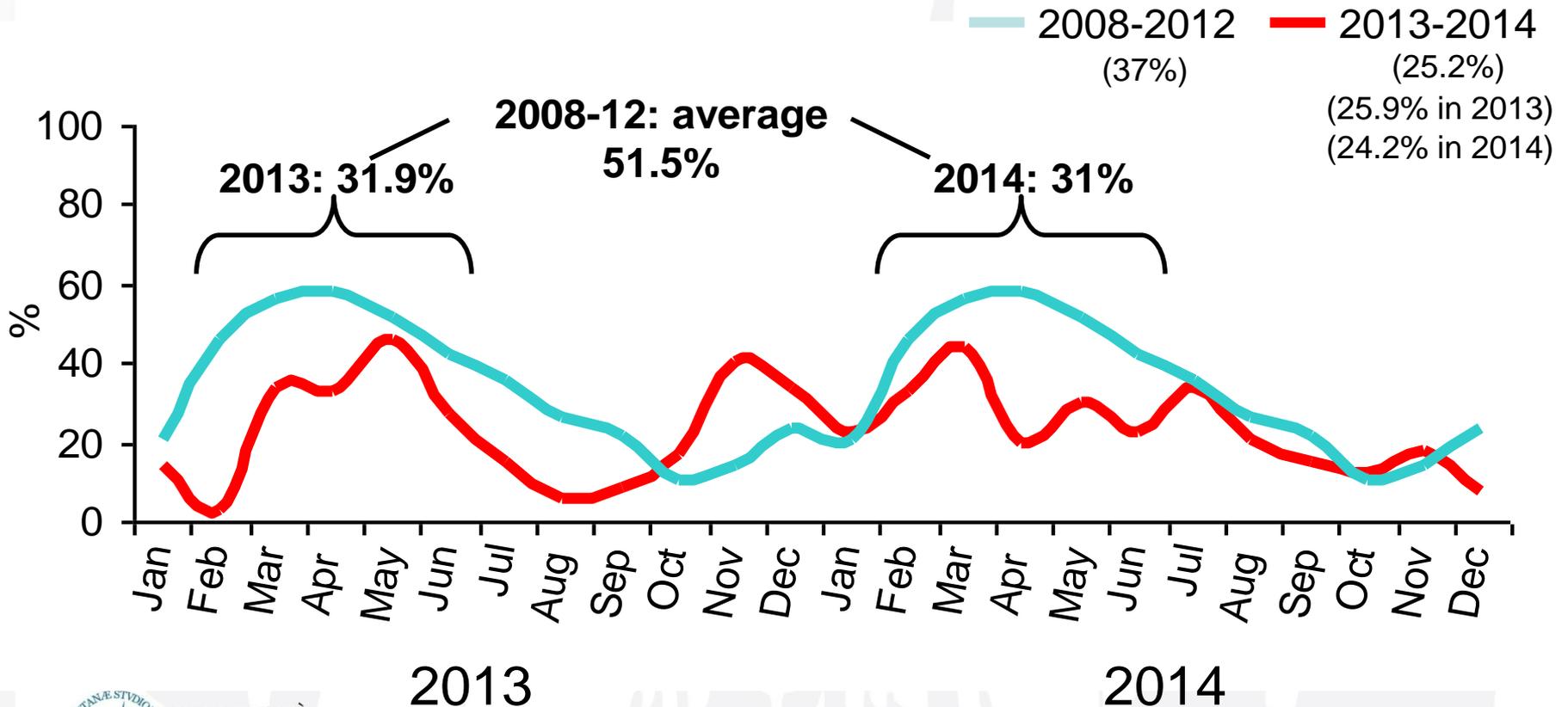
UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

UK

# Effectiveness of anti-RV vaccination

## Laboratory data - Palermo

Annual prevalence of HRV infections in children (up to 5 years) hospitalized for acute enteritis in Palermo

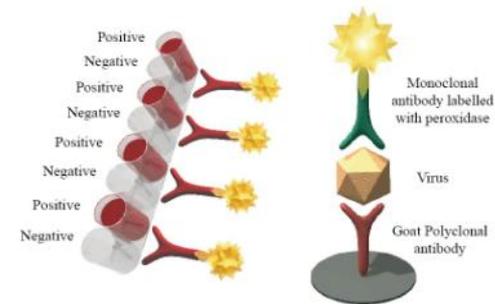


# Diagnosi di laboratorio

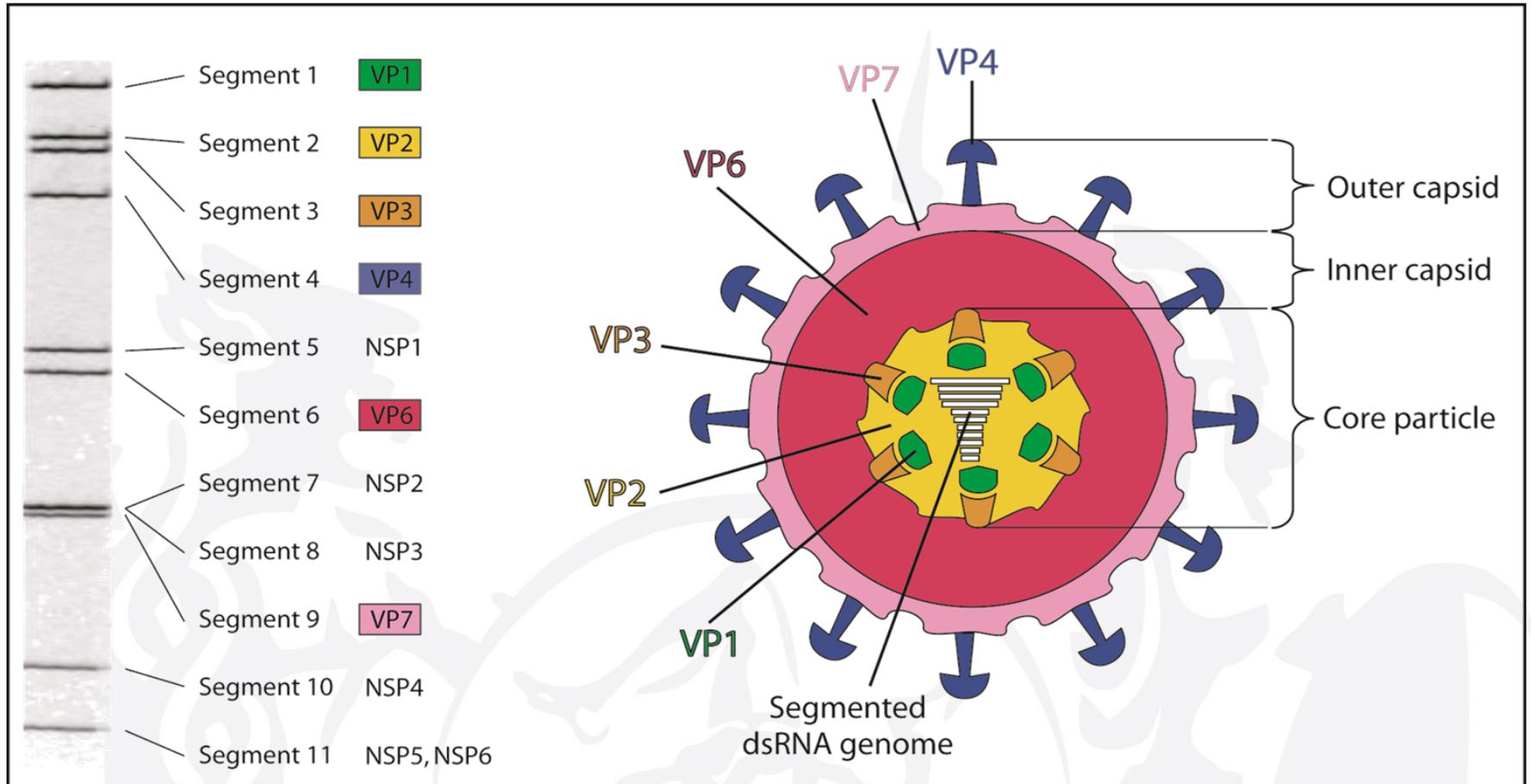
## Ricerca di antigeni virali nelle feci:

Generalmente VP6 (condivisa da tutti i Rotavirus di Gruppo A)

- Test ELISA in micropiastra
- Test immunocromatografici (spesso combinati: Rota+Adeno)
- Agglutinazione al latex



# Rotavirus Particle





# Principali ceppi di HRV circolanti nei paesi industrializzati



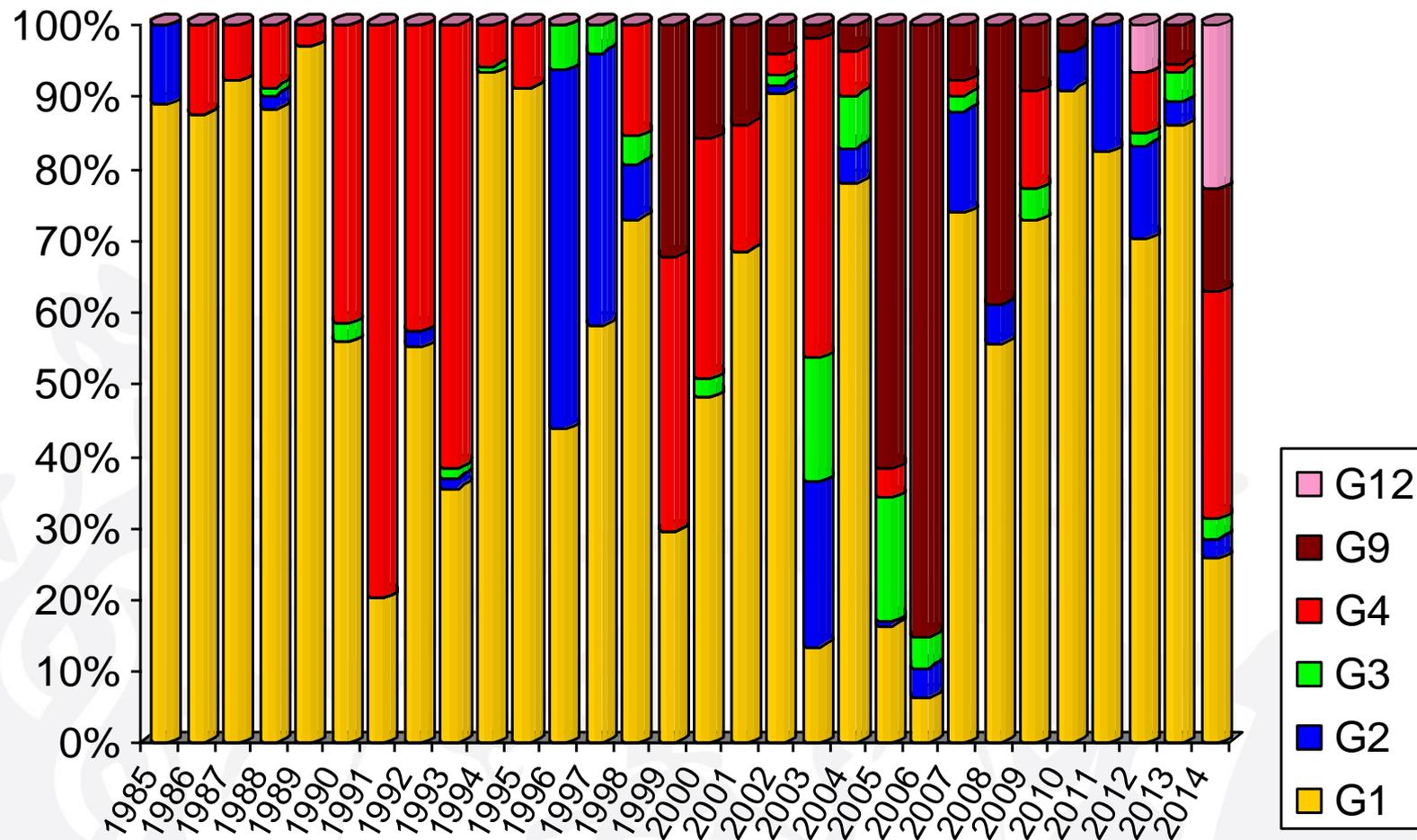
# RV genotypes in Europe, 2006-13

RV Genotype	Season								Total
	2006/2007	2007/2008	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013	No date	
G1P[8]	46.94	56.58	47.85	45.33	54.99	40.93	41.16	43.14	47.95
G4P[8]	8.14	16.22	23.14	16.88	12.59	11.98	8.64	9.71	14.57
G2P[4]	16.73	9.34	10.11	15.47	11.44	16.19	19.01	22.29	13.74
G9P[8]	22.10	11.25	8.50	10.52	8.41	14.41	15.01	14.14	12.07
G3P[8]	3.26	4.04	5.97	7.63	7.55	7.80	10.77	7.43	6.83
G12P[8]	0.61	0.57	0.72	0.64	3.45	7.13	3.58	1.71	2.48
G2P[8]	0.61	0.57	0.33	0.14	0.18	0.53	0.62	0.14	0.40
G1P[4]	0.32	0.37	0.24	0.43	0.43	0.30	0.24	0.14	0.33
G8P[4]	<0.01	0.04	0.87	1.01	0.07	0.01	<0.01	0.14	0.32
G9P[4]	0.12	0.20	0.24	0.43	0.24	0.09	0.15	0.14	0.22
G12P[6]	0.03	0.05	0.57	0.17	0.13	0.04	0.09	0.14	0.16
G4P[4]	0.03	0.07	0.28	0.10	0.03	0.14	0.04	<0.01	0.11
G3P[4]	0.03	0.01	0.07	0.29	0.06	0.04	0.02	0.14	0.08
G10P[8]	<0.01	0.07	0.21	0.13	0.03	0.01	<0.01	<0.01	0.07
G2P[6]	0.14	0.21	0.04	0.08	<0.01	<0.01	0.02	0.14	0.07
G6P[9]	0.12	0.04	0.01	0.14	<0.01	0.04	0.13	<0.01	0.06
G3P[6]	<0.01	<0.01	0.25	0.08	<0.01	<0.01	0.04	0.14	0.06

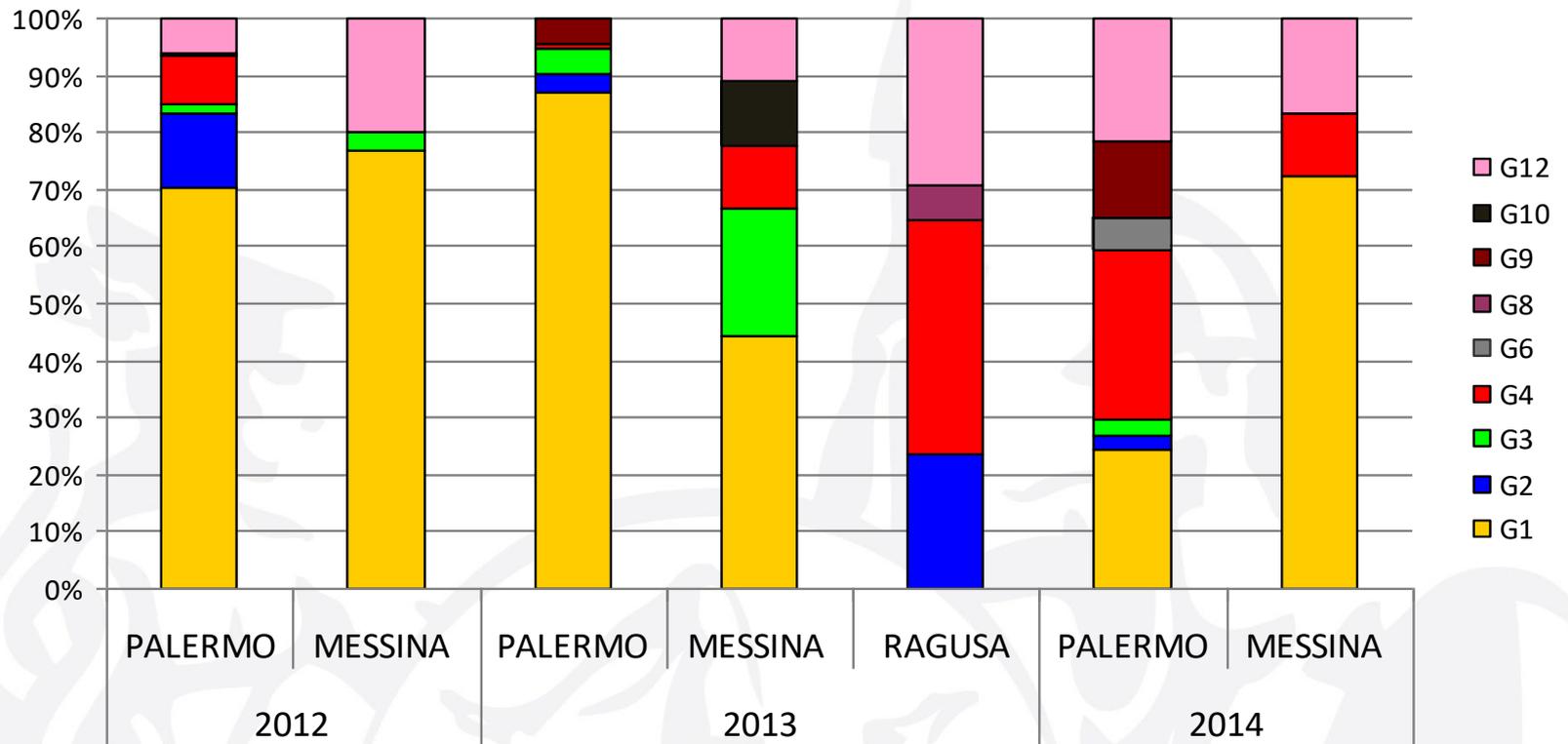
**b) Percentage of each genotype by season. Strains with a prevalence  $\geq 1\%$  are highlighted. (denominator excludes mixed and partially typed strains).**



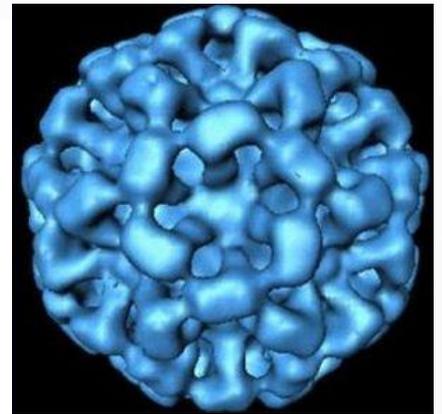
# Percent distribution of the six main HRV G-types in Palermo from 1985 to 2014



# Percent distribution of HRV G-types in Palermo, Messina and Ragusa from 2012 to 2014



# Norovirus

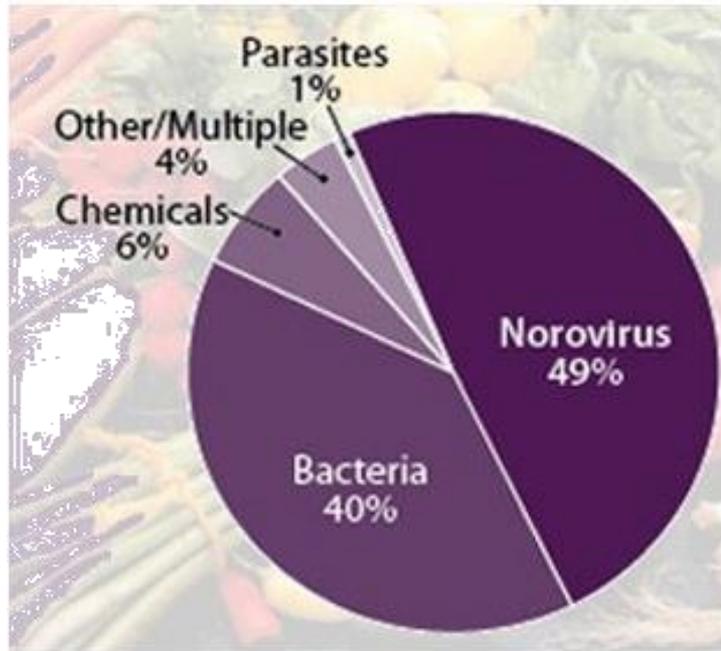


- I Norovirus (noti in precedenza come virus Norwalk-like) appartengono alla famiglia Caliciviridae.
- L'infezione da calicivirus è spesso trasmessa col veicolo alimentare, pur non essendo sempre imputabile al consumo di alimenti.
- La gastroenterite da Norovirus è anche chiamata “influenza dello stomaco”, pur non essendo questo virus connesso all'influenza.

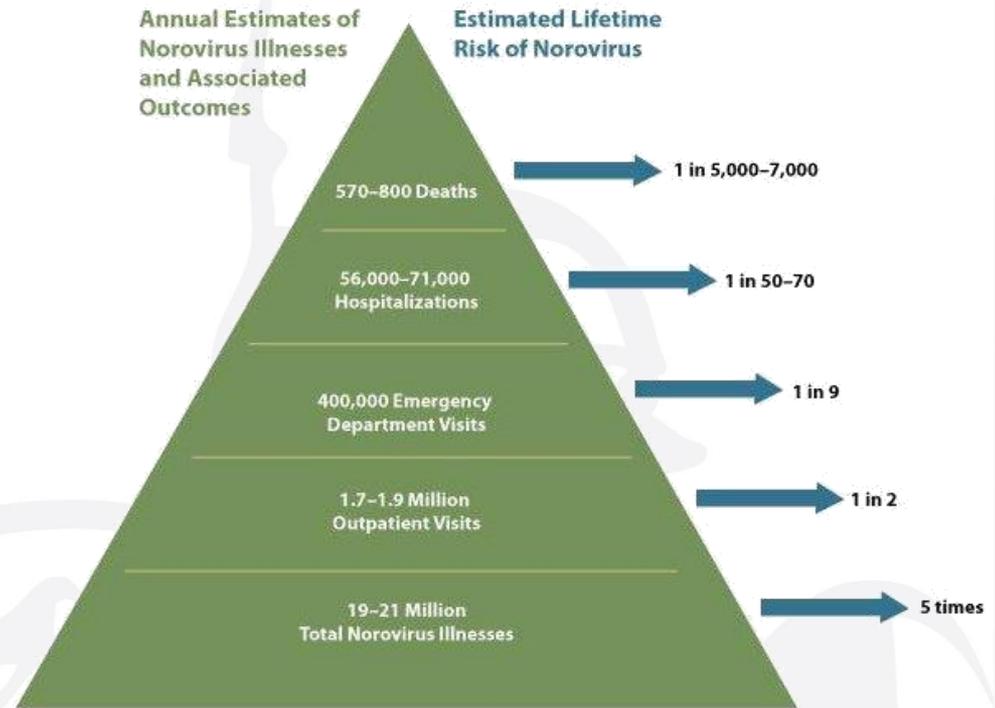


# Epidemie di gastroenterite da Norovirus

Cause di gastroenterite epidemica



(CDC, 2011)



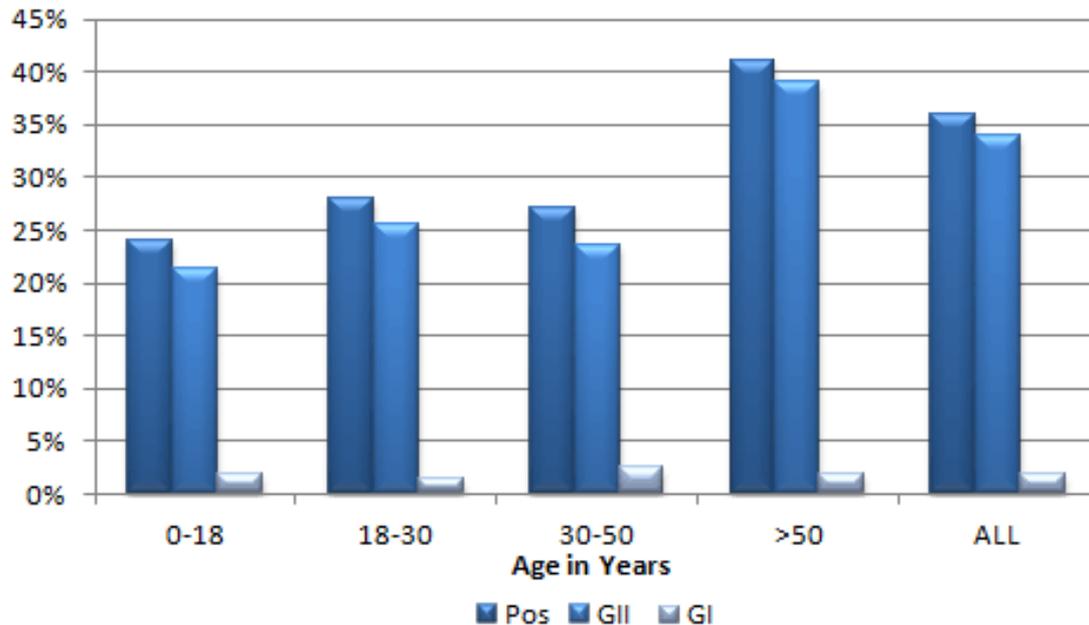
Burden of Norovirus in the United States



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

# Norovirus positivity by age group

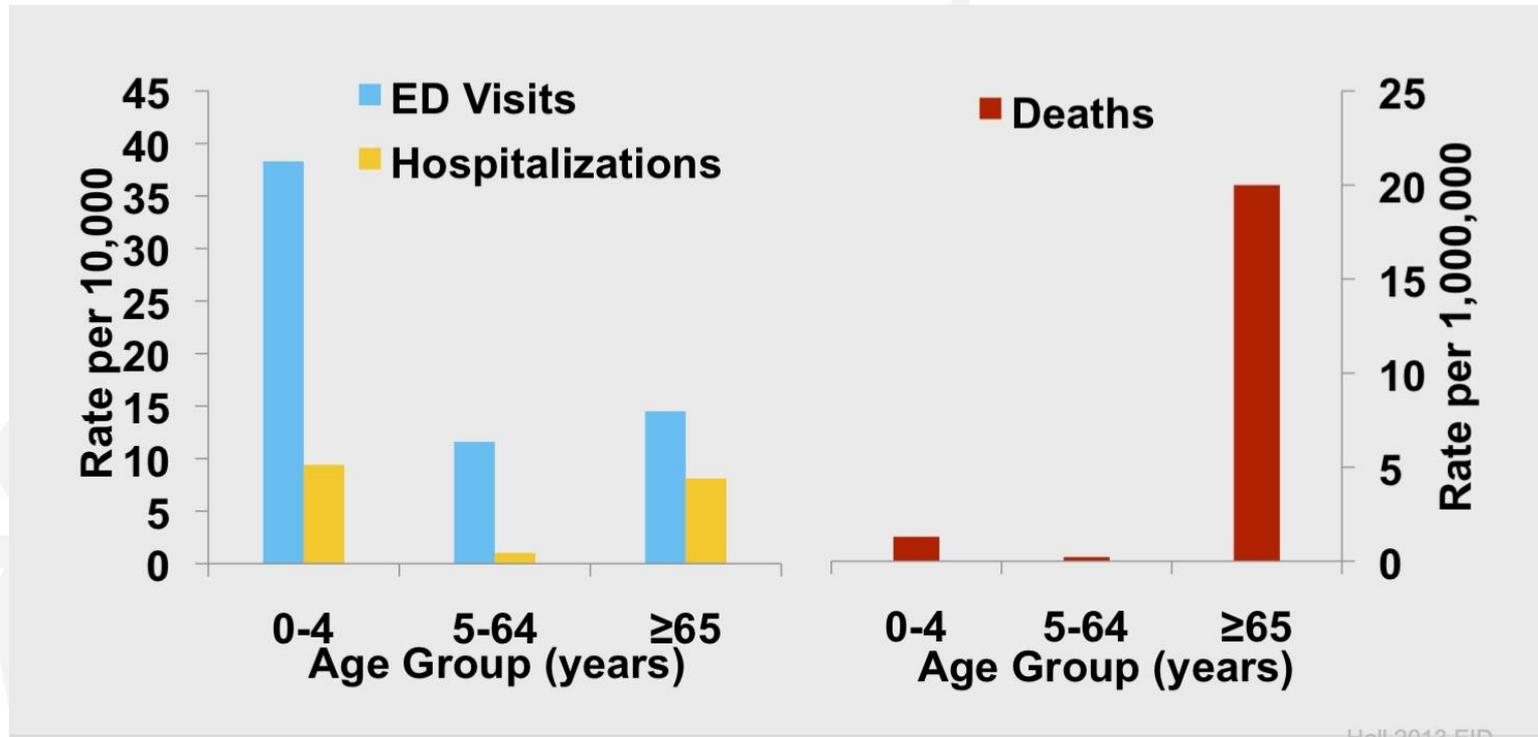
## Norovirus Positivity in Various Age Groups



**Figure 2.** Norovirus positivity rate (%) and genogroup in various age groups.

©2011 Laboratory Corporation of America® Holdings. All Rights Reserved.  LabCorp  
Laboratory Corporation of America

# Severe Norovirus-associated Disease Rates by Age Group



Hall 2013 EID



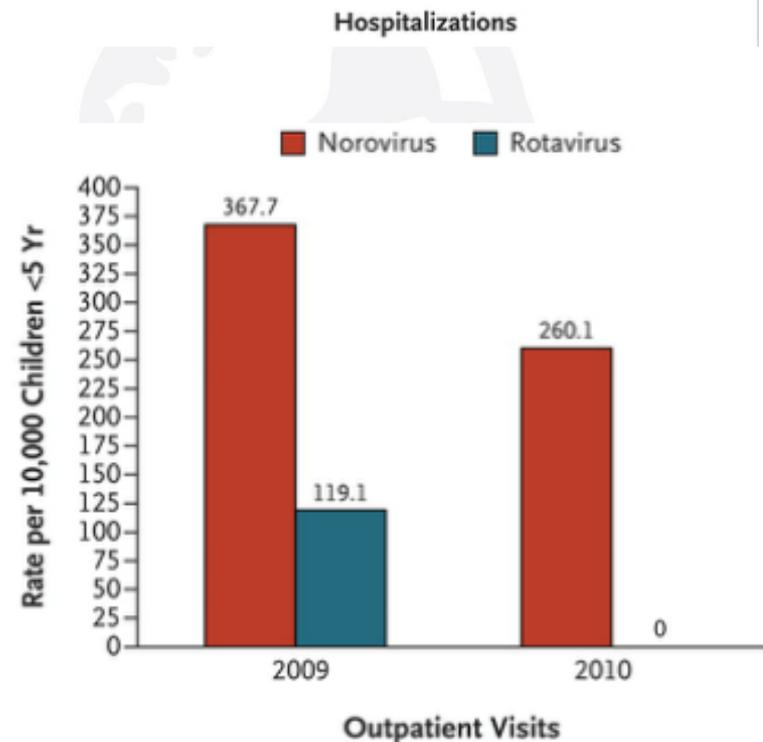
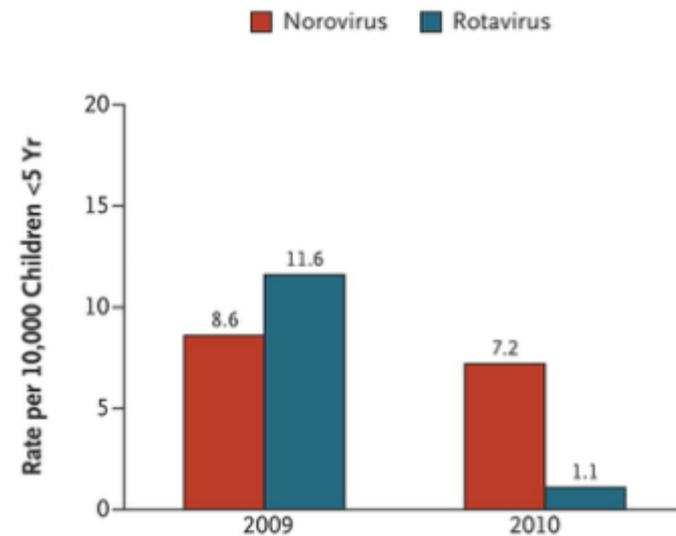
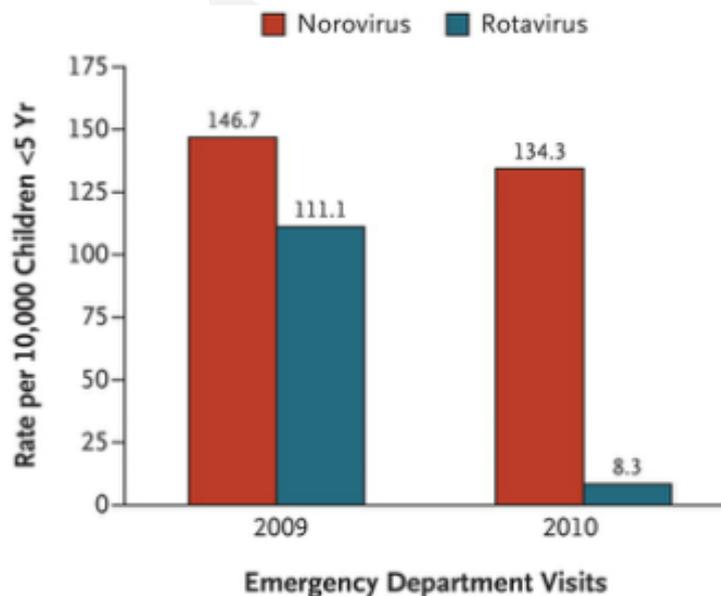


SPECIAL ARTICLE

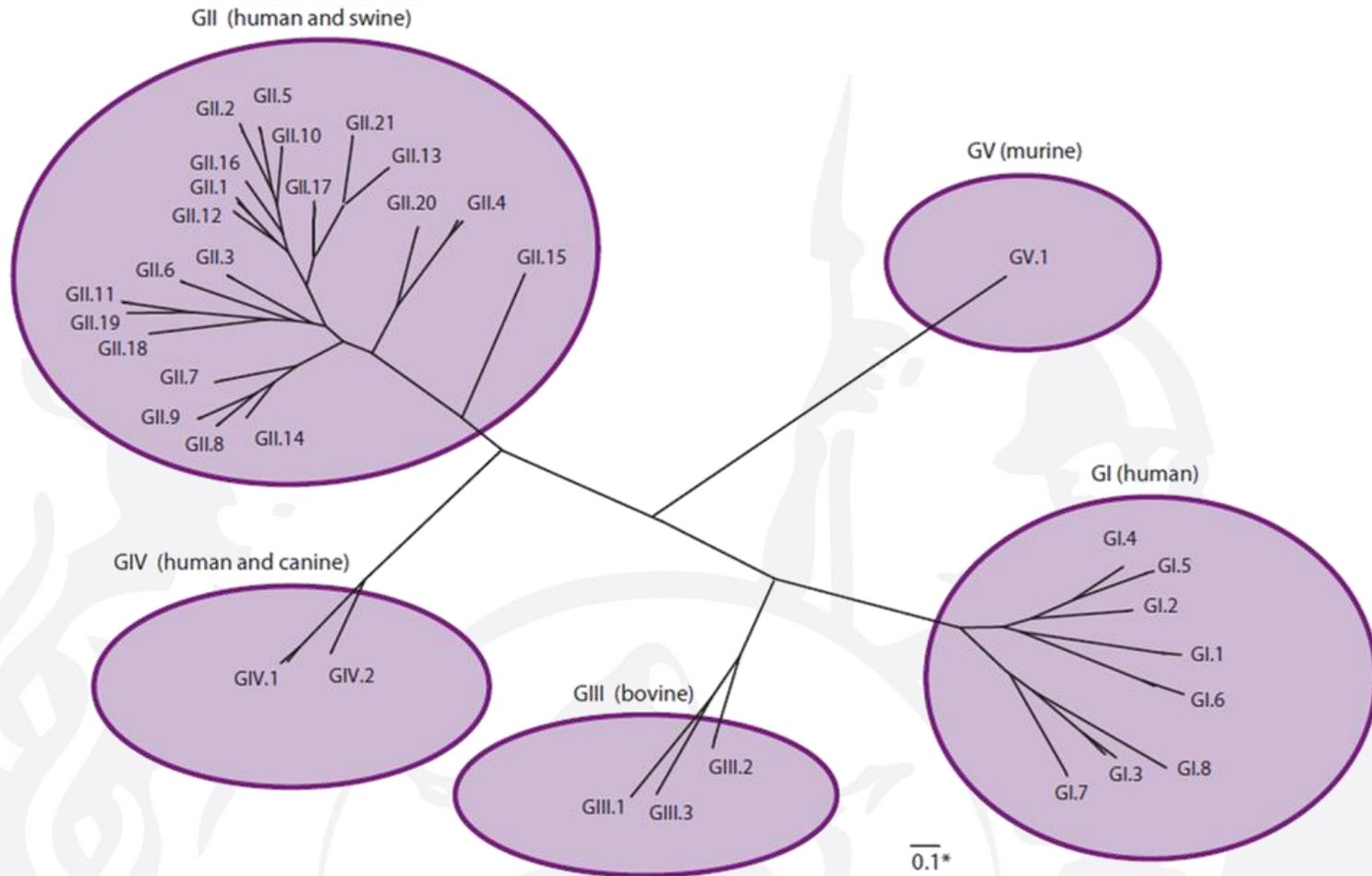
## Norovirus and Medically Attended Gastroenteritis in U.S. Children

Daniel C. Payne, Ph.D., M.S.P.H., Jan Vinjé, Ph.D., Peter G. Szilagyi, M.D., M.P.H., Kathryn M. Edwards, M. Allen Staat, M.D., M.P.H., Geoffrey A. Weinberg, M.D., Caroline B. Hall, M.D., James Chappell, M.D., Ph.D., Bernstein, M.D., Aaron T. Curns, M.P.H., Mary Wikswa, M.P.H., S. Hannah Shirley, B.S., Aron J. Hall, D.V.M Benjamin Lopman, Ph.D., M.P.H., and Umesh D. Parashar, M.B., B.S., M.P.H.

N Engl J Med 2013; 368:1121-1130 | March 21, 2013 | DOI: 10.1056/NEJMs1206589



# Classificazione dei Norovirus



# Genotipo GII.4

Genotype Distribution of  
Norovirus Outbreaks  
September 2014 - August 2015 (n=874)

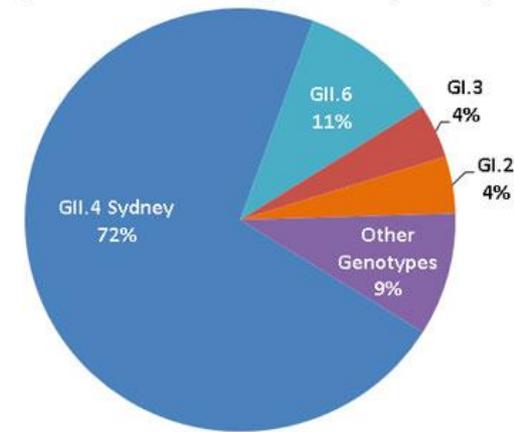


TABLE. Emergent norovirus variants of genogroup II type 4 (GII.4), including those associated with outbreaks — United States

Emergent GII.4 variant	Yrs of circulation	Epidemic Season
95/96-US	1995–2002	1995–1996
Farmington Hills	2002–2005	2002–2003
Hunter	2003–2006	None
Yerseke	2006–2008	2006–2007
Den Haag	2006–present	2006–2007
New Orleans	2009–present	None*

Sources: Zheng DP, Widdowson MA, Glass RI, Vinje J. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006; J Clin Microbiol 2010;48:168–77; CDC, unpublished data, 2010.

\*On the basis of data available as of September 2010, the New Orleans GII.4 variant has not been associated with an increased number of norovirus outbreaks in the United States.

A. Kroneman et al.

Eurosurveillance

Impact Factor **6.15**

Eurosurveillance, Volume 18, Issue 1, 03 January 2013

Rapid communications

## INDICATIONS FOR WORLDWIDE INCREASED NOROVIRUS ACTIVITY ASSOCIATED WITH EMERGENCE OF A NEW VARIANT OF GENOTYPE II.4, LATE 2012

J van Beek ([janko.van.beek@rivm.nl](mailto:janko.van.beek@rivm.nl)),<sup>1</sup> K Ambert-Balay<sup>2</sup>, N Botteldoorn<sup>3</sup>, J S Eden<sup>4</sup>, J Fonager<sup>5</sup>, J Hewitt<sup>6</sup>, N Iritani<sup>7</sup>, A Kroneman<sup>1</sup>, H Vennema<sup>1</sup>, J Vinje<sup>8</sup>, P A White<sup>4</sup>, M Koopmans<sup>1</sup>, on behalf of NoroNet<sup>9</sup>



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

Table 3 Proposed epidemic norovirus GII.4 variants

Proposed epidemic variant name	GenBank no. <sup>1</sup>
US95_96	AJ004864 <sup>2</sup>
Farmington_Hills_2002	AY485642 <sup>3</sup>
Asia_2003	AB220921 <sup>3</sup>
Hunter_2004	AY883096 <sup>2</sup>
Yerseke_2006a	EF126963 <sup>2</sup>
Den Haag_2006b	EF126965 <sup>2</sup>
NewOrleans_2009	GU445325 <sup>3</sup>
Sydney_2012	JX459908 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> GenBank accession number of the first submitted capsid sequence of this variant

<sup>2</sup> Capsid sequence

<sup>3</sup> Complete genome

# Norovirus GII.4/Sydney/2012 in Italy, Winter 2012–2013

Giovanni M. Giammanco,  
Simona De Grazia,  
Fabio Tummolo,  
Floriana Bonura,  
Adriana Calderaro,  
Alessio Buonavoglia,  
Vito Martella, and  
Maria C. Medici

Author affiliations: Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italy (G.M. Giammanco, S. De Grazia, F. Bonura); Università degli Studi di Parma, Parma, Italy (F. Tummolo, A. Calderaro, M.C. Medici); Medical Practitioner, Bari, Italy (A. Buonavoglia); and Università Aldo Moro di Bari, Valenzano, Italy (V. Martella)

countries in late 2012 has been related to the emergence of a novel GII.4 variant, Sydney 2012. This variant was first identified in March 2012 in Australia (5).

The Italian Study Group for Enteric Viruses (ISGEV; <http://isgev.net>) monitors the epidemiology of enteric viruses in children through hospital-based surveillance (6–8). NoVs are monitored and characterized by multi-

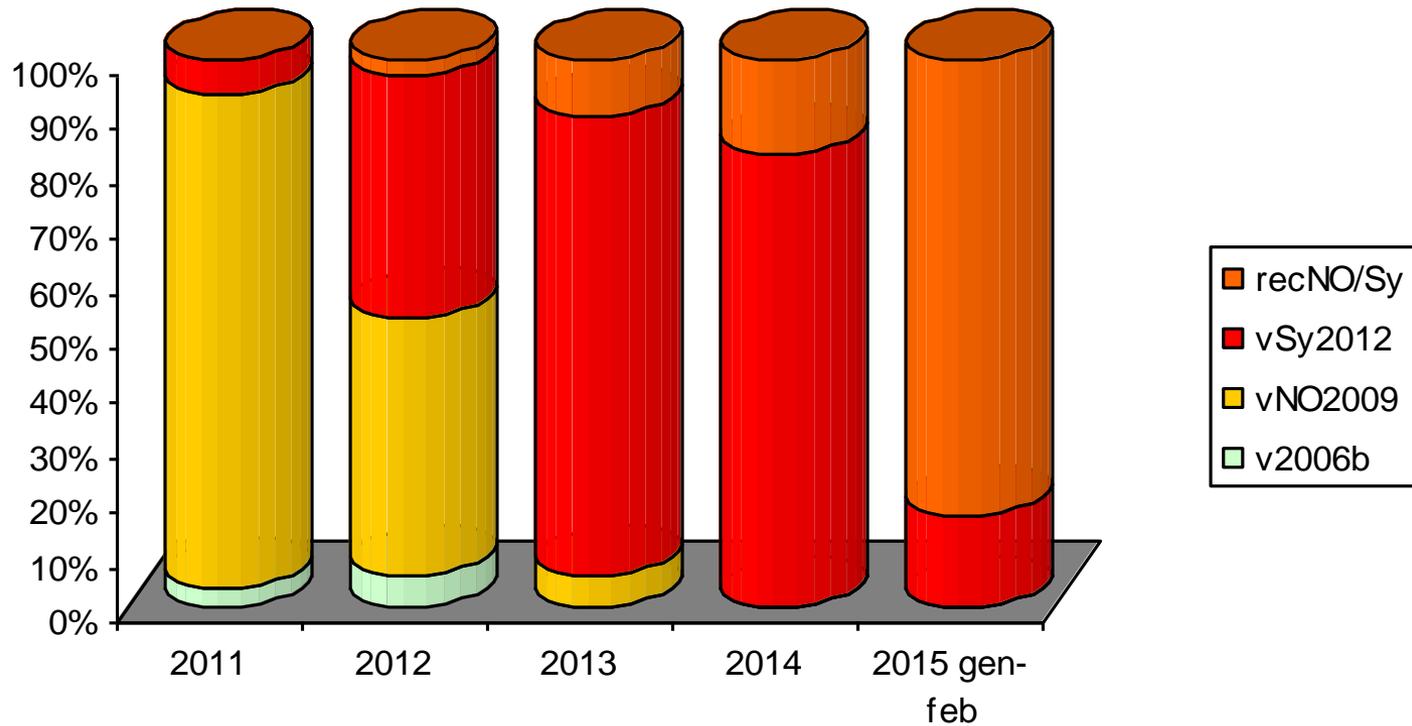
of 2012 with a marked increase in the prevalence only by the end of 2012 (10). Our surveillance detected the emergence of this variant in Italy at the end of 2011 and provided us with one of the earliest strains of the variant GII.4 Sydney 2012. This novel variant has a common ancestor with the

Emerging Infectious Diseases • [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid) • Vol. 19, No. 8, August 2013



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

# Varianti del genotipo GI.4 a Palermo



**ISGEV**

Italian Study Group for Enteric Viruses

<http://isgev.net/>

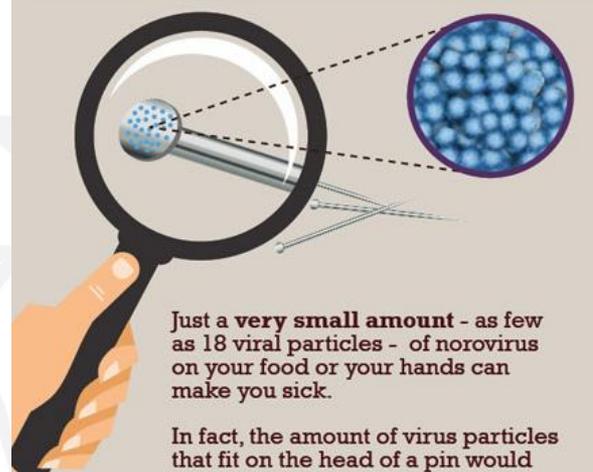


UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

# Caratteristiche dei Norovirus che ne facilitano la trasmissione

Bassa carica infettante	<10 <sup>2</sup> particelle virali	Possibile trasmissione secondaria per aerosol o per contagio diretto
Stato di portatore asintomatico prolungato	Fino a 2 settimane	Elevato e prolungato rischio di infezione secondaria, problemi nel controllo degli alimentaristi
Stabilità ambientale	Resiste a 10ppm di cloro, stabile dopo congelamento ed a 60°C	Difficile da eliminare nell'acqua contaminata, persiste nel ghiaccio e nei cibi poco cotti (mitili)
Grande variabilità fra i ceppi	Diversi tipi antigenici e genotipi	Difficoltà diagnostiche
Mancanza di immunità duratura	Infezioni sintomatiche ripetute	L'esposizione nell'infanzia non protegge in età adulta
Serbatoio	Non solo l'uomo	Recentemente descritti virus animali correlati

**How contagious is norovirus?**



Just a **very small amount** - as few as 18 viral particles - of norovirus on your food or your hands can make you sick.

In fact, the amount of virus particles that fit on the head of a pin would be enough to infect **more than 1,000 people!**

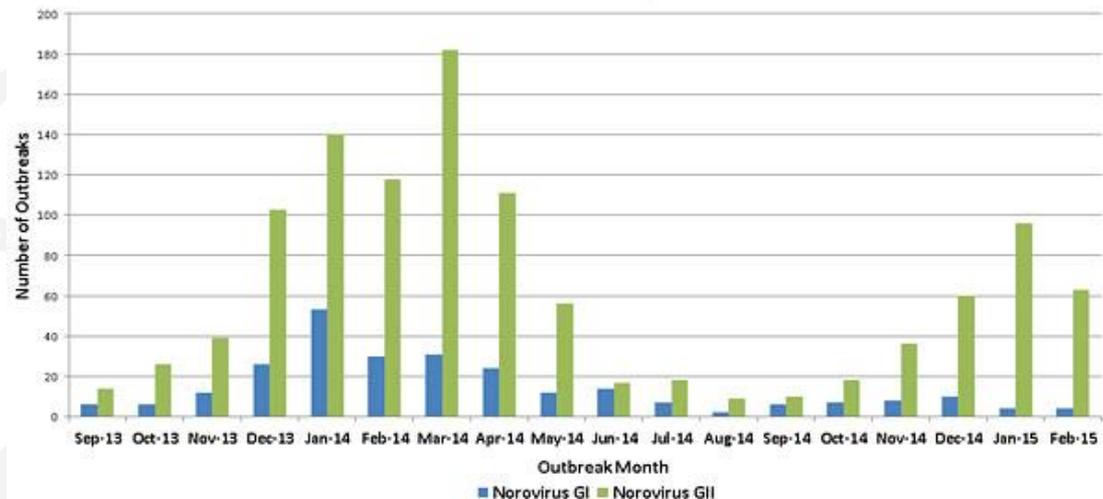
Source: Journal of Medical Virology, August, 2008

# Dove si trovano i norovirus

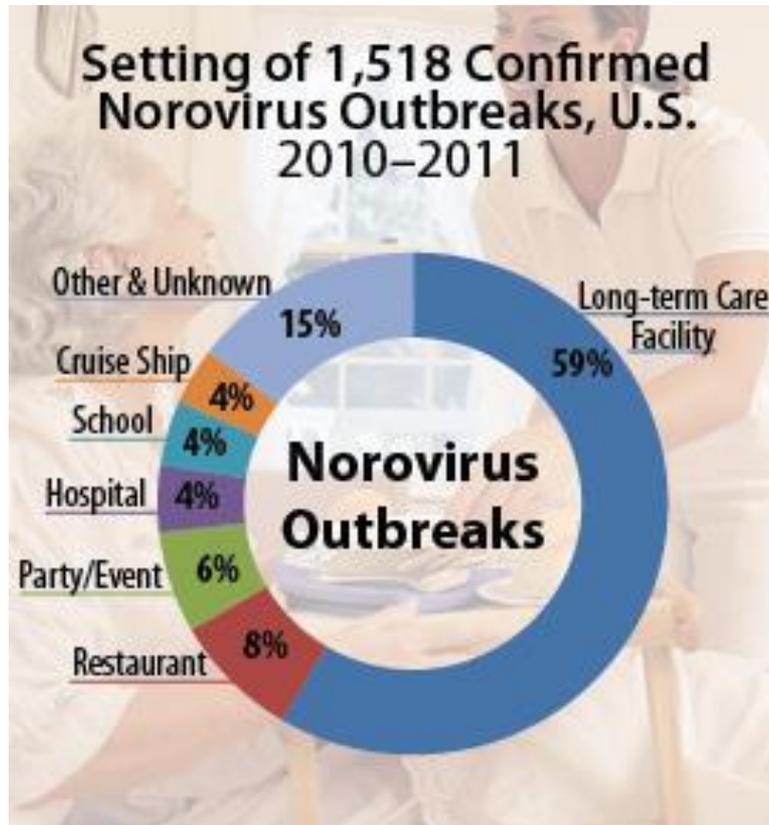
- I Norovirus si trovano nelle feci o nel vomito di persone infette e su superfici che sono state contaminate da persone malate. I focolai epidemici si verificano più spesso quando gruppi numerosi convivono in un'area ristretta, come case di cura, ristoranti, eventi organizzati e a bordo di navi da crociera.

NoV Stagionalità

**Confirmed Norovirus Outbreaks  
Submitted to CaliciNet, by Genogroup  
September 2013 – February 2015 (n=1378)**



# Outbreak settings



**ABOUT JIM WALKER**  
 Jim Walker is a nationally recognized attorney involved in admiralty and maritime personal injury law. He has been involved in MORE...

A headline in the norovirus mightier hits "Cruise Ships Causing Norovirus Outbreaks in Ports?" - indicating that norovirus is "often associated with cruise ship sickness." The article also raises the question whether cruise ships can infect the local port communities.

The cruise industry's PR people have been fighting the connection between norovirus and "cruise ship sickness" for many years.

ABOUT JIM WALKER SERVICES CONTACT ARCHIVES

Cause Norovirus Outbreaks in Ports?

Cause Norovirus Outbreaks in Ports?

Email This Print Comments Trackbacks Share Link

2015

Cruise Line	Cruise Ship	Sailing Dates	Causative Agent
Princess Cruises	<i>Star Princess</i>	<a href="#">4/29 - 5/14</a>	Norovirus
Oceania Cruises	<i>Oceania Marina</i>	<a href="#">4/21 - 5/7</a>	Norovirus
Holland America Line	<i>ms Maasdam</i>	<a href="#">4/17 - 5/1</a>	Norovirus
Princess Cruises	<i>Coral Princess</i>	<a href="#">4/12 - 4/27</a>	Norovirus
Royal Caribbean Cruise Line	<i>Legend of the Seas</i>	<a href="#">3/30 - 4/14</a>	Norovirus
Celebrity Cruises	<i>Celebrity Infinity</i>	<a href="#">3/29 - 4/13</a>	Norovirus
Norwegian Cruise Line	<i>Norwegian Pearl</i>	<a href="#">3/26 - 4/6</a>	Norovirus
Celebrity Cruises	<i>Celebrity Equinox</i>	<a href="#">2/13 - 2/23</a>	Norovirus
Royal Caribbean Cruise Line	<i>Grandeur of the Seas</i>	<a href="#">1/24 - 2/3</a>	Norovirus

2014

Cruise Line	Cruise Ship	Sailing Dates	Causative Agent
Princess Cruises	<i>Crown Princess</i>	<a href="#">10/18 - 11/16</a>	Norovirus
Princess Cruises	<i>Crown Princess</i>	<a href="#">4/5 - 4/12</a>	Norovirus and Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC)
Royal Caribbean Cruise Line	<i>Grandeur of the Seas</i>	<a href="#">4/5 - 4/12</a>	Norovirus
Royal Caribbean Cruise Line	<i>Grandeur of the Seas</i>	<a href="#">3/28 - 4/5</a>	Norovirus

CDC Vessel Sanitation Program



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

# Epidemia waterborne



## Investigation and control of a Norovirus outbreak of probable waterborne transmission through a municipal groundwater system

Giovanni M. Giammanco, Ilaria Di Bartolo, Giuseppa Purpari, Claudio Costantino, Valentina Rotolo, Vittorio Spoto, Gaetano Geraci, Girolama Bosco, Agata Petralia, Annalisa Guercio, Giusi Macaluso, Giuseppe Calamusa, Simona De Grazia, Franco M. Ruggeri, Francesco Vitale, Carmelo M. Maida and Caterina Mammina

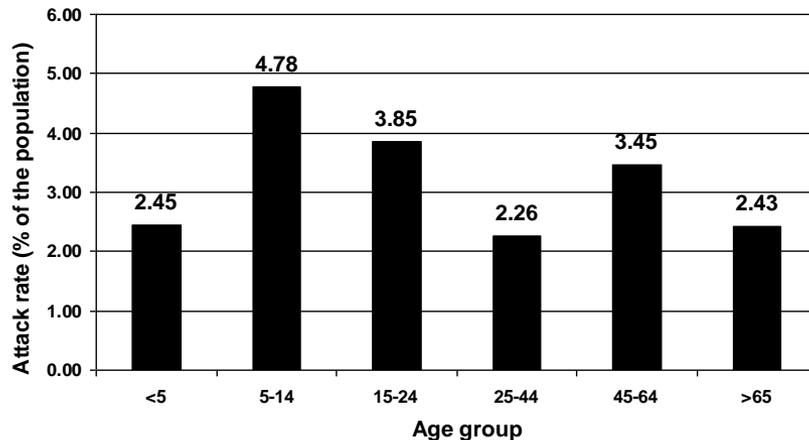
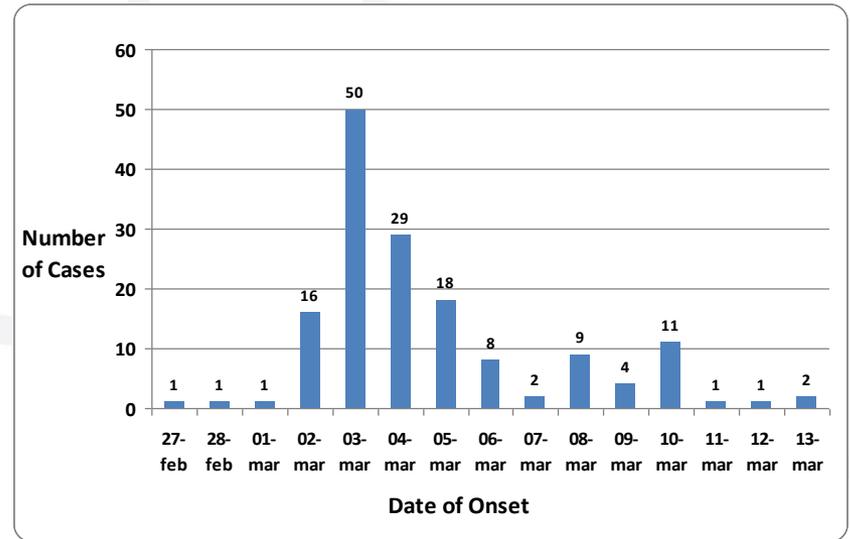


Figure 2: Attack rate of NoV gastroenteritis (n=151 cases) by age group. Outbreak in Santo Stefano di Quisquina (Agrigento, Italy), 27<sup>th</sup> February 2011-13<sup>th</sup> March 2011.



Probable cases of norovirus gastroenteritis, by date of onset of symptoms, Santo Stefano di Quisquina, Agrigento, Italy, 27 February 2011- 13 March 2011 (n=155)

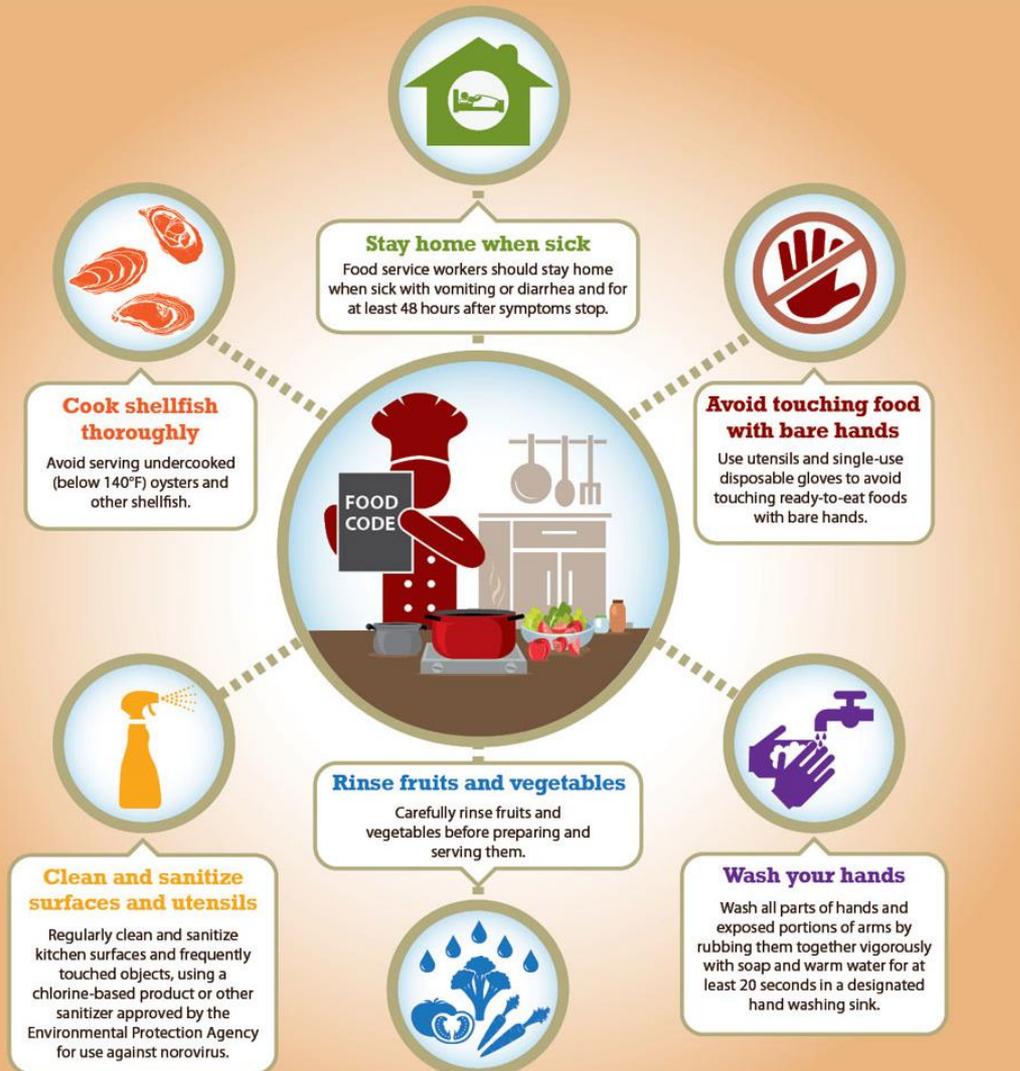






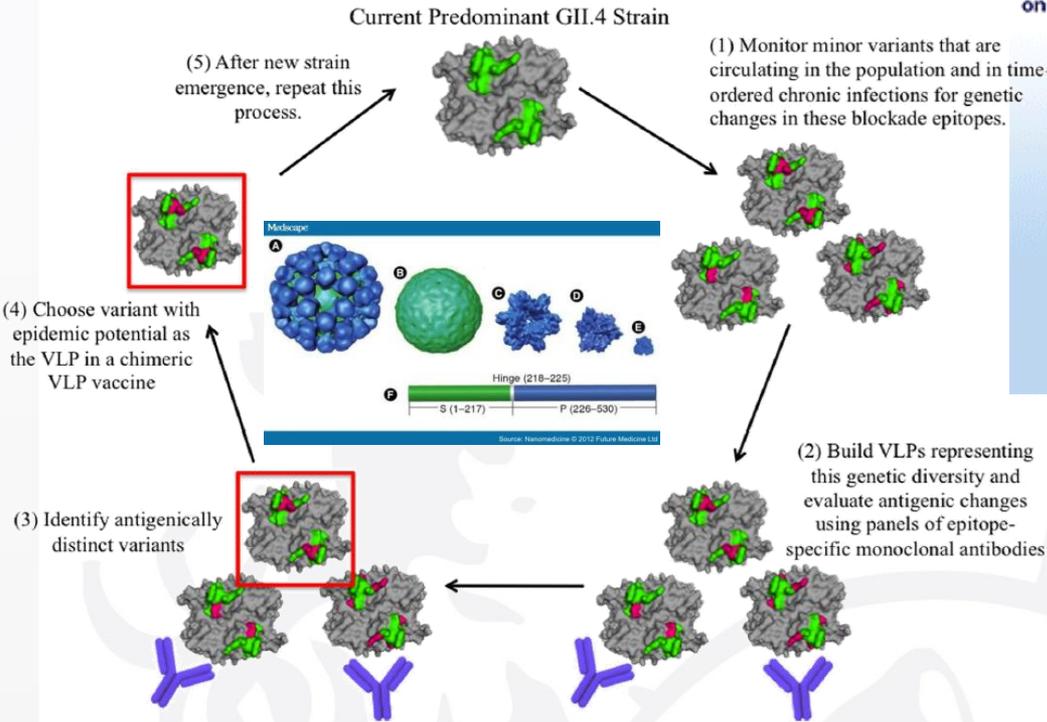
# Prevenzione

**Kitchen managers** should be trained and certified in food safety and ensure that **all food service workers follow food safety practices** outlined in the **FDA model Food Code and CDC guidelines**.

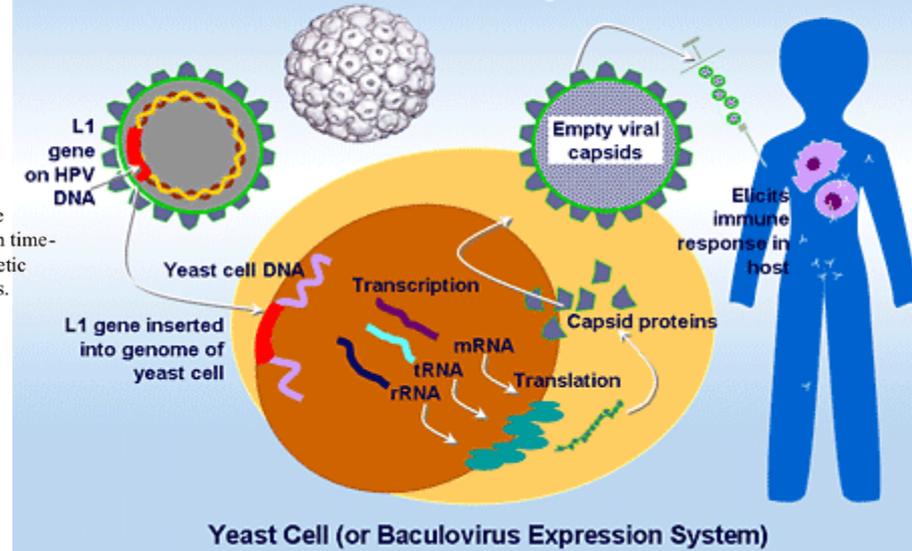


UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

# Making a Norovirus Vaccine a Reality



## HPV L1 VLP Vaccine Synthesis





**Università degli Studi di Palermo**  
**Dipartimento di Scienze per la Promozione della Salute**  
**e Materno Infantile “G. D’Alessandro”**

Giovanni Giammanco  
Simona De Grazia  
Floriana Bonura  
Laura Saporito



Francesca Di Bernardo  
Piera Dones  
Antonella Collura  
Diane M. Terranova



Antonio Cascio  
Mariella Valenzise



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

Le gastroenteriti virali: diagnosi di laboratorio e tipizzazione molecolare.  
G.M. GIAMMANCO

*Ragusa*  
*25/09/2015*