

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

FACOLTÀ DI AGRARIA

**DOTTORATO DI RICERCA
IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI
XXI CICLO**

**“INDAGINE SUI PROCESSI DI DISINFEZIONE NELL’INDUSTRIA
ALIMENTARE CON PARTICOLARE RIGUARDO ALLA
INATTIVAZIONE VIRALE E NUOVI METODI PER LA RICERCA DI
VIRUS IN ALIMENTI”**

Coordinatore e Relatore:
Chiar.mo Prof. G. Sansebastiano

Dottoranda
Roberta Zanelli

Anno accademico 2007-2008

INDICE

1.1 INTRODUZIONE	pag. 3
1.2 I VIRUS E GLI ALIMENTI	pag. 4
1.3 LA NORMATIVA	pag. 8
1.4 EPIDEMIOLOGIA	pag. 9
1.5.IMPORTANZA DELLE INFEZIONI DA NOROVIRUS	pag 12
1.6. SICUREZZA ALIMENTARE E CONTROLLO	pag 13
1.7. L'ACQUA NELL' INDUSTRIA ALIMENTARE	pag 14
1.7.1 CRITERI DI POTABILITÀ	pag 17
1.8. SANIFICAZIONE NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE	pag 18
1.8.1. I DISINFETTANTI CHIMICI	pag 18
1.8.2. MEZZI DI DISINFEZIONE FISICA	pag 27
1.8.2.1. ATTIVITA ' MICROBICIDA DELLE ALTE PRESSIONI	pag 27
1.9. METODI DI RILEVAMENTO VIRALE	pag 31
1.9.1. METODI DI AMPLIFICAZIONE GENICA	pag 32
1.10. METODI DI RILEVAMENTO VIRALE SUGLI ALIMENTI	pag. 37
2. BIBLIOGRAFIA	pag.42
3. METODI	pag 49
I. WATER AND WASTE WATER TREATMENTS IN FOOD INDUSTRIES”	pag 50
II “THE ROLE OF DISINFECTION IN FOOD INDUSTRY”	pag 70
III “EXPERIMENTAL STUDY ON VIRUCIDAL ACTIVITY OF PERACETIC ACID”	pag 82
IV “STUDY OF THE KINETICS OF INACTIVATION OF THE <i>FELINE CALICIVIRUS</i> VIRUS WITH PERACETIC ACID”	pag 94

V “STUDY ON INACTIVATION KINETICS OF <i>FELINE CALICIVIRUS (F9)</i> WITH HYPOCHLOROUS ACID, CHLORINE DIOXIDE AND PERACETIC ACID.”	pag 98
VI “INVESTIGATION ON VIRUCIDAL ACTIVITY OF CHLORINE DIOXIDE. EXPERIMENTAL DATA ON FELINE CALICIVIRUS, HAV AND COXSACKIE B5”	pag 110
VII “VALUTAZIONE DELL’IMPIEGO DELLE ALTE PRESSIONI PER L’INATTIVAZIONE VIRALE. STUDIO CONDOTTO SUL COXSACKIE VIRUS B5 E SUL CALICIVIRUS FELINO”	pag 120
VIII. “STUDY ON A NEW ASSAY FOR THE DETECTION OF ENTERIC VIRUSES IN FOOD”	pag 126
IX. “PROVE DI RECUPERO DI VIRUS CITOPATOGENI IN CAMPIONI ALIMENTARI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI”	pag 129
X. ANALISI PCR, REAL-TIME PCR SU VIRUS DI NORWALK IN PROVE DIRETTE SU ALIMENTI E DI CONTAMINAZIONE ARTIFICIALE	pag 137

1.1 INTRODUZIONE

Le infezioni e le tossinfezioni alimentari stanno diventando la sempre più frequente causa di morbosità nei paesi industrializzati

Le infezioni di origine alimentare sono causate dal consumo di alimenti o bevande contaminati, da diversi molteplici microrganismi. Sono state descritte più di 250 diverse infezioni causate da batteri, virus e parassiti che possono essere ritrovati sugli alimenti. Non solo i microrganismi patogeni però possono essere causa di malattie legate al consumo di alimenti, infatti possono essere presenti anche sostanze chimiche tossiche per l'uomo.

Gli agenti eziologici principalmente coinvolti nelle epidemie che si verificano a seguito di consumo di alimenti contaminati sono batteri, e in particolare i *Campylobacter*, le *Salmonella*, ceppi patogeni di *E.coli* e da virus enterici come Norwalk like virus, il virus A dell'epatite (HAV), il virus dell'epatite E (HEV) e rotavirus (RV). [25]

Il quadro epidemiologico di queste infezioni è cambiato, mentre nel secolo scorso la febbre tifoide, la poliomielite e il colera erano le patologie maggiormente diffuse, al giorno d'oggi infezioni sostenute da patogeni emergenti hanno preso il loro posto. I progressi compiuti nel campo della sicurezza alimentare, come l'introduzione della pastorizzazione e la disinfezione delle acque hanno contribuito a mantenere sotto controllo questo tipo di infezioni.

I nuovi patogeni emergenti rappresentano un serio problema di sanità pubblica assumendo una sempre maggiore importanza epidemiologica, essendo considerato in aumento il numero di casi delle infezioni veicolate da alimenti. 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.

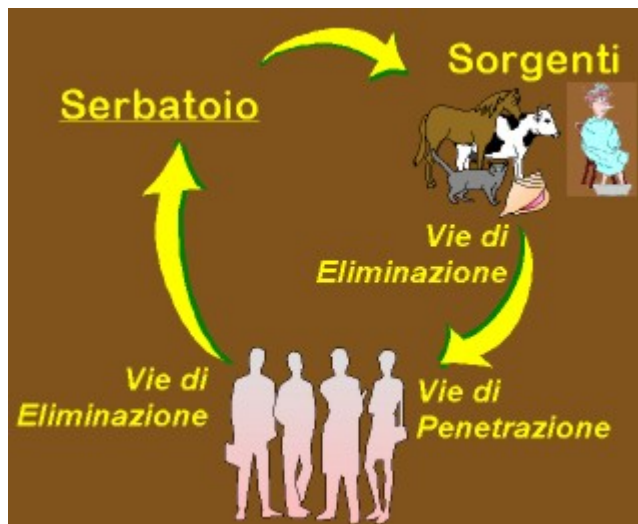
Negli ultimi anni l'introduzione di nuove tecniche di analisi hanno permesso l'identificazione di alcuni dei nuovi patogeni e di correlare gravi complicanze ed agenti patogeni enterici; come ad esempio la sindrome di Guillain-Barre che è risultata essere in alcuni casi una complicanza dell'infezione da *Campylobacter*, e altre gravi sindromi che colpiscono i bambini ad esempio la sindrome emolitica uremica che possono essere correlate ad infezione da *E. coli* O157:H7.

Dal punto di vista della prevenzione risulta molto importante il monitoraggio epidemiologico di queste infezioni, perché possono rappresentare un importante indice dell'efficienza delle misure di sicurezza alimentare, ed inoltre può fornire importanti informazioni che possono aiutare a mantenerle sotto controllo e a prevenirne l'insorgenza. Infatti molto di ciò che si conosce di queste malattie deriva da studi dettagliati condotti durante la manifestazione di un'epidemia. [75]

1.2 I VIRUS E GLI ALIMENTI

La diffusione dei virus patogeni per l'uomo è correlata sia alla via di eliminazione attraverso la quale si diffondono nelle diverse matrici ambientali, sia al grado di resistenza a fattori naturali ed artificiali di disinfezione.

I virus sono organismi che necessitano di un ospite per potersi replicare (parassiti endocellulari obbligati), andando a determinare uno stato infettivo nell'uomo o nel animale, che a sua volta riversano nuovamente l'agente infettante nell'ambiente attraverso diverse vie, tra le più importanti vi sono quella fecale, quella ematica e quella aerea.



Dati epidemiologici hanno recentemente messo in evidenza come il ruolo dei virus enterici, che hanno la capacità di replicarsi nell'intestino umano dal quale vengono poi

escreti attraverso le feci, nel determinismo di infezioni alimentari stia progressivamente aumentando, sia come conseguenza dell'innalzamento dell'età media della popolazione, che comporta maggiori complicanze legate alle patologie gastrointestinali, sia come effetto della globalizzazione del commercio, la quale ha velocizzato gli scambi commerciali e quindi la diffusione di eventuali patogeni in esso contenuti.

Gli alimenti coinvolti nella trasmissione all'uomo delle infezioni virali sono molteplici ma i prodotti della pesca (ostriche cozze vongole), cibi consumati freddi e prodotti della quarta gamma come frutta e vegetali rappresentano il principale veicolo di trasmissione. Negli ultimi anni si è assistito ad un aumento di epidemie causate dal consumo di fragole e frutti di bosco contaminati e acqua. [7,14, 24, 34, 54]. La causa dell'aumento dei casi di epidemie associate al consumo di tali prodotti può essere attribuita all'importazione di prodotti provenienti da regioni in cui non si attuano adeguate misure igieniche nella produzione dei prodotti e al consumo di alimenti consumati non adeguatamente cotti.

Tabella 1 alcuni casi epidemici da gastroenteriti

Year	Country	Pathogen	N° cases	Food	Syndrome
1968	Michigan	HAV	63	Pastries	Hepatitis
1975	Slovacchia	TBE	10	Sheep milk	Encefalitis
1976	Australia	HAV	7	Mussels	Hepatitis
1978	UK	HAV	41	Mussels	Hepatitis
1980	Australia	Norwalk	25	Mussels	Gastroenteritis
1982	Florida	Norwalk	6	Mussels	Gastroenteritis
1984	Jugoslavia	HAV	51	Mussels	Hepatitis
1984	USA	Norwalk	3.000	Bakery products	Gastroenteritis
1985	New York	Rotavirus	122	Cold food	Gastroenteritis
1986	New York	Norwalk	1017.	Mussels	Gastroenteritis
1988	Cina	HAV	292.000	Mussels	Hepatitis
1990	New York	SRV	41	Hamburger	Gastroenteritis
1990	Usa	Norwalk	-	Lettuce	Hepatitis
1991	Japan	SRV	82	Mussels	Gastroenteritis
1991	Texas	HAV	3.000	Mussels	Gastroenteritis
1991	N. Zeland	HAV	-	Mussels	Gastroenteritis
1991	UK	HAV	50	Bread	Hepatitis
1992	USA	HAV	6	Mussels	Hepatitis
1992	USA	HAV	28	Frozen strawberries	Hepatitis
1993	Louisiana	-	82	Mussels	Gastroenteritis
1998	USA	Norwalk	15	Oyster	Gastroenteritis
2006	Austria	Norovirus	113	Chicken	Gastroenteritis

La contaminazione degli alimenti può avvenire in diversi momenti della filiera alimentare, infatti questa può avvenire durante la fase di preparazione o di distribuzione, ed in questo caso si parla di contaminazione secondaria, attraverso il contatto con superfici contaminate o per contatto con altri alimenti contaminati, cross contaminazione. Un altro rischio infettivo è rappresentato dagli operatori, portatori sani, che non rispettano le corrette norme igieniche, infine ci può essere il caso in cui sono le materie prime stesse ad essere contaminate, in questo caso si parla di contaminazione primaria. Tra gli alimenti che possono essere contaminati all'origine vi sono naturalmente i prodotti ortofrutticoli, in quanto possono essere contaminati da acqua usata per l'irrigazione. Altri alimenti, che come già detto in precedenza, rivestono un ruolo molto importante per la trasmissione di virus enterici sono i prodotti della pesca ed in particolare i molluschi bivalvi. Questo perché i mitili sono organismi filtratori capaci di filtrare diversi litri di acqua, e durante questa attività possono trattenere batteri e virus eventualmente presenti nelle acque concentrandoli. [20]

Molti fattori possono influenzare la sopravvivenza dei virus nell'ambiente fattori di tipo chimico, fisico, biologico e legati al tipo di matrice. Tra i parametri chimici vi sono la salinità e il pH che hanno attività virucida andando ad agire su capsidi proteici, la presenza di sostanze organiche alle quali il microrganismo può adsorbirsi rimanendo protetto, e la presenza di sostanze alcalinizzanti, denaturanti ed ossidanti che possono inattivare o frammentare il genoma. Tra i parametri fisici invece riveste un ruolo molto importante la temperatura che ha un'azione inattivante su virus se raggiunge alti livelli, mentre basse temperature (intorno ai 4°C) agiscono proteggendo il genoma virale. Altri parametri fisici da prendere in esame sono la pressione atmosferica, idrostatica ed osmotica che agiscono modificando la percentuale di umidità relativa, in base alla quale si può indurre inattivazione o attivazione del virus, infine vanno considerati i raggi ultravioletti che agiscono danneggiando il genoma virale.

Nella tabella sottostante è riportato il grado di sopravvivenza di alcuni virus enterici nell'ambiente

Tab2

VIRUS	MATRICE	SOPRAVVIVENZA	TEMPERATURA	RIF. BIBLIOG.
Adenovirus 40	Acqua di mare	77g	15°C	Schwartzbrod 2003
Adenovirus 41	Acqua di mare	85 g	15°C	Schwartzbrod 2003
Calicivirus felini	Acqua di mare	30 g	≤ 10°C	Kadoi et al. 2001
Poliovirus 1	Acqua di mare	6 g	22-25°C	Rao et al 1984
	Sedimenti	19 g	22-25°C	
	Solidi sospesi	19 g	22-25°C	
	Sedimenti superficiali	19 g	22-25°C	
Poliovirus 1	Acqua di mare	1-3 g	28°C	Wait et al. 2001
		10 g	6°C	
Parvovirus	Acqua di mare	1-3 g	28°C	Wait et al. 2001
		10 g	6°C	
Rotavirus SA11	Acqua di mare	9 g	22-25°C	Rao et al 1984
	Sedimenti	19 g	22-25°C	
	Solidi sospesi	19 g	22-25°C	
	Sedimenti superficiali	19 g	22-25°C	

I virus enterici implicati nelle patologie a circuito oro-fecale, che quindi si possono ritrovare negli alimenti, secondo le modalità già viste in precedenza, sono dotati di una stabilità piuttosto elevata nell'ambiente esterno, essendo in grado di rimanere infettanti per periodi di tempo abbastanza lunghi (giorni o addirittura mesi).

Due fenomeni sembrano essere alla base della loro persistenza e diffusione nell'ambiente: l'aggregazione e l'adsorbimento. Il primo corrisponde alla formazione di aggregati, formati da diverse unità virali, che garantiscono una maggiore resistenza alle singole particelle alle condizioni ambientali avverse. La notevole capacità di adsorbimento a qualunque tipo di materiale particolato (organico ed inorganico), come particelle argillose, silicati, batteri, cellule algali e particolati organici, inoltre, aumenta il tempo di sopravvivenza dei virus nell'ambiente, grazie alla creazione di una vera e propria barriera fisica.

Il virus dell'epatite A e i Poliovirus possono sopravvivere in acque reflue o in acque profonde per circa 90 giorni a 10°C, così come sulle superfici porose e non porose dove si è calcolato un range di sopravvivenza di 30 giorni per gli enterovirus, inclusi il virus dell'epatite A e i Rotavirus.[61, 50,1]

Inoltre individui affetti da tali patologie gastroenteriche possono eliminare da 10^6 a 10^{10} particelle infettanti per grammo di feci, ritrovabili poi nelle acque reflue nell'ordine di 10^3 $10^5/L$ se non adeguatamente trattate. [49] Tale concentrazione virale nelle acque può

considerarsi oltremodo sufficiente a causare patologie a circuito oro-fecale se si pensa che sebbene non ci siano ancora dati certi tuttavia sembra che una sola particella virale possa causare la patologia nell'uomo.

1.3 LA NORMATIVA

La notifica

La notifica delle malattie infettive e diffuse è regolata dal D.M. 15/12/1990 del Ministero della Sanità "Sistema informativo delle malattie infettive e diffuse" pubblicato sulla G.U. 8/1/91 serie generale n.6.

In base al D.M. 15/12/90, le patologie a trasmissione alimentare sono soggette ad obbligo di notifica da parte del medico. Il decreto prevede 4 classi di notifica, ognuna con modalità distinta di progressione delle informazioni dal livello periferico a quello centrale; è possibile segnalare alcune patologie di origine alimentare sia come caso singolo (classe I e II) che come focolaio epidemico (classe IV). Per quanto riguarda le infezioni e le tossinfezioni di origine alimentare, comprese nella classe II e IV, il medico ha l'obbligo di segnalare al Servizio di Igiene Pubblica della AUSL ogni caso, anche solo sospetto, di malattia di classe II entro le 48 ore, mentre entro le 24 per quelle inserite nella classe IV.

L'indagine epidemiologica

L'indagine epidemiologica a seguito di un focolaio epidemico di MTA è regolamentata dal D.Lgs. 3/3/93 n.123 "attuazione della direttiva 89/397/CEE relativa al controllo ufficiale dei prodotti alimentari". All'art. 6 viene stabilito l'obbligo da parte del AUSL di effettuare l'indagine epidemiologica e trasmettere entro 30 giorni il rapporto alla regione, che provvederà ad inoltrarlo al Ministero della Sanità. L'indagine deve essere effettuata "... al fine di accertare: l'agente eziologico, il veicolo e le modalità di trasmissione, la provenienza del alimento contaminato, i fattori causali..."

Il decreto non da altre indicazioni sulle modalità di svolgimento dell'inchiesta.

1.4 EPIDEMIOLOGIA

Le Malattie Trasmesse dagli Alimenti (MTA) costituiscono nei paesi industrializzati un importante problema di sanità pubblica, con ricadute economiche non trascurabili dovute all'elevata morbilità prodotta. A questo proposito la letteratura internazionale riporta numerosi studi riguardanti le MTA con particolare interesse alla mortalità e alla morbosità, all'analisi dei determinanti e al costo sociale dell'evento; i lavori scientifici sono meno numerosi a livello nazionale e ancor meno a livello regionale. I dati provenienti da diversi sistemi informativi presenti in ogni stato sono difficilmente paragonabili, sia per disomogeneità di classificazione che per la mancanza di adeguati sistemi di sorveglianza. Tutti i dati però sembrano confermare che negli ultimi anni si è assistito ad un aumento delle malattie trasmesse dagli alimenti.

L'incremento dell'importanza dei virus nelle malattie legate al consumo di alimenti è stato recepito anche dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) che ha segnalato un possibile aumento dell'incidenza. Attualmente si ritiene che essa sia fortemente sottostimata a causa principalmente di un inadeguato sistema di sorveglianza, condizionato dalla scarsa disponibilità di procedure di controllo.

E' solo dal 1982 che il CDC (Center for Disease Control) ha iniziato a raccogliere dati inerenti ai casi di gastroenteriti virali, a seguito del verificarsi di diverse epidemie di gastroenteriti da Norovirus nel Minnesota (Stati Uniti). In questi ultimi anni l'importanza dei Norovirus quali causa di malattia conseguente ad ingestione di cibo contaminato, è andata sempre più aumentando.

E' stato stimato che attualmente negli Stati Uniti si verificano 23 milioni di infezioni da Norovirus ogni anno, che rappresentano il 60% del totale delle MTA causate da agenti conosciuti. Sempre i norovirus sono gli agenti eziologici maggiormente implicati nelle gastroenteriti non batteriche a livello mondiale. [47]

Inoltre i dati del CDC americano stimano che negli Stati Uniti circa 76 milioni di persone si ammalano ogni anno a seguito di un'infezione alimentare, con ospedalizzazione di 325 mila persone e la morte di 5200. Di queste, solo 14 milioni sono causate da patogeni conosciuti, per un totale di 60 mila ospedalizzazioni e 1800 morti l'anno.

Per quanto riguarda l'Europa nel 1980 è stato istituito un programma di sorveglianza degli alimenti dall'OMS per il controllo delle malattie trasmesse da alimenti e questo prevede il

controllo e il monitoraggio dell'insorgenza delle infezioni dovute a batteri, virus, tossine, funghi piante ed animali che possono costituire un pericolo per la salute.

Il settimo rapporto del programma di sorveglianza relativo al periodo '93-'94 considera i dati provenienti da 49 paesi, in 38 dei quali esiste un sistema di sorveglianza delle MTA, ma solo in alcuni è prevista la notifica obbligatoria delle epidemie.

Sono stati raccolti i dati delle epidemie che si sono verificate nel periodo compreso tra il 1973 e il 1998 dove l'agente causale è stato identificato nel 70,7% dei casi. La *Salmonella* ssp è risultata essere la causa di patologia più segnalata.

Nella tabella sottostante sono riportati gli agenti causali nelle epidemie indagate.

Tab 3

Agente causale	N.epidemie	%	N. casi
Batteri			
<i>Salmonella</i>	18159	77.1	126303
<i>Staphylococcus aureus</i>	960	4.1	10899
<i>Shigella</i>	633	2.7	17786
<i>Clostridium perfringens</i>	522	2.2	9019
<i>Bacillus cereus</i>	278	1.2	2918
<i>Clostridium botulinum</i>	238	1.0	700
<i>Campylobacter</i>	204	0.9	1703
<i>Escherichia coli</i>	156	0.7	2023
<i>Escherichia coli</i> EHEC/O157	37	0.2	86
Altro	378	1.5	10166
Totale batteri	3406	14.5	55300
Virus			
SRSV	78	0.3	394
Norwalk-like virus	35	0.1	2583
Calicivirus	25	0,1	2566
Epatite A	39	0.2	570
Altro	80	0.3	677
Totale virus	230	1	6790
Parassiti			
Trichinella	745	3.2	1975
Altro parassiti	4	< 0	50
Totale parassiti	749	3.2	2025
Intossicazioni			
Sgombrotossina/istamina	176	0.7	1529
Avvelenamenti da funghi	485	2.1	1609
Inquinamento idrico	127	0.5	34126
Altro	201	0.8	3648
Totale	23538	100.0	231330

Per quanto riguarda l'Italia i dati inerenti ad infezioni da Norovirus sono pochi in quanto l'unico servizio di sorveglianza, delle infezioni virali trasmesse dagli alimenti, il SEIEVA (Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta), controlla l'andamento, l'incidenza e le modalità di trasmissione dell'Epatite A.

Ampiamente documentato è infatti il ruolo degli alimenti nella trasmissione di questo virus. Tra il 2005 e 2007 è stato condotto uno studio in cui vengono riportati i dati ottenuti da un'indagine virologica ed epidemiologica condotta durante epidemie gastroenteriche in Italia.

Una prima epidemia ha visto coinvolte 184 soggetti nel dicembre 2005, in questo caso il veicolo di trasmissione è stato riconosciuto in un antipasto di pesce consumato in un ristorante, e la sorgente di infezione è risultata essere rappresentata dagli operatori alimentari.

Un secondo gruppo di epidemie con caratteristiche analoghe ha coinvolto nel gennaio 2007 almeno 65 persone in tre diversi ristoranti. L'indagine epidemiologica ha evidenziato un rischio relativo elevato associato al consumo di ostriche crude provenienti da un'unica partita nei tre diversi episodi. Il caso più eclatante si è verificato in un campeggio in provincia di Bari in cui sono state coinvolte oltre 1000 persone, in questo caso il veicolo di trasmissione è risultato essere l'acqua potabile.

E da tenere presente che con l'introduzione di nuove metodiche di biologia molecolare, per la ricerca di virus negli alimenti, è stato possibile evidenziare che le infezioni da Norovirus sono una delle più importanti cause di gastroenteriti negli adulti. Dal 1992 al 1999 nel mondo si è verificato un aumento dei casi di MTA attribuito ai Norwalk like virus, e i paesi maggiormente coinvolti sono stati: i Paesi Bassi (80%), l'Inghilterra e il Galles (27%), gli USA (47%) e la Finlandia (56%).

1.5.IMPORTANZA DELLE INFEZIONI DA NOROVIRUS

I Calicivirus sono una famiglia di virus privi di envelop di forma icosaedrica contenenti un singolo filamento di RNA. Fanno parte di questa famiglia: Norovirus, Sapporovirus, Lagovirus e Vesivirus, quest'ultimi infettano solo gli animali, i Norovirus e i Sapporovirus infettano sia gli animali che l'uomo anche se una trasmissione diretta tra uomo e animale non è ancora stata dimostrata. Sono caratterizzati da una bassa dose infettante che è stata stimata essere di 10-100 particelle virali

Uno dei problemi principale che riguarda nello studio dei Norovirus è rappresentato dal fatto che questi non sono in grado di replicarsi in coltura cellulare.

Il genoma virale, RNA a polarità positiva (7,5-7,7 kbasi), dei norovirus è composto da 3 open reading frames (ORFs), il primo dei quali codifica per diverse poli-proteine non strutturali importanti per la replicazione virale ma che non vengono ritrovate nelle particelle virali, tra cui la nucleotide trifosfato, proteasi, polimerasi e proteine legate al genoma virale (VPg).

La seconda regione (ORFII) codifica per le più importanti proteine strutturali (VP1), mentre la terza (ORFII) codifica sempre per proteine di struttura ma minori (VP2).

Il limite rappresentato dalla incapacità di replicarsi in vitro dei norovirus umani non ha permesso di effettuare una classificazione basata sui sierotipi, è stato quindi necessario eseguire un' analisi del genotipo, portando alla classificazione di 5 diversi genogruppi da GI a GV, i ceppi che colpiscono l'uomo appartengono al GI, GII, e al GIV.

I norovirus infettano soggetti di tutte le età, inizialmente si pensava che questi virus colpissero prevalentemente i bambini in età scolastica e gli adulti, mentre negli ultimi anni diversi studi hanno dimostrato che questi infettano anche bambini molto piccoli diventando la seconda causa di ospedalizzazione dopo i Rotavirus.

Le epidemie si manifestano tutto l'anno ma vedono un picco durante i mesi invernali. [27]

I principali genogruppi responsabili delle infezioni sono il GI e il GII anche se recentemente diversi studi hanno mostrato una predominanza del GII. Generalmente le epidemie sono causate da un unico ceppo anche se è possibile che si verifichino delle coinfezioni.

Nella tabella sottostante sono riportati i dati inerenti alla frequenza delle epidemie da norovirus in casi di gastroenteriti acute.

Tabella 4

Paese (bibliografia)	Anno di studio	Numero di epidemie	Frequenza infezioni da Norovirus	Distribuzione dei genogruppi
Olanda 15	1996	69	87%	7% GI, 91% GII, 2%GI and GII
Gran Bretagna 16	1996-97	94	68%	1% GI, 52%GII, 47% non identificato
Stati Uniti 17	1996-97	90*	96%	6% GI, 94%GII,
Giappone 18	1996-99	64*	73%	21% GI, 66%GII, 13% GI & GII
Stati Uniti 19	1997-02	233*	93%	26% GI, 73%GII, 1% GV
Giappone 20	1997-2004	60*	77%	11% GI, 72%GII, 17% GI & GII
Finlandia 21	1998-2002	416	61%	13% GI, 86%GII, 1% GI & GII
Spagna 22	2000-01	30	47%	21% GI, 79%GII,
Stati Uniti 23	2000-04	226*	81%	20% GI, 74%GII, 6% GI & GII
Australia 24	2001	59	51%	3% GI, 90%GII, 7% GI & GII
Olanda 25	2002	281	54%	Non riportati

*non infezioni batteriche

Essendo il virus di Norwalk un virus enterico, la via di trasmissione per eccellenza è la via oro-fecale, anche se non è da trascurare contagio interumano. Gli alimenti possono essere contaminati in ogni fase della lavorazione, ad esempio i prodotti della pesca e i frutti di bosco possono essere contaminati all'origine, mentre altri alimenti come insalata e alimenti consumati freddi possono essere contaminati durante la fase di preparazione. La trasmissione del virus si verifica spesso in luoghi di ricreazione.

La continua circolazione del virus è attribuibile in parte alla resistenza che mostra nei confronti di svariati disinfettanti.

Le diverse vie di trasmissione rendono difficile la pianificazione di interventi attuati al fine di interrompere la catena di trasmissione con successo. [57]

1.6. SICUREZZA ALIMENTARE E CONTROLLO

La presenza di numerosi casi di patologie veicolate da alimenti, siano esse di origine batteriche o virali, ha reso necessario l'applicazione di idonee misure di intervento in ogni punto della filiera produttiva allo scopo di prevenire lo sviluppo e la conseguente diffusione di tali patologie. Risulta quindi fondamentale fornire ai consumatori alimenti

sani e di buona qualità, al fine di promuovere, garantire e conservare il benessere dell'uomo.

Per poter raggiungere questo obiettivo diventa indispensabile l'igiene degli alimenti, intesa come qualità microbiologica e chimica del prodotto.

“Il conseguimento di un elevato livello di protezione della vita e della salute umana è uno degli obiettivi fondamentali della legislazione alimentare stabiliti dal regolamento CE n. 178/2002”.

“Per raggiungere tale obiettivo occorre garantire la sicurezza degli alimenti dal luogo di produzione primaria al punto di commercializzazione o esportazione” e “ogni operatore del settore alimentare dovrebbe garantire che tale sicurezza non sia compromessa lungo tutta la catena alimentare”.

Il regolamento CE n.852/2004 sull'igiene dei prodotti alimentari sottolinea l'importanza di monitorare ogni punto della filiera alimentare a partire proprio dalle materie prime facendo in modo che “i prodotti primari siano protetti da contaminazioni, tenendo conto di tutte le trasformazioni successive a cui saranno soggetti”.

1.7. L'ACQUA NELL' INDUSTRIA ALIMENTARE

L'acqua distribuita deve essere di accertata innocuità (non deve contenere sostanze tossiche o microrganismi patogeni), deve essere gradevole quanto a caratteri organolettici, deve essere usabile per tutti gli impieghi domestici e per tutte le destinazioni nell'ambito delle industrie e dei servizi.

Attualmente l'Art. 2 D.L..02.01 n.31 così si esprime riguardo alle “acque per il consumo umano”:

- 1) le acque trattate o non trattate, destinate ad uso potabile, per la preparazione di cibi e bevande, o per altri usi domestici, a prescindere dalla loro origine, siano esse fornite tramite una rete di distribuzione, mediante cisterne, in bottiglie o in contenitori;
- 2) le acque utilizzate in un'impresa alimentare per la fabbricazione, il trattamento, la conservazione o l'immissione sul mercato di prodotti o di sostanze destinate al consumo umano, escluse quelle, individuate ai sensi dell'articolo 11, comma 1, lettera e), la cui qualità non può avere conseguenze sulla salubrità del prodotto alimentare finale;

Fonti di approvvigionamento

- **Acque profonde:** le acque profonde possono essere schematicamente suddivise in rapporto alla costituzione geologica del terreno che attraversano prima di essere captate: terreni rocciosi da una parte e terreni sedimentari dall'altra.

Qualsiasi terreno roccioso è attraversato da un sistema di fessurazione attraverso cui l'acqua si infila e si approfondisce. Le rocce possono essere a loro volta silicee o calcaree; le rocce silicee chimicamente poco solubili danno un'acqua generalmente poco mineralizzata ma comunque di buona qualità. Le rocce calcaree hanno una alta solubilità, se il volume e la pressione dell'acqua sono rilevanti si possono verificare dei fenomeni carsici che limitano i processi di autodepurazione, se invece le fessurazioni sono di limitata grandezza i detriti vanno a costituire buoni sistemi di filtrazione.

I terreni sedimentari sono caratterizzati da un'alternanza di strati impermeabili e permeabili all'acqua, gli strati impermeabili possono essere continui o discontinui. L'acqua percolando attraverso terreni porosi forma delle falde sui terreni impermeabili, la prima falda partendo dalla superficie prende il nome di falda freatica, mentre le successive di falde profonde.

Nel processo di percolazione delle acque attraverso gli strati permeabili si realizzano costantemente dei fenomeni di autodepurazione, per filtrazione ed adsorbimento di microrganismi, per adsorbimento di e combinazione di svariati composti chimici.

Tuttavia molte acque di falde freatiche sono attualmente contaminate, specialmente là dove lo spessore dello strato permeabile è modesto, la granulometria dei terreni rilevante e la contaminazione del suolo è pesante e continua.

L'acqua rappresenta un grande rischio per la salute umana in quanto può fungere da veicolo di agenti patogeni e di sostanze chimiche che possono risultare tossiche per l'uomo.

È pressoché inevitabile che liquami di origine domestica o industriale raggiungano acque superficiali. Il grado di inquinamento dipenderà principalmente dalla composizione di questi liquami, dal rapporto tra il volume degli scarichi e portata dei corpi idrici recipienti, dalla natura e dal tipo dei trattamenti a cui questi sono sottoposti.

Questo tipo di contaminazione è un pericolo anche per falde profonde in rapporto ad inadeguati e pericolosi sistemi di smaltimento delle rispettive acque di rifiuto.

Inquinamenti possono per altro avvenire sia su acque originariamente pure che su acque precedentemente trattate, questo può verificarsi nel momento in cui le tubature e i raccordi dell'acquedotto siano costruiti con materiale improprio alla qualità dell'acqua distribuita.

L'infiltrazione di acqua salata o l'infiltrazione da depositi naturali sono fonti di inquinamento dell'acqua di falda freatica. La maggiore preoccupazione deriva dall'eccessiva contaminazione dell'acqua di falda freatica connessa ad attività umane. La contaminazione umana dell'acqua freatica può essere collegata all'eliminazione dei rifiuti (sistemi privati per la deposizione di acque luride, deposizione di rifiuti solidi nel terreno, acque di scarico comunali, prelievi dell'acqua di scarico, spargimento di fango sul terreno, eliminazione delle brine dall'industria petrolifera, rifiuti minerari, deposizione di scarichi liquidi in pozzi profondi, rifiuti di animali da foraggio, rifiuti radioattivi) o non direttamente collegati alla deposizione dei rifiuti (incidenti, alcune attività agricole, estrazione mineraria, sbrinatoria di strade principali, piogge acide, costruzione e manutenzione di pozzi, sale stradale).

Le conseguenze epidemiologiche degli inquinamenti idrici più ampiamente e da maggior tempo documentate sono di ordine infettivo. In letteratura sono riportate numerose condizioni di endemie, focolai epidemici e grandi epidemie legate a tale tipo di inquinamento.

Per ciò che concerne l'inquinamento da composti chimici i fatti epidemiologicamente ben accertati in campo umano riguardano le intossicazioni croniche da piombo, in acque capaci di solubilizzare tubature (acque troppo acide), e da arsenico naturalmente presente nelle acque. Peraltro in acque superficiali e profonde sono state frequentemente reperite altre sostanze pericolose come mercurio, cadmio, cromo, nickel, insetticidi ed erbicidi, PCB e policloroterpenili (PCT).

Per controllare patologie legate al consumo di acqua contaminata sono stati fissati diversi criteri di potabilità ed interventi di prevenzione degli inquinanti idrici come:

- Trattamento acque reflue
- Corretto smaltimento dei rifiuti solidi
- Riduzione sversamento di sostanze tossiche

1.7.1 CRITERI DI POTABILITÀ

Acque trattate o non trattate devono possedere requisiti ben definiti sia per quanto si riferisce alle caratteristiche organolettiche, alla composizione chimica, alla assenza di tossicità e di microrganismi patogeni.

Risulterà quindi molto importante mantenere sotto controllo diversi parametri chimico-fisici, come possono essere la temperatura la portata dopo abbondanti piogge, che possono dare importanti informazioni a livello della sicurezza delle falde profonde, e verificare l'assenza di sostanze chimiche che possono risultare tossiche per la salute. Va tenuto presente la presenza di sostanza organica misurata in termini di COD, che può fornire indicazioni importanti per quanto riguarda un possibile inquinamento dovuto a scarichi domestici, industriali o agricoli.

In fine sarà importante effettuare l'analisi microbiologica attraverso la ricerca di precisi indici di contaminazione fecale.

1.8. SANIFICAZIONE NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE

1.8.1. I DISINFETTANTI CHIMICI

Alla luce di tutti questi fattori hanno assunto notevole importanza le tecniche di disinfezione a livello di tutti i punti della filiera alimentare, specialmente nei riguardi di superfici, piani di lavoro e attrezzature che entrano a diretto contatto con l'alimento.

Le stesse strutture destinate agli alimenti dovranno essere progettate, costruite e ubicate in modo da “consentire un'adeguata manutenzione, pulizia e/o disinfezione, impedendo l'accumulo di sporcizia sulle superfici che può penetrare negli alimenti, fornendo un spazio di lavoro tale da consentire tutte le operazioni in condizione di igiene e garantendo adeguati sistemi igienici per l'operatore che deve manipolare l'alimento senza apportare contaminazioni esterne” (Regolamento CE n.852/2004).

La definizione ufficiale (Association of Official Analytical Chemist) sulle procedure di sanitizzazione per le superfici che entrano a diretto contatto con gli alimenti prevede una riduzione del livello di contaminazione del 99.999% (5 log) in 30 secondi e del 99,9% (3 log) per le superfici non a diretto contatto con gli alimenti.

Gli interventi devono anche essere supportati da un'analisi e un monitoraggio costante dei “critical control points” ossia delle possibili diverse vie di contaminazione a cui un alimento può andare incontro fino a ritrovarsi sulla tavola del consumatore.

Assume notevole importanza la scelta del disinfettante che dovrà tenere conto dei diversi fattori che possono influire sulla sua efficacia e sugli stessi microrganismi da inattivare.

Vi sono diversi parametri che possono contribuire ad aumentare il potere di un disinfettante e nello stesso tempo che possono influire sulla sopravvivenza dei microrganismi.

Tra questi la temperatura, il tempo di esposizione e la concentrazione del disinfettante sono direttamente correlati con l'efficacia della disinfezione; di contro la formazione di biofilm sulle superfici, le caratteristiche dell'acqua che può essere usata indirettamente come mezzo diluente per il disinfettante o direttamente sulle superfici per eliminare lo sporco, nonché fattori intrinseci dei microrganismi, legati alla loro resistenza nei confronti degli agenti microbicidi, determinano una riduzione del potere disinfettante.

Per quanto concerne la temperatura si assume che alte temperature favoriscano l'efficacia disinfettante, sebbene qualora troppo elevate (al di sopra dei 55°C) possono favorire il potere corrosivo degli agenti ossidanti sulle superfici trattate, determinare la precipitazione

di sali di calcio e magnesio insolubili favorendo la formazione dei biofilm e riducendo la solubilità di alcuni disinfettanti, come ad es. del cloro. [21, 50]

Vi sono diversi studi che riportano come un aumento della temperatura possa influire non solo sull'efficacia del disinfettante, ma anche sugli stessi microrganismi da inattivare, determinando, per quanto riguarda i virus, la perdita della loro infettività a seguito della degradazione del loro capsido che li rende incapaci di attaccarsi alla cellula ospite e quindi di infettarla e in questo modo il genoma privato dell'involucro esterno non costituiscono più un pericolo per l'uomo.

Per quanto concerne la concentrazione del disinfettante si deve sempre considerare combinata con il tempo di contatto e normalmente questi due parametri sono inversamente correlati. Generalmente più protratto è il tempo con cui un disinfettante rimane a contatto con una superficie, minore è la sua concentrazione d'uso necessaria, quindi la concentrazione d'uso e il tempo previsto di contatto dovranno essere scelti opportunamente per raggiungere lo scopo dell'inattivazione microbica salvaguardando però le strutture.

L'efficacia dei trattamenti di pulizia è anche determinata dalla qualità dell'acqua necessaria per un primo intervento sulle superfici per rimuovere lo sporco grossolano.

L'acqua impiegata nei processi di lavaggio e disinfezione in qualsiasi punto della filiera alimentare deve essere priva di patogeni e rispondere ai requisiti di potabilità fissati dalla direttiva 98/83 CE relativa alle acque da destinare al consumo umano. Qualora tali requisiti non siano rispettati occorre sottoporre l'acqua a procedure di disinfezione affinché non diventi veicolo di eventuali microrganismi indesiderati sulle superfici con cui viene a contatto.

Le caratteristiche dell'acqua che maggiormente influiscono sull'azione dei disinfettanti sono il pH, la durezza e la presenza di sostanze organiche ed inorganiche.

Il pH ha un ruolo importante nell'efficacia di azione dei disinfettanti, in particolare l'ipoclorito di sodio risulta notevolmente influenzato da tale parametro poiché ha un'azione microbica più rapida a pH 6-7.5 in cui prevale la sua forma più attiva nei processi di disinfezione, l'acido ipocloroso indissociato, mentre in ambiente basico prevale la forma dissociata del sale che ha un'azione microbica più lenta.

Il pH oltre a influenzare direttamente il meccanismo d'azione dei disinfettanti, favorendo o meno la comparsa della loro forma più efficace, può agire anche sui microrganismi da inattivare.

Diversi studi riportano come virus anche appartenenti alla stessa famiglia presentino diversa sensibilità all'azione disinfettante. Il Coxsackievirus B5 risulta 11 volte più resistente all'azione dell'acido ipocloroso a pH 6 rispetto al Coxsackievirus A9 e 44 volte più resistente a pH 10. L'Echovirus 1 si è visto essere il picornavirus più sensibile all'azione dell'acido ipocloroso a pH 6, mentre è il più resistente in ambiente altamente alcalino. [26]

La durezza dell'acqua è un altro parametro in grado di ostacolare direttamente l'efficacia della disinfezione diminuendo il potere del singolo disinfettante o indirettamente poiché la presenza di sali insolubili di calcio e di magnesio in essa contenuti possono offrire protezione ai microrganismi rendendoli difficilmente raggiungibili dai disinfettanti. Inoltre un'acqua dura può aumentare il rischio di corrosione delle attrezzature e può diminuire la quantità di calore scambiato durante i trattamenti termici portando a una diminuzione della loro efficacia e quindi anche a un possibile rischio di inefficacia battericida nel prodotto sottoposto a tale processo.

Il potere di un disinfettante può essere anche rallentato dalla presenza nell'acqua di sostanze inorganiche che riescono a sequestrarlo e a renderlo meno disponibile per la sua azione microbica. In particolare la disinfezione operata con il cloro porta alla formazione delle cloroammine, sottoprodotti di reazione tra il cloro e l'ammoniaca.

Quando il cloro è combinato a formare questi composti il suo potere disinfettante diminuisce poiché le cloroammine sono prodotti stabili che rilasciano il cloro lentamente rallentandone quindi l'azione.

La presenza di residui inorganici dei disinfettanti o residui di alimenti che possono rimanere sulle superfici qualora gli interventi di pulizia e disinfezione non vengano eseguiti correttamente, oltre a rallentare l'azione disinfettante, possono portare anche alla formazione di uno strato (conditioning layer) che facilita l'adesione da parte di eventuali microrganismi non inattivati dai processi di disinfezione.

Queste attive matrici biologiche sono quindi costituite da microrganismi che richiedono una superficie solida su cui aderire e nutrienti necessari per vivere e prendono il nome di biofilm. Nell'industria alimentare il biofilm, oltre che ostacolare l'efficacia dei disinfettanti, è altresì in grado di rallentare il flusso di calore, diminuendo il rendimento dei processi termici di inattivazione microbica, e di aumentare la resistenza di un fluido allo scorrimento, impedendo in tal modo una corretta procedura di lavaggio e favorendo la corrosione delle attrezzature.

Elevate temperature, spesso utilizzate nei processi di disinfezione, possono aumentare la formazione del conditioning layer mediante la denaturazione dello sporco proteico, favorendo in tal modo l'adesione di batteri, soprattutto di alcuni di essi come Legionelle spp. perfettamente in grado di moltiplicarsi a tali temperature.

Il potere di un disinfettante può essere influenzato anche da caratteristiche intrinseche dei microrganismi stessi i, in particolare dalla diversa resistenza che questi oppongono ai disinfettanti.

In generale i virus dotati di envelope sono più sensibili all'inattivazione da parte degli agenti ossidanti, sebbene la maggior parte dei virus implicati nelle patologie veicolate da alimenti siano di piccole dimensioni, privi di envelope, come i Norwalk-like virus, il virus A dell'epatite e gli Enterovirus, e quindi più resistenti all'azione dei disinfettanti. [26, 31, 37]

Si ritiene che la caratteristica comune ai virus privi di envelope sia quella di aggregarsi al materiale organico, legame che offre loro protezione all'inattivazione operata dai disinfettanti rendendoli in tal modo più resistenti.

In generale un disinfettante dovrebbe avere un ampio spettro di azione nei confronti dei microrganismi ed essere in grado di inattivarli velocemente, dovrebbe rimanere stabile a lungo, essere poco suscettibile ai diversi fattori ambientali che possono influire sulla sua efficacia, come la temperatura, il pH e la durezza dell'acqua con cui viene a contatto nelle procedure di pulizia.

Ulteriori caratteristiche di un disinfettante ideale sono la bassa tossicità che ne facilita l'impiego, la totale o la più esigua capacità possibile di corrodere le apparecchiature con cui viene a contatto e un prezzo tale da poterne permettere un ampio utilizzo.

I disinfettanti che trovano il più largo impiego nell'industria alimentare appartengono al gruppo degli ossidanti e tra questi si ritrovano il cloro e i suoi composti, da sempre impiegati nelle pratiche di disinfezione industriale, e l'acido peracetico che ultimamente sta riscuotendo notevoli consensi.

Il livello di cloro utilizzabile in processi in cui non sia prevista una fase di risciacquo per la disinfezione delle superfici e delle attrezzature è di 200 ppm, ma questa concentrazione può variare. [21, 42]

Per l'ipoclorito si raccomanda un'esposizione di 1 minuto alla minima concentrazione di 50 ppm e alla temperatura di 24°C (75°F) e per ogni diminuzione di 10 °C della temperatura si rende necessario un raddoppio del tempo di contatto. [21]

Per le cloroammine, essendo sottoprodotti di reazione più stabili del cloro e quindi ad azione più lenta, la dose raccomandata per la disinfezione è di 200 ppm per 1 minuto di contatto ed è prevista una concentrazione maggiore rispetto a quella ritenuta efficace per l'ipoclorito. [21]

Il meccanismo di azione dell'ipoclorito e dei disinfettanti a base di cloro non è mai stato sperimentalmente dimostrato. Tuttavia per la loro attività battericida sembra che siano necessarie due fasi: da un lato la penetrazione del disinfettante nel microrganismo, dall'altro la reazione tra disinfettante e proteine di membrana della cellula batterica che porta alla formazione di N-cloro composti, ritenuti diretti responsabili dell'azione battericida. [9]

Per quanto concerne il meccanismo di azione virucida del cloro e dei suoi composti dati sperimentali indicano un attacco dei gruppi sulfidrilici e disulfidrilici delle proteine e anche un danneggiamento dell'acido nucleico. [9]

Se il genoma virale è danneggiato, infatti, non può fungere da templatò nel meccanismo di replicazione e inibisce quindi la moltiplicazione virale nelle cellule bersaglio.

Anche la distruzione del capside virale sembra essere un ulteriore meccanismo d'azione dei disinfettanti a base di cloro perché comporta l'incapacità dei virus di adsorbirsi alle cellule e il rilascio del genoma virale nell'ambiente, entrambi fattori responsabili della perdita di infettività virale. [9, 59,32]

Per quanto riguarda l'ipoclorito la sua azione disinfettante è strettamente legata al pH.

L'acido ipocloroso è la forma attiva dell'ipoclorito, in grado di entrare in contatto con i microrganismi e inattivarli. A pH maggiore o uguale a 7,5 la quantità di cloro disponibile come acido ipocloroso è limitata e il cloro esiste maggiormente nella sua forma meno attiva di ione ipoclorito. Se il pH scende al di sotto di 4 si forma cloro gassoso altamente irritante per la pelle e per le mucose.

Il pH della soluzione disinfettante dovrebbe essere mantenuto tra 6 e 7,5 così da assicurare un'adeguata attività microbica, un'adeguata protezione per gli operatori e la salvaguardia delle attrezzature che a pH troppo acidi potrebbero andare incontro a fenomeni di corrosione. [50]

L'azione disinfettante dell'acido ipocloroso è anche influenzata e potenzialmente ridotta dall'eventuale presenza di sostanze inorganiche e organiche in soluzione acquosa con cui il cloro può reagire.

In presenza di gruppi amminici, infatti, il cloro si complessa con questi formando le cloroamine, composti stabili, con un più basso potere ossidante rispetto al cloro, capaci di sequestrare il cloro attivo libero.

Qualora in soluzione acquosa siano presenti sostanze organiche quali acidi umici e fulvici, l'ipoclorito reagisce con questi portando alla formazione dei trialometani (THM) di cui è stata dimostrata una loro implicazione nello sviluppo di tumori nell'uomo e per cui è stabilito un limite di legge di 30 µg/l per i trialometani totali (D.L.vo 31 del 2001).

Per quanto concerne l'utilizzo dell'ipoclorito nell'industria, diversi studi sperimentali riportano l'efficacia del "cloro attivo" intendendo con questo la forma dell'ipoclorito responsabile dell'attività microbica, l'acido ipocloroso, disponibile per la disinfezione perché non legato a sostanze organiche o inorganiche.

Per la disinfezione di superfici in acciaio, una concentrazione di cloro attivo compresa tra 500 e 5000 ppm di cloro attivo è risultata essere efficace nell'inattivare il virus A dell'epatite e altri virus non envelop alquanto resistenti agli interventi di disinfezione. (28)

Altri studi sulla disinfezione di superfici industriali in acciaio riportano come 5000 ppm di cloro attivo siano in grado di ridurre di oltre il 99,9% virus enterici quali Cox B3 e virus A dell'epatite e 1250 ppm di ipoclorito di sodio a pH 9 siano in grado di ridurre di 1000 volte il titolo degli stessi virus. [48]

Nella disinfezione industriale il cloro attivo e quindi l'ipoclorito nella sua forma efficace per la disinfezione è spesso sostituito dal biossido di cloro. Questo disinfettante è sempre a base di cloro, ma non dà origine a sottoprodotti di reazione quali i THM in presenza di sostanze organiche, risulta più facilmente utilizzabile perché meno irritante e rilascia anche meno odori sgradevoli in quanto non si lega a composti fenolici, eventualmente presenti nella matrice in cui è utilizzato.

Il biossido di cloro in presenza di sostanze organiche non si complessa con queste, a differenza dell'ipoclorito, ma ne determina l'ossidazione; si è visto infatti che l'abbattimento dei microrganismi risulta indipendente dal COD che rappresenta il carico di sostanze organiche presenti in acqua. [18]

Il limite massimo di biossido di cloro consentito per la disinfezione degli impianti è di 200 ppm, sebbene la normale concentrazione d'uso varia in un range compreso tra 1 e 10 ppm, inferiore a quella raccomandata per l'ipoclorito perché il biossido ha un potere ossidante 2.5 volte maggiore. [60]

Si ritiene che il bersaglio dell'azione microbica del biossido di cloro sia l'acido nucleico.

Prove sperimentali sull'inattivazione dell'HAV hanno confermato come il biossido di cloro sia in grado di danneggiare il genoma virale, in particolare la regione 5'NTR che si ritiene correlata all'infettività del virus. La totale inattivazione dell'infettività virale, infatti, non permette di rilevare mediante PCR proprio questa regione che si differenzia in tal modo da altre sequenze di RNA che invece vengono rilevate nelle stesse condizioni operative. [59,15]

Il biossido di cloro non sembra essere influenzato dal pH, poiché è efficace in un ampio range, da pH 6 a pH 10. Tuttavia si è visto più efficace a inattivare il Poliovirus a pH 10 e ciò è stato spiegato sia ipotizzando l'efficacia di inattivazione operata dai clorati che si formano in parte dal disproporzionamento in ambiente alcalino del biossido, sia dal fatto che un aumento di pH potrebbe rendere il virus più sensibile all'azione dello stesso biossido. [32]

Sebbene presenti più vantaggi rispetto all'ipoclorito, e per questo è spesso preferito, il ClO_2 deve essere utilizzato con molta attenzione da parte del personale e preparato solo al momento dell'uso perché non può essere stoccato.

Inoltre, pur non determinando la formazione di sottoprodotti cancerogeni quali i trialometani, può dare origine a cloriti a seguito o di un'incompleta reazione dei composti utilizzati per la sua preparazione o di una parziale riduzione del biossido che passa a clorito (ClO_2) invece che a cloruro durante la sua azione ossidante.

I cloriti sono implicati in fenomeni patologici importanti nell'uomo quali la metaemoglobinemia e il D.L.vo 31 del 2001 ne ha stabilito nei parametri chimici per l'acqua destinata al consumo umano il limite di 200 $\mu\text{g/l}$.

Ultimamente negli impianti industriali la disinfezione con il cloro, soprattutto in forma di acido ipocloroso, viene sostituita dall'acido peracetico, disinfettante ad ampio spettro di azione verso i microrganismi patogeni e che attualmente non è dimostrato essere responsabile della formazione di sottoprodotti cancerogeni di reazione, sebbene pare sia implicato nella formazione di alcuni prodotti secondari tossici e mutageni.

Test per individuare la mutagenicità (Ames test), la genotossicità (Allium test e Tradescanzia /micronuclei test), la tossicità (test sul batterio marino bioluminescente *V. fischeri*) sono stati condotti su campioni di acqua reflua trattati rispettivamente con 1 mg/l di acido peracetico e anche con 1,5 mg/l di ClO_2 . Entrambi i disinfettanti hanno prodotto mutagenicità batterica, in particolare il biossido di cloro, e hanno mostrato effetti tossici. Solo l'acido peracetico ha rilevato anche una parziale capacità genotossica. [16]

Un altro studio condotto sulla disinfezione dell'acqua superficiale ha confermato la formazione di DBPs genotossici dopo trattamento con acido peracetico, in particolare ha evidenziato la presenza di sottoprodotti non alogenati tra cui aldeidi (nonanale e decanale) e metossi-metil-benzene. Nello stesso studio è stata messa a confronto l'attività battericida dei disinfettanti a base di cloro e dell'acido peracetico e quest'ultimo si è dimostrato essere meno efficace rispetto all'ipoclorito e al biossido nella riduzione della carica batterica totale in acqua. [58]

Il meccanismo d'azione dell'acido peracetico si accomuna a quello di tutti i perossidi, ossia agisce liberando ossigeno attivo che interviene nella distruzione dei legami disolfuro degli enzimi, delle proteine e di altri metaboliti della cellula batterica rendendoli in tal modo incapaci di svolgere la loro funzione. Qualora tali enzimi o tali proteine così alterati siano presenti a livello di membrana cellulare ostacolano il trasporto transmembrana delle sostanze, interferiscono sulla normale attività cellulare e possono determinare la rottura della parete cellulare. [32, 45]

I principali vantaggi dell'utilizzo dell'acido peracetico sono un elevato potere ossidante che lo rende il secondo ossidante più potente dopo l'ozono, la debole reattività nei confronti di sostanze inorganiche ed organiche, la scarsa influenza dalla temperatura e la bassa corrosività per le superfici.

Tuttavia la sua efficienza risente del pH poiché la sua forma attiva, responsabile dell'attività antimicrobica, è quella indissociata che è presente a pH acido e si è visto che un incremento di pH fino a 7-8 riduce drasticamente il suo potere disinfettante. [3, 56]

Diversi studi riportano che la disinfezione operata con l'acido peracetico è influenzata dalla presenza di sostanze organiche, anche se in misura inferiore rispetto all'ipoclorito, tenendo presente che tale influenza rende spesso necessario operare con dosi di disinfettante in eccesso per ottenere un residuo attivo nei confronti dei microrganismi. [45]

Per le superfici che si trovano ad essere a contatto con gli alimenti si può prevedere un residuo massimo di 200 ppm di disinfettante per assicurare un'adeguata disinfezione. [77]

In uno studio pilota condotto dall'Università di Firenze per la disinfezione delle acque reflue così da poterle riutilizzare in agricoltura, si è reso necessario un dosaggio di 500ppm di acido peracetico con 30 minuti di contatto per l'inattivazione dei coliformi totali a norma di legge (abbattimento superiore a 6 log), concentrazione che si può ridurre a 2 ppm qualora il disinfettante sia usato in associazione con gli UV. [12]

L'acido peracetico si è dimostrato inoltre efficace nell'eliminare i biofilm batterici che possono aderire sulle superfici, specialmente su quelle dove il carico di materiale organico è elevato.

Spesso nei biofilm si ritrovano batteri quali *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, microrganismi molto diffusi nell'ambiente e quindi facilmente ritrovabili nelle carni di animali e di conseguenza anche sulle superfici e sui piani di lavoro a seguito dei processi di lavorazione industriali non seguiti da un'adeguata disinfezione. A tal proposito dati di letteratura riportano come l'acido peracetico sia efficace nel ridurre questi biofilm batterici con cariche iniziali intorno a 10^8 CFU fino a 3 CFU/cm² con concentrazioni di 160 ppm dopo un solo minuto di contatto.[19,56]

Qualora l'acido peracetico sia utilizzato in combinazione con il perossido di idrogeno per la rimozione dei biofilm è stata evidenziata una modalità di azione sinergica, specialmente nei confronti di *P. aeruginosa*. [3]

Soluzioni commerciali con il 23% di perossido di idrogeno e il 4% di acido peracetico si sono risultate efficaci nel ridurre la sopravvivenza nei biofilm di *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Listeria spp*, qualora tali soluzioni siano utilizzate alla concentrazione di 1-2%, a 25°C, per un tempo di contatto di 5 minuti.[42]

L'azione battericida dell'acido peracetico è oltremodo efficace poiché in grado di inattivare anche le più resistenti forme batteriche quali le spore.

Giffel et al. (1996) riportano l'efficacia sporicida del P3 Oxonia BK, una combinazione di acido peracetico con perossido di idrogeno (2,8% di PAA e 32% di HP), nei confronti delle spore di *B. cereus* isolate su superfici di acciaio inossidabile a seguito dei processi industriali di lavorazione del latte. L'utilizzo di una concentrazione di Oxonia dello 0,7%, con 10 minuti di contatto sulle superfici contaminate e alla temperatura di 50°C ha portato a una riduzione del numero di spore di 2,5 volte rispetto al numero delle spore su superfici di controllo hanno subito alcun trattamento. [67]

Come riportato dagli autori si deve tener presente che le spore che aderiscono a una superficie sono più resistenti ai trattamenti di disinfezione rispetto alle spore presenti in sospensione in relazione al fatto che possono insinuarsi in cavità o fessure, difficilmente raggiungibili dai disinfettanti.

Inoltre si è visto come l'aggiunta di materiale organico sulle superfici contaminate da spore aumenti l'effetto sporicida del disinfettante e ciò è attribuibile al fatto che l'azione del

disinfettante è rivolta non tanto alle spore in quanto forme di resistenza, ma alle spore germinate in forme vegetative, grazie all'apporto di sostanze nutritive.

Per quanto concerne l'azione virucida dell'acido peracetico vi sono attualmente studi disponibili in campo ospedaliero e non è ancora noto il suo meccanismo di azione.

(74) hanno indagato sull'efficienza della combinazione acido peracetico e etanolo 80% da utilizzare come possibile disinfettante per le mani per il raggiungimento di una riduzione del titolo virale dell'ordine di 4 log

Si è visto che la miscela di etanolo e PAA allo 0,2% determina un'inattivazione del Poliovirus 1 entro 1 minuto di contatto, mentre la stessa concentrazione di PAA in soluzione acquosa richiede un contatto di almeno 5 minuti per ottenere la stessa efficacia virucida. [74]

1.8.2. MEZZI DI DISINFEZIONE FISICA

1.8.2.1. ATTIVITÀ MICROBICIDA DELLE ALTE PRESSIONI.

La conoscenza dell'attività microbica delle alte pressioni risale al 1895, anno in cui H. Royer scoprì che un'elevata pressione idrostatica poteva inibire la crescita di batteri. Nel 1899 Bert H. Hite esaminò gli effetti della pressurizzazione su latte, carne, frutta e vegetali e dimostrò che le alte pressioni inattivavano le forme vegetative dei batteri ma non le spore. Le ricerche però non ricevettero la debita attenzione nei successivi 80 anni. Negli anni '80 Farkas, Hover e Knorr ripeterono gli esperimenti di Hite e dimostrarono che pressioni di 50000 psi potevano inattivare gran parte delle forme microbiche patogene [76]. Ricerche parallele furono svolte da ricercatori giapponesi. L'applicazione a livello industriale delle alte pressioni risale all'inizio degli anni Novanta, quando furono introdotti sul mercato giapponese i primi prodotti commerciali (succhi di frutta, marmellate, carni intenerite, yogurt) stabilizzati con la tecnologia HHP (dal termine anglosassone High Hydrostatic pressure). A queste seguirono nuove applicazioni industriali. Le alte pressioni inibiscono i fenomeni che portano ad un aumento di volume di un sistema, cioè le reazioni con attivazione di volume positiva [23]. Al contrario sono favoriti quei fenomeni a cui consegue una diminuzione di volume del sistema (transizione di fase; cambiamento della conformazione molecolare; reazioni chimiche) in accordo con il principio di Le Chatelièr, o principio dell'equilibrio mobile [5]. In un sistema biologico o alimentare le trasformazioni indotte dalle alte pressioni sono:

Rottura e distorsione di legami chimici I legami ionici e parte delle interazioni idrofobiche sono particolarmente sensibili alle alte pressioni, che ne causano la rottura o la deformazione.

Le alte pressioni non hanno effetto sui legami covalenti e i legami idrogeno risultano fortificati.

Denaturazione delle proteine Inizia a partire da 100-200 MPa per la rottura e la deformazione di legami ionici e interazioni idrofobiche. Le proteine sono sottoposte a cambiamenti irreversibili a livello di struttura secondaria, terziaria, quaternaria e di strutture sopramolecolari; si aggregano e gelificano. Le strutture oligomeriche si dissociano in subunità, quelle monomeriche cambiano conformazione [30].

Alterazione della struttura e della funzione di lipidi e polisaccaridi Il trattamento con alte pressioni provoca cristallizzazione dei lipidi [76] e gelificazione dei polisaccaridi.

Molecole di piccole dimensioni come le vitamine non subiscono modificazioni strutturali. Le alte pressioni, comprese tra 200 e 700 MPa, esplicano attività microbicide nei confronti di cellule vegetative batteriche, lieviti, muffe e alcuni virus [30]. Questa è dovuta ad una combinazione di effetti fisiologici e biochimici [22]. Le spore batteriche, in particolare quelle di *Clostridium* [4], possono invece sopravvivere a pressioni superiori. È stato provato che i microrganismi eucarioti sono generalmente più sensibili alle alte pressioni rispetto ai procarioti [5].

AZIONE DELLE ALTE PRESSIONI SUI BATTERI

I due fattori chiave per l' inattivazione batterica sono la denaturazione di proteine ed enzimi e il danneggiamento della membrana cellulare, che è il primo punto critico delle alte pressioni sulla cellula batterica.

La sua funzionalità è fondamentale per il trasporto di molecole, per la permeabilità e per la respirazione cellulare [5]. La cristallizzazione dei fosfolipidi di membrana e la denaturazione di proteine ed enzimi portano all' alterazione della permeabilità cellulare e all' interruzione dei meccanismi di scambio ionico necessari alla vitalità della cellula batterica [30]. Sono alterati anche i processi di trascrizione e di replicazione del DNA cellulare [76] per l' inattivazione degli enzimi chiave, ma non ci sono effetti diretti sul DNA. Secondo uno studio condotto su *E. coli*, il trattamento con alte pressioni idrostatiche induce uno stress ossidativo citoplasmatico che contribuisce all' inattivazione del batterio.

Questo sarebbe il terzo fattore chiave di morte cellulare [2]. I batteri sensibili alle alte pressioni incominciano a perdere vitalità a pressioni di circa 180 MPa per l'alterazione della funzionalità di membrana e la denaturazione delle proteine. Aumentando la pressione, tra i 200 ed i 400 MPa, avvengono cambiamenti morfologici irreversibili che possono culminare con la perdita di materiale cellulare per danno alla parete cellulare con conseguente morte del batterio. Ciò è stato dimostrato con il rilascio di materiale assorbente nell'ultravioletto da parte di *E. coli* [30]. La resistenza dei batteri alle alte pressioni dipende anche da fattori intrinseci: i batteri capsulati sono più resistenti dei non capsulati e i batteri Gram positivi sono più resistenti dei Gram negativi [23]. Questo per il fatto che la loro parete cellulare, da cui dipende la resistenza alla pressione e ad altri agenti esterni, è ricoperta per il 90% da uno spesso strato di peptidoglicano, e quindi dotata di maggiore resistenza [5]. Anche la fase di sviluppo è importante per la resistenza microbica: le cellule in fase logaritmica sono più sensibili alle pressioni di quelle in fase stazionaria. I microrganismi in condizioni di stress sono più sensibili alle alte pressioni, quelli che sopravvivono però acquistano maggiore resistenza. Come per il calore, la mortalità non è lineare ma si hanno delle code [23].

L'alta resistenza delle spore alle alte pressioni è dovuta alla complessità della loro struttura. La presenza di acido dipicolinico e ioni calcio, oltre al peptidoglicano conferisce alta resistenza a calore, pressione e altri agenti [5].

AZIONE DELLE ALTE PRESSIONI SUI VIRUS

Per comprendere il meccanismo d'inattivazione virale delle alte pressioni è importante la conoscenza della struttura del virus. L'azione virucida delle alte pressioni è attribuita alla denaturazione e dissociazione di proteine virali [30]. I virus non hanno struttura cellulare, sono parassiti endocellulari obbligati, incapaci di riprodursi in assenza di cellule viventi, con dimensioni dai 10 ai 300 nm. Sono costituiti da RNA o DNA racchiusi in un involucro proteico denominato capside. Il capside funge da barriera protettiva primaria per la particella virale ed è vitale nel proteggere il genoma virale dalla degradazione dovuta a fattori ambientali avversi. Nel caso di alcuni virus, come quelli enterici umani, il capside è necessario per l'attacco ai recettori della cellula ospite ed il rilascio del genoma virale al suo interno [51]. Il capside di alcuni virus è avvolto da una membrana limitante esterna,

detta envelope, di natura lipidica a struttura bilaminare con proteine transmembrana [53]. L'attività virucida non è dovuta ad un danneggiamento diretto del materiale genetico, bensì alla modificazione delle proteine di capsidi ed envelope. È infatti provato che pressioni di 300 MPa non hanno effetti significativi sulla struttura di proteine a catena singola e su acidi nucleici [68]. La dissociazione di proteine oligomeriche e di virus a simmetria icosaedrica è reversibile [62]. La reversibilità della dissociazione dipende dal numero di subunità e dalla complessità delle loro interazioni nell'aggregato originale [68]. Rispetto alle proteine oligomeriche, le particelle virali presentano una maggiore complessità. Nel caso dei virus con envelope, dalla struttura più complessa, ci si aspetta una completa irreversibilità degli effetti. In questi virus l'azione denaturante delle alte pressioni sulle proteine, oltre a modificare le interazioni tra le subunità del capsidi, compromette anche i contatti tra proteine di membrana, lipidi ed RNA. Studi su Herpes simplex e Citomegalovirus hanno dimostrato che il danno all'envelope virale impedisce il legame al recettore della cellula ospite e quindi l'infezione. Nel caso dei virus privi di envelope, o virus "nudi", l'azione denaturante sulle proteine modifica le interazioni tra capsidi e acidi nucleici. I virus icosaedrici sono inattivati per dissociazione del capsidi in subunità ed esposizione del genoma virale a fattori ambientali. Nel caso del virus A dell'epatite invece, secondo gli studi di Kingsley, il capsidi può rimanere intatto in seguito al trattamento con alte pressioni [36]. L'inattivazione è dovuta alla denaturazione di quelle proteine del capsidi essenziali per l'adsorbimento alla cellula ospite, e non al rilascio di RNA per distruzione del capsidi. I virus hanno dimostrato un ampio range di suscettibilità alle alte pressioni, che non sempre è prevedibile in base a nomenclatura e morfologia del virus [30] e può dipendere da diversi fattori. Ciò è evidente all'interno della famiglia delle Picornaviridae, che comprende virus come l'HAV sensibili e altri resistenti alle alte pressioni. I picornavirus hanno struttura del capsidi simile, quindi morfologia simile, ma ci sono considerevoli differenze genetiche tra i vari generi, da cui può dipendere la differente sensibilità alla pressione. Questa può essere collegata anche al tipo di legame con i recettori della cellula ospite e al meccanismo di penetrazione del virus [35]. Alcuni studi effettuati sui virus rivelano che gli effetti dell'alta pressione, se presenti, sono indipendenti dalla concentrazione di particelle virali [62]. L'unica spiegazione è che le particelle virali, come anche le proteine oligomeriche costituite da varie subunità, sono estremamente eterogenee, e da ciò risulta un'"individualità termodinamica" delle particelle.

AZIONE DELLE ALTE PRESSIONI SUI MICETI

Il punto critico per l' inattivazione dei miceti con alte pressioni è la membrana citoplasmatica. La denaturazione delle proteine e la cristallizzazione dei fosfolipidi porta all' alterazione della permeabilità cellulare e ai meccanismi di scambio ionico necessari per la funzionalità delle cellule [30]. L' azione delle alte pressioni porta anche a danneggiamento e deformazione delle membrane degli organelli cellulari e a danno meccanico alla parete cellulare. Nella cellula di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) i primi cambiamenti morfologici dovuti all' alta pressione sono a carico degli organelli cellulari: vacuoli e nucleo cellulare vengono fortemente deformati. A questi segue, a pressioni tra i 400 ed i 500 MPa, danno meccanico e distruzione della parete cellulare [78]. Tra i miceti, i più resistenti sono le muffe, che sono inattivate con pressioni di 350 MPa. Per inattivare i lieviti sono sufficienti invece 300 MPa. Le spore fungine (conidi) sono facilmente inattivate a pressioni di 300 MPa (*Aspergillus oryzae*) o 400 MPa (*Rhizopus javanicus*) a temperatura ambiente. Ascospore di muffe termoresistenti come *Byssoschlamis nivea* sono però estremamente resistenti all' alta pressione e richiedono per l' inattivazione pressioni superiori ai 600 MPa e temperatura superiore ai 60 °C [52].

1.9. METODI DI RILEVAMENTO VIRALE

Nonostante l'importanza epidemiologiche le infezioni virali trasmesse da alimenti rappresenti, come già più volte detto, un importante problema di sanità pubblica, esiste ancora un importante limite per quanto riguarda le tecniche di rilevamento virale da matrici alimentari.

Per molti anni l'uso del microscopio elettronico ha rappresentato il più importante mezzo di identificazione di virus gastroenterici non coltivabili, questo però presenta un importante limite rappresentato dalla bassa sensibilità in quanto sono necessarie alte cariche, nell'ordine di milioni di particelle virali, per far sì che sia possibile confermare un campione positivo. Questo strumento può essere facilmente impiegato per quanto riguarda campioni fecali dove possono essere presenti alte cariche, mentre per quanto riguarda gli alimenti solo raramente si raggiungono concentrazioni virali così elevate. In letteratura

esistono solo pochi casi in cui sono stati ritrovati campioni di mitili positivi con questa tecnica.

Negli ultimi anni il rilevamento di virus non citopatogeni ha visto l'introduzione di nuove tecniche immunoenzimatiche e tecniche di biologia molecolare, che hanno trovato largo impiego nell'identificazione di numerosi virus gastroenterici come astrovirus, adenovirus enterici, e norwalk like viruses.

I test immunoenzimatici hanno trovato largo impiego nell'analisi clinica, inclusi i casi di infezioni alimentari, aiutando a determinare l'importanza epidemiologica di questi virus.

I saggi immunoenzimatici, così come il microscopio elettronico, necessita di alte cariche virali per ottenere una reazione positiva, essendo quindi utile nell'analisi di campioni biologici ma non per lo screening degli alimenti.

Ciò non va sottovalutato in quanto la dose minima infettante ad esempio per i virus di norwalk è di 10-100 particelle virali.

Il clonaggio e il sequenziamento di diversi virus enterici ha permesso l'introduzione di nuove tecniche tra cui quelle di ibridazione del acido nucleico, ma anche in questo caso con scarso successo, sempre legato al problema della bassa sensibilità.

Al giorno d'oggi trovano largo impiego le tecniche di biologia molecolare che permettono di mettere in evidenza anche piccole quantità di materiale genico, senza l'uso delle colture cellulari.

1.9.1. METODI DI AMPLIFICAZIONE GENICA

Amplificazione degli acidi nucleici

PCR (reazione della polimerasi a catena)

Nel 1983 è stato sviluppato da Mullis un semplice metodo di amplificazione selettiva di una piccola regione genica, e questo processo è stato denominato reazione a catena della polimerasi a catena. (PCR). In pochi anni e dopo alcune modifiche la PCR è divenuta la tecnica più utilizzata per l'amplificazione genica.

La tecnica della PCR è basata sulla ripetizione di un processo a tre fasi: denaturazione del doppio filamento, appaiamento dei primers al DNA e da una fase di estensione enzimatica dei primers. Queste diverse fasi sono caratterizzate dalla temperatura, infatti la denaturazione generalmente viene fatta ad una temperatura di circa 95°C, l'estensione a 72°C mentre la temperatura di appaiamento dipende dalla sequenza dei primers, che viene calcolata attraverso la seguente formula:

$$T (^{\circ}\text{C}) = (n^{\circ}\text{A} + n^{\circ}\text{T}) \cdot 2 + (n^{\circ}\text{G} + n^{\circ}\text{C}) \cdot 4$$

Dove ATGC sono le basi presenti nei primers

Al termine della fase di estensione i nuovi filamenti fungono da templati per il secondo ciclo di amplificazione. Ogni ciclo di PCR, pertanto, raddoppia la quantità di DNA specifico presente. Uno dei miglioramenti apportati alla PCR è stata l'uso dell'enzima termoresistente Taq DNA polimerasi, che ha consentito la semiautomazione e la semplificazione del processo.

Esistono diversi tipi di PCR, tra cui la "nested PCR" che consiste in una amplificazione di DNA bersaglio e nella successiva amplificazione di un segmento interno alla regione precedentemente amplificata.

La "PCR in situ" con la quale è possibile amplificare il DNA di cellule bersaglio morfologicamente intatte dopo un trattamento blando con enzimi proteolitici.

Ed in fine la "quantitative competitiv PCR" che misura il numero di copie di menoma virale in un campione biologico

Reazione a catena della ligasib 8LCR

La reazione di amplificazione con la Ligasi è un'altra tecnica di amplificazione di una regine bersaglio. Rispetto alla PCR questa tecnica utilizza una ligasi termostabile per unire due oligonucleotidi che sono immediatamente adiacenti l'uno all'altro.

Anche questa tecnica prevede diversi cicli, ma diversamente dalla PCR che richiede due primers, per ottenere alti livelli di sensibilità e di specificità, utilizza quattro oligonucleotidi.

Sistemi di amplificazione basati sulla trascrizione: TAS e NASBA

Nel 1989 Kwoh e coll. Hanno descritto un sistema di amplificazione degli acidi nucleici basato sulla trascrizione del DNA in RNA detto TAS (transcription-Based Amplification System) che consiste nella ripetizione di un ciclo composto da due fasi. Nella prima fase il DNA denaturato o una catena di RNA diventa il bersaglio di una transcriptasi inversa con attività DNA polimerasica, RNA e DNA dipendente. Dopo l'ibridazione del primer al bersaglio la transcriptasi allunga il primer in modo complementare alla sequenza bersaglio.

Dopo la denaturazione al calore un altro oligonucleotide si appaia al nuovofilamento di DNA e la transcriptasi produce una nuova molecola di DNA a doppio filamento. Nella seconda fase un'RNA polimerasi produce molte copie di RNA ognuna delle quali compie un nuovo ciclo.

Un importante sviluppo del metodo TAS è rappresentato dalla “Nucleic Acid Sequence Based Amplification” (NASBA), questo è una tecnica di amplificazione isoterma inizialmente descritta per l’RNA, ma adattabile anche al DNA, in cui si fa uso di un primer iniziale che porta legata una sequenza promotore per l’RNA polimerasi.

Il primer-promotore si lega al filamento di RNA bersaglio, consentendo alla trascrittasi inversa di sintetizzare il singolo filamento complementare di DNA. Successivamente il filamento originale di RNA viene degradato ad opera di una ribonucleasi, mentre il nuovo filamento di cDNA rimane intatto. A questo punto si aggiunge un secondo primer che si lega al cDNA, consentendo la sintesi del filamento complementare.

Il DNA così ottenuto conterrà la sequenza promotore per la RNA polimerasi, che potrà trascriverlo in migliaia di copie di RNA complementare.

PCR Real-Time

La PCR “in tempo reale” utilizza una metodica che permette di evidenziare il prodotto dell’amplificazione nel momento stesso in cui si forma.

Questa tecnica si basa sull’impiego di sonde marcate con composti fluorescenti e sfrutta l’attività 5’-3’ esonucleasica della Taq DNA polimerasi. [46, 79]

La PCR Real Time è in grado di misurare in tempo reale la concentrazione iniziale di una sequenza target in un campione biologico.

La costruzione e l’introduzione di sonde che utilizzavano marcatori fluorescenti hanno poi agevolato la diffusione della tecnica, ciò ha permesso l’abbandono di marcatori radioattivi e l’ottenimento di una maggiore specificità di reazione. progettarono un tipo di sonda caratterizzata dal fatto di essere un oligonucleotide dotato sia di un fluorocromo “reporter” che di un “quencher”. [44]

Quando la sonda è intatta, la fluorescenza del reporter è spenta dalla vicinanza del quencher, secondo la legge di Forster; ma quando la sonda è rotta dalla Taq polimerasi, l’attività dei fluorocromi viene rilevata. In questo modo si evita di ricorrere all’analisi post-PCR per risalire alla quantità di sonda degradata.

Uno dei saggi più diffusi per PCR real-time è il sistema “TaqMan”, il quale utilizza una sonda contenente due fluorocromi: FAM (6-carboxy-fluorescein) come reporter fluorescente legato covalentemente all'estremità in 5' e TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) come quencher fluorescente legato covalentemente all'estremità in 3'.

L'evoluzione della tecnica di PCR proposta dal saggio TaqMan permette oggi una drastica riduzione sia dei tempi di esecuzione che del materiale consumato, utilizzando un solo strumento ed eliminando completamente l'impiego di reagenti radioattivi o tossici. Comparato alle PCR tradizionali, il test non solo mantiene spiccate caratteristiche di sensibilità, ma garantisce anche decisivi miglioramenti in termini di specificità, di precisione e di intervallo di quantificazione del campione incognito. Questi vantaggi sono dovuti ad un innovativo sistema di rilevamento e di misurazione in tempo reale del DNA amplificato che consente sia di ridurre il numero delle repliche necessarie alla determinazione di ogni campione, sia di abbandonare tutte le manipolazioni successive all'amplificazione che rappresentavano una potenziale fonte di alterazione dei risultati [29].

Data la sua specificità per la sequenza target, la sonda si appaia ai prodotti di amplificazione nella regione compresa tra i primers forward e reverse. Se è avvenuta l'ibridazione, l'attività 5' esonucleasica della *Taq* polimerasi rompe la sonda interna durante la fase di estensione, emettendo un segnale di fluorescenza. Poiché lo sviluppo della fluorescenza del reporter si ha solo se i primers e la sonda legano il DNA target, la specificità della PCR real-time è considerevolmente più alta rispetto alla PCR convenzionale.

La possibilità di utilizzare vari tipi di fluorocromi per marcare sonde diverse consente inoltre di rilevare contemporaneamente più di una sequenza target in una sola reazione, realizzando così una reazione in multiplex. Uno svantaggio sta invece nell'obbligo di sintetizzare, per ogni target, una sonda *ad hoc*.

In aggiunta alle sonde “TaqMan” sono state proposte e brevettate altri tipi di sonde specifiche, quali FRET (Förster resonance energy transfer), Molecular Beacons e sonde Scorpion™. [70, 72, 73]

La sonda FRET da un elevato livello di specificità dovuto all'uso di due sonde che ibridizzano in regioni adiacenti. Il terminale 3' di una sonda è coniugato con un fluoroforo donatore, mentre il terminale 5' di una sonda adiacente è marcato con un fluoroforo

accettore. Nella fase di annealing di ciascun ciclo di PCR, le sonde legano le sequenze target, inducendo l'emissione di un segnale fluorescente.

La sonda Molecular Beacons è un oligonucleotide che forma una forcina, la cui sequenza è complementare al bersaglio amplificato, e un piccolo tratto duplex formato da 5-7 coppie di basi. Un'estremità è marcata con un reporter mentre l'altra con un quencher. Quando la sonda è libera in soluzione, il reporter e il quencher si trovano appaiati e non si ha emissione di fluorescenza. Nella fase di annealing di ciascun ciclo di PCR, la forcina si lega alla sequenza bersaglio ed il quencher si allontana dal reporter, che emetterà fluorescenza che verrà rilevata dalla macchina. Sebbene il saggio Molecular Beacons sembra essere poco diffuso rispetto a quello delle sonde "TaqMan" e FRET per l'applicazione in PCR quantitativa, esso è largamente usato per discriminare differenze di sequenza puntiformi (SNP) [69].

Infine, la sonda Scorpions è un primer con l'estremità 5' legata ad una molecola simile ad una sonda Molecular Beacons. Durante la PCR, il primer Scorpions viene esteso e la sequenza specifica della sonda che forma l'ansa è in grado di legare la sequenza complementare che si trova all'interno dello stesso filamento di DNA. Come una sonda Molecular Beacons, l'ibridazione apre l'ansa e allontana il reporter dal quencher e si ha emissione di fluorescenza misurabile.

In alternativa alle sonde fluorogeniche, l'accumulo di amplificati in Real Time si può seguire utilizzando coloranti specifici del DNA con i seguenti vincoli: capacità di emettere fluorescenza crescente all'aumentare degli amplificati legati e capacità di non interferire in alcun modo nell'evolversi della reazione PCR (Applied Biosystem), con sensibilità paragonabile a quella del bromuro di etidio.

I prodotti di PCR possono essere caratterizzati anche attraverso l'analisi delle curve di melting. Ogni amplicone avrà infatti una sua specifica temperatura di melting, che dipende della sua composizione in basi.

Gli strumenti per PCR Real Time, oltre a fungere da termociclatori, eccitano, durante la PCR con un laser a ioni argon o con lampade al tungsteno, i fluorocromi presenti nei campioni e convogliano quindi la fluorescenza emessa in risposta lungo fibre ottiche fino ad uno spettrografo che provvede a separare le componenti del reporter e del quencher. Appositi software acquisiscono lo spettro di emissione di ogni singolo campione per tutta la durata della PCR e convertono la variazione di fluorescenza del reporter in una rappresentazione in tempo reale della cinetica d'amplificazione. In maggiore dettaglio,

L'algoritmo di analisi calcola l'emissione del reporter (R) e del quencher (Q) ogni pochi secondi. I valori di ΔR_n riflettono la quantità di sonda fluorescente degradata e possono essere rappresentati in un grafico in funzione del numero dei cicli. Contemporaneamente, l'algoritmo determina il ciclo soglia che corrisponde ad effettiva emissione di fluorescenza, scorporata dal rumore di fondo. Il calcolo della quantità di DNA dei campioni incogniti viene effettuata determinando il ciclo della PCR (ciclo soglia, Ct) in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del reporter e dove cioè i segnali di amplificazione specifici sono separabili da quelli del rumore di fondo del sistema. Il numero dei cicli necessari perché un campione raggiunga il suo Ct è inversamente proporzionale al numero di copie target presente inizialmente. Una curva di referenza costruita con i Ct di campioni standard a contenuto di DNA noto in funzione del logaritmo della relativa quantità di DNA consente poi l'estrapolazione del contenuto di DNA nei campioni incogniti. Il vantaggio in termini di precisione e di intervallo di quantificazione rispetto alle PCR tradizionali, è dovuto alla possibilità di quantificare il DNA al ciclo soglia, che è sempre calcolato nella fase esponenziale della reazione PCR, fase in cui i reagenti sono ancora lontani dall'esaurimento e gli elementi di variabilità sono così ridotti al minimo.

1.10. METODI DI RILEVAMENTO VIRALE SUGLI ALIMENTI

L'agente eziologico responsabile di molte epidemie, dovute al consumo di alimenti contaminati, spesso non viene identificato, anche se si pensa che in molti casi siano i virus enterici la principale causa. L'impossibilità di confermare l'origine virale di queste infezioni è spesso dovuta ad una mancanza di tecniche sensibili ed affidabili per il rilevamento virale sugli alimenti. [66]

Il monitoraggio microbiologico rappresenta un importante mezzo per garantire la sicurezza di un alimento. Tecniche rapide, semplici e sensibili per il rilevamento di virus in alimenti ed in acqua possono essere di aiuto per stabilire le cause e la sorgente di infezione fornendo anche importanti per capire dal punto di vista epidemiologico le caratteristiche delle epidemie. [11] Esistono tecniche efficaci per il rilevamento su campioni biologici provenienti da soggetti infetti, ma questo è possibile perché le cariche virali presenti in questi campioni sono molto alte, mentre negli alimenti le cariche sono generalmente molto basse, va ricordato che comunque i virus hanno una bassa dose infettante.

La difficoltà della messa appunto di queste tecniche dipende da diversi fattori: le ridotte dimensioni del virus, l'elevato grado di diluizione che subiscono nell'ambiente, la capacità dei virus a formare aggregati, la grande variabilità delle specie virali con conseguente variabilità genica, la presenza di contaminazioni multiple con eventuale interferenza, la variabilità degli alimenti e la presenza di sostanze inibenti.

Un altro importante problema è rappresentato dal fatto che due dei più importanti virus enterici, quali i Norovirus e il virus dell'epatite A, non crescono in coltura, risulta difficile la messa a punto di una metodica utilizzando questi virus, infatti per gli studi sperimentali vengono impiegati dei surrogati.

Risulta quindi fondamentale la standardizzazione di una tecnica che permetta di mettere in evidenza la presenza di virus negli alimenti.

Il metodo ideale mira ad ottenere un prodotto finale da sottoporre a tecniche di biologia molecolare per il rilevamento di virus, che non interferisca con esse, in oltre sarà importante trovare una metodica che permetta di concentrare il virus da qualsiasi campione alimentare.

Importanti passi in avanti sono stati fatti nello sviluppo di tecniche che prevedono due step fondamentali: il "trattamento del campione" da cui vengono rimossi e concentrati i virus; e il "rilevamento virale" vero e proprio attuato attraverso tecniche di biologia molecolare o attraverso l'impiego delle colture cellulari.

Per quanto riguarda l'estrazione virale, fase chiamata eluizione, viene fatta ad opera di una soluzione tampone. Questo passaggio fondamentale è basato sul fatto che l'adsorbimento virale, a tessuti o ad altre superfici, è regolato dal pH, questo importante fattore permette nella fase di eluizione separare il virus operando in condizioni di pH basico e fornendo siti di legame che competono con quelli su cui il virus si trova adsorbito. seguita da una fase di chiarificazione ottenuta mediante centrifugazione al fine di separare le particelle solide. [6, 10, 33,]

A questo punto l'eluato così ottenuto va sottoposto a una fase di concentrazione che può essere fatta impiegando la precipitazione acida, flocculazione filtrazione, l'adsorbimento con eluizione alcalina ed ultrafiltrazione, l'adsorbimento con eluizione alcalina e precipitazione, eluizione-precipitazione.

Preparazione del campione

Principi generali

I campioni devono essere raccolti in condizioni di asepsi e successivamente refrigerati, per poter poi essere così utilizzati dopo un periodo di tempo di 48-72 ore, oppure possono essere congelati a -70°C .

Prima di procedere con l'analisi seguendo le metodiche vigenti, è necessario sottoporre il campione ad un trattamento preliminare costituito da tre passaggi fondamentali:

. *Eluizione.* Il virus necessita di essere estratto dalla matrice alimentare. La fase di trattamento del campione prevede quindi un omogeneizzazione del campione in una soluzione tampone, chiamata elution buffer, operata mediante agitazione vigorosa, fino ad ottenere una soluzione omogenea. Per mantenere l'integrità del virus si rende necessario l'uso di una soluzione tampone, e ciò è particolarmente importante se deve essere conservata l'infettività del virus come nel caso di ricorso a colture cellulari per l'indagine. I metodi più semplici, ma al contempo molto laboriosi, sono la macinazione con mortaio e pestello (resa più efficace dalla presenza di sabbia sterile) e il taglio con un coltello a scalpello. Gli omogenizzatori automatici e i bagni ad ultrasuoni sono i più efficienti e permettono di trattare un elevato numero di campioni con più facilità.

Chiarificazione. Il virus, che si trova a questo punto in sospensione, viene recuperato attraverso centrifugazione, assorbimento su colonna o filtrazione, per rimuovere il particolato di origine alimentare. La rimozione della sostanza alimentare è particolarmente importante per il rilevamento di virus per i quali è previsto l'impiego di colture cellulari, dal momento che molti alimenti sono tossici per le linee cellulari standard utilizzate. Recentemente sono stati utilizzati anche metodi chimici (etere etilico o freon) e la separazione immunomagnetica, quest'ultima consente anche di concentrare il virus.

Concentrazione. I virus solitamente sono presenti in basse cariche nei campioni alimentari e quindi si rende necessaria la loro concentrazione. Se si parte da un campione piuttosto grande il recupero del virus si può ottenere attraverso ultrafiltrazione, ultracentrifugazione, o dialisi mediante idonee membrane (utilizzando un attrattore osmotico come polietilenglicole e/o destrano).

La scelta del metodo più idoneo a cui ricorrere per la preparazione del campione dipende da diversi aspetti che comprendono la valutazione del tipo di matrice alimentare (volume

del campione, consistenza del campione), il metodo di rilevamento utilizzato e il microrganismo cercato.

Per quanto concerne la concentrazione dei virus enterici da volumi variabili di acqua e alimentari, attualmente si hanno a disposizione numerose tecniche e le più rappresentative sono:

Flocculazione-filtrazione

Flocculazione di alimenti solidi con soluzioni polielettrolitiche, seguita da rimozione mediante filtrazione o centrifugazione. Il principio di questo metodo si basa sul fatto che le sostanze alimentari che possono essere tossiche per le colture cellulari vengono rimosse in modo più efficace rispetto all'utilizzo della sola centrifugazione. Un flocculante disponibile in commercio, Cat-floc è risultato avere un'efficacia maggiore rispetto agli reperibili in commercio. [39, 40, 41]

Precipitazione acida

. Questo metodo prevede l'aggiunta di acido cloridrico (HCl) con un pH pari a 3,0-3,5 al campione di alimento omogeneizzato. Esso ha permesso un recupero del virus Coxsackie B5 inoculato in ostriche, vongole e molluschi, dell'ordine del 50-60%. (38)

Adsorbimento con eluizione alcalina ed ultrafiltrazione Il virus viene prima adsorbito sull'alimento omogeneizzato, eluito da questo agendo sul valore del pH e poi concentrato mediante ultrafiltrazione. Il valore di pH preciso utilizzato per l'eluizione e l'adsorbimento dipende dal tipo di virus che si va a ricercare. [64]

Adsorbimento con eluizione alcalina e precipitazione. Questo metodo è una variante del metodo descritto nel punto precedente, che consente di ottenere un simile recupero virale, in percentuale, ma necessita di un tempo minore. Esso può essere modificato aggiungendo un flocculante nel passaggio di eluizione ed eliminando il successivo passaggio di filtrazione. [13, 17, 63, 65]

Eluizione-precipitazione

Il virus viene direttamente eluito dall'alimento. Un recente studio comparativo ha mostrato come il metodo basato su questa tecnica consente di ottenere una migliore resa percentuale di recupero virale senza ricorrere al passaggio iniziale di adsorbimento. [43, 55, 71]

Queste tecniche si possono utilizzare per alimenti quali molluschi bivalvi, prodotti di origine animale, latte e vegetali e frutta, effettuando modifiche dei vari parametri a seconda della matrice alimentare presa in considerazione [8].

2. BIBLIOGRAFIA

1. .Abad F.X., Pinto R.M., Bosch A. (1994): "*Survival of enteric viruses in environmental fomites*". Applied and environmental Microbiology:60;3704-3710.
2. Aertsen Abram, De Spiegeleer Philipp, Vanoirbeek Kristof, Lavilla Maria, Michiels Chris W. (2004), "*Induction of Oxidative Stress by High Hydrostatic Pressure in Escherichia coli*" , Applied and Environmental Microbiology , May 2005, 2226-2231
3. Alasri A., Roques C., Michel G. (1992): "*Bactericidal proprietes of peracetic acid and hidrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains*". Can. J. Microbial.: 38; 635-642.
4. Alpas H. et al. (1999), "*Variation in Resistance to Hydrostatic Pressure among Strains of Foodborne Pathogens*", Applied and Environmental Microbiology , Sept.1999, Vol. 65, No 9, 4248-4251
5. Arroyo G., Sanz P. D., Préstamo G. (1996), "*Effect of high pressure on the reduction of microbial populations in vegetables* ", Journal of Applied Microbiology , 1997, 82, 735-742
6. Atmar R., et al. (1995): "*Detection of Norwalk like virus and hepatitis A virus in shellfish tissuse with the PCR*" Appl. Environ. Microbiol. 61:3014-3018
7. Beller M., et al. (1997): "*Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well-international consequences*". J. Am. Med. Assn. 278:563-568
8. Blackie Academic & Professional; Chapman & Hall (1994) "*Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology*" Edited by P. Patel: cap. 6, 173-180.
9. Blackkmer F., Reynolds KA., Gerba CP., Pepper IL. (2000): "*Use of Integrated Cell Culture-PCR to Evaluate the effectiveness of Poliovirus Inactivatio by Chlorine*" Applied and Enviromental Microbiology: 66;2267-2268
10. Bouchriti N., Goyal S. (1992): "*Evaluation of three methods for the concentration of Poliovirus from oyster*" Microbiological 15:403-408
11. Bresee JS., Widdowson MA., Monroe SS., Glass RI. (2002): "*Foodborne viral gastroenteritis: challenges and opportunities*" Clin. Infect. Dis. 35: 748-753
12. Caretti C. , Lubello C. (2003) "*Wastewater disinfection with PAA and UV combined treatment: a pilot plant study*". Water Ressearch: 37;2365-2371
13. Cole MT., Kilgen MB., Hackney CR. (1986): "*Evaluation of methods for extration of enteric viruses from Luisiana Oyster*". J. Food Prot.; 49, 592-595

14. Daniels NA., Bergmire-Sweat DA., Schwab KJ. (2000): "*A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwal-like viruses: first molecolare traceback to deli sandwiches contaminated during preparation*" J. Infect Disease: 181: 1467-1470
15. De Boer E., Beumer RR. (1999): "*Methodology for detection and typing of Foodborne microorganisms*". Int. J. Food Macriobiology: 50; 119-130
16. Dychdala GR: (1991): "*Chlorine and Chlorine compounds*". S.S. Block: Disinfection, Sterilization and Preservation (Ivedition); 131-141
17. Ellender RD.et al. (1980): "*Natural enterovirus and fecal coliform contamination of Gulf Coast oyster*". J. Food prot.; 43, 105-110
18. Fang Ma J. et al (1994): "*Cell Culture and PCR Determination of Poliovirus inactivation by disinfectants*". Applied and Environmental Microbiology: 60;4203-4206
19. Fatemi P., Frank JF. (1999): "*Inactivation of Listeria monocitogenes/Pseudomonas biofilm by Peracid Sanitizer*". Journal of Food Protection: 62; 761-765
20. Fiore A., Delibato E. (2003): "*Importanza dei virus enterici nelle malattie trasmesse dagli alimenti*" rapporti ISTISAN 03/03:42-22
21. Fiore AE. (2004): "*Hepatitis A transmitted by Food*". Food safety:38;705-715
22. Flick George (2003), "*Effect of High Hydrostatic Pressure Processing on Listeria spp. Microorganisms*", Global Aquaculture Advocate , volume 6, numero 2
23. Galli Volonterio Antonietta (2005). "*Microbiologia degli Alimenti*", Milano, Casa Editrice Ambrosiana
24. Gaulin C., Frigon M., Poirier D., Fournier C. (1999): "*Transmission of calicivirus by a foodhandler in the pre-syntomatic phase of illines*". Epidemiol. Infect. 123:475-478
25. Gerba C., Rose JB., Haas CN. (1996): "*Sensitive population who is at the greatest risk?*" Int. J. Food Microbiol. 30:113-123
26. Gordon C., Toze S. (2003): "*Influence of ground water characteristics on the survival of enteric viruses*" Journal of Applied Microbiology: 95;536-544.
27. Green KI., AndoT., Balayan MS, et al. (2000): "*Caliciviridae*". 7th Report of International Committee on taxonomy of Viruses. Orlanod (FL): Accademic press: 725-735

28. Greening GE., Hewitt J. Lewis GD. (2002): "*Evaluation of integrated cell culture –PCR (ICC-PCR) for virological analysis of environmental samples*". J. of Applied Microbiology: 93; 745-750
29. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J. and P.M. Williams (1996). "*Real Time Quantitative PCR*". PCR Methods & Application., 6 (10): 986-994.
30. Hoover Dallas G. et al. (2006), "*Inactivation of Foodborne Viruses of Significance by High Pressure and Other Processes*" , Journal of Food Protection, Vol. 69, No. 4, 957-968
31. Hot D. et al. (2003): "*Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicator of human enteric viral pollution in surface water*" Water Research: 37; 4703-4710
32. Jensen H., Thomas K., Sharo DG. (1980): "*Inactivation of Coxsackievirus B3 and B5 in water by chlorine*" Applied and Environmental Microbiology: 40; 633-640
33. Katzenelson E., Fattal B., Hostovesky T. (1976): "*Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water*" Appl. Environ. Microbiol. 32:638-639
34. Khon MA. Et al. (1995): "*An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oyster. Implications for maintaining safe oyster beds*". J. aM. Med. Assn. 273:1492
35. Kingsley David H., Haiqiang Chen, Hoover Dallas G. (2004), "*Inactivation of selected picornaviruses by high hydrostatic pressure*", Virus Research 102, 221-224
36. Kingsley David, Hoover Dallas G., Papafragkou Efi, Richards Gary P. (2002), "*Inactivation of Hepatitis A Virus and a Calicivirus by High Hydrostatic Pressure*", Journal of Food Protection , Vol. 65, No. 10, 1605-1609.
37. Klein D. (1999): "*Proviral load determination of different feline immunodeficiency virus using real-time polymerase chain reaction: influence of mismatches on quantification*" Electrophoresis: 20; 291-299
38. Konowalchuk J., Spiers JI. (1972): "*Enterovirus recovery from laboratory-contaminated sample of shellfish*" Can J. Microbiol; 18,1023-1029
39. Kostembader KD., Cliver OD. (1972): "*Polyelectrolyte flocculation as an aid to recovery of enteroviruses from oysters*". Appl. Microbiol.; 24,540-543

40. Kostembader KD:, Cliver OD. (1973): "*Filtrtion methods for recovering enteroviruses from food*". Appl. Microbiol. 26,149-154
41. Kostembader KD:, Cliver OD. (1981): "*Floculants for recovery of food-borne viruses*" Appl. Environ. Microbiol; 41, 318-320
42. Kumar C., Anand SK., (1998): "*Significance of microbial biofilm in food industry: a review*" Int. J. Food Microbiology: 49;9-27
43. Landry EF., Vaughn JM., Vicalè TJ. (1980): "*Modified procedure for extration of poliovirus from natural infected oysters using Cat-floc and beef extract*". J. Food Prot.; 43, 91-94
44. Lee L.G., Connel C.R. and W. Bloch (1993). "*Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probs.*" Nucleic Acids Research., 21: 3761-3766.
45. Li JW. Et al. (2002): "*Mechanism of inactivation of hepatitis A virus by chlorine*" Applied and Environmental Microbiology: 68; 4951-4955
46. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. (2002): "*Real-time PCR in virology.*" Nucleic acids Researce; 30:1292-305
47. Mead PS. Et al. (1999): "*Food-related illness and death in the United States*" Emerg. Infect Dis; 5 (5):607-625
48. Mele A., Rastelli MG:, Gill ON. (1989): "*Recurrent epidemic hepatitis A associated with consumption of raw shellfish, probably controlled throught public health measures*" Am. J. Epidemiol.: 130; 540-546
49. Mele A., Stroffolini T., Pasquini P. (1996): "*SEIEVA Intergrated Epidemiological System for Acute Viral Hepatitis*". Rapporto ISTISAN 96/3. Roma ISS.
50. Nasser A.M., Tchorch Y., Fattal B. (1993): "*Comparative survival of E.coli, F super (+) bacteriophages, HAV and Poloiovirus 1 in wastewater and groundwater*" . health Related Water Microbiology: 27;401-407.
51. Nuanualsuwan Suphachai, Cliver Dean O. (2002), "*Capsid Functions of Inactivated Human Picornaviruses and Feline Calicivirus*" , Applied and Environmental Microbiology , Jan. 2003, 69(1), 350-357
52. Palou E. et al. (1998), "*Effect of oscillatory high hydrostatic pressure treatments on Byssochlamys nivea ascospores suspended in fruit juice concentrates*" , Letters in Applied Microbiology , 27, 375-378
53. Poli Giorgio, Cocilovo Alessandra (1996), Microbiologia e Immunologia Veterinaria, Torino, UTET

54. Ponka A., Maunual L., Bonsdorff CH., Lytikainen O. (1999): "*An outbreak of calòicivirus associated with consumption of frozen raspberries*". Epidemiol. Infect. 123:469-474.
55. Richards GP., Coldminz D., Babinchak L. (1982): "*Rapid method for extration and concentration of poliovirus from oyster tissuse*". J. Virol. Method.; 51, 285-291
56. Riveira EV. (2005): "*A review of chemical disifection methods for minimally processed leafy vegetables*". Food Sciens Graduate Program Colleg of Agriculture, Kansas State University.
57. Robert L., Atmar MD., Mary K. (2006): "*The Epidemiologic and Clinical Importance of Norovirus Infection*" Gastroenterologiy Clinics of North America. Vol.35 ISS2: 275-290
58. Sansebastiano G. (2001): "*Indagine sull'attività disinfettante dei perossidi in presenza di sostanze organiche e su biofilm batterici*". Annali della Facoltà di Medicina e Veterinaria: vol. XXI; 315-324
59. Sapers GM. (2003): "*Washings and saniting raw materials for minimally processed fruits and vegetables*". Microbial safety of Minimally Processed Foods, CRC Press; 221-253.
60. Schmidt RH. (2003): "*Basic elements of equipment cleaning and sanitizing in food processing and handling operations*". Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida.
61. Seymour I.J., Appleton H. (2001): "*A Review: Foodborne viruses and fresh produce*". J. of Applied Microbiology: 91:759-773.
62. Silva Jerson L., Luan Peng, Glaser Michael, Voss Edward, Weber Gregorio (1991), "*Effects of Hydrostatic Pressure on a Membrane-Enveloped Virus: High Immunogenicity of the Pressure-Inactivated Virus* ", Journal of Virology , Apr. 1992, 2111-2117
63. Sobsey MD., Carrick RJ., Jensen HR. (1978). "*Improved method for detecting enteric viruses from oyster*". Appl. Environ. Microbiol.; 36, 121-128
64. Sobsey MD., Wallis C., Melnick JL. (1975). "*Development of a simple method for concentrating enteroviruses from oyster*". Appl. Environ. Microbiol.; 29, 21-26
65. Sullivan R. et al. (1984): "*Evaluation of a method for recovering poliovirus 1 from 100-g oyster sample*". J. Food Prot.; 47, 108-110

66. Svenson L. (2000): "Diagnosis of foodborne viral infection in patients". *Int. J. Food Microbiol.* 59: 117-126
67. Te Giffel MC., Beumer RR., Van Dam WF. Slaghuis, Romboust FM. (1995): "*Sporicidal effect of disinfectants on Bacillus cereus isolated from the milk processing environmental*". *International Biodeterioratio & Biodegradation*; 421-430
68. Tian Shao-Min, Ruan Kang-Cheng, Qian Jian-Fei, Shao Guo-Qing, Balny Claude (2000), "*Effects of hydrostatic pressure on the structure and biological activity of infectious bursal disease virus*", *Eur. J. Biochem.* 267, Feb. 2000, 4486-4494
69. Tyagi S. (1996). "*Taking DNA probes into a protein world.*" *Nat. Biotechnol.*, 14 (8): 947-948.
70. Tyagi S. and Kramer F.R. (1996). "*Molecular Beacons: probes that fluoresce upon hybridization.*" *Nat. Biotechnol.*, 14(2): 347-382.
71. Vaughn JM. et al. (1980): "*Isolation of naturally occurring enteroviruses from variety of shellfish species residing in Long Island and New Jersey marine embayments*". *J. Food Prot.*; 43, 95-98
72. Whitcombe D., Theaker J., Guy S.P., Brown T. and Little S. (1999). "*Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence.*" *Nat. Biotechnol.*, 17 (8): 804-807.
73. Whittwer C.T., Hermann M.G., Moss A.A. and Rasmussen R.P. (1997). "*Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification.*" *Biotechniques*, 22: 130-138.
74. Wutzler P. Sauerbrei A.. (2000): "*Virucidal efficacy of a combination of 0,2% peracetic acid and 80% (v/v) ethanol (PAA/ethanol) as a potential hand disinfectant*". *J. of Hospital Infection*: 46; 304-308.
75. www.cdc.gov foodborne illness jenuary 10, 2005
76. www.distam.unimi.it/info
77. www.fda.gov; 21CFR178.1010
78. www.fluid.ippt.gov.pl/ictam04/text/sessions/docs
79. Yang JH., et al. (2002): "*Real-time for quantitation of hepatitis C virus RNA*" *J. Virol Methods*; 102(1-2): 119-28

3. Metodi

I. **“WATER AND WASTE WATER TREATMENTS IN
FOOD INDUSTRIES”**
ISEKI-Food Intergrating Safety and Enviromental Knowledge Into
Food Studies towards European Sustainable Development
Springer Science+Business Media, LCC
(in press 2009)

5.5. Water and waste water treatments in food industries

Authors names:

Giuliano Sansebastiano¹, Roberta Zoni¹ and Roberta Zanelli¹,
Samantha Pinho², Rogers Ribeiro² and Giovana Tommaso²,
Regina Nabais^{3,4} and Markus Carpenter⁴

¹Department of Public Health Sec. Hygiene – University of Parma (Italy); ²Department of Food Engineering – University of S. Paulo (Brazil); ³Centro de Estudos de Recursos Naturais Ambiente e Sociedade and ⁴Instituto Politécnico de Coimbra (Portugal)

5.5.1. Introduction

This chapter represents a joint venture comprised of three countries and four institutions of higher education with the common propose of providing general overview, at an introductory level, of key issues pertaining to water quality supply criteria and treatments Italy (University of Parma, Italy), wastewater treatments and final disposals (University of S. Paulo, Brazil), and water management required by current procedures of the food industry (Centro de Estudos de Recursos Naturais Ambiente e Sociedade and Instituto Politécnico de Coimbra, Portugal).

5.5.2. Potable Water Quality Supply

Water intended for human consumption is a major carrier of pathogenic micro-organisms and toxic substances coming from domestic and industrial drains.

Infectious episodes caused by exclusive or prevalent faecal pathogenic micro-organisms have been documented for a long time. Common among these are *Enteroviruses* (*Poliovirus*, *Coxsackievirus*, *Echovirus*), *Rotavirus*, *Hepatitis A and E viruses*, *Norwalk virus* and *Norwalk-like viruses*; as well as the bacteria and protozoa strains such as *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrios*, *Campylobacter*, pathogenic *E.coli* strains; *Entamoeba histolitica*, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* are among the protozoa.

In recent years – in the developed countries – a remarkable reduction in the circulation of the classic pathogens such as *S.typhi* and *Enteroviruses* has occurred, while the notified cases caused by emerging pathogens have increased (World Health Organization 1996).

These are usually opportunistic pathogens responsible for infectious pathologies which are especially serious in the elderly, children and immunocompromised people. Among viruses, a particularly important role is played by *Norwalk virus* and similar agents. In fact, it is known that viruses are responsible for more than 70% of all the gastro-enteritis transmitted by water consumption and other contaminated food (Bosh A., 1998, Godoy P. and others, 2006, W. F. J. Hill and others, 1971).

As to contamination by chemical substances, there are natural pollutants – for instance arsenic – and more often industrial pollutants, usually heavy metals such as mercury, chromium, nickel and cadmium, solvents and pollutants of agricultural origin such as insecticides and pesticides.

Special attention was paid to organochlorinated compounds such as Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polychloroterphenyls (PCTs).

In the last several years, organic chlorinated compounds deriving from chlorination of waters with hypochlorites such as Trihalomethanes (THMs) and chlorine dioxide such as chlorites and chlorates have been kept under control (Lewis WJ. and others, 1982).

There are different classes of toxic substance accumulation – also characterized by mutagenic and carcinogenic properties.

The concentration of these contaminants – some of which are present in different environmental matrixes – should remain within specific maximum admissible values to obtain a good safety margin.

Fluorine and Nitrates must be considered differently. Fluorine damages to human health are caused both by a surplus and shortage in water. With concentrations higher than 1.5 mg/L, the phenomena of fluorosis may occur in children undergoing the formation of permanent dentition. At lower concentrations – less than 0.7 mg/L – a higher incidence of dental cavities among children may be seen.

The absorbed quantity of fluorine is in connection with the quantity of ingested water and also depends on the external average temperature values of the area (U. S. Environmental Agency, 1962).

As to nitrates, the available epidemiological data show that for concentrations higher than 50 mg/L, the phenomena of methaemoglobinaemia may occur in nursing babies, since – in connection with the still very high gastric pH – the passage of bacterial flora capable of reducing nitrate to nitrite can be determined. The nitrites – when absorbed in the intestine – bind to haemoglobin and cause variable conditions of cyanosis.

Quality criteria

In view of the numerous risks of both chemical and biological contamination, it is essential that the water used for domestic purposes as well as industry (particularly the food industry) meet specific requirements of both quality and potability.

This very complex problem has been dealt with by WHO since 1958.

The European Community has lately reviewed the proposal by WHO and issued an EC Directive (98/93) (Direttiva 98/83/CE, 1998) to which all the member Countries should comply.

The Legislative Decree 31/2001 issued in Italy, implemented and partly changed the previous Presidential Decree 236 of 1988 (De. leg 2 febbraio 2001).

Organoleptic features

Water destined for human consumption must be clear, colourless, odourless and naturally pleasant to taste.

Therefore, the parameters of evaluation are colour, turbidity, odour and taste, all of which must be acceptable to consumers and without anomalous variations. Importantly, these anomalies may indicate the presence of foreign substances and contamination.

Physical features

The physical features to be considered are temperature, electrical conductivity, pH and fixed solids (Table 1).

Table 1 – Physical parameters

Temperature	9-15 °C (optimum 12 °C)	Electrical conductivity	2500 µS/cm
pH	6.5 – 9.5	Fixed solids	1500 mg/L

Besides specific temperature values, this parameter characterizes the telluric water in connection with the depth of strata. Moreover, it is very important to consider the stability of this parameter with small variations in different seasons since significant changes in temperature – especially if combined with particular meteorological events, – favour phenomena of infiltration and possible contaminations.

Even pH must be demonstrably stable, since both acid and basic values favour the solubilisation of substances present in the materials of supply networks.

Electrical conductivity is a measure of the salt content of water. This is the reason why its stability over one year must be also taken into account, since significant changes are an index of contamination of surface waters.

The fixed solids provide a good assessment of the water mineralization degree and its palatability.

Elevated residue values are typical of waters very rich in salts, which are difficult for bodily assimilation and may stress plants.

Chemical criteria

The several chemical analyses carried out on waters may be separated into 3 groups: degree of mineralization, indicators of organic contamination and toxic substances.

Mineralization degree

It is an assessment that does not affect water potability, but rather its usability.

One of the important water properties is hardness, essentially an elevated measure of calcium and magnesium salts. A distinction is also made between temporary and permanent hardness. The former is caused by a combination of calcium bicarbonate and magnesium, which after boiling, turn into carbonates that precipitate. The latter is caused by the presence of chlorides, calcium, magnesium sulphates and nitrates that cannot be removed by boiling. The total hardness is the sum of the temporary and permanent hardness.

The range of acceptability is from 150 to 500 mg/L CaCO₃, even though they are only recommended values in the new regulations. Sodium was taken into account again because of studies linking higher intakes of NaCl and hypertension. The maximum acceptable values are 200 mg/L.

Chlorides and sulphates are usually present in waters and their concentrations must be moderate, since they give a bad taste to water. The limits established in the Regulation are 250 mg/L (Table 2).

For the above-mentioned fluorine and nitrates the maximum acceptable values are 1.5 and 50 mg/L respectively (Table 2).

Table 2 – Maximum mineral concentration

Chloride	250 mg/L	Fluorine*	1.5 mg/L
Sulfate	250 mg/L	Nitrate**	50 mg/L
Sodium	200 mg/L	---	---

*over this value fluorine is toxic

**over this value nitrate are toxic

Indexes of organic contamination

The water contamination with organic material may be detected through the determination of the total content of organic substances carried out by means of COD (Chemical Oxygen Demand) that shall not exceed 5 mg/L as oxygen.

Then some products of the organic substances are received such as ammonia and nitrites that must be absent or present at a maximum concentration of 0.5 mg/l if their source is natural.

Two other indicators of organic contamination are H₂S (hydrogen sulphide) and phosphates for which the maximum acceptable values were established (Table 3).

Table 3 – Organic pollution indicators (max concentrations if of natural source)

Ammonia	0.5 mg/L	Fluorine	1.5 mg/L
Nitrite	0.1 mg/L	Hydrogen sulphide	--
Phosphate	5,000 mg/L	---	---

However, some of these substances may be naturally present in waters, so are not indicators of organic contamination.

Toxic substances

They are contaminants of natural, industrial and agricultural origin.

Compared to our previous Presidential Decree 236/88 the number of substances to be measured was considerably reduced, moreover some substances used in surface water purification plants were inserted as well as substances that may be released by piping in building materials (Table 4).

Table 4 – Toxic substances, maximum concentration

Arsenic	10 µg/L	Mercury	1 µg/L
Cadmium	5 µg/L	Nichel	20 µg/L
Chromium	50 µg/L	Pesticides	0.5 µg/L
Lead	10 µg/L	IPA	0.1 µg/L
Tetrachloethylene	10 µg/L	Total THMs	30 µg/L
Trichoroethylene	10 µg/L	Chlorite	200 µg/L
Acrylamide	0.1 µg/L	Epichlorohydrin	0.1 µg/L
1,2 Dichloroethane	3 µg/L	Vinyl chloride	0.5 µg/L

Microbiological criteria

As already shown, water is a good oral-faecal micro-organism transmission medium.

Therefore, it is logical to search there directly for the exclusive or prevalent faecal pathogenic micro-organisms.

However, this formulation becomes problematic because of the necessity of specialized laboratories and the long isolation times of the pathogens.

It is always necessary to prevent, not only to point out the presence of a pathogenic micro-organism in waters. This is the reason why the indicators of faecal contamination are used.

First of all a non-specific indicator is considered – the Total Bacterial Count (TBC) with incubation at 36 °C and at 22 °C – so as to assess any presence of bacteria adapted on the one hand to warm-blooded animals and man, and on the other hand to the normal native flora of water. Deep waters are usually characterized by very moderate values from zero to some colonies per mL at both temperatures, – and only sudden increments show a possibility of contamination.

For the specific indicators of faecal contamination we refer to the total coliforms that may derive not only from a faecal contamination, but also from the environment in addition to the *E.coli* whose origin is solely faecal.

According to the new regulations *E.coli* should be absent in 100 mL of water.

Another important indicator is made up of the *Enterococc*, labile in water and whose presence informs us of recent contamination or a contamination under way.

The absence in 100 mL of water is also required for this parameter.

Further determinations may concern *P.aeruginosa* for bottled water and spores of reducing sulphite *Clostrides* for surface waters undergoing purification treatments (Table 5).

Table 5 – Microbiological parameters

<i>E.coli</i>	0/100 mL	Total bacterial count 22 °C	Without significant changes
<i>Enterococci</i>	0/100 mL	Total bacterial count 37 °C	Without significant changes

It is important to point out, that occasionally in particular epidemiological situations, specific pathogenic micro-organisms may be found, such as *Enteroviruses*, *Salmonella*, *Hepatitis A* virus, protozoa, algae and fungi.

Potability judgment and sampling frequency

A potability judgment derives from the ensemble of the physical, chemical and microbiological analyses by taking into account the hydrogeological studies carried out before the exploitation of the water resource.

The sampling frequency is important regarding this point, since it is the most important prevention means we have at our disposal. Samples indicating the organic contamination and faecal pollution must be determined very often together with the determination of physical parameters. They are constantly monitored in the industry of mineral and thermal waters.

Water chemical treatments

In general, these are methods for correcting some physical and chemical parameters and mainly microbiological ones. The first treatments are those regarding the removal of turbidity and anomalous colouring by means of systems of flocculation, sedimentation and filtering.

These methods are implemented especially when surface waters purification is carried out, while for deep strata waters sand filtration is usually performed.

Very often it is necessary to remove iron through aeration and transformation of Fe⁺⁺ into Fe⁺⁺⁺ and subsequent filtration.

Manganese and iron are frequently found together and removal requires a stronger oxidation with chlorine or ozone.

Hardness may be corrected through ion exchange resins or inverse osmosis systems by making sure not to fall below 150 mg/L CaCO₃.

However the softening process must be performed and followed by skilled personnel in order not to alter or contaminate water.

As to the so-called micropollutants, the reduction procedures are very complex and it is possible to proceed with effective treatment systems only for some of them.

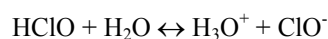
Waters disinfection

This intervention is usually carried out on waters which, although meeting the potability criteria, are distributed through waterworks where a safety margin is intentionally kept in order to counteract any traces of pollution along the supply network. Chlorine with its components and ozone are among the most used disinfectants.

The UV Ray systems are less used. Water chlorination is performed with sodium hypochlorite and chlorine dioxide.

Hypochlorite in water forms the hypochlorous acid that is called active chlorine, since it is the real oxidizing compound.

Hypochlorous acid is balanced between its undissociated and dissociated form.



The reaction balance is regulated by pH; equal concentrations of HClO and ClO surround neutral pH.

For practical applications water pH must range between 6.5 and 7.5 – values more conducive to oxidizing activity.

Besides pH, an important factor to be considered is the presence of organic substances that may be oxidized by consuming active chlorine. Moreover, they may bind to chlorine thus forming organic chloro-compounds, some of which are toxic to man.

Therefore, the chlorine request must be determined, that is the quantity of active chlorine to be added to water to obtain a free, active chlorine made up of HClO capable of performing its own oxidizing activity on the micro-organisms. In clear water, without organic compounds, simple chlorination may be carried out by adding active chlorine, at a concentration of 0.2-0.5 mg/L and letting it act for 20-30 minutes.

When treating water with organic and inorganic oxidizable compounds, it is necessary to proceed with the chlorination until the breakpoint; a sufficient amount of chlorine must be added in order to satisfy the chlorine demand, then the same amount of active chlorine as in the simple chlorination can be added.

Other chlorine compounds that release HClO, are calcium hypochlorite, and organic and inorganic chloramine.

The most important problems, connected to the use of HClO, are represented by the organic products formed during the reactions between chlorine and organic compounds present in the waters – fulvic acids and humic acids in particular.

Trihalomethanes were especially studied among these reaction products – in particular the chloroform – which represents by itself 95% of the compounds.

Research from the last several years has connected exposure to these compounds in concentrations higher than 80 mg/L to mutagenic and carcinogenic effects, and more recently, with alterations somatic parameters at birth (Ed W.B. de Leer and Corrie Erkelens, 1990, Scully F.E. Jr. and others, 1990).

It is mainly due to this problem of chlororganics that in many treatment plants in Europe and Italy hypochlorite was replaced with chlorine dioxide.

Chlorine dioxide – prepared by starting from sodium chlorite and a mineral acid – is a gas with a strong oxidizing power acting as bactericide and virucide in a wide pH range from 5 to 9, and leading to the formation of moderate amounts of chlororganics, for the most part non volatile, while it does not form THMs. The drawback of using chlorine for water disinfection is the likely formation of chlorites and chlorates that are toxic to man.

Essentially, a maximum concentration of 200 µg/L is required for chlorites.

Ozone is another oxidant used in the suitable plants. It is an allotropic form of oxygen O₃, a gas characterized by a particular odour and a bluish hue.

Ozone is produced with suitable instruments – called ozonizers – where electric discharges are produced on dried air at high voltage > 7000 – 15000 Volt. The gas formed in this way is then conveyed to suitable towers to guarantee a close water-oxidant contact.

The disinfectant action is obtained with 0.2 – 0.4 mg/L for very moderate contact times (3-4 minutes).

The excess ozone dissipates into the air, and none is present in the water supply.

However, a problem with using ozone is the likely formation of toxic reaction products such as certain aldehydes.

UV rays must be mentioned, too: they are excellent sterilizers that may be used in small plants with clear and colourless water because they have a low penetration power and are ineffective in the presence of turbidity and iron salts. They are produced by mercury vapour lamps and have an optimal wavelength of 257 nm.

The target is given by DNA and RNA nucleic acids, where the formation of purine and pyrimidine dimers is determined.

5.5.3. General wastewater treatment techniques for the food industry – Chemical, physical, biochemical and microbiological characterization of effluents

Wastewater treatment is like an industry where the final product is well-defined and highly regulated, but sometimes the quality and the quantity of the raw material is not well known, and this is not a very easy position for the treatment plant operator (Brown & Koch, 2005). In the food industry this situation can be modified by the implantation of a quality program, which tends to standardize the productive processes and consequently, its residues, among them, the wastewaters. In this way, the wastewaters characteristics can be determined, and the design and operation of a treatment plant can be done efficiently.

The characterization of wastewaters in the food industry is very important to the design and operation of collection, treatment and disposal facilities aiming the mitigation of the environmental damages caused by the incorrect disposal of this category of effluent.

Wastewater is characterized in terms of its physical, chemical and biological composition. In the following paragraphs there will be briefly discussed relevant parameters concerning the food industry wastewater characterization.

pH – the pH measurement is related to the hydrogen concentration of the effluents, and is made by a potentiometer. It is important to know this parameter because all the wastewater treatment pathways, physical – chemical or biological will be affected by this value, if is not at an acceptable range it must be corrected with salts addition (Metcalf and Eddy, 2003).

Temperature – The temperature variation is closely linked to the process that originated the effluent. This parameter is important because of the significant effect that temperature has on all biological process. Although organisms are capable of adapting to a great range of values, the optimum temperature for bioactivity is 25 °C to 35 °C (Brown & Koch, 2005).

Pathogenic microorganisms – Pathogenic microorganisms can be found in effluents from industries that process products of animal origin, or when the sanitary discharges are also treated in the industrial wastewater treatment plant. There are a great number of possible microorganism's strains, and as its isolation and identification is quite difficult, the coliform organism is usually used as indicator.

Biochemical Oxygen Demand (BOD) – is an indirect measurement of the biodegradable organic matter present in the effluent as expresses the amount of oxygen necessary to the aerobic microorganisms oxide the organic matter present. It is expressed in mg O₂ L⁻¹. The test consists in inoculating a sample with adapted microorganisms and then measurement the O₂ consumption by such culture. A common problem found in this assay is the presence of inhibitory compounds, which may disable the organic matter consumption by the microorganisms, leading to a wrong interpretation. As protein degradation produces ammonia, and the nitrification process can also consume O₂, this process must be avoided by the addition of some inhibitory agent. The most common BOD assay is the BOD₅²⁰ that is conducted at controlled temperature (20 °C) for 5 days. This parameter is very useful for the design and operation of reactors destined to carbonaceous organic matter consumption. The BOD_u is the indirect measurement of total organic matter present at a sample, and must be carried out also at controlled temperature, for 20 days. In such way it can be assumed that 99% of the organic matter was consumed (Metcalf and Eddy, 2003).

Chemical Oxygen Demand (COD) – Is an indirect measurement of the total organic matter present in the effluent based on the chemical oxidation of the sample. This method is catalyzed by silver and utilizes chrome as oxidant agent. It lasts two hours and is conducted at 150 °C.

Solids – Is consider the most important physical characteristic in effluents and is composed by floating matter, settleable matter, colloidal matter and matter in solution. This composition can be divided in organic solids (named volatile solids) and in inorganic solids (named fixed solids). The organic solids is the fraction that is volatilized by muffle oven at 600 °C, by 2 hours, and the inorganic solids is the fraction that remain unaltered before this operation.

Nitrogen – The Nitrogen content can be divided in, organic nitrogen, normally related to the proteins or peptides and amino acids present in the wastewater, ammoniacal nitrogen, originated from the degradation of organic compounds or from some salts used in industry, nitrate and nitrite, from additives used in the food process, or from ammonia oxidation and nitrate reduction process. The method for the organic and ammoniacal Nitrogen quantification is the macro Kjeldhal, besides the quantification of NO₃ and NO₂ can be made by flow-injection analysis (FIA).

Phosphorus – Among other sources, phosphorous is found in detergents, and because of this, some food processing industries also contribute significantly to the phosphorus budget, (Tusseau-Vuillemin, 2001). Phosphorous is present in residuary waters mainly as orthophosphates and polyphosphates, as well as in the organic form. The method for phosphorous analysis is based on the transformation of all its forms into orthophosphates and the determination of its concentration by calorimetric analyses (Metcalf and Eddy, 2003).

Sulphates – sulphate ion is one of the main anions occurring in natural waters and can be present in some food industry wastewaters. In anaerobic environment, the sulphates generate sulphetes, which are responsible for corrosion problems, bad odor emission and, depending on the concentration, inhibition of some biological processes. In food industry effluents, sulphate may be present in processing plants of refined sugar and wine.

Alkalinity – The alkalinity is related to the effluent capability to react with bases and acids. In general, as higher the alkalinity value, greater will be its capacity to maintain its pH (pH range). This parameter is especially important for biological wastewater treatment, as the microorganisms usually produce acids or gases that can the pH value (Speece, 1996).

Oil and Greases – In food industry effluents, these substances are normally related to the processed material and equipment cleaning water. It must be removed from the wastewater before its entrance in the reactors because it can cause biomass flotation and consequent washout from the system, combined with substrate unavailability for the microbial consortium. The quantification can be made by the oil and grease extraction in a solvent (i.e. hexane), evaporation and mass determination.

Surfactants – shortened form of "surface-active agent", a surfactant is a chemical product that stabilizes mixtures of oil and water by reducing the surface tension at the interface between oil and water molecules

(Metcalf and Eddy, 2003). Largely used in detergents, this compound can be harmful for microorganisms, but several authors have related that its removal is possible at anaerobic reactors (Duarte and others, 2005; Sanz and others, 2003).

Color – in food effluents is related to the processed product, and usually represents the occurrence of colloidal organic matter, recalcitrant to many kinds of biological processes. The color measurement is made by spectrophotometric methods and its removal is made by the application of specific strains of microorganisms or by physical-chemical ways.

Turbidity – Is a measure of the light-transmitting properties of water, used to indicate the quality of wastes discharges with respect to colloidal and residual suspended matter. (Metcalf and Eddy, 2003). Many food processing wastewaters have turbidity, like the ones from dairy plants, slaughterhouses.

Odor – Fresh wastewater’s odors are related to its origin, each effluent have its characteristic odor, but, when uncontrollable biological processes occur, the odor is usually related to the gases produced in these processes, or to the presence of some intermediated compounds produced by the consortium. The importance of odors at low concentration in human terms is related to the psychological stress they produce (Metcalf and Eddy, 2003).

Salinity – The agro-food sectors requiring the higher amounts of salt are meat canning, pickled vegetables, dairy products and the fish processing industries. In the food industry, saline effluents are mainly generated by the use of brine solutions and dry salt (NaCl) for obtaining the finished product. Saline effluents are conventionally treated through physical-chemical means, as biological treatment is strongly inhibited by salts (mainly NaCl) (Lefebvre & Moletta, 2006). The measurement of this content is made by potentiometric methods.

For the involved methodologies detailing, Standard Method for Water and Wastewater examination must be consulted (APHA, 1998).

To give an idea of the range of concentration of the parameters Table 6 presents some biochemical, physicochemical and physical parameters found in food industry effluents.

Table 6 – Biochemical, physicochemical and physical parameters found in food industry effluents

Industry	COD (mg/L)	BOD ₅ (mg/L)	Suspended Solids (mg/L)	Total Nitrogen (mg/L)	Total Phosphorous (mg/L)	Oil and grease (mg/L)	pH	Source
Pig slaughterhouse	2,500	1,250	700	150	25	150	7.2	Hansen & Mortensen (1992)
Cattle slaughterhouse	4,000	2,000	1,600	180	27	270	7.2	Hansen & Mortensen (1992)
Meat processing*	9,833	8,333	3,333	1,666	-	925	7.1	Site Visit Report (2008)
Baker facility	830	500	-	2	3	-	6.0	Givens & Cable (2008)
Candies	4,560	2,380	2,950	13	5.5	66	6.2	Givens & Cable (2008)
Citric juice	5,050.3	2,481.6	-	-	-	-	6.2	Guimarães, 1997
Brewery	1,800 – 3,000	1,000 – 1,500	10 - 60	30 - 100	10 - 30	-	7.0	Santos, & Ribeiro (2005)
Soft drink	2,149	1,188	-	34.6	6.7	87	10.1	Santos, & Ribeiro (2005)
Dairy**	5,312	2,397	-	90	26	96	5.3 -9.4	Meganha (1996)
Dairy***	20,559	5,312	-	159	21	463	5.3 -9.4	Meganha (1996)

* lb/Mgal;

** with cheese whey segregation;

*** without cheese whey segregation

Parameters interpretation

The BOD to COD ratio can inform if the effluent can be treated by biological ways, with or without previous physicochemical corrections. If the ratio value is higher than 0.6, the effluent can be biologically treated, if this value is between 0.3 and 0.6, biological treatment is possible, but with previous physical-chemical corrections, and if this value is lower than 0.3, only physical-chemical treatment is indicated.

As the total fixed solids (TFS) are related to the mineral fraction of the solids present in a sample, and the total volatile solids (TVS) are related to the organic fraction, the TFS/TVS ratio also indicates the possibility of application of biological process to treat a given effluent. If too high, probably the biological treatment is not indicated, but is necessary to evaluate the magnitude of the soluble fixed solids fraction in the total fixed solids, because sometimes, this ratio is high in function of high soluble solids concentration, which does not hinder the application of biological processes.

The ratio (BOD:N:P) is commonly used to verify if the microorganisms nutrient needs will be satisfied by the effluents to be treated. As BOD is an aerobic test, this ratio is applied to aerobic process. Normally the ratio 100:5:1 is accepted as satisfactory for these microorganisms. Considering the anaerobic microorganisms, the commonly used ratio is COD:N:P, and because this kind of microorganisms have lower growth rates, they are less exigent in relation to nutrients availability, so the ratio 500:5:1 is accepted as satisfactory. If the nutrients are present in lower conditions, supplementation must be provided to promote an efficient biological process. These two ratios are also useful to foresee the necessity of a nutrient removal process.

Preliminary proceedings

Preliminary treatment is the first step in wastewater treatment by which large objects like sticks, bottles, cans, stone, grit, rags are removed to protect the equipment in the plant from physical damage or interfere with downstream equipment and treatment processes, including pumps, pump inlets, and pipelines (Nielsen, 1996). Treatment equipment such as bar screens and grit chambers are used as the wastewater first enters a treatment plant, and the collected material can be sent for composting and used as a soil amendment or as a medium to grow plants. The collected material can also used to produce animal's food or it can be disposed of in a landfill.

Screening is typically the first and most inexpensive form of primary treatment. There are several types of screens used in wastewater treatment including: static or stationary, rotary drum, brushed and vibrating screens. Mesh sizes from these equipments can range from 0.5 inch in a static screen to 200 mesh in high-speed circular vibratory polishing screens. Screening systems may be used in combination (i.e., prescreen-polish screen) to achieve the desired solids removal efficiency (USEPA, 2002).

Static screen are used to remove large solid particles, as coarse, suspended matter (larger than 1 mm mesh), from slaughterhouse raw wastewater, which can represent 40 to 50 percent of the raw wastewater COD (Johns, 1995; Mittal, 2006). In poultry products facilities two types of vibrating screens may be employed. The first case, for offal recovery, vibratory screens usually have 20-mesh screening. Other use of vibratory screens is for feather removal where a 36- by 40-mesh screen cloth is used (USEPA, 2002).

Some food industries facilities operate on intermittent form, with discontinuous wastewater production, where weekly variation of wastewater flow is also common. In addition, there are significant differences in flow during processing and cleanup periods, producing a substantial diurnal variation in flow and organic load on days of processing. To keep away from the necessity of sizing subsequent treatment units to handle peak flows and loads, flow equalization tanks may be installed to provide a constant 24-hour flow rate on processing days, but also may be sized to provide a constant daily flow rate, including non-processing days. The presence of equalization basins promoted the better operation condition of secondary wastewater treatment systems since they are not subjected to shock loads or variations on feed. To avoid settling of solids and odors generation, aeration and mixing of flow equalization basins are required. Methods of aeration and mixing include diffused air, diffused air with mechanical mixing, and mechanical aeration (Metcalf and Eddy, 2003). The best localization for equalization facilities vary with the characteristics of the collection system, wastewater to be handled, land availability and type of treatment required.

Primary Treatment

Primary treatment is the second step in treatment and removes settleable and floatable materials from the wastewater. In several cases, wastewater is held in a quiet tank for several hours allowing the particles to settle to the bottom and the greases to float to the top. The solids drawn off the bottom and skimmed off the top receive further treatment on to the solids handling process. The clarified wastewater flows on to the next stage of wastewater treatment.

Sedimentation is one of the most widely utilized gravity-separation methods to remove contaminants in wastewater treatment. Settling basins separate grease and suspended solids from wastewater by the process of gravity separation, in which a minimum turbulence flow through tank is necessary to those solids heavier than water sink to the bottom, and grease and fine solids rise to the surface. Settling basins are equipped with a skimmer to remove grease and scum off the top and a scraper to remove sludge at the bottom. Detention time and the rate of solid removal from the basin are key factors that affect basin efficiency. The flow rate and solids-flux analyses are the most important criterions for the design, and the most common sizing factor is determined by measuring the volume of flow during one peak hour with 30 to 40 minutes of detention (USEPA, 2002; Metcalf and Eddy, 2003). Nevertheless, in some cases, the use of appropriated screening release settling basins utilization. An equalization tank before the catch basin reduces size requirements significantly.

Most fats, oils and grease have low density and cannot be separated efficiently by sedimentation from water streams. Thus, flotation is a much more suitable technique to remove oil and particles with low density

from water during or after de-emulsification, which may be natural or forced depending on technical/economic analysis. Dissolved air flotation (DAF) is used extensively in the primary treatment of food industries wastewaters to remove suspended solids. The principal advantage of DAF over gravity settling is its ability to remove very small or light particles (including grease) more completely and in a shorter period of time. Once particles have been to the surface, they are removed by skimming (Metcalf and Eddy, 2003).

In DAF, either the entire influent, some fraction of the influent, or some fraction of the recycled DAF effluent is saturated with air at a pressure of 40 to 50 psi (250 to 300 kPa), and then introduced into the flotation tank. Chemicals (e.g., lime, iron and aluminum salts, polymers and flocculants) are often added prior to the DAF to improve the DAF performance. There are many advantages to a DAF system, including its low installation costs, compact design, ability to accept variable loading rates, and low level of maintenance (Nielsen, 1996). The mechanical equipment involved in the DAF system is fairly simple, requiring limited maintenance attention for such things as pumps and mechanical drives (USEPA, 2002; Mittal, 2006).

Secondary treatment

Objectives and available technologies

Considering an efficient primary treatment, these secondary removal operations must be focused on the degradation of soluble organic matter. Specifically for industrial wastewaters, the objective would be the removal or reduction of the concentration of organic and inorganic compounds, resulting in COD, BOD, phosphate and ammonia concentrations decrease (Metcalf and Eddy, 2003).

Such operations are often arranged in a sequence which can include biological, physical and physical-chemistry units; however, biological approaches are certainly the preferred ones. Metcalf and Eddy (2003) also state that the objectives of biological treatment of wastewaters are: (i) to transform (oxidize) dissolved and particulate biodegradable constituents into acceptable end products; (ii) capture and incorporate suspended and nonsettleable colloidal solids into a biological floc or biofilm. As most of the wastewaters originated from agro-industrial units, including food processing plants, are suitable to be treated biologically, when well operated these biological organic matter removal units can reach more than 90% of efficiency.

The main type of microorganisms involved in the consumption of organic matter in the biological systems are the bacteria, but protozoa, fungi, rotifers and algae and Archae are also present in the microbial community.

Among the traditional biological units – aerobic, anaerobic or mixed units – there are the lagoons (or ponds), activated sludge systems (with or without extended aeration), oxidation ditches, biofilters, UASB (upflow anaerobic sludge bed reactor), SBR (aerobic sequencing batch reactor), ASBR (anaerobic sequencing batch reactor), trickling filters and rotating bed contactors (RBC). Emergent technologies include aerobic granular sludge process (AGSP), anaerobic migrating blanket reactor (AMBR), bioaugmentation, membrane bioreactor, integrated fixed-film activated sludge and mobile-bed reactors (USEPA, 2008).

The anaerobic wastewater treatment processes aims the reduction of complex organic compounds to gases as the mechanism for organic matter and BOD reduction, by an anaerobic microbial consortium. Biogas is the name usually employed to refer to the final gas mixture (mainly methane, but there is also carbon dioxide, sulfur dioxide, gas ammonia, hydrogen and nitrogen) resulting from the degradation process. This biogas is originated by a multi-step process, in which the microorganisms form a syntrophic relationship (microbial consortium). Six steps in the anaerobic conversion of organic matter can be listed: (i) hydrolysis of biopolymers; (ii) fermentation of aminoacids and sugars; (iii) anaerobic oxidation of long chain fatty acids; (iv) anaerobic oxidation of intermediary products such as volatile acids (with the exception of acetate); (v) conversion of acetate to methane and (vi) conversion of hydrogen to methane. As biogas is a potential energy source, its production confers to the anaerobic units a high extent of sustainability (Gujer and Zehnder, 1982; Lettinga *et al.*, 1999).

Another very attractive characteristic of the anaerobic processes is their non-intensive requirements of energy input; this characteristic together to their technical simplicity means they have a high extent of robustness. Two more beneficial aspects of anaerobic units are: (i) low volume of excess sludge produced, due to the very low growth rate of anaerobic microorganisms, and already well stabilized, and (ii) anaerobic microorganisms can be preserved unfed for long periods of time (Speece, 1996; Lettinga *et al.*, 1999).

On the other hand, anaerobic processes are not capable of producing promptly dischargeable effluents; however, they can significantly reduce energy requirements for subsequent aerobic treatment to produce effluents suitable to most of emission requirements (USEPA, 2002).

Bad odours are another major drawback often attributed to anaerobic units (mainly due to the production of H₂S). However, technologies to use or treat these bad-odoured final products, especially sulfur hydroxide, have been developed. This treatment aiming odor or harmful/corrosive component removal can be carried out by biofiltration, adsorption on activated carbon, chemical absorption, gas stripping, catalytic oxidation or

thermal oxidation. After this pre-treatment, its use as fuel must be seriously considered, as its calorific power is about 60% of the natural gas. If dried and previously treated, it can be used in internal combustion motors, boilers and electric energy generation.

Advantages of using aerobic wastewater treatment processes include low odor production, fast biological growth rate, no elevated operation temperature requirements and quick adjustments to temperature and loading rate changes. The primary goal of aerobic degradation units is to transform soluble and colloidal organic compounds into microbial biomass, with subsequent removal of the biomass formed by settling or mechanical separation as the primary mechanism for organic matter and BOD removal.

However, the production of a high amount of microbial mass originates the first disadvantage of aerobic process, the necessity of constant removal of the excess biomass and its subsequent stabilization. This stabilization is normally carried out in anaerobic digesters. The second disadvantage of aerobic process, especially when compared to anaerobic ones, is the higher energy required for aeration, as the aerobic environment in the reactor is maintained by using diffused or mechanical aeration, giving the unit a characteristic of completely mixed regime. These additional operations contribute to increase the operating costs of aerobic system, which are higher than the costs of anaerobic systems for processing most of wastewaters, because of the relatively high space, maintenance, management, and energy required for artificial oxygenation (USEPA, 2002).

The degree of carbon oxidation on aerobic systems depends on the solids retention time (SRT), also referred to as the mean cell residence time of the process, which determines the age of the microbial population. Processes with long SRTs operate in the endogenous respiration phase of the microbial growth curve and generate less settleable solids per unit BOD removed. At SRTs sufficiently long to maintain an active population of nitrifying bacteria, oxidation of ammonia nitrogen to nitrate nitrogen (nitrification) also occurs, a process which is already considered as part of the tertiary treatment.

Another very common classification of the biological units, aerobic or anaerobic, is in attached (immobilized) or suspended microbial growth processes. A microbial population in the form of single cells dispersed throughout a medium has its physical behavior governed by the properties of bulk liquid; in addition, when the liquid is drained from the vessel, so are the cells. In order to be retained, they must be separated from the liquid; this can readily be achieved by cell immobilization. A major feature of most immobilization processes is the very high cell concentrations that can be achieved and this, combined with the ability to handle immobilized cells distinguishably from the fluid phase, offers a number of potentially advantageous possibilities for biological processes (Webb and Atkinson, 1992). As for bioreactors employed for wastewater treatment, the biomass can be immobilized as flocs, biofilms or granules.

The conventional activated sludge process and its uncountable modifications are the most commonly used biological wastewater treatment processes in the world, both for municipal and industrial wastewaters. The basic activated-sludge treatment unit is composed of three parts: (i) aerobic reactor, where the microbial consumption of organic matter occurs; (ii) liquid-solid separation; (iii) recycle responsible for returning the biomass to the reactor.

Nowadays a modern concept of wastewater treatment can not separate anaerobic or aerobic treatment systems and recommend an isolated solution just comparing their advantages and drawbacks. It suggests the coupling of both types, in order to take advantage of the best characteristics of each one, in an approach generally called combined systems. In this approach, the secondary and tertiary treatments – aerobic or anaerobic – are automatically dependent and are part of just one project.

Experience in operation of biological systems and the effort to maximize process performance has resulted in established biological treatment processes undergoing modifications on emerging technologies. Generally, the improvements in established biological treatment processes provide treatment of recycle streams, optimize recycle, and maximize nutrient-removal capabilities (U.S. Environmental Protection Agency. EPA. 2008).

Tertiary treatment

The tertiary treatment is the part of the plant related to nutrient (nitrogen and phosphorous) removal. The excessive accumulation of nutrient discharges in surface waters can cause serious ecological problems that affect the health of aquatic life and consequently of humans and animals. There are several major effects associated with discharge of nutrient containing effluents to receiving waters, were the most important are eutrophication, ammonia toxicity and nitrate contamination. Eutrophication is the enrichment of water bodies with plant nutrients and precursors, typically nitrogen and phosphorus, and represents a problem as algae growth can emit toxic substances and also limits the light permeability in clear water, negatively influencing the existing ecosystem. Molecular and un-ionized forms of ammonia nitrogen are toxic to fish and to other aquatic life, nitrate can cause a blood disorder called methemoglobinemia, related to the preferential binding between nitrate and hemoglobin, preventing its association with oxygen, resulting in infants suffocation (“blue baby” syndrome). (Brown and Koch, 2005).

Nitrogen removal

This process can be made by biological or by physical-chemical ways. Because biological nitrogen removal is effective and inexpensive, it has been adopted widely in favor of the physical-chemical processes.

Ammonia nitrogen can be removed from wastewater by volatilization of gaseous ammonia. The process is simple in concept, but it has serious drawbacks that make it expensive to operate and maintain (Metcalf and Eddy, 2003). The volatilization can be achieved by raising the pH of the liquor so that the aqueous ammonia is existing in equilibrium with its gaseous counterpart in accordance to Henry's law. When the pH exceeds 9.5, un-ionized ammonia prevails and can be stripped from the side stream liquid. The process requires a large amount of air and the gas stream must be captured and treated (Brown and Koch, 2005). As the Henry's constant is variable with temperature, the ammonia solubility is also variable, and the costs of the process can seriously rise with temperature reduction.

The breakpoint chlorination involves the addition of chlorine to wastewater to oxidize the ammonia nitrogen in solution to gas and other stable compounds. With proper control, all ammonia can be oxidized, but there are serious considerations involved with the process, such as the formation of high chlorine residuals, trihalomethanes or trichloride gas (this one, avoided by the careful control of the pH process, what requires high quality skilled operators). The process can be used following other nitrogen removal process for fine-tuning of the overall Nitrogen elimination process (Metcalf and Eddy, 2003).

Ion exchange can be used where climatic conditions inhibit biological nitrification and where strict effluent standards are required. The process may be able to meet total nitrogen standards, but requires a high capital and operational costs and high quality skilled operators (Metcalf and Eddy, 2003).

At a conventional biological tertiary treatment plants, nitrogen is removed in two stages, nitrification and denitrification. In the nitrification stage, ammonia is converted to nitrate under aerobic conditions, and after that, the denitrification pathway must be carried out. The denitrification process involves the biological reduction of nitrate and/or nitrite to nitrogen gas in the absence of dissolved oxygen. As nitrification and denitrification are carried out under different conditions and by different microorganisms, these processes have to be separated in time or space to function effectively. Unlike nitrification, denitrification is performed by a wide range of heterotrophic bacterial species, many of which are commonly found in secondary tanks, because they are facultative, and can use oxygen, nitrate or nitrite as their terminal electronic acceptor. As heterotrophic, this kind of bacteria needs carbon sources to accomplish the denitrification process. These substrates can be: organics presents at wastewater, ethanol, methanol, acetic acid (Brown and Koch, 2005). Methane is a potentially inexpensive, widely available electron donor for biological denitrification of wastewater (Modin and others, 2007).

Conventional nitrification reaction consumes a large amount of oxygen, requiring 4.2 g of oxygen for each gram of nitrified ammonium nitrogen. During denitrification, the requirement of organic carbon is significant. Aiming to optimize these processes novel and sustainable technologies have been proposed. SND (*Simultaneous nitrification denitrification*) is one of this kind of technology, being the process in which, given the correct conditions, nitrification and denitrification occur simultaneously. The process is based on the presence of anoxic zones and availability of electron donors for the denitrification occurrence where the nitrification already is happening. Another possibility is the Anammox process (Anaerobic Ammonium Oxidation) in which nitrite and ammonium are converted into nitrogen gas under anaerobic conditions without needing to add an external carbon source. In the Sharon process (Single reactor system for High Ammonium Removal Over Nitrite) ammonium is oxidized in a reactor system under aerobic conditions to nitrite, which in turn is reduced to nitrogen gas under anoxic conditions by using an external carbon source.

Phosphorous removal

Microbes usually have low requirements for phosphorous, thus to achieve low effluent concentration levels is necessary an additional uptake beyond that needed for normal cell maintenance and synthesis. This situation is achieved when microorganisms get phosphorous as storage for posterior utilization, and it is possible when this specific organisms are submitted to different environment (aerobic and anaerobic or anoxic) successively. This situation provides a favorable growth condition to microorganisms capable of storing phosphorous, in comparison to other microorganisms (Brown and Koch, 2005). It is known that when an anaerobic zone is followed by an aerobic zone the microorganisms exhibit phosphorous uptake above normal levels. In the other hand, at anoxic conditions, phosphorous may be released by microorganisms. Many processes are based in these simultaneous exposures, as the five stage Bardenpho process, and Phostrip process. Only physicochemical treatment (precipitations and posterior removal) can also be applied and the most common chemicals used at the process are metal salts (ferric chloride and aluminum sulfate), lime and polymers. (Metcalf and Eddy, 2003).

Final effluent discharge/disposal

Final effluent treatment focuses on removal of pathogen organisms from wastewater and subsequent discharge to adjacent surface wastewater. Treated wastewater can be disinfected by adding chlorine, ozone or by using ultraviolet light. Nevertheless, high levels of chlorine in effluent must be avoided because chlorine may be harmful to aquatic life. Thus, treatment systems often add a chlorine-neutralizing chemical, such as sulfur dioxide, to the treated wastewater before stream discharge. Other alternative employed in effluent disposal is the land application that is a technology that can eliminate the need for tertiary treatment of wastewater (Johns, 1995; Uhlman and Burgard, 2001).

Land application by sprinkler or flood irrigation is a feasible alternative to surface water discharge, since the appropriate land is available. Soils with moderately slow to moderately rapid permeability and soils with the ability to collect any surface runoff are prerequisites that must be respected (Uhlman and Burgard, 2001).

The new tendency in wastewater disposal is the application of advanced treatment technologies aiming water recycling and reuse, as a result of the increasing costs of water and water discharge combined with reduced water availability and environmental problems. The reuse of water in food production and processing has become interesting both from an economical and a sustainability point of view.

Sludge treatment and disposal

Sludges are generated during the wastewater treatment process. Primary sludges, materials that are removed by gravity separation during primary treatment, often have a strong odor and require treatment prior to disposal. Secondary sludges are the microorganisms discharged from the biological treatment processes. The goals of sludge treatment are to stabilize the sludge and reduce odors, remove some of the water and reduce volume, decompose some of the organic matter, kill disease-causing organisms and disinfect the sludge.

The major problem is that untreated sludges are about 97 percent water; dewatering is the critical step which must be carried out in order to stabilize them. Gravity thickeners are the first and least expensive method of dewatering sludge; they hold sludge and allow it to settle down to the bottom and thicken by gravity, resulting in sludge with about 96 to 92 percent water. Then, the biological stabilization occurs, aiming the reduction of volatile content and eliminated offensive odors. After that, the sludge is mixed with a polymer to help coagulate particles, helping the dewatering process, and then pumped into vacuum filters, filter presses and centrifuges. The remaining product is a sludge cake that is approximately twenty to forty percent (20-40%) solids that can be hauled off site to a landfill, to composting or to land application. Caustic chemicals stabilization and heat treatment are other processes that can be employed by reduce pathogens (Metcalf and Eddy, 2003).

5.5.4. Food industry water uses, reuses and management

Any in depth discussion, about the complex modern technologies developed to improve food industry water quality, is far beyond the scope of this chapter. However, it can be useful to select and highlight the main issues relative to consideration of the broad range of requirements for management utility for the overall success of the current food industry processes.

Traditionally, but especially for the last two decades, the food and beverage industry has been characterized by a consistent increase of lucrative opportunities, but they still operate within very narrow profit margins in an increasingly competitive market. This explains why nowadays – with steady shrinkage of available resources – the industry is also facing a highly cross linked threat to their effort to restrain excessive operating costs. These include a multiplicity of support utilities and services, such as communications, energy, water, wastes, effluents treatments and or their final disposals. Fortunately, there are new management and technological tools available that can help businesses control energy, water and wastes costs (U.S. Environmental Protection Agency. EPA. 2004; General Electric Water & Process Technologies, 2008). That is, as they seek to obtain more efficient production methods, better economic and environmental outcomes should necessarily flow from a steady improvement of operational efficiency permitting them to produce more, new and diversified commodities while spending less. This industrial option is known by a recently recovered old concept: *manufacturing* – which, in general, means manufacturing for the future.

Indeed, to face the future, food and beverage industries have already embarked upon a long term strategic path, simultaneously seeking to minimize resource depletion – such as, energy and freshwater consumption – maximization of operational efficiency, and continued improvement of brand image before progressively better informed consumers and the general public. Besides, the complexity of the integrated solutions – requiring full solutions to the holistic challenges facing the food industry – they also provide great openings for intervention by other specialized consultancies, initiatives and activities which in turn, may explore advantages of innovation potential among a multitude of new possible solution approaches. One

should also bare in mind that when, for instance, 98% of beverage factories product water, sustainable water use is tied to job security and the economic health of the company.

Thermal energy, for instance, for the food processing sector, is mainly used in the form of steam and hot water, mainly applied for cleaning, pasteurizing, sterilizing and rendering. Electricity is predominantly used for the operation of machinery and equipment, refrigeration, ventilation, lighting and production of compressed air. Much of the alternative energy supply comes from steam and hot water production. Four alternative processes offer particularly good opportunities concerning decreased steam use: i) Pasteurization and sterilization by cold pasteurization and electron beam sterilization; ii) Evaporation, concentration and drying by supercritical extraction; iii) Chilling, cooling and refrigeration and iv) by applying controlled atmosphere packaging.

Food and beverage industries operate within a broad range of water quality standards: as a raw material, especially, for the drinks industry; cooling and cleaning; as process water, e.g. for extraction, washing raw materials, intermediates and products; for cooking, dissolving and for transportation; as auxiliary water, e.g. for the production of vapor and vacuum; as sanitary water. Therefore, water consumption control is one of the key environmental issues in food and beverage industries; in fact, all internal water conservation initiatives contribute to cost reduction of both water supply and wastewater systems, and imply the adoption of improved procedures in other sectors of the organization like reduction of freshwater resource depletion, and diminishing the risk of contamination or pollution of freshwater resources (Environwise, 2005).

The challenge for the food industry follows three main axes of action: First, to reduce the amount of waste water through efficient processing methods. Second, to improve the quality of waste water, through state-of-the-art water treatment. Third, to optimize the re-use, recycling and recovery of waste water whenever this is possible without compromising stringent EU, global and world wide hygiene requirements.

Data from the EEA (European Environment Agency) shows that in 2001, industry as a whole accounted for slightly less than 12% of overall water use in Europe; to promote processes efficiency and cost reduction the reuse of water is encouraged, especially in secondary processes such as boilers, steam generation, washing and cooling towers. Practices of reuse are gaining currency against previous concepts that all water to be used by food processing plants must fulfill drinking water quality (Lailana and others, 2001).

The use of processing units as potential storage vessels has also been demonstrated using a so called *inherent storage availability diagram* – ISAD (Thokozani Majozi and others, 2006). In applying this technique, the design engineer can choose either concentration or time as a primary constraint (Thokozani Majozi and others, 2006). Only, by a systematic approach to minimizing water use, will the food industry be able to continue reduction of water related costs. Currently water supply, wastewater treatment and final disposal make up between 20% and 50% of overall operating costs. Common source reduction methods employed at most plants include improving good housekeeping practices, making process modifications, substituting more environmentally friendly raw materials, and segregating waste streams. There are several simple cost-effective means of achieving source reduction such as: installing automatic shut-off valves, using low-flow or air-injected faucets/spray cleaners, switching from chemical caustic peeling processes to mechanical peeling, and converting from water to mechanical conveyance of raw materials through a production line (US-AEP, 2006). In fact, energy requirements can be reduced when using multi-effect evaporators for evaporation; for instance, when using single-stage evaporators, steam consumption ratio ranges from 1.1 to 1.2, expressed in tons per ton of evaporated water. In the case of double or third effect evaporators, the required steam will decrease to 0.6 - 0.7 and 0.4 tones of steam per ton of evaporated water, respectively. Mechanical vapor recompression – is obtained by a compressor and is limited to compression ratios of less than about 2:1 per stage. The compressor may be driven by an electric motor, gas engine, or gas turbine – which is another option to reduce steam and, and in consequence, water consumption.

Countercurrent rinsing is another operation that can improve water efficiency. In this process, the cleanest water is used only for the final or last stages of a rinse operation; water for early rinsing tasks, when the quality of the water is not so important, can be collected from water that is used during later stages in the process.

Key performance indicators (KPIs) should integrate an organized assembly of registered measurements that may help the food industry to objectively evaluate the consistency of their tactical management options with the set of established targets expressed in their strategic development plan, aiming for permanent procedures perfection (Environwise, 2004). By setting KPIs, food companies are encouraged to monitor what they are doing and then establish targets to achieve successive improvements (US-AEP, 2006). KPIs can be used to establish base-line performance and to track changes. KPIs can also be used for external benchmarking, i.e. to measure the performance of a company or product compared to a similar company or product, or against 'best practice' data (if available). Large volumes of water are needed for cleaning, sanitation, piping and pump sealings, cooling and food production purposes (US-AEP, 2006).

The pasteurization/sterilization process requires significant heat generation capacity. Many large food facilities have on site boilers to meet these high temperature requirements. Also, scale build-up in pipes reduces flow area and smoothness of passage. Clean pipes mean less energy is needed to drive the pumps. Energy costs may be reduced by up to 30% this way. When water systems are kept clean and free of deposits, heat transfer is at its most efficient. Scales and biofilm deposits are heat transfer insulators; this circumstance requires that food processing water supply must be carefully controlled, measured, monitored and audited. Industries that produce water as major ingredient (breweries, soft drinks, and bottled water) require high quality water with specific characteristics and in these cases, taste, odor and color must meet strict specifications. The previously described general ideas, about the importance of fresh water efficiency and requirements, drove several countries to impose mandatory standards under the law, such as regulations within United States and European Directives – Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC) Directive, Water Framework Directive, or specialized organizations (ex. Practical Environmental Advice for Business from Harwell International Business Centre) and private enterprises (such as Nestle, Unilever and Carlsberg) to systematic Guidelines or Handbooks, that can help industries and services, including food facilities, to introduce economically beneficial fresh water savings measures within a systematic water saving campaign.

Some operations, such as boiler blow down, cooling tower make-up and reactor effluents are typical examples where water quantity is far more important than the water quality.

As in any other industry, water-using operations in food processing plants may generally be classified into mass transfer-based and non-mass transfer-based operations (Manan and others, 2004).

Foo, and others, 2005, defined the designation of non-mass transfer-based water- the procedure of using operation water other than as a mass separating agent (MSA). Typical examples include water being fed as a raw material, or being withdrawn as a product or a by-product in a chemical reaction, as well as being utilized as a heating or cooling medium (e.g. cooling tower make-up).

Water as a raw material fed into a reactor, or as heating or cooling media are clearly non-mass transfer operations since these operations are not designed to preferentially transfer contaminant between streams (Foo and others, 2005).

Two main approaches are generally used to address to systematic synthesis of a water recovery network, i.e. the graphical approach (the water pinch technique) and mathematically-based optimization approach which implies two groups of tasks: utility targeting and network design – already commonly applied for continuous processes but it can also be extended to batch processes.

The options for regeneration-reuse and regeneration-recycling are modeled as mass transfer operations. Hence, there exists a trade-off between the network complexity and operating costs, which means that one must select the number and interconnections of water storage, between water sources and water using points, the ‘water sinks’.

In the food and beverage industry, apart from the required volumes and flows, special care must be taken in several constraints – water quality requirements of the water sources and also, very importantly, the appropriate time of availability. Cross-process combination of water and energy management is one of the major methods of reducing water consumption and, in consequence, waste water treatment costs (Galitsky and others, 2003; Lenntech_a, 2008, Lenntech_b, and 2008 Lenntech_c, 2008).

In what concerns water quality, spent process water in the food industry (salt content as electrical conductivity < 3000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ and COD < 700 mgO_2/L) can be desalinated and organic content can be removed fulfilling the requirements for water reuse. In most countries, food industry standards specify that, spent process water intended for reuse (even for cleaning purposes) must be at least of drinking quality, however several options are available to reduce waste water in the food industry, as an example fruit and vegetable processing methods should be noted (Boersma and Murarka, 1995): i – use of air flotation units to remove suspended debris from raw crop materials; ii – Recovery and reuse of process water throughout the processing plant; iii – Decrease of water volume use in peeling and pitting operations, as well as decrease of raw product losses; iv – Segregation of waste process streams at their sources, for potential by-product use; v – Countercurrent reuse of wash and flume/cooling waters; vi – Separation of low and high strength waste streams; vii – Installation of low-volume, high-pressure cleanup systems; viii – Conversion from water to steam blanching and peeling operations; ix – Use of air cooling after blanching. In operating systems, proper treatment of general water supply, boiler, cooling, and effluent waters often requires constant adjustment of their chemistry to meet the requirements of rapidly changing system conditions. A well designed network of water and water treatments are essential to maintaining proper overall control (US-AEP, 2006).

At this stage, it is important to remember that concerning water, the batch processes – most common in the food industries – are constrained by the amount and the quality of the available resources, and in both time and components concentration required by processes and products specifications.

In operating systems, proper treatment of water supplies, water storages, boiler, cooling, and effluent waters often requires constant adjustment of their chemistry/physics to meet the requirements of rapidly changing system conditions when several unit operations are applied, such as filtration, dealkalinization, softening and demineralization.

High purity feed water reduces the use of boiler chemicals due to less frequent blowdown requirements (reducing blowdown frequency by as much as a factor of 10). Lower blowdown frequency also results in lower fuel costs. Scale buildup is reduced due to a smaller concentration of impurities in the boiler feed water to foul heat transfer surfaces. The lower level of impurities also reduces corrosion rates in the boiler.

Water, even of potable quality, is characterized by having dissolved minerals, gases and particulate materials. Minerals lead to scaling that acts as an insulator reducing equipments heat transfer efficiency, gases may be corrosive and particulates may cause both problems. Many variables are important in utility water supply systems such as: water characteristics (suspended solids, hardness, pH swings); water flow/velocity; water temperature; process temperature; process demands; evaporation rates, water characteristics (suspended solids, hardness, pH swings) and, importantly, the informed judgments of the operator plus skills and training. Usually, these systems are controlled by evaluating pH, conductivity, iron, manganese, phosphates, silica, alkalinity and turbidimetry. Hence, water volumes, flows and quality are major concerns of the operational management utilities in the food industry, if not for other reasons – due to microbiological, chemical composition and the strict hygiene requirements and because of the range of temperatures necessary for their operations (General Electric Water and Process Technologies, 2008). Common untreated potable water usually is not suitable for boilers and can quickly lead to foam and scale buildup. The boiler would become less efficient and the steam would become dirty and wet, also decreasing the service life of the boiler (General Electric Water and Process Technologies, 2008).

Important losses of water may come from the steam system due to leaks, loss of condensate and blowdown. During the evaporation process, most solids stay in the liquid water phase section of the drum while steam is sent to the superheater. As the solids content increases in the liquid water phase on account of evaporation to produce steam, they are removed by sending a small portion (typically 1% to 2% of the feed water flow rate) through a drum blowdown pipe to the blowdown tank. This water is most often released to a drain (Spirax Sarco, 2008).

Chemicals product added to boiler feed water will lead to the presence of suspended solids in the boiler. These will inevitably collect in the bottom of the boiler in the form of sludge, and are removed by a process known as bottom blowdown. This can be done manually – the boiler operator will use a key to open a blowdown valve for a set period of time, usually twice a day.

Other impurities remain in the boiler water after treatment in the form of dissolved solids. Their concentration will increase as the boiler produces steam and consequently the boiler needs to be regularly purged of some of its contents to reduce the concentration (General Electric Water and Process Technologies, 2008 and Spirax Sarco, 2008). This is called control of total dissolved solids (TDS control). This process can be carried out by an automatic system which uses either a probe inside the boiler, or a small sensor chamber containing a sample of boiler water for TDS measurement. Once the TDS level reaches a set point, a control mechanism signals the blowdown valve to open for a set period of time. The lost water is replaced by feed water with a lower TDS concentration, consequently the overall boiler TDS is reduced. The disadvantage of base-exchange softening is that there is no reduction in the TDS and alkalinity. This may be overcome by the prior removal of the alkalinity and this is usually achieved through the use of a dealkalizer (Spirax Sarco, 2007 and Spirax Sarco, 2008). If the raw water has a high amount of suspended solids, it will quickly foul the ion exchange material, drastically increasing operating costs. In these cases, some pre-treatment of the raw water such as clarification or filtration must be considered.

In what concerns boilers or steam generators, both external and internal treatment systems require maintenance to guarantee water quality. The latter is usually achieved through pH control, degassing, blow down and simultaneous make-up and partially used water – that means used blow-down water must be replaced by a freshwater supply – a makeup (Lenntech_b), 2008).

External treatment, as the term is applied to water prepared for use as boiler feed water, usually refers to the chemical and mechanical treatment of the water source. The goal of external treatment is to improve the quality of this source prior to use as boiler feed water, and is performed before it enters the boiler. Such external treatment normally includes: Clarification, Filtration, Softening, Dealkalization, Demineralization and Degassing/Deaeration (Lenntech_b), 2008).

Internal boiler water treatment is applied to avoid, restrain and minimize equipment failures, regardless of external treatment malfunction. Internal treatment may be used alone or in conjunction with external treatment, and it should prevent corrosion and scaling. Its purpose is to properly react with feed-water hardness, to condition and disperse sludge, scavenge oxygen and prevent boiler water foaming.

When demineralization is required, processes commonly employed are electro dialysis, reverse osmosis, distillation, and ion exchange (Departments of the Army and the Air Force, 2004). Disposal of waste brine solutions derived from these processes often poses a serious problem because of higher costly need systems, and must be carefully considered at the beginning of the project development. All demineralization processes are energy intensive, and alternative water sources should be thoroughly investigated before a commitment to a demineralization project is made (Departments of the Army and the Air Force, 2004).

The blowdown of a boiler – being it continuous or by flash discharges – is used to limit the concentration of mineral salts, such as chlorides, alkalis and silicic acid, and it is, therefore, necessary to keep these parameters under strict specifications. It is also used to remove the sludge deposits, e.g. calcium phosphates, and corrosion products, such as ferric oxides from the boiler and to keep the water clear and colorless (Departments of the Army and the Air Force, 2004).

Primary indicators of boiler water treatment are pH, TDS (Total Dissolved Solids), TSS (Total Suspended Solids) and hardness.

Very high concentrations of any solids in boiler-water cause foaming. Foaming generally results from complex arrangements of specific substances such as alkalis, oils, fats, greases. Certain types of organic matter and suspended solids are particularly conducive to foaming. Boiler water carry-over is the ‘contamination’ of the steam with boiler-water solids. Even after implanting the most appropriate external water treatment of the supplied water, boiler feed water (including condensates return) still contains impurities that could adversely affect boiler operation. Internal boiler water treatment is then applied to minimize the potential problems and to avoid any potential failure, regardless of external treatment malfunction.

Makeup water introduces appreciable amounts of oxygen into the system. Oxygen can also enter the feed water system from the condensate return system. Deaeration is used to remove oxygen, carbon dioxide and other noncondensable gases from feed water and to, heat the incoming makeup water and return condensate to an optimum temperature, minimizing solubility of the undesirable gases; thus, providing the highest temperature water for injection into the boiler. For small boilers, the maintenance of feed water supply at the highest possible temperature and using oxygen scavenging chemical treatment is usually acceptable for oxygen control (lower than 0,01 mg/l).

Priming is the carryover of varying amounts of droplets of water, foam and mist into the steam, which causes a decrease in steam quality, lowers the energy efficiency of the steam and leads to the deposit of salt crystals as well (Lenntech_a, 2008).

A plant that maintains good feedwater achieves the following three benefits: it ensures maximum service life from its boilers, steam turbines, condensers, piping and pumps; it reduces maintenance expenses, and importantly, sustains optimal thermal performance.

Cooling towers are devices used – in a loop circuit – to remove heat that was picked up, through heat exchangers, along different process stages of production lines. Usually, the heat produced at cooling towers is released to the atmosphere by the hot water in circundant air, or by conter-current direct contact with atmospheric air, causing partial evaporation of the circulated water. Heat is dissipated into the atmosphere by the evaporation of water and energy removed due to the latent heat of vaporization of water, achieved by bringing the cooling water into direct contact with the surrounding air. As a result of evaporation the water becomes concentrated with dissolved solids which can cause scaling and the water itself can become biologically fouled – by biofilm deposits on contact surfaces – causing microbe-induced corrosion. Scaling and biological fouling reduce the life and efficiency of the cooling system.

Since only water evaporates, the concentration of dissolved minerals and other solids in circulating water will tend to increase unless some means of dissolved-solids control, such as blow-down, is provided. Some water is also lost by droplets being carried out with the exhausted air (drift).

Biological control is the foundation of cooling tower water treatment. Biofilms can directly cause corrosion problems (microbial induced corrosion – MIC), pathogen concerns (*Legionella*), increase pump pressure, promote heat-transfer inefficiency, and off-odors development. There are various, traditional methods available, utilizing a chemical program incorporating chemical inhibitors and biocides which, in themselves, also present particular problems of storage and handling and potential environmental impact issues but, more recently, physical alternatives were developed to treat recirculated cooling towers water, including ozonation, ionization, and UV light treatment (this requiring very low turbidity – UV disinfection with “low-pressure” lamps – say 0,05 to 0,6 W/cm² – is not as effective for TSS levels above 30 mg/L) and electromagnetic fields. Fortunately, microorganisms cannot become resistant to ozone even after long exposure, as is the case with most chemicals. Ozonation allows chemical free cooling towers waters by replacing disinfectants, dispersants, and inhibitors, so no chemical compounds to buy, store, apply, or dispose off and besides, it controls off odors in these equipments.

5.5.5. Final recommendations and conclusions

As emphasized at the beginning of this chapter, the aim was that of setting the major heuristic aspects of managing water and wastewater in the food industry, within different cultural and environmental requirements in mind. Hopefully, this article will stimulate interest in this rapidly developing field and attract new people to the area and more knowledge may be gathered. Once again, there are factors of economic competition and viability linked to the efficient applications of these technologies, as well as relatively recent environmental and legal standards to be met, which will probably become more stringent over time.

Technology alone cannot solve all our problems and even creates new challenges which must be met through joint effort, multidisciplinary expertise and genuine team work and good will among those determined to find the best solutions for water and wastewater management. In the key, global industry of food processing informed decision making translates into a higher value added product and a cleaner environment.

References

- APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Edition. American Public Health Association, Washington D.C.
- Boersma, Larry L. and Murarka, Ishwar P. 1995. Waste Management and Utilization In Food Production and Process. Department of Soil Science, Oregon State University, Corvallis, and Electric Power Research Institute, Palo Alto, California, CAST, October 1995. R124, ISBN 1-887383-02-6, October 1995, 125 pp.
- Bosch A., 1998. "Human enteric viruses in the water environment"; a review. *Int. Microbiol.* (1, 191-196).
- Breidenstein, Blaine B. 1995. Waste Management and Utilization in Food Production and Processing. Task Force Report. Palo Alto, California. R124, Council for Agriculture Science and Technology. ISBN 1-887383-02-6.
- Brown, J. A. and Koch, C. M. 2005. *Biological nutrient removal operation in wastewater treatment plants*. Water Environmental Federation – WEF, 450pp.
- Carlsberg Group. 2006. Environmental Report 2005-2006. <http://www.carlsberggroup.com/Investor/Facts/Documents/Carlsberg%20Environmental%20Report%202005-06.pdf>. (accessed in 31st July, 2008).
- De.leg 2 febbraio 2001 n.31 2 Attuazione della direttiva 98/83/CE. In Gazzetta Ufficiale n.52 del 3 marzo 2001 sup. ord. N41.
- Departments of the Army and the Air Force. 2004. Unified Facilities Criteria (Ufc). Water Supply: WaterTreatment. Army Tm 5-813-3. Air Force Afm 88-10, Vol 3. UFC 3-230-08A.
- Direttiva 98/83/CE del 3 novembre 1998. in gazzetta ufficiale delle Comunità europee 5.12.98.
- Duarte, I. C. S., Saavedra, N. K. D., Oliveira, L. L. and Varesche, M. B. A. (2005). Anaerobic Degradation of Anionic Surfactant in Fixed Bed Reactor in: Proceedings of VII Taller y Simposio LATinoamericano sobre Digestión Anaerobia, October, 2th to 5th, Punta Del Leste, Uruguay 209-216.
- Ed W.B. de Leer and Corrie Erkelens 1990. "Pathways for the Production of Organochlorine Compounds in the Chlorination of Humic Matirials". In: Richard A., Larson (eds). Biohazards of Drinking Water Treatment. p. 97-106
- Environwise. Practical Environmental Advice for Business. 2005. Cost-effective water saving devices and practices – for industrial sites. GG523. Revised version. Harwell International Business Centre. Didcot.
- Galitsky, Christina, Martin, Nathan, Worrell, Ernst and Lehman, Bryan. 2003. Energy Efficiency Improvement and Cost Saving Opportunities for Breweries. An ENERGY STAR® Guide for Energy and Plant Managers. Energy Analysis Department. Environmental Energy Technologies Division. Ernest Orlando Lawrence Berkeley National Laboratory. University of California. Berkeley, CA 94720. LBNL-50934.
- General Electric Water and Process Technologies. 2008. Handbook Industrial Water Treatment (online publication). <http://www.gewater.com/handbook/index.jsp> (accessed in July, 30th 2008).
- Givens, S. W. and Cable James K. 2008. CASE STUDY – A Tale of Two industries Pretreatment of Confectionary and Bakery Wastewaters. On Line: <http://www.p2pays.org/ref/14/13658.pdf>,
- Godoy P., Nuin C., Alseda M., Llovet T., Mazana R., Dominguez A. 2006. "Waterborne outbreak of gastroenteritis caused by Norovirus transmitted through drinking water". *Rev. Clin. Esp.*: 206(9); 435-437.
- Gujer, W. and Zehnder, A.J.B. 1982. "Conversion processes in anaerobic digestion", *Water Science and Technology*, 15(8-9), p. 127-167.
- Hansen, P-I. E. and B. F. Mortensen, 1992. *Reduction of Pollution and Reclamation of Packaging House Waste Products*, in A.M. Pearson and T.R. Dutson (eds), *Inedible Meat By-products. Advances in Meat Research* 8. Elsevier. Amsterdam.
- Johns, M.R. 1995. Developments in wastewater treatment in the meat processing industry: a review, *Bioresource Technol.* 54, pp. 203–216.
- Lailana, C., Krinner, W. and Estrela, T. CEDEX Nixon, . S. . Water Research Centre. Leonard, J. , Berland, J. M.. IOW ETC/IW Leader: Lack, T. J. Sustainable water use in Europe – Part 2: Demand management. SBN: 92. 9167-268-8. Catalogue No: TH-34-00-293-EN-C.
- Lefebvre, O. and Moletta, R. 2006. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. *Water Research*, 40, 3671 – 3682.
- Lenntech. 2008 a). Boiler feed water. http://www.lenntech.com/boiler_feedwater.htm (accessed, July, 31st, 2008).
- Lenntech. 2008 b). Food and beverages. <http://www.lenntech.com/food-beverage.htm>. (accessed, July, 31st, 2008).
- Lenntech. 2008 c). Water treatment decision path tutorial. <http://www.lenntech.com/water-treatment-decision-path.htm>. (accessed, July, 31st, 2008).
- Lettinga, G.; Hulshoff Pol, L.W.; Van Lier, J.B.; Zeeman, G. 1999. "Possibilities and potential of anaerobic wastewater treatment using anaerobic sludge bed (ASB) reactors". In: Rehm, H.J.; Reed, G. (eds). *Biotechnology*. Wiley-VCH, Weinheim, p. 518-526.
- Lewis WJ., Foster SSD., Dragar BS. 1982. "The risk of groundwater pollution by on-site sanitation in developing countries, a literature review". Dubendorf, Switzerland, International Center for Wastes Disposal (Report No. 01/82).

- Manan ZA, Foo DCY, Tan YL. 2004. Targeting the minimum water flow rate using water cascade analysis technique. *AIChE Journal* 0(12):3169e83.
- Meganha, M. F. B (2006). *Dairy products*. CETESB, São Paulo, 95p. In Portuguese, available in <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>
- Metcalf and Eddy, Inc. 2003. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse* 4th ed.: McGraw Hill, New York.
- Mittal, G.S. 2006. Treatment of wastewater from abattoirs before land application—a review. *Bioresource Technology*, 97 (9) pp 1119-1135.
- Modin, O., Fukushi, K., Yamamoto K. 2007. Denitrification with methane as external carbon source. *Water Research*, 41, 2726 – 2738.
- Nielsen V.C. 1996. Treatment and Disposal of Processing Wastes. In: *Processing of Poultry*, edited by G.C. Mead, Chapman and Hall Publishing Company, New York, New York.
- Santos, M. S. and Ribeiro, F. M. R. 2005. *Brewery and Soft drink*. CETESB, São Paulo, 60p. In Portuguese, available in <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>
- Sanz J. L., Culubret E., Ferrer J., Moreno A. and Berna S. L. 2003. Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in Upflow anaerobic sludge Blanket (UASB) reactors. *Biodegradation*, 14, 57-64.
- Scully F.E. Jr., Marzina K., Sonenshine D.E. and Ringhand H.P. 1990. "Toxicological Significance of the Chemical Reactions of Aqueous Chlorine and Chloroamines". In: Richard A., Larson (eds). *Biohazards of Drinking Water Treatment*. p. 141-152
- Site Visit Report – North Carolina Department of Environment and Natural Resources: Meat processing facility COD Reduction. 2008. On line: <http://www.p2pays.org/ref/09/08028.pdf>
- Speece, R. 1996. "Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters". Archae Press, Nashville.
- Spirax Sarco. (2007). *The Steam and Condensate Loop Book*. Best practice guide to saving energy and optimising plant performance. SBN 978-0-9550691-3-0. Pp. 1,464.
- Spirax Sarco (online tutorials). 2008. Steam Engineering tutorials Water for the Boiler. <http://www.spiraxsarco.com/resources/steam-engineering-tutorials/introduction/the-steam-and-condensate-loop.asp> (accessed in August, 6th, 2008).
- Thokozani Majoji, C.J. Brouckaert and C.A. Buckley. 2006. "A graphical technique for wastewater minimisation in batch processes". *Journal of Environmental Management*. 78. 317–329.
- Tusseau-Vuillemin, M-H. 2001. Do Food Processing Industries Contribute to the Eutrophication of Aquatic Systems? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 50, 143:152.
- Uhlman, K., and D. Burgard 2001. Land Application for Natural Wastewater. Treatment. *Environmental Protection*,. 12 (8) pp 28-30.
- US-AEP. U.S.-Asia Environmental Partnership. 2006. Clean Technologies in U.S. Industries: Focus on Food Processing. Online publication: <http://www.owr.ehnr.state.nc.us/ref/09/08853.htm> (accessed in July, 31st).
- U.S. Environmental Protection Agency. EPA 1962. "Public Health Service Drinking Water Stanrads". EPA No. N/A Pp.70
- U.S. Environmental Protection Agency. EPA. 1979. "Spinoff on dairy processing water and wastewater management". United States Environmental Protection. Extension special report no. AM-18B.
- U.S. Environmental Protection Agency. EPA. 2002. "Development Document for the Proposed Effluent Limitations Guidelines and Standards for the Meat and Poultry Products Industry Point Source Category". United States Environmental Protection. Agency 40 CFR 432.
- U.S. Environmental Protection Agency. EPA. 2004. "Guidelines for Water Reuse". United States Environmental Protection. Agency EPA/625/R-04/108.
- U.S. Environmental Protection Agency. EPA. 2008. "Emerging technologies for wastewater treatment and in-plant wet weather management" United States Environmental Protection. Agency EPA 832-R-06-006.
- W.F.J. Hill, E.W. Akin, W.H. Benton 1971: "Detection of viruses in water: a review of methods and application". *Water Res.* 5:967-995.
- Webb, C. and Atkinson, B. 1992. "The role of chemical engineering in biotechnology", *Chemical Engineering Journal*, 50, B9-B16.
- World Health Organization 1996. *Guidelines for drinking Water*. Second edition Vol. 2.

II “THE ROLE OF DISINFECTION IN FOOD INDUSTRY”
Proceeding of “Food Science 2006 VOL.27 No.11: 159-163 (Sreial No.324)

Xiamen Cina

THE ROLE OF DISINFECTION IN FOOD INDUSTRY

G. Sansebastiano, R. Zoni, R. Zanelli and L. Bigliardi
Department of Public Health Sec. of Hygiene
University of Parma Italy

SUMMARY

At present microbiological risk are still the most frequent in the food industry and the disinfection is one of the procedures that can be carried out in the general prevention of foodborne infectious diseases.

In the industrial process of food transformation the cleaning and disinfection procedures of surfaces and machinery have to be considered an integrate system with food production, a technological aspect that surely affects the finished product quality and safety.

First of all to carry out properly these operations it is necessary that the factory and the equipment have been designed and constructed with high standard of hygiene to reduce the risk of contamination and to facilitate the sanitation.

The procedures involve several stages which generally include pre-washing with water, cleaning, real disinfection, and a final rinsing with water.

In order to assure a right disinfections of surfaces areas and of processing equipment the choice of disinfectant takes on particular importance.

Some of the most widely used disinfectants include the hypochlorous acid, the chlorine dioxide and the peroxides like peracetic acid; the latter is widely used in soft drink and mineral water industries.

The efficiency of these chemical agents depends on various factors as pH, temperature and the presence of organic substances with which the disinfectants can react to give by-products which can reduce the activity and can present toxicity.

The use of hypochlorite may lead to the formation of carcinogenic substance such as Trihalomethanes (THM) while the use of Chlorine dioxide may lead to the formation of chlorites and chlorates.

The peracetic acid is a good alternative compounds and it doesn't lead to the formation of carcinogenic by-products.

In our researches we evaluated the effectiveness of peracetic acid to inactivate some resistant micro-organism like Hepatitis A virus; our results show that in practical application in CIP (Cleaning in place) it's necessary to use concentration of 600-1300 mg/l of peracetic acid for 15-30 minutes of contact time for an inactivation >99,99%.

Key words: food industry, disinfection, Peracetic acid, HAV

INTRODUCTION

In industrialized countries, the epidemiology of infectious diseases with indirect transmission through water and foodstuffs has undergone considerable changes over the past decades with the almost total disappearance of some traditional pathogen microorganisms in the oro-fecal circuit and the appearance of new microorganisms called “emerging pathogens” which, though not responsible for serious diseases, nevertheless have an important impact on human health.

Several measures have been introduced concerning vaccination and on an environmental level with important land reclaiming works, and these measures have led to the eradication of certain pathologies (e.g. poliomyelitis)⁽¹⁵⁾ and the control of others (typhoid fever).⁽¹⁰⁾

On the other hand, several factors have affected the appearance of other pathologies caused by opportunistic pathogens (*Listeria spp*, *E.coli O157: H7*)^(8,11,15) and, above all, by viruses (Norwalk virus and Norwalk like virus)^(4,5) in certain age groups, particularly the elderly and children.

The role played by foodstuffs in the transmission of these pathogens is particularly important, and their diffusion is mainly linked to the changing characteristics of the food industry and of the markets with the introduction of new technologies and the globalization of trade, as well as to new eating habits of consumers.

This confirms that today the microbiological risk is increasingly frequent in the food industry,⁽¹⁴⁾ as has been demonstrated by American and European epidemiological data regarding outbreaks of foodborne diseases.⁽¹³⁾

As far as prevention is concerned, several interventions can be carried out though one of the most important in the food industry is undoubtedly disinfection.

It can be claimed that disinfection and cleaning operations are an integral part of food processing and production procedures, and the means whereby these operations are carried out have a decisive effect on the quality of the end product.

Indeed, it should be pointed out that in order to carry out an effective sanitizing programme all the equipment used in the industry should be designed and built so as to be easily cleaned and disinfected suitably and frequently, in order to ensure the good quality of the end product.

CIP (Cleaning in Place) is implemented in various production lines, requiring cleansing with detergents followed by disinfection procedures.

One of the problems to be faced is the selection of the disinfectant in order to ensure a good microbicidal activity with reduced corrosion effects on the surfaces and on the equipment.

Some of the most widely used compounds include oxidizing agents such as chlorine and its compounds, and peroxides.

Chlorine as hypochlorous acid (HClO) has been used and is still used in disinfection of water in consideration of its effective oxidizing effects, but these effects are conditioned by the presence of organic substances to which it may react, leading to the formation of toxic substances, the most widely known being the THMs (trihalomethanes) including chloroform, which has an oncogenic effect.⁽⁷⁾

Studies carried out on “ready-to-eat” drinks and vegetables have shown variable concentrations of these by-products.⁽¹⁾

As an alternative disinfectant in water, several European countries have started using chlorine dioxide (ClO₂), which is also used in the food industry⁽¹²⁾. ClO₂ is effective in a wide pH range (5-9) and is relatively unaffected by organic substances.

When using it, one needs to keep under control the concentration of chlorites and chlorates, the inorganic by-products which are formed when dioxide has been incorrectly prepared or when it has a disproportionate preparation. In particular, chlorites are meta-hemoglobinizing agents.

The virucidal effects of HClO and ClO₂ have been studied on Enteroviruses and in particular on the Polioviruses, since these microorganisms are particularly resistant to disinfectants.

The data we have gathered on Poliovirus 2 under experimental conditions and neutral pH have also shown a good reduction of the viral load with HClO and even more so with ClO₂.

In particular, a 99% reduction of the viral titre of Poliovirus 2 occurred after 15 mins contact with 0.8 mg/l of HClO; this contact time dropped to 5 minutes at the same concentration of ClO₂ with the same inactivation percentage.

The greater effectiveness of ClO_2 was shown also in experimental trials we conducted on Poliovirus 1 ⁽¹³⁾.

Bearing in mind the effective virucidal activity of chlorine and its compounds, but also the possibility that by-products such as THMs, chlorites and chlorates may be formed, peracetic acid has been used for the past few years in the food industry in the disinfection procedures as an alternative to chlorine compounds.

The virucidal activity of peracetic acid is effective and has properties which are similar to those of hydrogen peroxide, with the advantage of providing a sporicidal activity even at room temperature and not being inhibited by catalase and peroxidase.

It is used in the food industry for disinfection of steel and glass tanks, as well as of piping and cisterns for transport of foodstuffs ⁽⁶⁾; it is also used for the disinfection of systems where meat and poultry are processed, in cheese factories, and in factories where beer, wine and soft drinks are manufactured ⁽⁶⁾.

Just like other disinfectants with an oxidizing effect, peracetic acid is affected by pH, by temperature and by the presence of organic substances even if at lower level than HClO .

Several studies have been carried out by our department on the virucidal activity of peracetic acid versus several viruses.

Our research

In this part of our research, the effectiveness of PAA was assessed with inactivation kinetics of hepatitis A virus, a microorganism which has shown good resistance to the effect of oxidants.

MATERIALS AND METHODS

Inactivation kinetics were performed on the hepatitis A virus (strain HM-175), at different concentrations of disinfectants, and observations were recorded at various contact times of the virus-disinfectants inoculum.

Cell cultures

The HAV was grown in foetal cell cultures from monkey kidneys FRHK4

Disinfectants

39% peracetic acid with final concentrations 160-1280 mg/l

5% Hypochlorous acid with final concentrations 0.4-1.6 mg/l

0.06-0.07% ClO₂ with final concentrations 0.4-1.6 mg/l

Performing the experimental trials

To assess the trend of the HAV titre the trials were set up by adding 1 ml of virus to 100 ml of the disinfectant solution at the required concentration, buffered at neutral pH and at +20°C.

Once the specimens had been removed at the various times, neutralized and for each of them 10 fold dilutions were performed and each was subsequently disseminated at a concentration of 0.1 ml in cell cultures for HAV.

Dissemination of HAV samples was performed on selective cultures for the Hepatoviruses which had previously been arranged with 12 days' observations to assess subsequently the viral replication detectable as lysis plaques (titre PFU).

Data Analysis

The data were processed by means of linear regression and we proceeded to group the data according to two inactivation intervals.

RESULTS

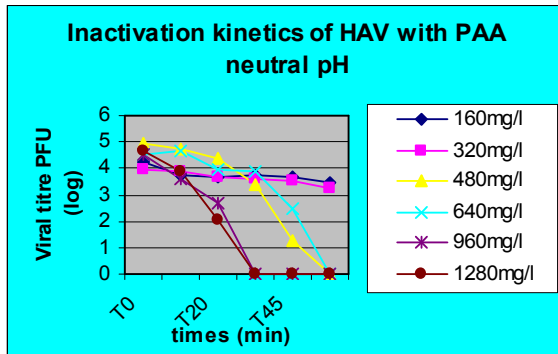
1) Trials on HAV with peracetic acid

The trends of the inactivation kinetics have shown a reduction of the viral activity only at a concentration of 480 mg/l (graph1).

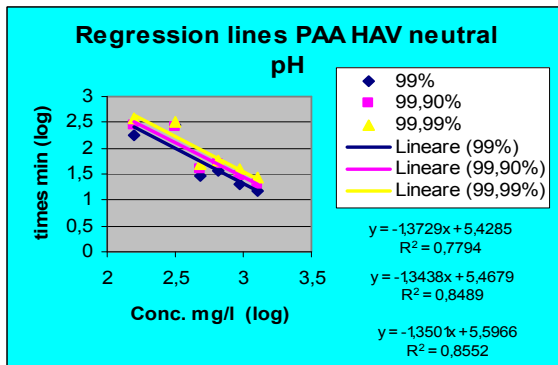
Following the analysis of the regressions which were then calculated, a good linear trend was observed with R² ranging from 0.78-0.85 for the 3 inactivation percentages (graph 2).

From the data grouped in two inactivation intervals, 99-99.9% and 99.9-9.99%, in neutral pH conditions with concentrations of approx. 1300 mg/l mean times of inactivation ranged between 15 and 30 minutes (graph3).

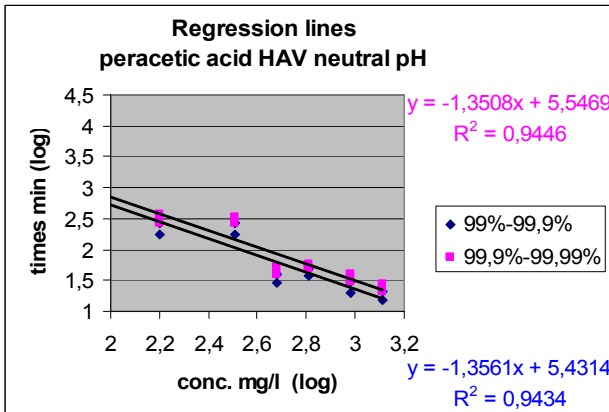
Graph 1



Graph 2



Graph 3



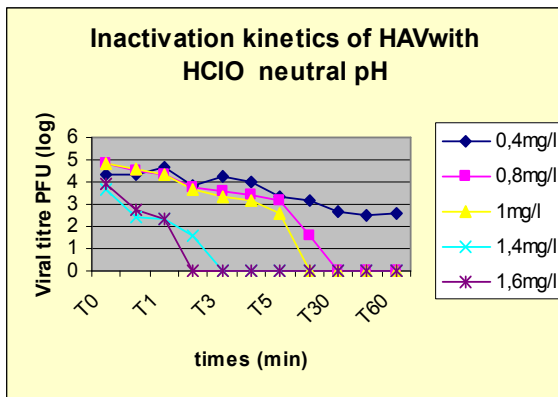
2) Trials on HAV with HClO

The trends of the inactivation kinetics have shown a reduction of the viral activity at a concentration over 0.8 mg/l (graph 4).

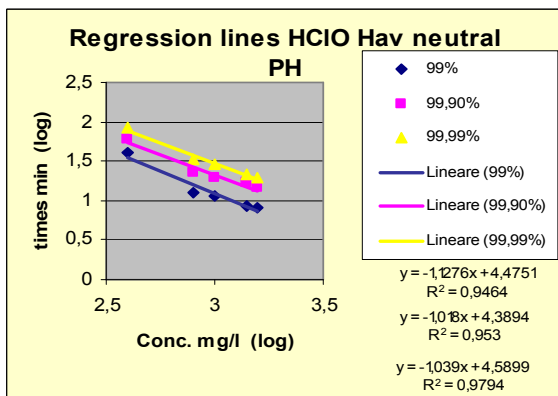
The analysis of the regressions were then calculated and a good linear trend was observed with R^2 ranging from 0.94-0.97 for the 3 inactivation percentages (graph 5)

From the data grouped in two inactivation intervals, 99-99.9% and 99.9-99.99%, with concentrations of approx. 1 mg/l mean times of inactivation ranged between 16 and 25 minutes (graph 6).

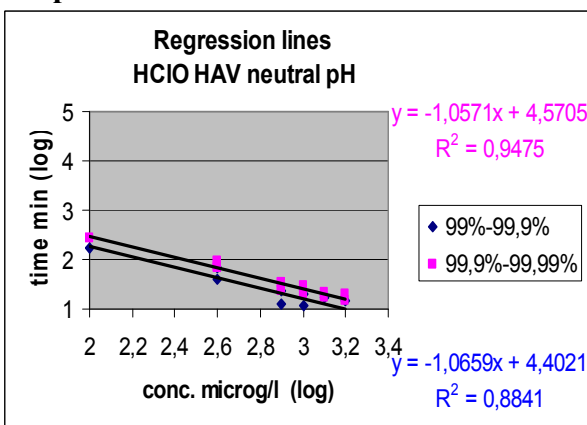
Graph 4



Graph 5



Graph 6



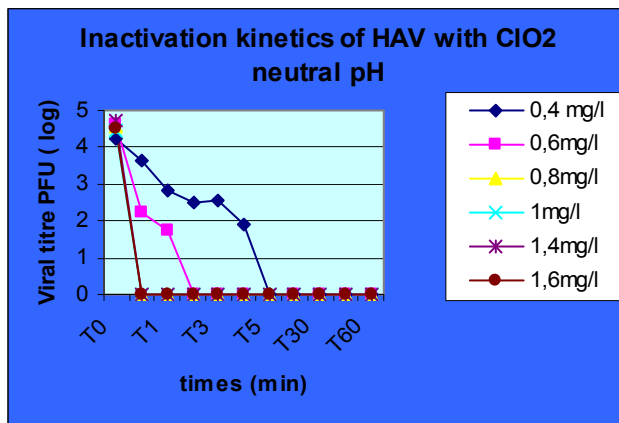
3) Trials on HAV with ClO₂

The trends of the inactivation kinetics have shown a reduction of the viral activity at a concentration over 0.8 mg/l (graph 7).

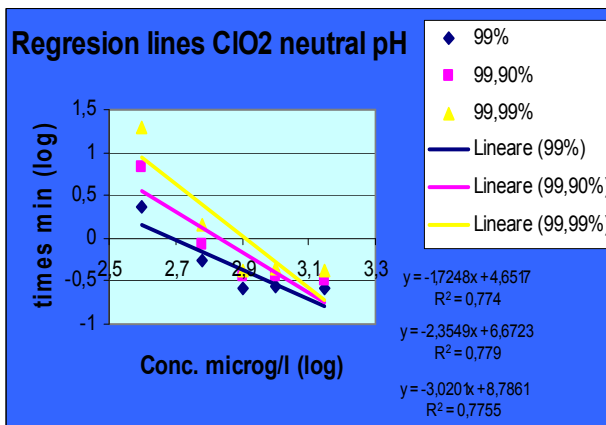
The analysis of the regressions were then calculated and a good linear trend was observed with R² ranging from 0.77-0.78 for the 3 inactivation percentages (graph 8)

From the data grouped in two inactivation intervals, 99-99.9% and 99.9-9.99%, with concentrations of approx. 0.8 mg/l mean times of inactivation ranged between 2.5 and 3.5 minutes (graph 9).

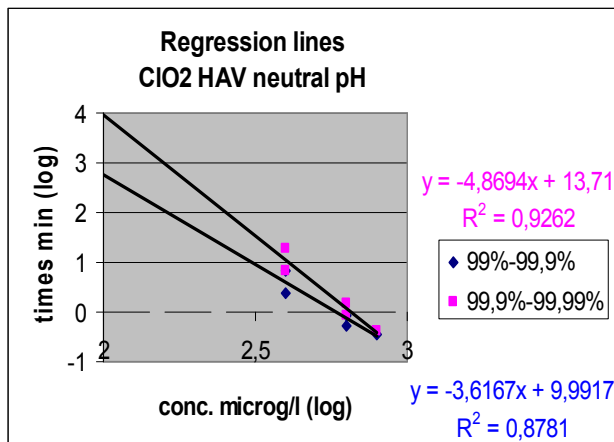
Graph 7



Graph 8



Graph 9



DISCUSSION

The activity of peracetic acid was compared to that of hypochlorite and of chlorine dioxide versus the *hepatitis A virus*.

In experimental conditions at neutral pH the results have shown a good activity of Peracetic acid in absence of organic substances as in the last step of CIP; nevertheless mean contact times were high, 15-30 minutes, for inactivation above 99.9%.

The results of the kinetics of this virus with HClO have also shown high mean times, 16-25 minutes, for the two gaps of inactivation.

The two situations are similar: in fact, when comparing the times obtained with peracetic acid with those obtained with HClO, no significant differences appear.

This result leads us to prefer peracetic acid to HClO even though longer times are required for a viral inactivation equal to 4 log.

This aspect should be taken into account in practical applications where contact times are often very brief. In such cases, it is possible to increase the concentration, for instance from 0.1 to 1% so as to reduce contact times to a minute when interventions are not carried out very frequently in order to avoid corrosion of the equipment. On the other hand, low concentrations at long contact times can be used when complete sanitizing of the plants needs to be carried out.

Apart from its use in cases where viral contamination is to be expected, the use of concentrations of peracetic acid which can inactivate a resistant virus such as HAV, ensure inactivation of less resistant microorganisms with greater probability.

Only chlorine dioxide presents a greater oxidizing effect versus the same virus (*HAV*) with significantly lower mean inactivation times.

It is well-known that ClO_2 presents some disadvantages in its application in the food industry, first of all the necessity to prepare the solution *in loco* at the moment of use and secondly the probability of chlorite formation; its use is suitable in the field of disinfection of water destined to human consumption to avoid the formation of chlororganic compounds.

However, the same inactivation levels can be obtained as with ClO_2 by increasing the concentration of peracetic acid.

Peracetic acid may be considered a valid alternative disinfectant to hypochlorous acid or ClO_2 for applications in the food industry on equipment used in line and on surface areas in contact with foodstuffs, bearing in mind that it has a lower corrosive effect and a lower reactivity versus organic substances.

REFERENCES

1. Abdel-Rahman MS.: the presence of trihalomethanes in soft drinks. *J.Appl. Toxicol.* 2 (3): 165-166; 1982
2. Baldry MGC, French MS.: The activity of peracetic acid on sewage indicator bacteria and viruses. *Wat Sci Technol* 1991; 24: 353-7
3. Centers for Disease Control: "Foodborne disease outbreaks, 5 years summary, 1988-1992". *MMWR*; 45: SS-5,1996
4. Cliver DO: Epidemiology of viral foodborne disease. *J Food Prot* 57:263-266, 1994
5. Cliver DO: Viral foodborne disease agents of concern. *J Food Prot* 57:176-178, 1994
6. Dyehdala G.R.(1988): New Hydrogen peroxide-proxyacetic acid disinfectant. Proc.4th Conf. Prog. Chem. Disinfection, Binghamton, NY, 315-42. In Block S.S. (1991): Disinfection, sterilization and preservation. Ed. 1991, Lea and Febiger, Philadelphia-London.
7. Entz R., Thomas K., Diachenko G.: Residues of volatile halocarbons in food using headspace gas chromatography. *J.Agric. Food Chem.* 30:846-849; 1982

8. Farber JM, Peterkin PI: *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 55: 476-511, 1991
9. Harekeh MS: Inactivation of enteroviruses, rotaviruses, and bacteriophages by peracetic acid in a municipal sewage effluent. *FEMS Microbiol Lett* 1984; 23: 37-30
10. Ivanoff B., Levine MM., Lambert PH.: Vaccination against typhoid fever: present status. *Bull World Health Organ.* 72: 957-971, 1994
11. Padhye NV, Doyle MP: *Escherichia coli* O157: H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *J Food Prot* 55: 555-565, 1992
12. Ruzic C.: Chlorine dioxide-based water treatment in the food industry. Proceedings of "First European Symposium on Chlorine Dioxide and Disinfection" Roma November 7-8 1996. Ed. C.I.P.A. 1997. *Collana ambiente.* 17: 197-209; 1997
13. Sansebastiano G.: Epidemiological review on chlorine dioxide. Proceedings of "First European Symposium on Chlorine Dioxide and Disinfection" Roma November 7-8 1996. Ed. C.I.P.A. 1997. *Collana ambiente.* 17: 197-209; 1997
14. Smith JL, Fratamico PM: Factors involved in the emergence and persistence of food-borne diseases. *J Food Prot* 58:696-716, 1995
15. Terr PI: *Escherichia coli* O157: H7: overview of clinical and epidemiological issues. *J Food Prot* 57:632-637, 1994
16. WHO. Certification of Poliomyelitis Eradication, European Region. June 2002. *WER* 2002; 27: 221-223

**III. “EXPERIMENTAL STUDY ON VIRUCIDAL
ACTIVITY OF PERACETIC ACID”**
International Conference Faro may 2006
(Traditional Food Processing and Technological Innovation)

EXPERIMENTAL STUDY ON VIRUCIDAL ACTIVITY OF PERACETIC ACID

G. Sansebastiano, R. Zoni, L. Bigliardi, R. Zanelli

Department of Public Health, Sec. Hygiene

University of Parma, Italy

INTRODUCTION

Considerable changes have taken place over the past few years in the food industry, especially in relation to the increasing market demands which have led to increased production and consequently a rise in the problems involved in guaranteeing a consistently high quality and safety of the foodstuffs.

Bearing this in mind, it became necessary to value the production and economic aspects in according to the health- hygienic aspects of the processing systems for foodstuffs.

One of the most important issues to be dealt with concerns the construction characteristics of the machinery, which should reduce substantially the critical points where the products come in contact with the equipment, as well as favour procedures for cleaning and disinfecting, both manually and automatically.

At present, microbiological risks are still the most frequent in the food industry.

The CDC have investigated foodborne diseases occurring in the United States between 1983 and 1992, and have identified the agents which were responsible for those episodes.

Over 95% of the episodes investigated were caused by etiological agents, such as bacteria, viruses and parasites, and by the toxins produced by some of them. As far as bacteria are concerned, the highest percentage of cases was attributed to *Salmonella spp.* which was responsible for 52% of the episodes, and to *Shigella spp.*, the etiological agent in 15% of the cases investigated.

The *hepatitis A virus* and the *Norwalk* and *Norwalk-like viruses* were classified as the agents which most affected these foodborne diseases, and only 3% of the episodes can be attributed to non biological agents, i.e. chemical agents such as heavy metals, which are also able to contaminate food **(1, 2)**.

Disinfection is one of the procedures that can be carried out in general prevention of infectious diseases as it is able to interrupt the transmission chain between the pathogen microorganism and the host.

In order to assure a suitable disinfection of surface areas and of the processing equipment, the choice of disinfectant takes on particular importance.

In general, compounds with an oxidizing effect are widely used, and they include chlorine and its compounds and peroxides, including hydrogen peroxide and peracetic acid.

These compounds are characterized by a wide range of action and, in suitable concentrations, they present sterilizing effects although their efficacy may be affected by various factors.

In fact, in the various processing procedures for foodstuffs, product residues may remain on the equipment, thereby representing a risk of microbial contamination.

The organic substances, together with the microorganisms which may adhere to them, deriving protection and nutrition from them, form the biofilm which conditions and reduces the normal efficacy of the disinfectants used **(3, 4, 5, 6)**.

Another aspect which should not be underestimated during disinfection procedures, involves the possible formation of toxic by-products as a result of the reaction between the disinfecting agent and the organic substances found on the matrixes to be treated; these by-products may also derive from an incorrect procedure in the preparation of the oxidants.

In particular, it is well-known that the use of hypochlorites may lead to the formation of carcinogenic substances, such as trihalomethanes, while the use of chlorine dioxide as alternative disinfectant may lead to the formation of chlorites and chlorates, both of which are involved in pathogen diseases.

The use of peroxides may partially solve these problems, even though very few data are currently available on the possible formation of toxic reaction compounds.

In industrial processing systems, disinfection with chlorine – especially in the form of hypochlorous acid - has recently been replaced by peracetic acid, a disinfectant with a wide range of action versus pathogen microorganisms; it has not been found to be responsible for the formation of carcinogenic by-products through reaction, even though it appears to be involved in the formation of genotoxic secondary products, such as aldehydes (nonanal and decanal) and methoxy-methyl-benzene **(7, 8)**.

Furthermore, peracetic acid allows a good compromise to be reached as regards concentration/contact time for the inactivation of pathogen microorganisms, without

causing damage to the equipment and without releasing any residues on the surface areas, which would reduce the efficacy of the disinfecting procedure.

The experimental trials we have carried out confirm the high microbicidal activity of peracetic acid also versus very resistant micro-organisms, such as *Hepatitis A virus*, and this offers a good guarantee as regards disinfection since it ensures the elimination of less resistant pathogenic micro-organisms (9).

AIM

The investigation was carried out on the virucidal effects of peracetic acid versus the *hepatitis A virus*, as well as two *Enteroviruses*, the *Poliovirus 2* and *Coxsackie B5* to ensure an effective assessment and the comparison between chlorine and chlorine compounds.

MATERIALS AND METHODS

Inactivation kinetics were performed on the *hepatitis A virus* and on the *Enteroviruses* tested, at different concentrations of peracetic acid ranging from 160 mg/L to 1280 mg/L, and observations were recorded at various contact times of the virus-disinfectant inoculum as regards the gradual disappearance of the cytopathic effect determined by the virucidal activity of the disinfectant being tested.

Viruses tested

The viral strains HM-175 (VR-1402, ATCC) were tested for *HAV*, a vaccinal strain for the *Polio 2* virus and for the *Cox B5* virus a strain that was isolated from a clinical case.

Cell Cultures

The two *Enteroviruses* were grown in cell cultures from monkey kidneys RC-37, and the *HAV* in foetal cell cultures from monkey kidneys FRhK4.

Disinfectant

39% peracetic acid with final concentrations of 160-320-480-640-960-1280 mg/L.

PERFORMING THE EXPERIMENTAL TRIALS

The concentrations of disinfectant to assess the trend of the *HAV* titre and of the *Enteroviruses* were set up by adding 1 ml of virus to 100 ml and to 50 ml respectively of the disinfectant solution at the required concentration, buffered at the required pH value.

Once the specimens had been removed at the various times, for each of them 10 fold dilutions were performed and each was subsequently disseminated at a concentration of 0.1 ml on the selective cell cultures for *HAV*, and at a concentration of 25µl for the *Enteroviruses* being tested.

Dissemination of *HAV* samples was performed on selective cultures for the *Hepatoviruses* which had previously been arranged with 12 days' observation to observe the cytopathic effect detectable as lysis plaques (titre in UFP); both specimens of *Coxsackie B5* and *Poliovirus 2* were arranged in micromethod plates to which selective cell cultures were added as well as suitable growth medium, and the cytopathic effect detectable as cell lysis was observed after 4 and 6 days from the inoculum in the culture (titre in TCID₅₀).

Data Analysis

The data were processed by means of linear regression and were compared to previous data on kinetics which we had performed on the same viruses, using as disinfectants hypochlorous acid and chlorine dioxide at concentrations of 0.4, 0.8, 1, 1.4, 1.6 mg/L. Following this analysis, we proceeded to group the data according to two inactivation intervals.

RESULTS

1) Trials on *HAV* with peracetic acid

The trends of the inactivation kinetics have shown a reduction of the viral activity only at a concentration of 480 mg/l in the three pH conditions tested (graph 1).

Following the analysis of the regressions which were then calculated, a good linear trend was observed with R² ranging from 0.97 to 0.99 with a 4 log reduction (graph 2).

From the data grouped in two inactivation intervals, 99-99.9% and 99.9-99.99%, in neutral pH conditions with concentrations of approx. 1300 mg/l mean times ranged between 15 and 20 minutes (graph 3).

2) Trials on *Poliovirus 2* with peracetic acid

In this case, the trends of the inactivation kinetics have shown a significant reduction of viral activity starting with the lowest concentration of 160 mg/l at acid and neutral pH; at a basic pH the reduction was observed only at the highest concentrations of 960 and 1280 mg/l (graph 4)

From the analysis of regressions for a decrease of 4 log a good linear trend can be observed with R² ranging between 0.97 and 0.99 (graph 5).

Mean times for the two inactivation intervals ranged between 15 and 18 minutes with concentrations of approx. 1000 mg/l (graph 6).

3) Trials on the *Coxsackievirus B5* with peracetic acid

In this case, the trends of the inactivation kinetics appeared to be exactly similar to those observed for the *Poliovirus 2* in the three pH conditions tested (graph 7).

From the analysis of the regressions a good linear trend was observed with R^2 ranging between 0.94 and 0.99 for a reduction of 4 log (graph 8).

Mean times for the two inactivation intervals were faster and ranged between 7 and 10 minutes, with concentrations of approx. 1000 mg/l (graph 9).

DISCUSSION

The activity of peracetic acid was compared to that of hypochlorite and of chlorine dioxide versus the *hepatitis A virus*.

Data previously collected by us on the inactivation kinetics of this virus with HClO have shown mean times of 15-25 minutes for the two gaps, 99-99.9% and 99.9-99.99%, at neutral pH at a concentration of approx. 1 mg/l (graph 10).

Times recorded with ClO₂ were decidedly lower, about 2 minutes with 1 mg/l for the two inactivation gaps at neutral pH (graph 10).

For a more rapid assessment of the concentration-contact time combinations, Ct ratios were calculated with the use of peracetic acid on the three viruses tested (*HAV*, *Polio 2*, *Cox B5*), and on *HAV* with the use of peracetic acid and hypochlorous acid.

The Ct ratios were calculated by transforming the linear regression into a power curve so as to have a constant Ct value to be used for practical applications (graph 11).

The results obtained by comparing viral decrease seem to lead to the conclusion that peracetic acid presents a good virucidal activity which is at least comparable to that of hypochlorite with no significant differences as far as the pH value is concerned.

These data have been confirmed also by the Ct obtained (in log) for inactivation of the *HAV*, which is the most resistant virus to disinfection treatments given that the concentration-contact time combinations were higher when compared to those for the *Enteroviruses* tested.

As for the concentrations of use for peracetic acid at 0.1-0.2%, mean times for the reduction of the viral titre of 4 log ranged from 15 to 30 minutes for a virus like *HAV*, which as we have seen it is particularly resistant to the effect of oxidants.

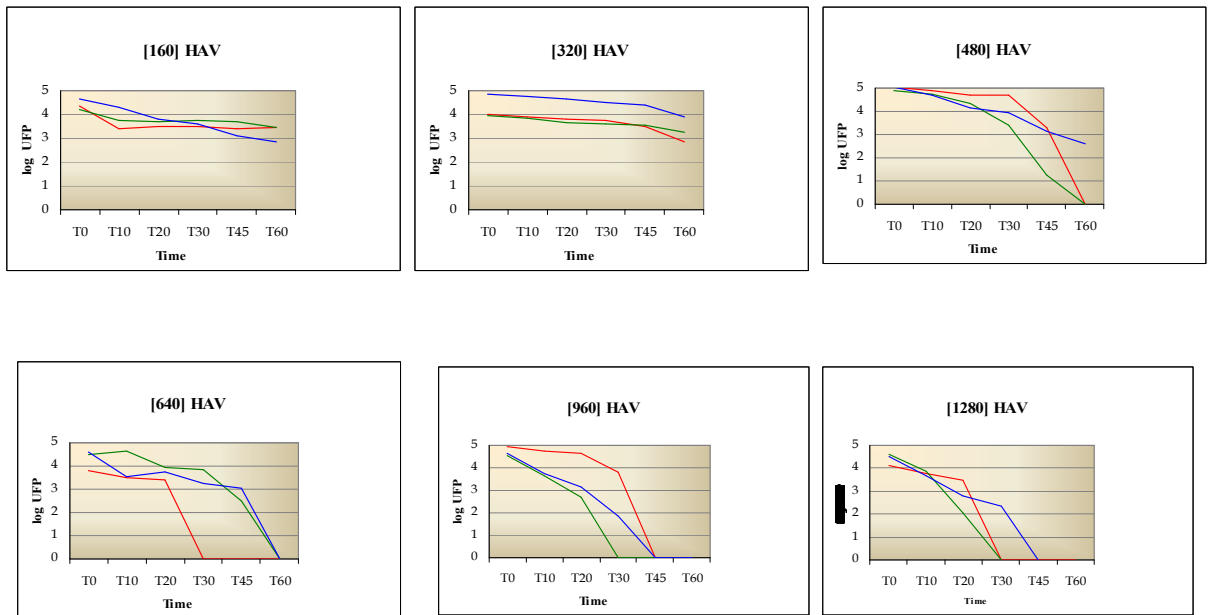
Peracetic acid may be considered a valid alternative disinfectant to hypochlorous acid for applications in the food industry on equipment used in line and on surface areas in contact with foodstuffs, bearing in mind that it has a lower corrosive effect and a lower reactivity versus organic substances. Nevertheless, we need to point out that when planning the intervention in an industrial plant, prolonged contact times for the disinfectant on the

surface areas to be disinfected need to be provided for in order to ensure correct efficacy of peracetic acid.

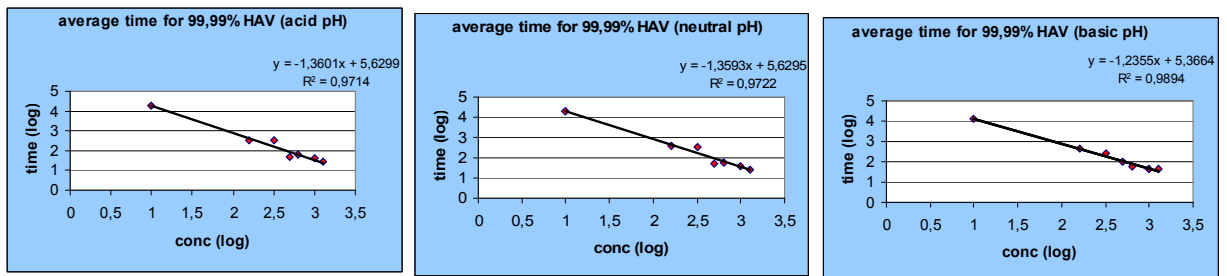
Only chlorine dioxide presents a greater oxidizing effect versus the same virus (*HAV*) with significantly lower mean inactivation times.

It is well-known that ClO_2 presents several disadvantages in its application in the food industry, and its use is suitable in the field of disinfection of water destined to human consumption to avoid the formation of chlororganic compounds.

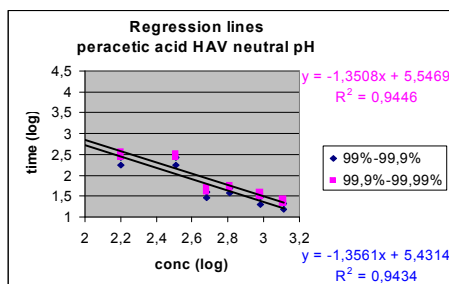
Graph. 1



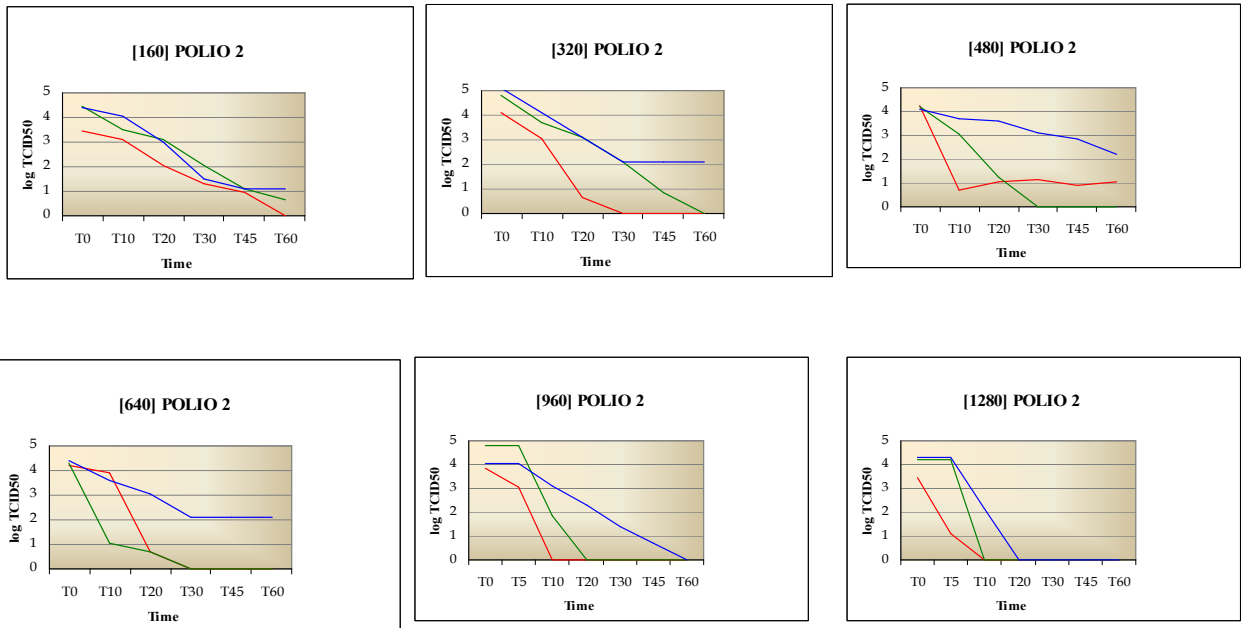
Graph. 2



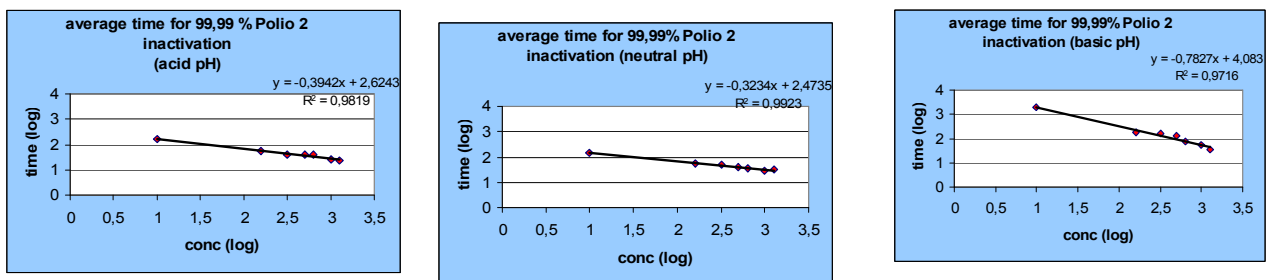
Graph. 3



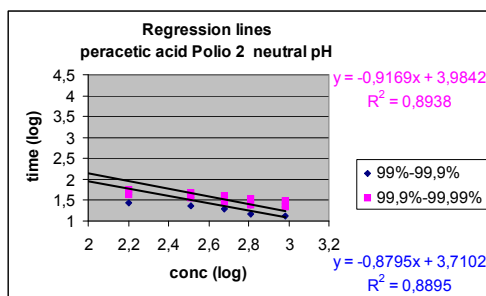
Graph. 4



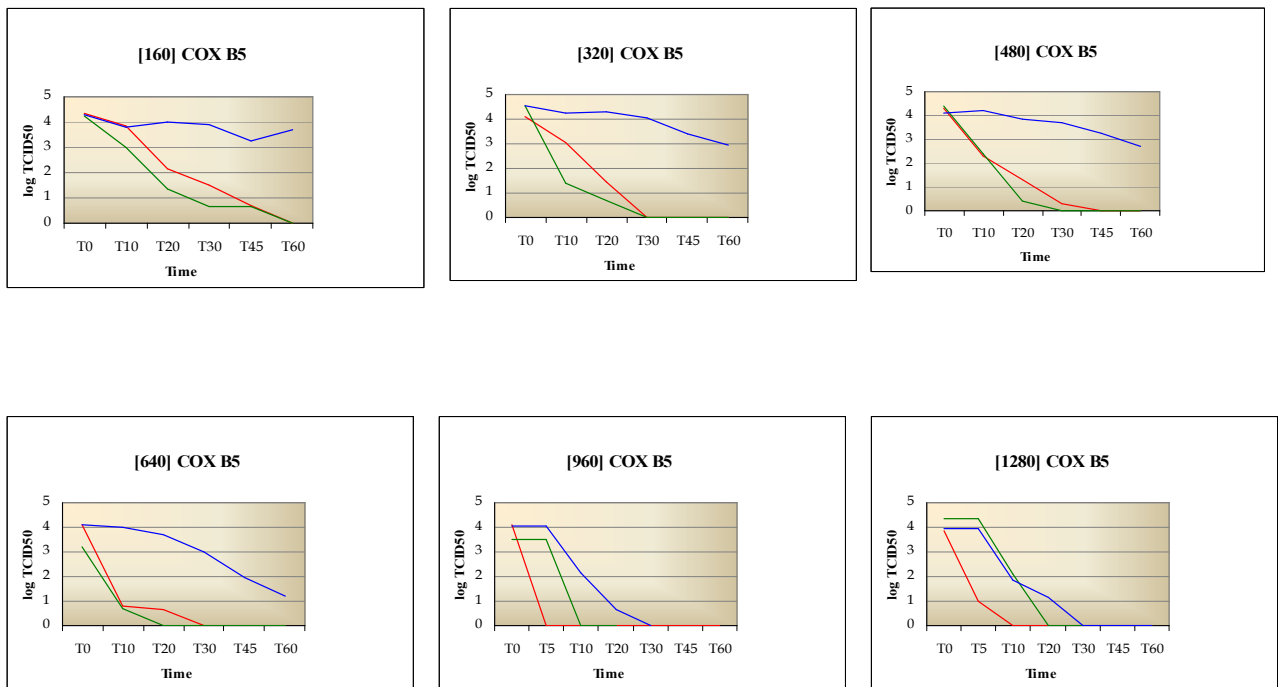
Graph. 5



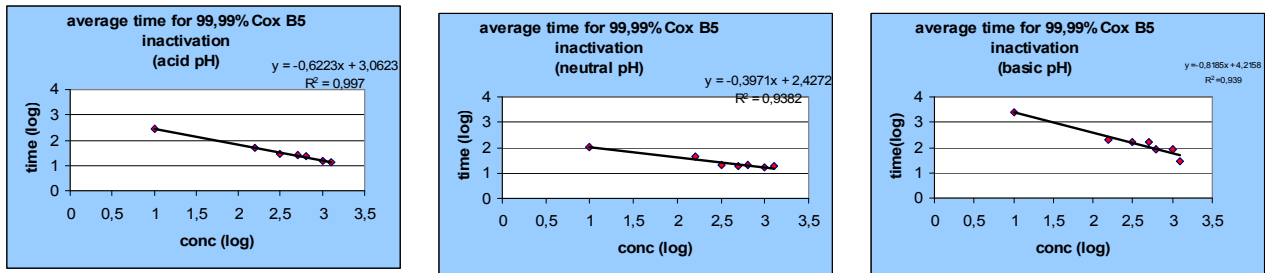
Graph. 6



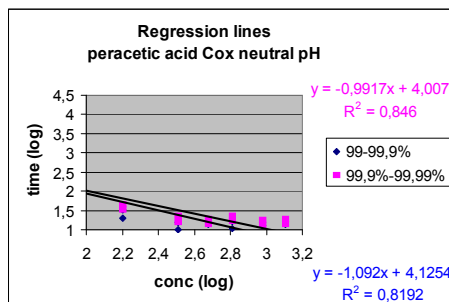
Graph. 7



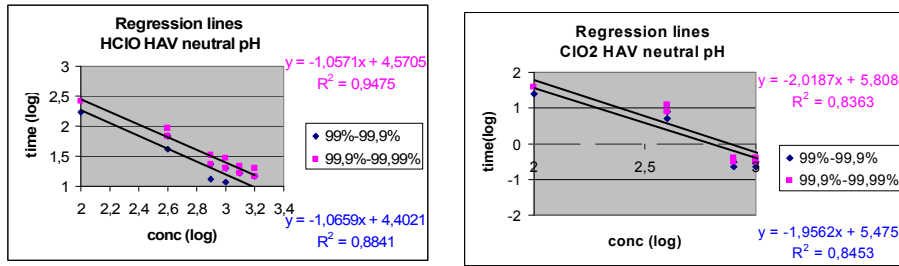
Graph. 8



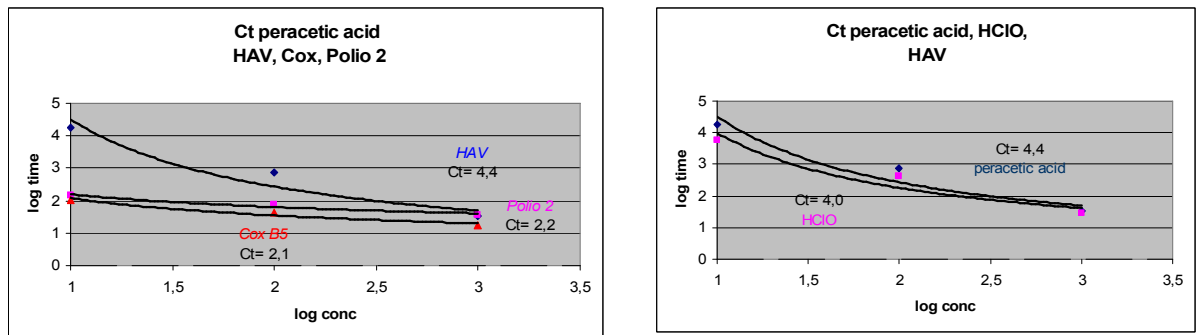
Graph. 9



Graph. 10



Graph. 11



BIBLIOGRAPHY

- 1) Centers for Disease Control: "*Foodborne disease outbreaks, 5 years summary, 1983-1987*". MMWR; 39: SS-1,1990.
- 2) Centers for Disease Control: "*Foodborne disease outbreaks, 5 years summary, 1988-1992*". MMWR; 45: SS-5,1996.
- 3) Am Jang et al (2005): "*Measurement of chlorine dioxide penetration in dairy process pipe biofilm during disinfection*". Applied Microbial and Cell Physiology.
- 4) C.Kumar, S.K.Anand (1998): "*Significance of microbial biofilm in food industry: a review*". Int. J. Food Microbiology: 49; 9-27.
- 5) E.V.Rivera (2005): "*A Review of chemical disinfection methods for minimally processed leafy vegetables*". Food Science Graduate Program College of Agriculture, Kansas State University.
- 6) G.Sansebastiano (2001): "*Indagine sull'attività disinfettante dei perossidi in presenza di sostanze organiche e su biofilm batterici*". Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria: vol. XXI; 315-324.
- 7) S.Monarca et al (2004): "*A new approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected drinking water*". Water Research: 38; 3809-3819.
- 8) S.S.Block (1991): "*Peroxygen compounds*": S.S.Block: Disinfection, Sterilization and Preservation (IV Edition); 167-180.
- 9) Sansebastiano G., Zoni R., Bigliardi L., Ghirardi E., Losio N. (2003): Studio comparativo sulle cinetiche di inattivazione dell'HAV e del Poliovirus 2 con acido peracetico. Nota 1. Igiene e Sanità Pubblica; 5, 319-328.

**IV. “STUDY OF THE KINETICS OF INACTIVATION OF THE
FELINE CALICIVIRUS VIRUS WITH PERACETIC ACID”**

11th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research in Food
Science and Technology (2006) Teramo

Study of the kinetics of inactivation of the feline Calicivirus virus with peracetic acid

Roberta Zanelli (robertaz77@libero.it)

Dipartimento di Sanità Pubblica Sezione di Igiene, Università degli Studi di Parma

Tutor: Prof. G.E. Sansebastiano

The aim of this work was to assess the efficacy of peracetic acid on certain enteric viruses through the kinetics of inactivation performed under experimental conditions. It will be possible to use the results thus obtained to set up time-concentration models to be applied to food processing plants.

Studio delle cinetiche di inattivazione del Calicivirus felino con acido peracetico

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di verificare l'efficacia dell'acido peracetico su alcuni virus enterici attraverso le cinetiche di inattivazione condotte in condizioni sperimentali. I risultati così ottenuti potranno essere utilizzati per la predisposizione di modelli tempo- concentrazione da applicare sugli impianti alimentari.

1. State-of-the-Art

Diseases that are transmitted in food still present an important problem in the field of public health; in fact studies carried out recently by CFSAN (Center for Food Safety & Applied Nutrition) refer that the hepatitis A virus infects 22,700 people each year in the USA and 7.3% of these infections are caused by eating contaminated foodstuffs. The CFSAN studies also indicate that in the USA only the common 'flu is more frequent than gastroenteritis of a viral origin. It is believed that the Norwalk virus is involved in at least 1/3 of the cases of gastroenteritis which principally affect individuals aged from 6 to 12 months. On the contrary, the rotaviruses affect almost exclusively newborn infants and children, causing over 3 million cases of infantile gastroenteritis a year, and the death of millions of children in developing countries.

One of the main objectives of food legislation set down in EC regulation no. 178/2002 is that of ensuring a high level of protection of human life and health.

In order to reach this objective it is necessary to guarantee the microbiological safety of foodstuffs throughout the food chain, starting with primary production and ending at the consumer's table (article 1, EC no. 852/2004), to prevent the risk of infectious diseases whose etiological agent can be carried in foodstuffs.

In order to do this, it is necessary to eliminate pathogen microorganisms and reduce undesirable microorganisms to acceptable levels for public health by means of suitable procedures for cleaning and disinfecting each segment of the food chain, including removal of any food residues present on surfaces and equipment in contact with food which is required by any microorganisms present in order to multiply (www.fao.org)

In this, the choice of disinfectant becomes extremely important as it will need to take into account the various factors which can affect its efficacy and the microorganisms to be inactivated.

A disinfectant should generally have a wide range of action versus the microorganisms and be able to inactivate them quickly; it should remain stable for a long time; it should not be sensitive to the various environmental factors affecting its efficacy, such as temperature, pH and the hardness of the water it comes into contact with in cleaning procedures.

Furthermore, the ideal disinfectant should present low toxicity, which facilitates its use; absence of risk – or the lowest possible risk – of corroding the equipment it comes into contact with; a reasonable price, which allows it to be widely used. There are various parameters which can increase the efficacy of a disinfectant and at the same time affect the survival of the microorganisms. These parameters include temperature, exposure time and the concentration of the disinfectant, which are all positively correlated to the efficacy of the disinfectant; on the other hand, the formation of biofilm on the surfaces, the characteristics of the water used indirectly to dilute the disinfectant or directly on the surfaces to eliminate dirt, as well as factors intrinsic to the microorganisms and connected to their resistance as regards microbicidal agents, determine a reduced efficacy of the disinfectant.

The official definition (Association of Official Analytical Chemists) of sanitizing procedures for surfaces in contact with food requires a 99.999% (5 log) reduction of the level of contamination in 30 seconds, and 99.9% (3 log) for surfaces not in contact with foodstuffs (R.H.Schmidy, 2003).

Peracetic acid appears to represent a good compromise and its use is becoming increasingly widespread in the sanitizing procedures of industrial food processing plants thanks to its characteristics. The main advantages in using peracetic acid are a high oxidizing power, a weak reactivity versus inorganic and organic substances, its efficacy which is not greatly affected by temperature and finally it is not corrosive for surfaces and it does not cause the formation of sub-products, even though few studies have as yet been carried out on this particular aspect. Peracetic acid has been approved by the FDA (Food and Drug Administration) as a disinfectant for surface areas of industrial processing plants which come into contact with foodstuffs (www.fda.gov).

2.PhD Thesis Objective and Milestones

Given the importance of disinfection procedures in the food industry, a study was started to assess, through inactivation trials, the disinfecting effects of several oxidizing agents versus several enteric viruses; the selection of the enteric viruses is justified by their high resistance towards the means of disinfection, thereby representing good indicators for decontamination. For our trials, the *hepatitis A virus* and the *feline calicivirus* were selected, as surrogate to the Norwalk virus which is unable to replicate in vitro. Assessment of the efficacy of the disinfectant was performed by analyzing the trend of the inactivation kinetics and calculating the mean elimination times at 99%, 99.9%, 99.99%. The objective was to determine suitable contact time-concentration combinations which could be applied on the field in various sectors of the food processing industry. The following tables show the final data relating to the trials performed with HAV (Tab.1 and Tab.2) and the preliminary data for the *feline calicivirus*.

Tab1. Trend of viral titer expressed in log UFP for the hepatitis A virus with peracetic acid in neutral pH.

Contact times in minutes						
Concentrations in mg/l	T ₀	T ₁₀	T ₁₅	T ₃₀	T ₄₅	T ₆₀
160	4,21	3,74	3,69	3,76	3,68	3,46
320	3,94	3,86	3,67	3,58	3,56	3,24
480	4,91	4,76	4,36	3,4	1,25	0
640	4,5	4,64	3,94	3,85	2,48	0
960	4,55	3,63	2,7	0	0	0
1280	4,63	3,88	2,04	0	0	0

Tab. 2 Mean times (in log, in minutes) for three elimination percentages for the hepatitis A virus

Concentrations in mg/l	Elimination percentages		
	99%	99,9%	99,99%
160	2,25	2,43	2,56
320	2,24	2,42	2,53
480	1,47	1,6	1,71
640	1,58	1,68	1,78
960	1,31	1,48	1,6
1280	1,18	1,32	1,44

Tab. 3 Trend of viral titer expressed in log TCID₅₀ for Feline Calicivirus with peracetic acid in neutral pH

Tempi di contatto in minuti								
Concentrazioni in mg/l	T ₀	T ₂	T ₅	T ₁₀	T ₂₀	T ₃₀	T ₄₅	T ₆₀
320	4,33	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
480	4,17	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10

Tab.4. Mean times (in log, in minutes) for three elimination percentages for Feline Calicivirus

Percentuali di abbattimento			
Concentrazioni in mg/l	99%	99,9%	99,99%
320	1,12	9,17	75,08
480	1,39	12,71	116,27

3. Selected References

www.fao.org; “*Recommended International Code of Practice General Principles of Food Hygiene*”. Rev.3 (1999).

R.H.Schmidy (2003): “*Basic Elements of Equipment Cleaning and Sanitizing in Food processing and Holding Operations*”. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

www.fda.gov; 21 CFR 178.010

V. “STUDY ON INACTIVATION KINETICS OF *FELINE CALICIVIRUS (F9)* WITH HYPOCHLOROUS ACID, CHLORINE DIOXIDE AND PERACETIC ACID.”

Proceeding of “5th International Congress on Food Technology Vol.3; 381-387,
2007 Thessaloniki,

**Study on inactivation kinetics of *Feline calicivirus (F9)* with hypochlorous acid,
chlorine dioxide and peracetic acid.**

G. Sansebastiano, R. Zanelli, L. Bigliardi
Department of Public Health, Sec. Hygiene
University of Parma, Italy

Abstract

Among the emerging pathogens Noroviruses are undoubtedly the most widespread microorganisms causing acute gastroenteritis.

Recent data in the USA have estimated that 23 million diseases are caused by these viruses.

The transmission modes are essentially represented by person-to-person contact and by consumption of contaminated water and food.

Disinfection is an essential part of the preventive measures that need to be carried out, especially in the food industry.

In this respect, we are carrying out a study on the inactivation kinetics of a citopatogenic feline calicivirus strain (F9) as a surrogate of Norovirus.

The inactivation tests were carried out with solutions of Hypochlorous acid, Chlorine dioxide and Peracetic acid in experimental conditions, +20°C and pH 7.

Results show that FCV presents a good resistance to hypochlorous acid; the mean times were shorter for ClO₂ and Peracetic acid and also shown a good effect for the same rate of inactivation. Hypochlorous acid required a very long contact time and the necessity to use very high concentrations, with the problems linked to the formation of by-products.

On the contrary, Chlorine dioxide is very useful in washing and disinfection procedures in food industry.

The good activity of peracetic acid suggests that it can be used in the cleaning and disinfection of equipment in CIP procedures.

INTRODUCTION

Noroviruses (NoV) are nowadays acknowledged as one of the major causes of foodborne worldwide illness (1, 4, 7, 8).

NoV are transmitted predominantly through the fecal-oral route, directly by person to person contact, when customary hygiene procedures are disregarded, or indirectly via contaminated food, water, or through contact with contaminated surfaces or fomites.

NoV are a common cause of acute gastroenteritis (AGE); in the United States each year 23 million illnesses caused by these viruses are estimated, with over 9 million foodborne events (1).

Epidemiological data, collected by CDC of Atlanta from July 2000 to June 2004 in United States, show that *Calicivirus* family which includes *NoV* was detected in 81% of fecal specimens from 226 outbreaks of acute gastroenteritis analysed (1).

In order to check a possible viral spread by foodborne routes through contaminated food and water, or fomites, or infected food handlers, it is important especially in the food industry to carry out disinfection as an essential part of preventive measures.

As *NoV* are characterized by high infectivity, low infectious dose and persistence in the environment, strong disinfection treatments with effective disinfectants are required to inactivate and/or kill these viruses from surfaces and the environment, especially if we takes into consideration that the viral capsid structure makes these viruses very resistant versus common disinfection procedures.

The major difficulty to assess the disinfection efficacy of *NoV* is that these viruses cannot grow in tissue culture. Consequently, in disinfection efficacy and inactivation studies it is common to use a closely related surrogate virus of *NoV*, such as *Feline calicivirus*, which can grow in cell culture.

However, *Feline calicivirus* has different physio-chemical properties from *Noroviruses* and so data on inactivation with *Feline calicivirus* cannot reflect exactly the efficacy versus *Noroviruses*.

CDC and US Environmental Protection Agency (EPA) approve chlorine bleach for use on surfaces to inactivate *NoV* (6). Several studies (3, 9) suggest that bleach diluted to obtain 1000 ppm of available chlorine can reduce infectivity titre of *Feline calicivirus* by 4.5 log factor in only 1 minute.

A further 500 ppm concentration requires 10 minutes to obtain the same viral activity reduction.

100 ppm of available chlorine does not seem to be effective against *NoV* even with a contact time of 5 minutes.

As regards other chlorine disinfectant compounds, such as chlorine dioxide, previous studies have shown that this disinfectant is effective versus *Feline calicivirus* and its action can be increased by higher levels of pH and temperature.(13)

At 5°C with ClO₂, 1 minute of contact time was effective to achieve 99.99% viral inactivation with disinfectant concentration of 6.6 mg/L at pH 6 and with a lower concentration of 0.136 mg/L at pH 8.

At 15°C to obtain the same viral inactivation, at the same contact time of 1 minute, chlorine dioxide concentrations were lower than at 5°C, and ranged between 4.20 and 6.72 mg/L at pH 6 and less than 0.18 mg/L at pH 8.

As far as other chemical disinfectants are concerned, iodine with 0.8% as final concentration was tested and shown to be a very effective inactivator of *Feline calicivirus*, even if it has the disadvantage of discolouring treated surfaces (5).

Other disinfectants such as quaternary ammonium compounds, often used for sanitizing food preparation surfaces, have no significant activity on *Feline calicivirus*, probably because these compounds act by disrupting the viral envelope and *Feline calicivirus* does not present any envelope (3, 5).

This study was undertaken in an effort to better characterize the persistence of *NoV* versus disinfectants commonly used in the food industry and the relative effectiveness of these disinfectants to inactivate these viruses.

We are currently carrying out a study on the inactivation kinetics of cytopathogen *Feline calicivirus* (*FCV*) strain F9 as a surrogate of *NoV* which interests human pathology and does not grow in cell cultures.

MATERIALS AND METHODS

Inactivation kinetics were performed on the *Feline calicivirus* (strain F9), at different concentrations of disinfectants, and observations were recorded at various contact times of the virus-disinfectants inoculum.

Cell cultures

Feline calicivirus was propagated in monolayers of CFRK cells and the infected cultures were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂.

Disinfectants.

39% peracetic acid with final concentrations 160-232-418-508 mg/l

5% Hypochlorous acid with final concentrations 0.2-0.4-0.6-0.8 mg/l

0.06-0.07% ClO₂ with final concentrations 0.2-0.6-0.8 mg/l

Performing the experimental trials

To assess the trend of *FCV* titre the trials were set up by adding 1 ml of virus to 100 ml of the disinfectant solution at the required concentration, buffered at neutral pH and at +20°C.

Once the specimens had been removed at the various times, neutralized and for each of them 10-fold dilutions were performed and each was subsequently disseminated at a concentration of 0.25µl in cell cultures for *FCV*.

Dissemination of *FCV* samples was arranged in 96 well plates to which selective cell cultures were added as well as suitable growth medium, and the cytopathic effect detectable as cell lysis was observed after 4 and 6 days from the inoculum in the culture (titre in TCID₅₀).

Data Analysis

The data were processed by means of linear regression and we proceeded to group the data according to 3 inactivation intervals.

RESULTS AND DISCUSSION

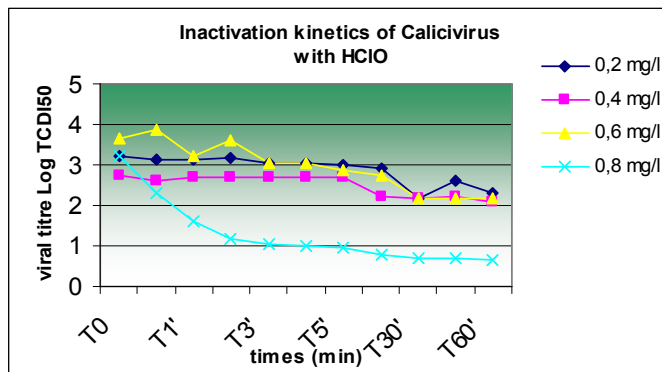
Test with HClO

In Table 1 and Graph 1 we reported the trend of viral titres (log) at the four concentrations; it is clear that viral activity is still present after 60 minutes with 0.8 mg/l. Mean times for the three reduction percentages with 0.8 mg/l ranged from 16.25 minutes (99%) to 45.24 minutes (99.99%) (Tab.2 Graph. 2)

Tab 1: Trend of *Feline calicivirus* titre (log TCID₅₀) with HClO

Concentrations HClO	Times min.										
	T0	T30''	T1'	T2'	T3'	T4'	T5'	T15'	T30'	T45'	T60'
0,2 mg/l	3,2	3,13	3,13	3,17	3,06	3,06	3,01	2,93	2,17	2,6	2,32
0,4 mg/l	2,74	2,6	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,23	2,18	2,21	2,1
0,6 mg/l	3,66	3,89	3,21	3,59	3,03	3,06	2,87	2,76	2,18	2,17	2,17
0,8 mg/l	3,2	2,3	1,6	1,17	1,06	1,02	0,95	0,8	0,68	0,68	0,66

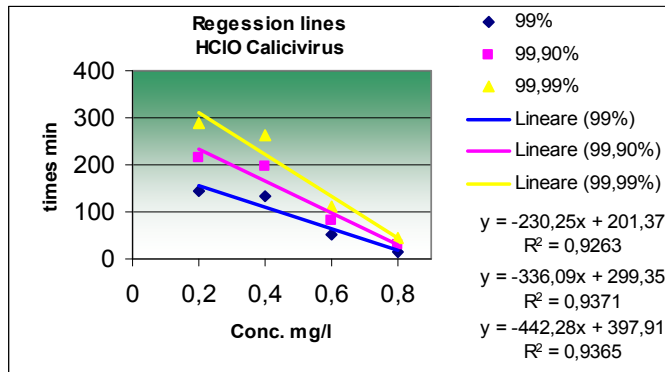
Graph 1



Tab 2. Average time for reduction of *Feline calicivirus* with HClO

Reduction percentages	Concentrations HClO			
	0,2 mg/l	0,4 mg/l	0,6 mg/l	0,8 mg/l
99%	142,87	133,25	52,61	16,25
99,90%	216,41	196,62	81,44	30,74
99,99%	289,21	262,63	109,99	45,24

Graph 2



Test with ClO₂

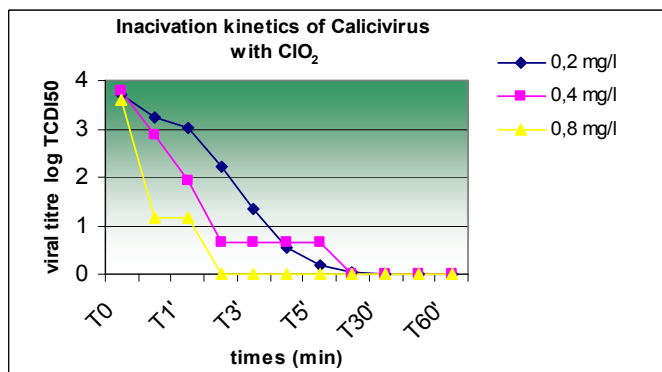
The inactivation kinetics were faster with ClO₂ (tab3 graph 3); no viral activity was detected after 30 minutes with 0.2 mg/l, after 15 minutes with 0.4 mg/l and after 2 minutes with 0.8 mg/l

Mean times for the three reduction percentages with 0.8 mg/l ranged from 0.5 minutes (99%) to 2.1 minutes (99.99%) (Tab. 4 Graph 4).

Tab.3: Trend of *Feline calicivirus* titre (log TCID₅₀) with ClO₂

Concentrations ClO ₂	Times min.										
	T0	T30''	T1'	T2'	T3'	T4'	T5'	T15'	T30'	T45'	T60'
0,2 mg/l	3,7	3,24	3,03	2,2	1,35	0,54	0,17	0,05	0	0	0
0,4 mg/l	3,8	2,87	1,93	0,64	0,64	0,66	0,65	0	0	0	0
0,8 mg/l	3,6	1,17	1,17	0	0	0	0	0	0	0	0

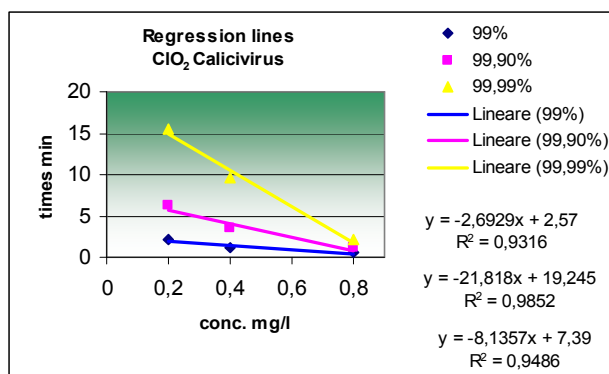
Graph 3



Tab.4: Average time for reduction of *Feline calicivirus* with ClO₂

Reduction percentages	Concentrations ClO ₂		
	0,2 mg/l	0,4 mg/l	0,8 mg/l
99%	2,2	1,24	0,5
99,90%	6,2	3,48	1,1
99,99%	15,5	9,59	2,1

Graph. 4



Test with PAA

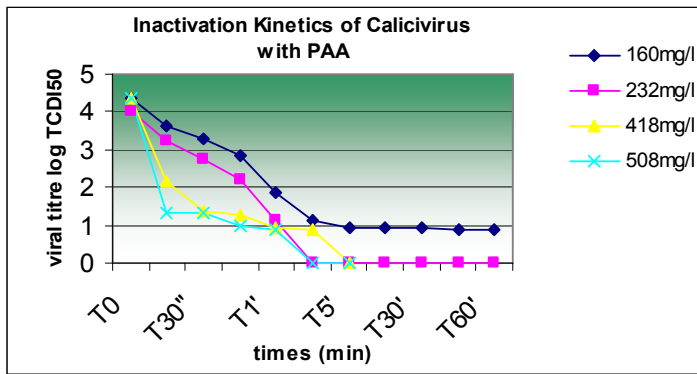
Also with Peracetic acid the inactivation kinetics were fast with absence of viral activity after 2 minutes with 232-508 mg/l (Tab5 graph 5).

At a higher concentration the mean times ranged from 0.38 minutes (99%) to 1.39 minutes (99.99%) (Tab.6 graph.6)

Tab.5: Trend of *Feline calicivirus* titre (log TCID₅₀) with PAA

Concentrations PAA	Times										
	T0	T15''	T30''	T45''	T1'	T2'	T5'	T15'	T30'	T45'	T60'
160 mg/l	4,34	3,64	3,28	2,83	1,84	1,11	0,95	0,93	0,93	0,9	0.89
232 mg/l	4,04	3,24	2,73	2,22	1,14	0	0	0	0	0	0
418 mg/l	4,35	2,16	1,38	1,26	0,93	0	0	0	0	0	0
508 mg/l	4,35	1,34	1,34	0,96	0,89	0	0	0	0	0	0

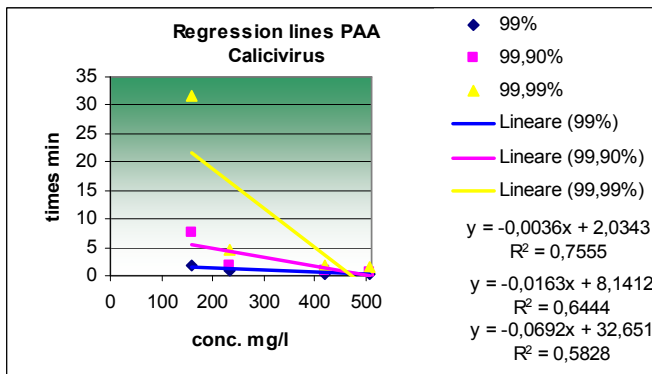
Graph 5



Tab.6: Average time for reduction of *Feline calicivirus* with PAA

Reduction percentages	Concentrations PAA			
	160 mg/l	232 mg/l	418 mg/l	508 mg/l
99%	1,81	0,8	0,43	0,38
99,90%	7,62	1,89	0,91	0,72
99,99%	31,67	4,49	1,89	1,39

Graph 6



DISCUSSION

As appears from the report of CDC, foodborne illnesses caused by Norovirus are likely to increase as these viruses are very resistant to disinfection and are commonly found in the environment (15). Moreover, we should remember that the viruses are found in animals like cows and pigs and some authors have expressed a hypothesis about zoonotic transmission (14).

As for the disinfection, we can only verify the efficacy of some disinfectants on Feline calicivirus which we think is a good model of Norovirus.

From our data on the resistance of Feline calicivirus towards the three tested disinfectants, first of all we can note the low activity of Hypochlorous acid in accordance with CDC indications relating to the high concentrations of chlorine necessary for the inactivation of Norwalk virus of which FVC is a surrogate (2).

Besides, we should consider that in the presence of organic substances it will undoubtedly be necessary to increase HClO concentrations with the risk of the formation of chlororganic by-products.

The FCV resistance presented to chlorine is comparable to the resistance of Hepatitis A virus versus the same disinfectant.

Chlorine dioxide was more active in inactivating FCV as well as towards Poliovirus 1 and HAV (10, 11, 12); at concentrations of 0.5-1.0 mg/l a good inactivation is achieved in 1-3 minutes.

The use of Chlorine dioxide determines some problems linked to the *in loco* preparation and the Chlorite residues, which is likely to present some difficulties in the food industry.

A good compromise seems to be represented by peracetic acid, which is undoubtedly active also towards HAV at concentrations which are not too high, thereby avoiding corrosion of equipment.

Considering the higher resistance of HAV it will be necessary to use concentrations of PA about 0.1-1,5% for contact times of 7-9 minutes.

Our work will continue with inactivation tests on Norwalk virus to verify the effectiveness of disinfection procedures with PCR reaction.

REFERENCES

- 1) Blanton L.H. et al (2006): Molecular and Epidemiologic Trends of caliciviruses associated with Outbreaks of Acute Gastroenteritis in the United States, 2002-2004. *J. Infectious Diseases.*, 193: 413-421.
- 2) CDC (2001). Norwalk like viruses. Public health consequences and outbreak management. *MMWR, Morbidity and Mortality Weekly Report.* 50, N. RR-9.
- 3) CDC(2006): Norovirus in Health care Facilities Fact Sheet. *CDC, Infection Control in Healthcare.*
- 4) D' Souza D.H et al (2006): Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 84-91.
- 5) Doultree J.C., Druce J.D., Birch C.J., Bowden D.S, Marshall J.A. (1999): Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J of Hospital Infection*, 41, 51-57.
- 6) Jimenez L., Chiang M. (2006): Virucidal activity of a quaternary ammonium compound disinfectant against feline calicivirus: a surrogate for norovirus. *Am J Infect Control.*, 34, 269-73.
- 7) Lopman B., van Duynhoven Y, Hanon F.X., Reacher M., Koopman M., Brown D. (2002): Consortium of foodborne viruses in Europe. Laboratory capability In Europe for foodborne viruses. *Euro. Surveill.*, 7, 61-65.
- 8) Mead P.S. et al (1999): Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect.*, 5, 607-625.
- 9) Sattar S.A. (2004): Microbicides and the environmental control of nosocomial viral infections. *J of Hospital Infection.*, 56, S64-S69.
- 10) Shin, G. A., D. Battigelli, and M. D. Sobsey. (1998). Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and coliphage MS2 by free chlorine, chlorine dioxide, and ozone disinfection of water. In *Proceedings of the Water Quality Technology Conference. American Water Works Association, Denver, Colo.*
- 11) Thraenhart O. (1991). Measures for disinfection and control of viral Hepatitis. *Disinfection, Preservation and Sterilization.* (ed Block,S:S.), IV TH, 445-471.
- 12) Thraenhart O., Kuwert E. (1975). Virucidal activity of the disinfectant, Gigasept, against different enveloped and non-enveloped RNA-and DNA-viruses pathogenic for man. *Investigation in the suspension test. Zentralblatt fur bakteriologie und hygiene, I. Abt. Orig. B*, 161, 209-232.

- 13) Thurston Enriquez J.A, Hass C.N., Jacangelo J, Gerba C.P. (2005): Inactivation of enteric Adenovirus and Feline Calicivirus by Chlorine Dioxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 n. 6, 3100-3105.
- 14) Widdowson M.A, S.Monroe S., Glass R.I. (2005). Are Noroviruses emerging?. *CDC, Emerging Infectious Diseases*, 11, 5.
- 15) Widdowson M.AQ., Rockx B., Scheep R., Van Duynhoven YTHP, Vinje J., Van der Poel WHM et al. (2005). Detection of serum antibodies to bovine Norovirus in veterinarians and the general population in the Netherland. *J Med Virol*, 76, 119-128.

**VI. “INVESTIGATION ON VIRUCIDAL ACTIVITY OF CHLORINE
DIOXIDE. EXPERIMENTAL DATA ON FELINE CALICIVIRUS,
HAV AND COXSACKIE B5”**

Journal of Preventive Medicine and Hygiene 2007; vol.48: 91-95

Investigation on Virucidal Activity of Chlorine Dioxide. Experimental Data on Feline Calicivirus, HAV and Coxsackie B5.

Zoni R., Zanelli R., Riboldi E., Bigliardi L. and G. Sansebastiano

Department of Public Health Sec. Hygiene

University of Parma Italy

Introduction

Although viruses, unlike bacteria, are incapable for replicating in food, they represent an important cause of foodborne infections.

Viruses with aural-faecal transmission play an important role in the etiological factors involved, and most cases of gastroenteritis are attributed to the Norwalk virus or to the Norwalk-like virus, viruses belonging to the family of caliciviruses, and to the hepatitis A virus.

Food is exposed to risks of primary contamination when the raw materials themselves are contaminated, or secondary contamination when they come into contact with surfaces/equipment which are contaminated ¹.

Thus, sanitizing the processing systems and the equipment which comes into contact with the foodstuffs is extremely important in the food industry in order to reduce the risk of secondary contamination, and represents a fundamental instrument to reduce the risk of infection linked to the consumption of foodstuffs.

Hypochlorite and chlorine dioxide (ClO₂) are highly oxidizing and are thus commonly used as disinfectants, especially when disinfecting water.

Studies carried out on potential genotoxic effects of chlorination have shown that the use of sodium hypochlorite leads to the formation of a larger number of mutagen substances than the use of chlorine dioxide ².

As compared to other oxidizing disinfectants, chlorine dioxide offers certain advantages, such as its efficacy in a wide range of pH values and its rapid action.

If compared to hypochlorite, for instance, it has a higher selectivity and generates a smaller number of reaction products; furthermore, the bactericidal efficacy of ClO₂ is greater than that of HClO since its greater oxidizing capacity has been demonstrated.

Inactivation assays carried out under controlled experimental conditions have shown a different sensitivity towards ClO₂ on the part of various enteroviruses: at a concentration of 0.32 mg/l in conditions of neutral pH and at a temperature of 15°C, the inactivation time for 99.99% was 5 min for *Echo* 7, 3 min for *Coxsackie* B3 and 7 min for the *polio*1 virus³⁻⁴.

The low concentrations generally required, low contact times and reduced microbial load are favourable elements promoting the use of ClO₂ in the food industry.

The following table illustrates the disinfecting activity of chlorine dioxide⁵.

Reduction of bacterial load			
Microorganism	Concentration ClO ₂ mg/l	Contact Times	% inactivation
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	60 sec	99.999
<i>Escherichia coli</i>	0.15	300 sec	99.90
<i>Escherichia coli</i>	0.25	60 sec	>99.999
<i>Streptococcus</i>	1	15 sec	>99.999
<i>Lactobacillus brevis</i>	0.15	5 min	99.90
<i>Lactobacillus brevis</i>	1	5 min	>99.999
<i>Pseudomonas aeuruginosa</i>	1	60 sec	>99.999

The aim of this study was to assess under experimental conditions the efficacy of chlorine dioxide when used with certain viruses which have proven to be particularly resistant to oxidizing agents, and which has not been thoroughly investigated in the literature.

Materials and Methods

The following were used for the inactivation assays: the feline *Calicivirus* F9 strain grown on CRFK (feline kidney) cultures, the *Coxsackie* B5 virus grown on RC-37 (monkey kidney), and the *Hepatitis A virus* strain HM-175 grown on FRhK4 (monkey kidney embryonic) cultures.

Infected cell cultures were incubated at 37°C until the onset of the cytopathic effect, and subsequently frozen at -80°C to induce cell lysis; the contents of the flask were then

submitted to ultra-filtration and re-suspended with sterile physiological solution, and finally aliquoted in sterile test tubes and stored in deepfreeze at -20°C .

The titre of the viral suspension was determined for the hepatitis A virus using the plate method and expressed as PFU, while for the other viruses it was calculated as TCID₅₀ (titre of the dose infecting 50% of the cell culture) according to the Reed-Muench method.

Chlorine dioxide was used as disinfectant at the following concentrations: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mg/l.

Viral inactivation assays were carried out at a constant temperature of 20°C with neutral pH kept constant by using a buffer solution at pH 7.

PERFORMING THE ASSAYS

1 ml of viral suspension was added to the disinfecting solution, then aliquots of samples were collected at pre-set times - T₀, T_{0.5}, T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₁₅, T₃₀, T₄₅, T₆₀ – and immediately placed in contact with 0.5 ml thiosulphate 0.05M in order to neutralize the disinfectant activity.

For hepatitis A virus, we proceeded by setting up scalar 10-folds dilutions for each contact time and by inoculating them in cell cultures previously grown in 24-wells-plates (0,1ml/well); the plates were then incubated for 2 hours at 37°C (5% CO₂). As soon as the contact time has expired, the inoculum was sucked up and a semi-solid medium was added (4% foetal calf serum, 43% MEM 2X, 43% carboxymethylcellulose). After a twelve-days incubation, the cell cultures were fixed with formalin (two hours-contact time), then washed with demineralised water and stained with Giemsa; the following day we washed away the exceeding stain and the cell lysis plaques were counted.

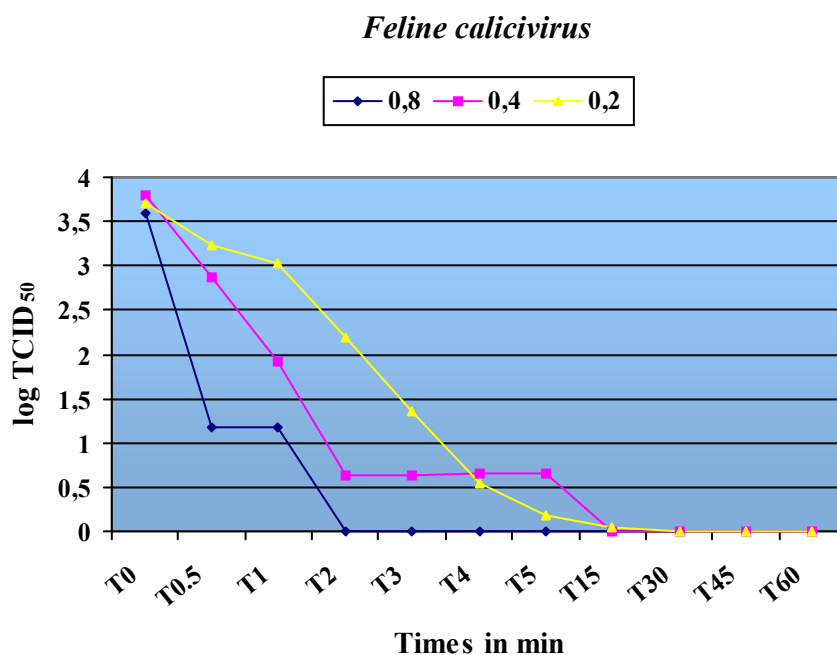
As regards the other viruses assayed, the 10-folds dilutions prepared for each contact time aliquot were placed in 95-wells plates (25µl/well) previously prepared with 25µl/well of medium and 50µl of cell suspension has been added to each well. Finally, after an incubation at 37°C for 4 days, we detected the presence of the cytopathic effect induced by the virus.

Results

Feline calicivirus

In order to assess the trend of the inactivation assays with *Feline calicivirus*, the logarithms of the titres were calculated and the trends at various concentrations at various times are shown in Graph 1.

Graph 1: Trend of viral titre (log TCID₅₀) at different ClO₂ concentration and contact times



At a concentration of 0.8 mg/l the viral titre was eliminated after two minutes, and after thirty minutes at a concentration of 0.2 mg/l.

Mean reduction times were then calculated for 99%, 99.9% and 99.99% inactivation through analysis of regression, giving the results shown below in Table 1.

Tab. 1: Mean reduction times for various inactivation percentages.

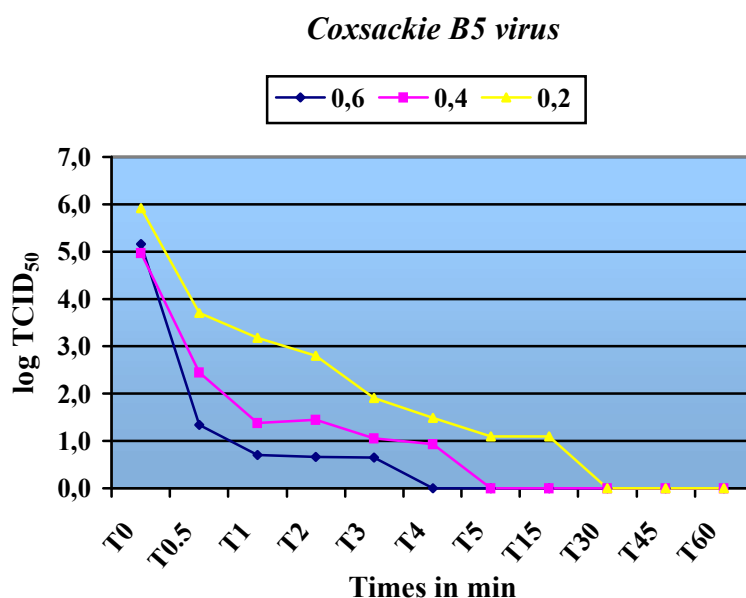
<i>ClO₂ - Feline calicivirus - neutral pH</i>			
[ClO ₂] (mg/l)	Mean time (min) to obtain reduction of:		
	99%	99.9%	99.99%
0.8	0.5 (0.16-0.74)	1.10 (1.05-1.26)	2.10 (2.02-2.22)
0.4	1.24 (0.98-1.52)	3.48 (3.10-3.73)	9.59 (9.16-9.81)
0.2	2.20 (1.80-2.09)	6.20 (5.90-6.90)	15.50 (15.2-15.9)

The table shows that at a concentration of 0.8 mg/l a 99.99% reduction was obtained after 2.1 minutes, while 15.5 minutes were required for concentrations of 0.2 mg/l.

Coxsackie B5 virus

In this case, logarithms of the titres, as TCID₅₀, were calculated too, and results are shown below in Graph 2. It is possible to note that at a concentration of 0.6 mg/l the titre was eliminated after 4 minutes, while at a concentration of 0.2 the titre was eliminated after 30 minutes.

Graph 2: Trend of viral titre (log TCID₅₀) at different ClO₂ concentration and contact times



By calculating the regression, it was possible to record the mean reduction times at 99%, 99.9% and 99.99%. Results are shown below in Table 2.

Tab.2: Mean reduction times at various inactivation times

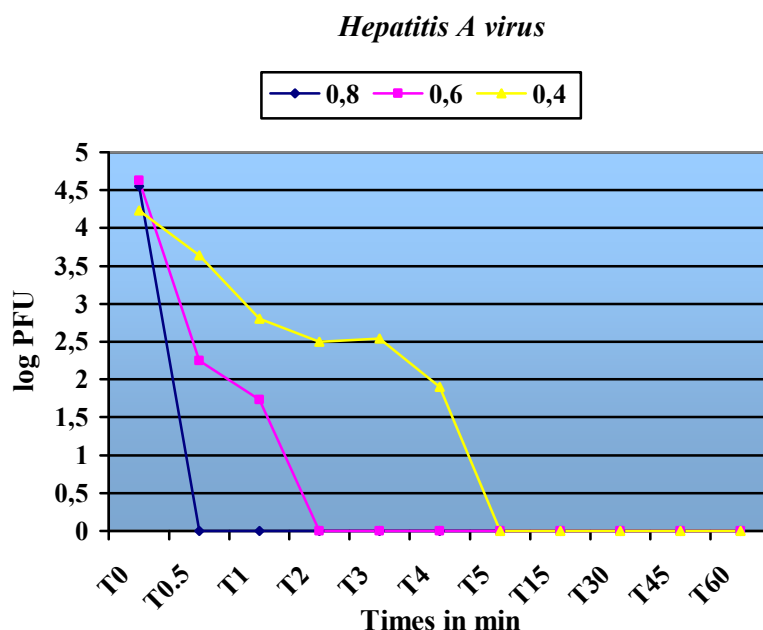
<i>ClO₂ - Coxsackie Virus B5 - neutral pH</i>			
[ClO₂] (mg/l)	Mean times (min) to obtain reduction of 10⁶		
	99%	99.9%	99.99%
0.6	0.12 (0.08-0.17)	0.34 (0.27-0.45)	1 (0.87-1.15)
0.4	0.57 (0.41-0.79)	1.18 (0.94-1.47)	2.41 (2.20-2.73)
0.2	0.63 (0.45-0.89)	1.52 (1.18-1.95)	3.73 (3.18-4.38)

Results show that at concentrations of 0.6 mg/l a 99.99% reduction of the viral titre was obtained after 1 minute, while at a concentration of 0.2 mg/l it was obtained after 3.73 minutes.

Hepatitis A virus

As regards the Hepatitis A virus, the viral titre was calculated according to the PFU method. Graph 3 shows the trends of viral titres at various concentrations

Graph 3: Trend of viral titre (log PFU) at different ClO₂ concentration and contact times



At a concentration of 0.8 mg/l the titre was completely eliminated after only 30 seconds, while at concentrations of 0.4 complete elimination was obtained after 5 minutes.

Finally, mean reduction times for elimination at various percentages were calculated here, too, using the regression analysis as shown in Table 3 below.

Tab. 3: Mean reduction times at various inactivation percentages

ClO₂ - Hepatitis A virus - neutral pH			
[ClO₂] (mg/l)	Mean times (min) to obtain reduction of:		
	99%	99.9%	99.99%
0.8	0.26 *	0.35 *	0.43 *
0.6	0.53 (0.41-0.58)	0.85 (0.76-0.94)	1.45 (1.38-1.53)
0.4	2.35 (1.63-3.40)	6.79 (5.52-8.16)	19.58 (18.70-20.50)

Considerations and Conclusions

Chlorine dioxide is an excellent bactericidal agent, as has been reported in various studies, although its virucidal activity has not been thoroughly investigated as yet⁶⁻⁷⁻⁸⁻⁹⁻¹⁰⁻¹¹⁻¹².

The inactivation kinetics of Poliovirus 1 under experimental conditions have shown that it has a good oxidizing effect¹³.

Our results have shown that it is only with concentrations greater than 0.6 mg/l that inactivation is obtained quickly for HAV and for Feline calicivirus, and only Coxsackie B5 shows great sensitivity at all concentrations assayed.

If these data are compared to the inactivation kinetics we performed on Poliovirus 1, the greater resistance of Calicivirus to Chlorine dioxide is confirmed¹⁴.

This result is particularly important in that it confirms that the Norwalk virus, which the Feline calicivirus is a surrogate of, presents considerable resistance to hypochlorite and is also characterized by strong resistance to Chlorine dioxide. This needs to be taken into account in sanitizing procedures applied to processing systems as well as in direct disinfection treatments of foodstuffs which may be involved as carriers of this virus.

Bibliography:

1. Koopmans M., Duizer E. *Food viruses: an emerging problem*. Intern J Food Microbiol 2004;90:23-41.
2. Guzzella L., Monarca S., Zani C., Feretti D., Zerbini I., Buschini A. et al. *In vitro potential genotoxic effect of surface drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants*. Mutation research 2004;564:179-93.
3. Sansebastiano G., Cesari C., Bellelli E. *Further investigation on water disinfection by chlorine dioxide*. Igiene Moderna 1986;85: 358-80
4. Sansebastiano G. *Epidemiological review on chlorine dioxide*. In: *Chlorine Dioxide and Disinfection*, C.I.P.A. Publisher (Milano) 1997; vol.17: 63-71
5. Ruzic C. *Chlorine dioxide-based water treatment in the food industry*. In: *Chlorine Dioxide and Disinfection*, C.I.P.A. Publisher (Milano) 1997; vol.17: 197-209
6. Aieta EM, Berg JB, *A review of chlorine dioxide in drinking water treatment*. JAWWA 1986;78:62-72.

7. Alvarez ME, O'Brien RT. *Mechanisms of inactivation of poliovirus by chlorine dioxide and iodine*. Appl Environ Microbiol 1982;44:1064-71.
8. Bernarde MA, Israel BM, Olivieri VP, Granstrom ML. *Efficiency of chlorine dioxide as a bactericide*. Appl Microbiol 1965;13:776-80.
9. Chen YS, Vaughn JM. *Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine dioxide*. Appl Environ Microbiol 1990;56:1363-6.
10. Latshaw CL. *Chlorine dioxide: effective broad-spectrum biocide for white-water systems*. Tappi Journal 1994;78:163-6.
11. Roller SD. *Some aspects of the mode of action of chlorine dioxide on Bacteria*. M.S. thesis, Johns Hopkins University, Baltimore, 1978
12. Scarpino PV. *Virucidal effectiveness of disinfection processes-chlorine dioxide*. In: *Proceedings of the American Water Works Association, Annual Conference, 1979*; vol. 1978, 98th, Part2:1-35.
13. Traenhart O., Kuwert E. *Comparative studies on the action of chlorine and ozone on polioviruses in the reprocessing of drinking water in Essen*. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig B, 1975;160:305.
14. Sansebastiano G., Mori G., Tanzi ML., Cesari C., Bellelli E. *Chlorine dioxide: methods of analysis and kinetics of inactivation of poliovirus type 1*. Igiene Moderna 1983;79:61-91.

**VII. “VALUTAZIONE DELL ’ IMPIEGO DELLE ALTE PRESSIONI
PER L’INATTIVAZIONE VIRALE. STUDIO CONDOTTO SUL
COXSACKIE VIRUS B5 E SUL CALICIVIRUS FELINO”**

VALUTAZIONE DELL' IMPIEGO DELLE ALTE PRESSIONI PER L'INATTIVAZIONE VIRALE. STUDIO CONDOTTO SUL COXSACKIE VIRUS B5 E SUL CALICIVIRUS FELINO.

Le ricerche sulle applicazioni delle alte pressioni alla conservazione degli alimenti iniziarono nei primi del '900, quando Hite 1 dimostrò che il trattamento ad alte pressioni di latte, frutta e vegetali, grazie alla loro attività microbica, poteva estenderne la shelf-life preservandone le caratteristiche sensoriali. Queste ricerche si interruppero, da una parte per difficoltà tecniche di applicazione alla produzione di massa degli alimenti, dall'altra perché nello stesso periodo si incominciarono a studiare gli effetti dei trattamenti termici di pastorizzazione, più economici e di più semplice applicazione. Negli ultimi anni il crescente interesse dei consumatori per prodotti sicuri dal punto di vista igienico e allo stesso tempo di alta qualità organolettica e nutrizionale ha alimentato la domanda di “minimal processed foods” da parte del mercato. Si è riaperto così l'interesse per le cosiddette “nonthermal processing technologies” o processi di stabilizzazione atermici, tra cui i trattamenti ad alte pressioni idrostatiche. Questi, a differenza dei trattamenti termici tradizionali hanno in molti casi effetti limitati sulle caratteristiche nutrizionali ed organolettiche degli alimenti pur avendo un effetto stabilizzante sull'alimento. Le alte pressioni, comprese tra 200 e 700 MPa, per una combinazione di effetti fisiologici e biochimici, esplicano infatti attività microbica nei confronti di cellule vegetative batteriche, lieviti, muffe e alcuni virus 2.

Scopo

Valutazione dell'efficacia del trattamento ad alte pressioni idrostatiche per l'inattivazione di Coxsackie virus B5, enterovirus che può essere un indicatore di contaminazione fecale, e Calici virus felino, utilizzato come surrogato dei norovirus umani non coltivabili in vitro, attualmente di grande importanza epidemiologica come agenti di gastroenteriti acute.

Materiali e Metodi

Culture cellulari e virus: Il *virus A dell'epatite* è stato fatto crescere in colture cellulari di FRHK4, derivante da rene embrionale di scimmia incubate a 37°C in atmosfera modificata al 5% di CO₂. Per la replicazione cellulare del *Calicivirus felino*, è stata utilizzata la linea cellulare CRFK incubate in termostato a 37°C. Per la replicazione del virus *Coxsackie B5* è stata utilizzata una coltura cellulare di rene di scimmia in linea continua, stipite RC37 incubazione a 37°C.

Il titolo virale è stato calcolato come log TCID 50 secondo il metodo Reed-Muench per il virus *Coxsackie B5* e il *Calicivirus felino*. Mentre il titolo virale della sospensione del *virus A dell'epatite* è stato determinato con il metodo delle placche secondo Dulbecco ed espresso come UFP, unità formanti placca (Anderson D.A., 1987).

Svolgimento delle prove:I campioni sono stati preparati inserendo 1,5 ml di sospensione virale a titolo noto, in provette di plastica sterili, saldate a caldo e poi poste in sacchetti di plastica i quali sono stati introdotti a loro volta in contenitori di plastica apposti. I campioni, posti in un contenitore refrigerato insieme ad un campione di controllo, sono stati portati alla Stazione Sperimentale per l' Industria delle Conserve Alimentari dove, ad eccezione del controllo, sono stati sottoposti al trattamento con l' autoclave ad alta pressione QUINTUS ® FOOD PRESS 3SL-600 con volume utile di 35 litri e capace di raggiungere 6000 bar. Le prove sono state effettuate a tempi di esposizione di 1, 5, 9, 10, 15 e 20 minuti per pressioni di 400, 500, 600 MPa. A trattamento ultimato, sono state allestite diluizioni scalari in base 10 a partire dall' intero in terreno idoneo. Ogni diluizione è stata poi seminata in piastrine per micrometodica già inoculate con cellule e con terreno di crescita idoneo per le colture cellulari. Le piastrine sono state infine sottoposte ad agitazione e riposte in termostato a 37°C per 4 giorni, trascorsi i quali è stata effettuata una prima lettura per osservare l' eventuale effetto citopatico. La lettura finale è stata effettuata in sesta giornata, così da evidenziare eventuali cambiamenti avvenuti nella lisi cellulare. Per il *virus A dell'epatite* vengono impiegate piastre di macrometodica precedentemente allestite con colture cellulari di FRHK4, dopo avere rimosso il terreno si procede alla semina di 0,1ml di ciascuna diluizione e successiva incubazione per 2 ore in termostato a CO₂ a 37°, dopo di che viene aspirato l'inoculo e si procede all'aggiunta di una miscela di terreno semisolido costituito da carbossimetilcellulosa, MEM 2x e 4% di siero fetale. Trascorsi 12 giorni di incubazione le cellule vengono fissate con una miscela costituita da formalina salata e MEM 2x con cui vengono lasciate a contatto per 2 ore, a temperatura

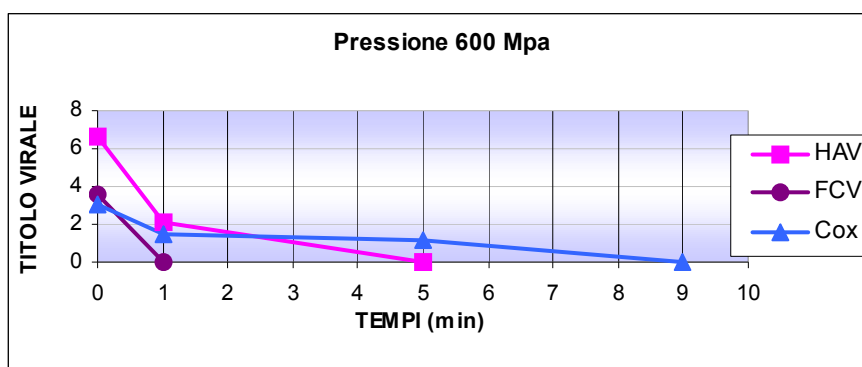
ambiente, dopo di che vengono lavate con acqua demineralizzata e colorate con GIEMSA lasciate in contatto per una notte, il colorante viene poi rimosso e si procede alla conta delle UFP.

Risultati e Discussione

Dalle prove condotte a 600 Mpa, il virus più resistente si è mostrato essere il *Coxsackie B5* per cui è stato necessario un tempo di esposizione di 9 minuti per ottenere una completa inattivazione.

Mentre decisamente più sensibili si sono dimostrati essere il *FCV* e l'*HAV*. Infatti per pressioni di 600 Mpa il *FCV* è stato inattivato già solo dopo 1 minuto di trattamento, e l'*HAV* dopo 5 minuti. (grafico 8)

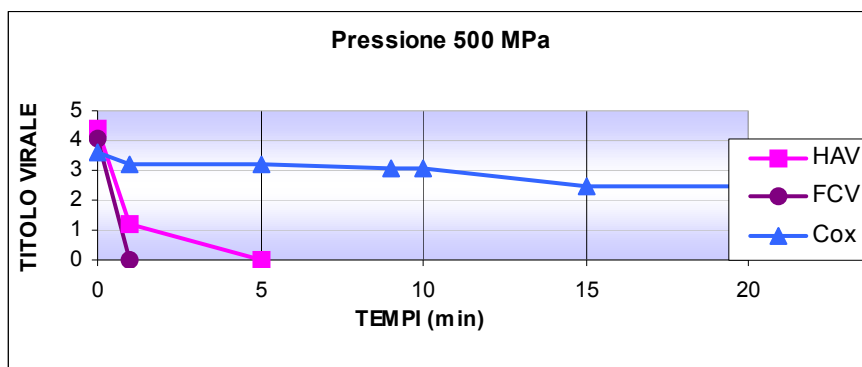
Questi risultati si mostrano in linea con altri studi condotti sul virus *Coxsackie B5* dai quali è risultato che per esposizione a pressione di 600 Mpa e tempi di 5 minuti non si ha avuto riduzione del titolo virale.(15)



Anche per quanto riguarda le prove condotte a 500 MPa è risultato essere il *Coxsackie B5* il virus più resistente. Infatti non si raggiunge mai la completa inattivazione, con una percentuale di abbattimento dopo 20 minuti pari a 99.10%.

Per quanto riguarda l'*HAV* si è riscontrato un completo abbattimento del titolo virale dopo 5 minuti con una percentuale di abbattimento del 99,94% dopo un minuto, per quanto riguarda il *FCV* già dopo un minuto si ottiene la completa inattivazione. (Grafico 9)

I risultati rispecchiano quelli avuti in studi condotti sull'*HAV* per i quali un titolo iniziale di 7log-10 PFU/ml è stato ridotto a livelli non misurabili con l'esposizione per 5 minuti a pressioni di 450 Mpa. (14)



Dalle prove condotte a 400 Mpa è stato possibile verificare che il virus più resistente si è mostrato essere il *Coxsackie B5* non portando mai la completa inattivazione con una percentuale di inattivazione del 92,10% dopo venti minuti.

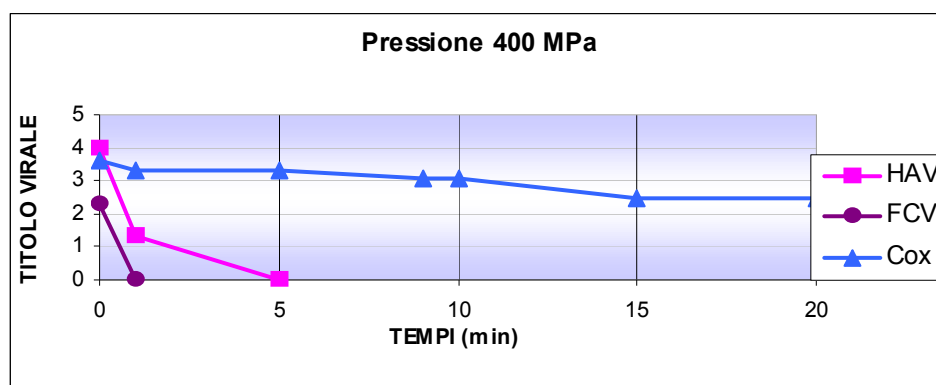
Mentre per quanto riguarda il *FCV* si è avuta un inattivazione totale già solo dopo un minuto di esposizione e per l'*HAV* sempre dopo 5 minuti con una percentuale di abbattimento del 99,77% dopo 1 minuto. (Grafico 10)

Diversi studi condotti sull'inattivazione del *FCV* hanno dimostrato che per ridurre di 7 logaritmi il titolo infettante il 50% delle colture (log TCID 50) bastano trattamenti di 5 minuti con pressioni uguali o superiori ai 275 Mpa. (16)

Altri studi hanno invece inserito la variabile temperatura per il trattamento iperbarico ed è risultato che, mentre trattamenti a temperatura ambiente di 4 minuti a 200 Mpa hanno ridotto il titolo solamente di 0,3 unità logaritmiche, trattamenti condotti a -10°C e 50°C hanno portato rispettivamente alla riduzione di 5,0 e 4,0 unità logaritmiche. (9)

Per ottenere una riduzione di 4 logaritmi sono risultati sufficienti trattamenti di 5 minuti a 375 Mpa. (13)

L'*HAV* è risultato sensibile a pressioni tra 300 e 450 Mpa con vari tempi di trattamento.



CONCLUSIONI

Nel presente lavoro abbiamo utilizzati i virus, i microrganismi più resistenti ai trattamenti di stabilizzazione microbiologica e rilevanti dal punto di vista epidemiologico nel settore alimentare.

Questo con la prospettiva futura di trovare le combinazioni ottimali di tempo, pressione e temperatura per l'inattivazione virale e il mantenimento delle caratteristiche chimiche, fisiche e nutrizionali degli alimenti.

Bibliografia

- 1 Hoover Dallas G. et al. (2006), " Inactivation of Foodborne Viruses of Significance by High Pressure and Other Processes " , Journal of Food Protection, Vol. 69, No. 4, 957-968
- 2 Kingsley David H., Haiqiang Chen, Hoover Dallas G. (2004), " Inactivation of selected picornaviruses by high hydrostatic pressure " , Virus Research 102, 221-224
- 3 Kingsley David H., Guan Dongsheng, Hoover Dallas G., Chen Haiqiang (2006), " Inactivation of Hepatitis A Virus by High-Pressure Processing: The Role of Temperature and Pressure Oscillation " , Journal of Food Protection, Vol. 69, No 10 2006, 2454-2459
- 4 Kingsley David H., Guan Dongsheng, Hoover Dallas G. (2005), " Pressure Inactivation of Hepatitis A Virus in Strawberry Puree and Sliced Green Onions " , Journal of Food Protection, Vol. 68, No 8 2005, 1748-1751

**VIII. “STUDY ON A NEW ASSAY FOR THE DETECTION OF
ENTERIC VIRUSES IN FOOD”**

12th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research in Food
Science and Technology (2007) Reggio Calabria

Study on a new assay for the detection of enteric viruses in food

Roberta Zanelli (robertaz77@libero.it)
Department of Public Health – Hygiene Unit, University of Parma
Tutor: Prof. G.E. Sansebastiano

This work concerns the definition and assessment of a method to extract viruses from foodstuffs. The protocol was subjected to an initial analysis by means of tests for artificial contamination by *Enterovirus* in vegetables in order to assess the recovery percentages. Subsequently, the investigation focused on detection of the Norwalk virus in foodstuffs ready to eat.

Messa a punto di una nuova metodica per il rilevamento di virus in alimenti

Il lavoro riguarda la messa a punto e la valutazione di una metodica per l'estrazione di virus dagli alimenti. Si è proceduto ad una prima analisi del protocollo mediante prove di contaminazione artificiale con *Enterovirus* di campioni vegetali al fine di valutare le percentuali di recupero. Successivamente si passati alla ricerca diretta di virus di Norwalk su alimenti della quarta gamma.

Key words: Norwalk virus, virus detection , food, RT-PCR

1. INTRODUCTION

The definition of a method for the direct detection of enteric viruses in food needs to take into account several factors, such as: the capacity to detect even low viral loads, short times for execution, easy to use, and low costs.

The techniques mainly used can be classified as traditional methods, based on the use of cell cultures, and innovative methods which use immunological techniques, techniques of molecular biology (PCR, Real-Time PCR), and finally, integrated systems (cell cultures - PCR).

The direct analysis of viruses in foodstuffs presents several critical elements, which include selection of the amount of samples to be analysed, the presence of low viral loads, and therefore the need for suitable techniques for those concentrations, and finally the need for a positive sample.

We are therefore proceeding with assessment of the protocol for extraction from vegetables, and defining at RT-PCR method. In the early phase, experimental tests were carried out with artificial contamination using cito-pathogen viruses, and the initial tests with direct detection of the Norwalk-like virus in foodstuffs.

2. MATERIALS AND METHODS

In the artificial contamination tests, the *Coxsackie B5* virus was used, as cultivated on kidney cells of monkeys RC-37, and maintained by means of serial passages on growth medium with 10% foetal bovine serum. The viral titre was expressed in TCID₅₀.

Tests were carried out after contaminating with 1ml of viral suspension of a known titre, 1l of physiological solution in which 50 g of lettuce were immersed for 2h. Once the contact time had expired, the lettuce was removed and subjected to the protocol of viral extraction as described below. An aliquot of the sample was taken in each phase in order to determine the viral titre in the cell culture.

For the direct detection of the Norwalk virus from vegetable samples, the following protocol was used:

Take 50 g lettuce and immerse it in the eluate solution (containing glycine and 3% beef extract), approx. 50 ml, for an hour, shake and recover as much as possible in a flask, distribute the entire volume in test tubes for sterile centrifuge, centrifuge for 15 min at 10,000 g; recover the supernatant and take to 7.2 pH, distribute the suspension in sterile test tubes for centrifuge adding the PEG in a ratio 1:4, leave at 4°C overnight. The following day, centrifuge for 60 min at 10,000 g, re-suspend the pellet with 2 ml physiological solution, centrifuge once again for 15 min at 10,000 g, and, finally, recover the supernatant, which represents the concentrated sample.

As regards the RNA extraction, the protocol contained in the sales kit was used (Nucleo Spin RNA II).

For RT-PCR the specific primers for preserved regions were used, in particular:

For *Enteroviruses* the following primers were used:

EN1 5' ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA 3'

EN2 5' CGG TAC CTT TGT ACG CCT CT 3'

EN5 5' TCC GGC CCC TGA ATG CGG CTA 3'
 EN6 5' GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA 3'
 A Nested PCR was applied.

For the *Norwalk* virus, the following primers were used:

JV12Y 5' ATACCACTATGATGCAGAYTA 3'
 JV12I 5' TCATCATCACCATAGAAIGAG 3'

A Booster PCR was applied. As positive sample, an extract from faecal material was used, from a case of gastroenteritis from a Norwalk agent. The electrophoresis was carried out on agar gel at 1.5% with expected band of 326bp for the NV and 123bp for the enteroviruses.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1 Recovery Tests

Recovery tests performed with artificial contamination with Coxsackie B5 gave a decidedly low recovery percentage, approximately 1% (tab. 1).

Table 1 Viral titres expressed in TCDI50/0.1ml in the various samples and recovery percentages for Coxsackie B5

Initial viral suspension	Adsorbed virus	Eluated Virus	Concentrated Virus	Recovery percentage
10 ⁶	10 ⁴	4 · 10 ²	1,2 · 10 ²	1,2
10 ^{5,5}	10 ^{4,5}	15 · 10 ²	2,5 · 10 ²	0,8
10 ^{6,5}	10 ⁴	4 · 10 ²	1,0 · 10 ²	1

The same samples were subjected to RT-PCR and gave positive results for all the phases of the protocol (Fig. 1).

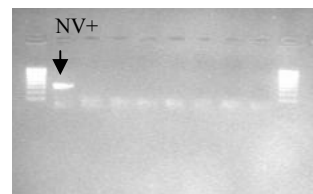
Figure. 1 Results of RT-PCR conducted on samples obtained in various phases in one of the artificial contamination tests carried out with *Coxsackie B5*. 1 marker, 2 negative, 3 initial suspension, 4 washing solution, 5 elution solution, 6 concentrated virus.



3.2 Direct detection of the Norovirus in foodstuffs

Trials carried out so far on ready to eat food and on frozen goods have given negative results.

Figure 2 Results obtained with several RT-PCR tests carried out on fruit and vegetables to detect NV



These are preliminary recovery tests from artificially contaminated vegetables which need to be confirmed with other viruses. Initial results seem to identify the eluting phase as the most critical in the protocol, a result which had already appeared in a study carried out with Real-time PCR

4. Reference

- Butot S., Putallaz T., Sanchez G. (2007). "Procedure for Rapid Concentration and Detection of Enteric Viruses from Berries and Vegetables". *Applied and Environmental Microbiology*: 73; 186-192
- Vinje J., Koopmans G., Marion P. (2000). "Simultaneous Detection and Genotyping of Norwalk like viruses by Oligonucleotide Array in a Reverse Line Blot Hybridization Format". *Journal of Clinical Microbiology*:38; 2595-2601

**IX. “PROVE DI RECUPERO DI VIRUS CITOPATOGENI IN
CAMPIONI ALIMENTARI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI”**

(bozza inviata per la pubblicazione a “Annali di Igiene e Sanità Pubblica)

PROVE DI RECUPERO DI VIRUS CITOPATOGENI IN CAMPIONI ALIMENTARI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI

Zoni R., Zanelli R., Salsi S., Sansebastiano G.
Dipartimento di Sanità Pubblica Sezione di Igiene
Università degli Studi di Parma

Le gastroenteriti acute sono infezioni caratterizzate da diarrea come manifestazione clinica più frequente. Esse possono essere causate da numerosi agenti protozoari, batterici e virali. Studi condotti negli anni '80 hanno messo in evidenza che il 60% delle enteriti acute sono di origine virale (5) il ciò potrebbe essere spiegato dalle basse dosi infettanti dei virus (10–100 particelle virali) rispetto a quelle dei batteri, e alla facilità con cui gli alimenti possono essere contaminati.

Lo studio dei dati epidemici disponibili hanno evidenziato che tra i virus causa di infezioni alimentari, quelli enterici sono responsabili del 67% degli episodi di malattia spesso a carattere gastroenterico.

Tra i virus che possono causare gastroenteriti quelli più frequentemente coinvolti sono: Norovirus, Rotavirus, Adenovirus, tipo 40 o 41, Sapovirus e Astrovirus.

Le gastroenteriti virali possono essere facilmente confuse con le gastroenteriti batteriche perché caratterizzate dagli stessi sintomi.

Generalmente la gastroenteriti virali non rappresentano una patologia grave, anche se può portare a complicanze nel caso in cui l'ospite non riesca a reintegrare a sufficienza i liquidi persi attraverso vomito o diarrea.

La trasmissione dei virus enterici si verifica principalmente per via oro-fecale, ma anche per contagio interumano e per ingestione di cibo o acqua contaminati.

Gli alimenti coinvolti nella trasmissione all'uomo di infezioni virali sono molteplici e vanno dall'acqua, che rappresenta una delle principali fonti di infezione, al latte, alla carne, alla frutta, ma un ruolo particolarmente importante è rivestito dai prodotti vegetali (insalata) e dai prodotti della pesca (soprattutto molluschi).

Allo scopo di poter associare alle malattie un'origine di tipo alimentare, si rende necessario il raggruppamento in opportune categorie degli alimenti che possono fungere da veicolo dei virus responsabili dell'insorgere delle epidemie. Sebbene l'idea possa sembrare semplice la ricerca di uno schema unico di classificazione degli alimenti rappresenta invece un problema critico.

A livello generale una lista dei principali prodotti alimentari può includere 11 categorie: pollame, uova, carne suina, carne bovina, prodotti lattiero-caseari, pesce, molluschi,

crostacei, selvaggina, prodotti orticoli (ad esempio lattuga e mais) e frutti (ad esempio mele e arance e frutti di bosco).

Prove sperimentali condotte con Poliovirus e HAV hanno evidenziato che l'insalata irrigata con acqua contaminata è in grado di adsorbire sulla superficie una rilevante quantità di virus, che si mantiene a livelli elevati per diversi giorni a 4°C e non viene significativamente abbattuta in seguito al lavaggio domestico (4).

Nonostante i virus siano ormai riconosciuti come agenti di malattie dovute all'ingestione di alimenti contaminati, occorre rilevare una carenza di metodi per il loro isolamento da matrici di origine alimentare. Il loro rilevamento in queste matrici, o in acque contaminate, infatti rappresenta un problema.

Il monitoraggio microbiologico rappresenta un importante mezzo per garantire la sicurezza di un alimento. Tecniche rapide, semplici e sensibili per il rilevamento di virus in alimenti ed in acqua possono essere di aiuto per stabilire le cause e la sorgente di infezione fornendo anche importanti informazioni che permettono di capire dal punto di vista epidemiologico le caratteristiche delle epidemie (2). Esistono tecniche efficaci per il rilevamento su campioni biologici provenienti da soggetti infetti, ma questo è possibile perchè le cariche virali presenti in questi campioni sono molto alte, mentre negli alimenti le cariche sono generalmente molto basse, va ricordato che comunque i virus hanno una bassa dose infettante.

La difficoltà della messa appunto di queste tecniche dipende da diversi fattori: le ridotte dimensioni del virus, l'elevato grado di diluizione che subiscono nell'ambiente, la capacità dei virus a formare aggregati, la grande variabilità delle specie virali con conseguente variabilità genica, la presenza di contaminazioni multiple con eventuale interferenza, la variabilità degli alimenti e la presenza di sostanze inibenti.

Il metodo ideale mira ad ottenere un prodotto finale da sottoporre a tecniche di biologia molecolare per il rilevamento di virus, che non interferisca con esse, inoltre sarà importante trovare una metodica che permetta di concentrare il virus da qualsiasi campione alimentare.

Importanti passi in avanti sono stati fatti nello sviluppo di tecniche che prevedono due step fondamentali: il "trattamento del campione" da cui vengono rimossi e concentrati i virus; e il "rilevamento virale" vero e proprio attuato attraverso tecniche di biologia molecolare o attraverso l'impiego delle colture cellulari.

Per quanto riguarda l'estrazione virale, fase chiamata eluizione, viene fatta ad opera di una soluzione tampone. Questo passaggio fondamentale è basato sul fatto che l'adsorbimento virale, a tessuti o ad altre superfici, è regolato dal pH e questo importante fattore permette nella fase di eluizione di separare il virus operando in condizioni di pH basico e fornendo siti di legame che competono con quelli su cui il virus si trova adsorbito, in seguito si ha una fase di chiarificazione ottenuta mediante centrifugazione al fine di separare le particelle solide (2,3,6).

A questo punto l'eluato così ottenuto va sottoposto a una fase di concentrazione che può essere fatta impiegando la precipitazione acida, flocculazione filtrazione, l'adsorbimento con eluizione alcalina ed ultrafiltrazione, l'adsorbimento con eluizione alcalina e precipitazione, eluizione-precipitazione

Scopo del lavoro

Il primo obiettivo è stato quello di valutare quantitativamente il recupero di particelle virali artificialmente aggiunte ad un prodotto alimentare mediante l'applicazione di un nuovo protocollo di eluizione e concentrazione utilizzando un virus citopatogeno facilmente titolabile in colture cellulari.

Materiali e metodi

Virus saggiato e colture cellulari utilizzate

Le prove di contaminazione artificiale sono state condotte con il virus Coxsackie B5 ceppo derivante da uno stipite isolato da un caso clinico.

La sospensione virale è stata allestita seminando 0.1 ml di virus in coltura in fiasca da 75 cm² di cellule renali di scimmia private del terreno di crescita e lavate con soluzione di lavaggio PBS. La fiasca è stata incubata in termostato per un'ora, al termine della quale è stato aggiunto terreno di mantenimento e poi riposta nuovamente in termostato a 37°C fino ad ottenere il massimo effetto citopatico, rilevabile dopo 6 giorni. Successivamente si è proceduto al congelamento a -20°C e quindi scongelamento della coltura per tre volte. Per separare il surnatante contenente il virus dalle cellule, il terreno colturale è stato sottoposto a centrifugazione ottenuta a 2000 rpm per 2 minuti. La sospensione virale ottenuta è stata poi purificata per ultrafiltrazione in centrifuga refrigerata a 4°C alla velocità di 3000 rpm su filtri Millipore con taglio molecolare 10000 dalton. Infine il virus trattenuto dalla

membrana filtrante è stato risospeso con soluzione fisiologica sterile e sottoposto a titolazione in micrometodica calcolato in TCID₅₀ stoccato in congelatore a -80°C.

Contaminazione artificiale di alimenti e procedura di recupero virale.

A 200 ml di soluzione fisiologica sono stati addizionati di 0,5 ml di sospensione virale a titolo noto e un'aliquota è stata prelevata per determinare il titolo virale iniziale.

Per contaminare l'alimento 50 grammi di fragole o frutti di bosco sono stati immersi nella soluzione fisiologica precedentemente allestita e lasciati in contatto per 1 ora.

Dopo tale tempo l'alimento veniva tolto asetticamente dalla soluzione fisiologica e si procedeva ad una nuova titolazione del virus nella soluzione per una valutazione differenziale di quanto virus si era adsorbito all'alimento.

Successivamente si procedeva al trattamento dell'alimento con una soluzione eluente a pH 9,2, la cui composizione (riferita a 500 ml) è la seguente:

- Tris-HCl 100 ml (Cf = 100 mM)
- Glicina 1,88 g (Cf = 50 mM)
- Beef Extrat 15 g (3%, 3 g/100 ml)
- MgCl₂ 2,35 g (Cf = 50 mM)
- Pectinasi 540 µl (Cf = 180 U)

Mantenendo a contatto in agitazione l'alimento per 20 minuti con 50 ml di tale soluzione elunte. L'omogenato così ottenuto è stato centrifugato a 10000 giri per 15 minuti, e il surnatante, recuperato in un matraccio, è stato portato a pH 7,2 con HCl o NaOH.

Un'aliquota è stata prelevata, addizionata di una mescolanza di antibiotici, ed infine titolata, per la valutazione del recupero virale nella fase di eluizione.

La restante parte è stata divisa in due aliquote: una è stata sottoposta a purificazione del virus mediante trattamento con cloroformio (1/1), eseguita in imbuti separatori e lasciando stratificare le fasi per 10 minuti circa, è stato aggiunto PEG 8000 in rapporto 1:4, e il tutto lasciato a contatto per una notte (over night) a 4°C. L'altra non è stata sottoposta alla fase di purificazione ma direttamente posta a contatto con il PEG8000.

Il giorno seguente si è proceduto ad una centrifugazione di entrambi i campioni a 10000 giri per 60 minuti a 4°C e il pellet è stato risospeso in 2 ml di acqua sterile, fino alla sua

completa dissoluzione. Infine, dopo un'ulteriore centrifugazione a 10000 giri per 15 minuti a 4°C, è stata recuperata la fase acquosa da sottoporre a titolazione.

Risultati e discussione

Nelle 12 prove di contaminazione artificiale condotte con Coxsackie virus B5 sono state calcolate le percentuali di recupero del virus eluito in funzione del virus adsorbito e quelle del virus concentrato in funzione del virus eluito.

Percentuali di recupero ottenute con il Cocksackie B5 prima dell'introduzione del pre-trattamento con cloroformio

TEST	ELUITO	CONCENTRATO
1	4%	0,49%
2	2,08%	0,04%
3	1,64%	0,64%
4	4,10%	0,01%

Percentuali di recupero ottenute con il Cocksackie B5 inserendo nella procedura la fase di pre-trattamento con il cloroformio

TEST	ELUITO	CONCENTRATO
5	1,07%	nd
6	5,89%	4,76%
7	8,14%	3,66%
8	0,47%	0,52%
9	0,04%	5,87%
10	0,09%	3,10%
11	1,31%	6,31%
12	0,3%	3,66%

Dalle tabelle si evince come le due tecniche, sia quella di eluizione che quella di concentrazione, abbiano percentuali di recupero molto basse nelle prime quattro prove, mentre migliorano nelle prove successive, soprattutto per quanto riguarda la fase di concentrazione, dove è stata introdotta la purificazione con il Cloroformio. Dalle prove eseguite risultano percentuali di recupero del virus eluito in relazione a quello adsorbito comprese fra **1,64%** e **4,10%**, e si riscontra un miglioramento nelle prove in cui è stata introdotta la purificazione con il Cloroformio in cui le percentuali di recupero raggiungono anche l'**8,14%** senza peraltro evidenziare differenze statisticamente significative. Per quanto riguarda la fase di concentrazione con il PEG 8000 (PoliEtilenGlicole) le percentuali di recupero del virus concentrato variano tra lo **0,01%** e lo **0,64%** e tra **0,52%** e **6,31%** nelle prove in cui è stata inserita la fase di purificazione con il cloroformio con una differenze statisticamente significativa.

Conclusioni:

Sia nella fase di eluizione che in quella di concentrazione, in particolare nelle prove dove non è stato introdotto l'uso del cloroformio, le percentuali di recupero non sono risultate elevate, tuttavia risultano in linea con studi condotti in precedenza in cui le analisi eseguite su fragole fresche, in prove di contaminazione con il virus A dell'Epatite, Norovirus e Rotavirus, hanno determinato efficienze di eluizione comprese tra 0,93% e 2,29%⁵.

Il trattamento con cloroformio se non ha portato ad incrementi di recupero significativi ha favorito comunque una più alta recupero nel concentrato.

Bibliografia

1. Atmar R., et al. (1995): "*Detection of Norwalk like virus and hepatitis A virus in shellfish tissue with the PCR*" Appl. Environ. Microbiol. 61:3014-3018
2. Bouchriti N., Goyal S. (1992): "*Evaluation of three methods for the concentration of Poliovirus from oyster*" Microbiological 15:403-408
3. Bresee JS., Widdowson MA., Monroe SS., Glass RI. (2002): "*Foodborne viral gastroenteritis: challenges and opportunities*" Clin. Infect. Dis. 35: 748-753
4. Durkop J. "Virus contamination of surface water". In: Trends in Microbial Ecology proceeding of the Sixth International Symposium on Microbial Ecology. Barcelona, 6-11 Septembaer 1992
5. Frankhauser R.L., S.S. Monroe, J.S. Noel, C.D. Humphrey, J.S. Bresee, U.D. Parashar, T. Ando and R.I. Glass (2002). "*Epidemiologic and molecular trends of Norwalk-like viruses associated with outbreaks of gastroenteritis in the U.S.*". J. Infect. Dis.: 186; 1-7;
6. Katzenelson E., Fattal B., Hostovesky T. (1976): "*Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detoction of viruses in tap water*" Appl. Environ. Microbiol. 32:638-639

**X. ANALISI PCR, REAL-TIME PCR SU VIRUS DI NORWALK IN
PROVE DIRETTE SU ALIMENTI E DI CONTAMINAZIONE
ARTIFICIALE**

(bozza inviata per la pubblicazione a “Annali di Igiene e Sanità Pubblica)

ANALISI PCR, REAL-TIME PCR SU VIRUS DI NORWALK IN PROVE DIRETTE SU ALIMENTI E DI CONTAMINAZIONE ARTIFICIALE

Zoni.R., Zanelli R., Sansebastiano G.
Dipartimento di Sanità Pubblica Sezione di Igiene
Università degli Studi di Parma

I Norovirus hanno una distribuzione cosmopolita e possono essere considerati i principali agenti di malattie gastroenteriche infettive nei paesi industrializzati, essendo responsabili del 68-80% delle gastroenteriti (2); il Centers for Disease Control and Prevention (CDC) stesso stima che siano almeno 23 milioni ogni anno negli Stati Uniti i casi di gastroenteriti acute imputabili a questi virus, ad esempio solo in Minnesota si sono dimostrati responsabili della quasi totalità delle infezioni alimentari, essendo stati individuati come agenti eziologici nel 96% dei 90 focolai epidemici di natura virale (7).

Una delle prime epidemie importanti legate al consumo di acqua si verificò a Finnish (4) nel mese di Aprile del 1994, dove un, circa il 25-50% della popolazione, manifestò la sintomatologia tipica delle gastroenteriti acute. Ricerche di laboratorio confermarono Adenovirus, Norwalk-like virus, Small Round Viruses (SRV), e Rotavirus appartenenti ai gruppi A e C, quali agenti infettanti, ma l'agente eziologico più frequentemente implicato risultò il virus di Norwalk. Le falde acquifere profonde situate in prossimità del fiume, vennero contaminate dall'acqua del fiume stesso durante il periodo delle piene primaverili (4).

I sistemi di sorveglianza europei indicano i Norovirus come i responsabili di circa il 50% dei casi di gastroenteriti riportati in Inghilterra e in Galles; dati simili provengono anche dalla Finlandia, Svezia, Olanda, Germania, e Giappone a dimostrazione della loro diffusione mondiale. Numerose epidemie da Norovirus sono state associate al consumo di alimenti contaminati, soprattutto frutti di mare come mitili, ed ostriche (1), nonché alla contaminazione di acque destinate al consumo umano (5). La capacità di dare luogo ad infezioni clinicamente rilevanti in tutti i gruppi di età e di trasmettersi con diverse modalità, così come l'elevata diversità genetica, la bassa dose infettante (10-100 particelle virali) e l'incapacità di sviluppare nell'uomo una immunità di tipo duraturo, fanno sì che i Norovirus rappresentino un importante problema di sanità pubblica in tutto il mondo.

L'agente eziologico responsabile di molte epidemie, dovute al consumo di alimenti contaminati, spesso non viene identificato, anche se si pensa che in molti casi siano i virus

enterici la principale causa. L'impossibilità di confermare l'origine virale di queste infezioni è spesso dovuta ad una mancanza di tecniche sensibili ed affidabili per il rilevamento virale sugli alimenti. (6)

Un importante problema è rappresentato dal fatto che due dei più importanti virus enterici, quali il virus di Norwalk e il virus dell'epatite A, non crescono in coltura, risulta difficile la messa a punto di una metodica che permetta l'identificazione di tali virus, infatti per gli studi sperimentali vengono impiegati dei surrogati.

Risulta quindi fondamentale la standardizzazione di una tecnica che permetta di mettere in evidenza la presenza di tali virus negli alimenti.

Nel corso degli anni, diverse metodiche sono state applicate per l'isolamento e l'identificazione dei virus negli alimenti, in particolare nei molluschi, nelle acque, nei vegetali e nella frutta. La scelta del metodo da impiegare è legata alla valutazione di diversi aspetti analitici che sono principalmente: la carica virale, la matrice alimentare, i tempi di determinazione e i costi. Attualmente i metodi più utilizzati nella determinazione e identificazione dei virus sono le *colture cellulari*, le tecniche di biologia molecolare (*sonde, Polymerase Chain Reaction o PCR*) e i sistemi integrati (*colture cellulari-PCR*). In questi ultimi anni si sta affermando anche per i virus enterici, una metodica innovativa quale la *Real Time PCR*, che oltre ad offrire tutti i vantaggi della PCR classica, come la sensibilità, la specificità e la rapidità di risposta, presenta il vantaggio di poter monitorare la reazione di amplificazione in tempo reale. La Real Time PCR permette di rendere quantitativa la risposta della reazione determinando l'accumulo degli ampliconi all'inizio della fase esponenziale della PCR.

Scopo del lavoro

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di mettere a punto una metodica di determinazione di virus non citopatici da campioni alimentari attraverso metodi di biologia molecolare l'applicazione e l'ottimizzazione di un protocollo mediante prove sperimentali di contaminazione artificiale per una valutazione percentuale di recupero virale.

Materiali e metodi

Virus non citopatici utilizzati

Per le prove di rilevamento virale diretto è stato utilizzato il Virus di Norwalk recuperato da un campione fecale di un soggetto malato

Estrazione del virus di Norwalk da campioni di feci: 1 g di feci è stato sospeso in PBS 0,01 M, agitato con il Vortex per circa 60 secondi, centrifugato a 1000 rpm e sottoposto a filtrazione. I campioni così ottenuti sono stati stoccati in congelatore a -80°C . Per poter eseguire l'RT-PCR, i campioni di feci sono stati diluiti in H_2O RNAsi free, vortexati per 30 secondi e centrifugati a 10000 rcf per 5 minuti.

Estrazione RNA virale

L'estrazione è stata condotta utilizzando un kit commerciale "Nucleo Spin RNAII Macherey-Nagel" attenendosi al protocollo ad esso allegato.

Questo procedimento permette di estrarre, separare e purificare l'RNA virale eliminando gli acidi nucleici cellulari, le DNAsi e le eventuali ribonucleasi presenti

Retrotrascrizione del RNA

La ricerca della sequenza nucleotidica specifica sull'RNA mediante l'uso della PCR, prevede la retrotrascrizione dell'RNA virale mediante l'impiego di una trascrittasi inversa (MuLV Reverse Trascrittasi 2,5 U/ μl), MgCl_2 (5 mM), Tampone PCR (1 X), dNTPs (4 mM), Inibitore RNAsi (1 U/ μl), Random Examer (2,5 U/ μl) al fine di ottenere un DNA complementare (cDNA) che funge da template per la successiva fase di amplificazione.

Amplificazione del virus di Norwalk (Booster-PCR)

Dopo aver ottenuto il cDNA dall'RNA virale, si è proceduto all'amplificazione della regione considerata, conducendo due PCR consecutive con la stessa coppia di primer, riportata in tabella.

Primer	Sequenza (5'-3')
GII Rw	5' CC(AG) CC (AGCT) GCA T(AG) (ATC) CC(AG) TT(AG) TAC AT 3'
GII Fw	5' C (AGCT)T GGG AGG GCG ATC GCA A 3'

Real-time PCR su Norovirus

è stata condotta una Real Time-PCR utilizzando un Mastermix 2X Power SYBR Green (Applied Biosystem), che prevede un volume finale di 20 μl di cui:

- 10 µl di Master mix SYBR Green contenente: SYBR Green 1 Dye, AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTPs con dUTP;
- 10 µl di un mix costituito da: 5 µl di cDNA e 5 µl di primers e H₂O RNAsi free.

I primer utilizzati sono i seguenti:

COG2R 5' TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA 3'

QNIF2d 5' ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA 3'

Prove di contaminazione artificiale

Come campioni alimentari sono state scelte fragole e frutti di bosco surgelati acquistati in commercio.

Per contaminare l'alimento, 5g di fragole o frutti di bosco, sono stati immersi in 10ml di sospensione virale diluita 1/100 di virus di Norwalk, e lasciati a contatto per 1 h. Al termine del tempo di contatto l'alimento viene rimosso in condizioni di asepsi, e posto a contatto per 20 minuti con 10 ml di soluzione eluente a pH9,2 e mantenuto in agitazione. L'omogenato così ottenuto è stato centrifugato a 10000 giri per 15 minuti, e il surnatante recuperato e stato portato a pH 7,2, in fine a tale sospensione è stato aggiunto PEG 8000 in rapporto 1:4, e il tutto lasciato a contatto per una notte (over night) a 4°C. Il giorno seguente si è proceduto ad una centrifugazione a 10000 giri per 60 minuti a 4°C e il pellet è stato risospeso in 2 ml di acqua sterile; infine, dopo un'ulteriore centrifugazione a 10000 giri per 15 minuti a 4°C, è stata recuperata la fase acquosa. Ad ogni step del protocollo è stata prelevata un'aliquota da sottoporre ad analisi biomolecolari.

Procedura per il rilevamento virale diretto da campioni di fragole e frutti di bosco: I campioni di fragole e frutti di bosco da utilizzare per l'indagine virologica diretta sono stati sottoposti ad eluizione, omogeneizzazione e concentrazione secondo le procedure descritte nel paragrafo precedente. Sui campioni ottenuti è stata eseguita l'estrazione dell'RNA virale e si è proceduto ad analisi mediante RT-PCR.

Risultati e discussione

Confronto tra PCR classica e Real Time-PCR su campioni positivi di Norovirus:

Con l'impiego della PCR classica si è ottenuto un risultato solo qualitativo, mentre utilizzando la Real Time-PCR si è ottenuto anche un dato quantitativo. Paragonando i

risultati ottenuti dalle prove di PCR classica e di Real Time-PCR, è stato possibile osservare come quest'ultima abbia mostrato una sensibilità maggiore evidenziando la presenza del virus nel campione diluito 1:1000 che non è stata rilevata con la PCR classica. Attraverso il confronto tra la tecnica di PCR classica e la Real-Time PCR è stato possibile valutare una maggiore sensibilità di quest'ultima.

Fig.1 corsa elettroforetica PCR classica

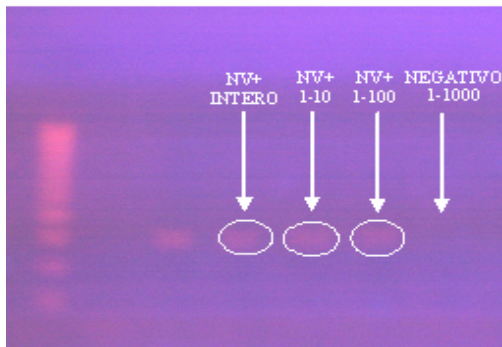
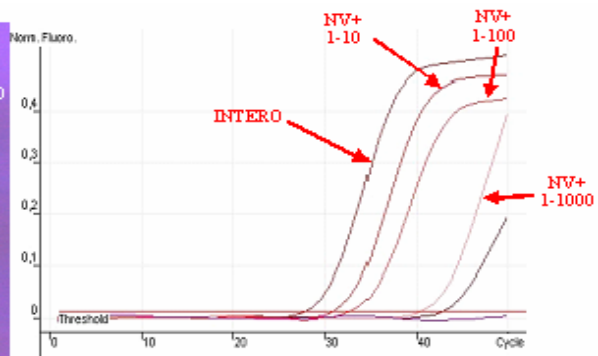


Fig.2 Real-time



Contaminazione artificiale

Dalle prove di contaminazione artificiale condotte con il virus di Norwalk analizzate attraverso l'impiego della real-time PCR è stato possibile evidenziare per entrambe le prove (prova A e prova B) condotte, positività solo per il campione di partenza e per il campione corrispondente alla fase di lavaggio, mentre nei campioni corrispondenti alla fase di eluizione e di concentrazione non è stata evidenziata alcuna positività. In figura è riportato il risultato ottenuto attraverso l'impiego della real-time.

Fig. 3 real-time PCR

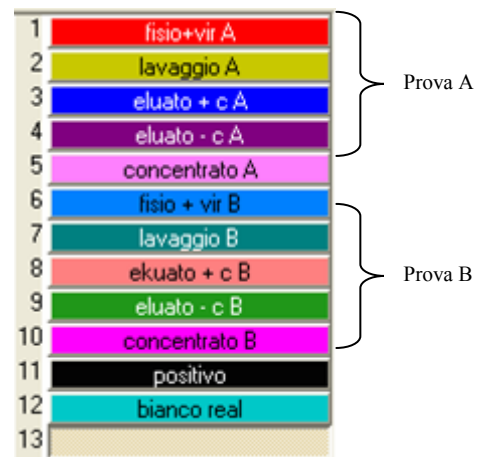
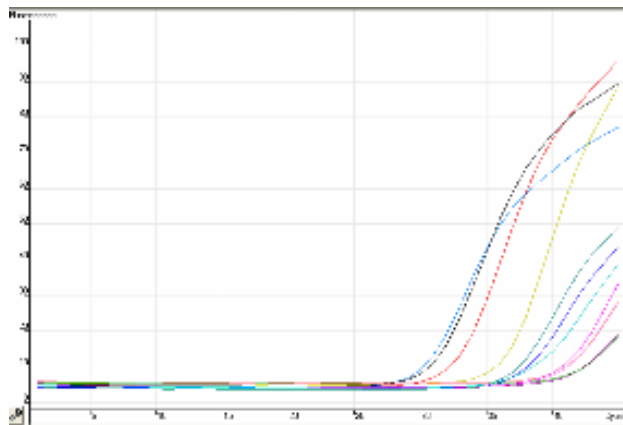
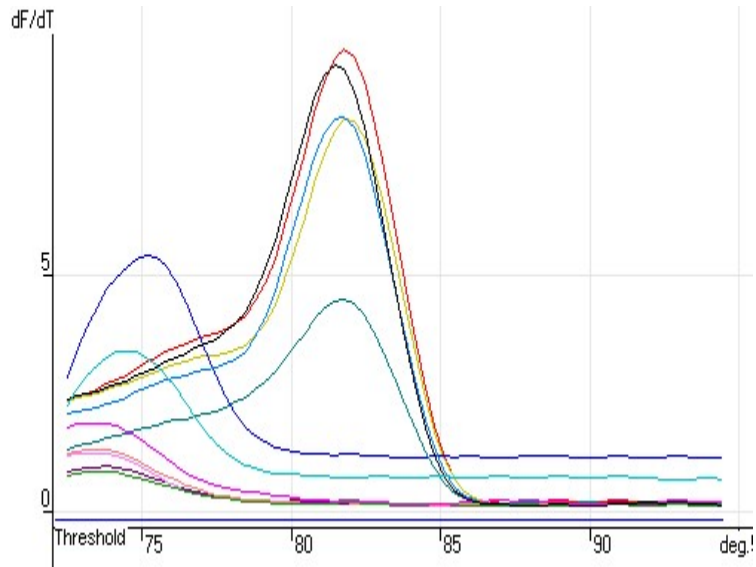


Fig.4 curva di melting

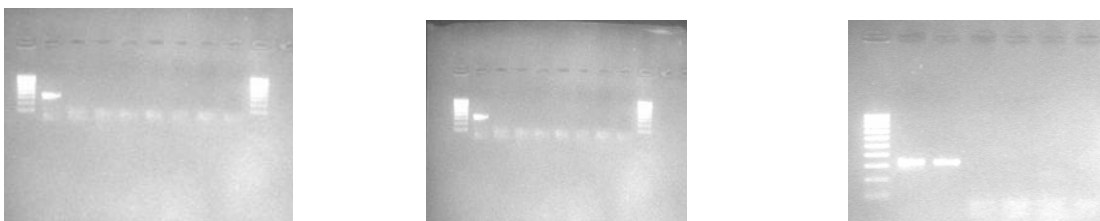
Melt data for Melt A.FAM/Sybr



Prove di rilevamento virale diretto:

Le prove di rilevamento virale diretto del virus di Norwalk da matrici alimentari condotte fino ad ora, che hanno riguardato campioni di frutti di bosco surgelati presenti in commercio di diverse marche, non hanno evidenziato la presenza del virus. In figura è riportato il risultato ottenuto da prove RT-PCR condotte su frutta e verdura per la ricerca del N condotte su frutta e verdura per la ricerca del NV

Fig.5 alcune corse elettroforetiche di analisi di rilevamento virale diretto su campioni alimentari



Conclusioni

Questi dati sono ancora del tutto preliminari e necessitano di essere confermati. I risultati fino ad ora ottenuti mettono in evidenza notevoli difficoltà nelle fasi di recupero e concentrazione come si evince dalle basse percentuali. Sembra a questo proposito necessario valutare le diverse fasi del protocollo modificando eventualmente le modalità di eluizione e concentrazione.

Bibliografia

1. **Berg D., Kohn M., Farley T., MacFarland L. (2000).** *"Multistate outbreaks of acute gastroenteritis traced to fecal-contaminated oysters harvested in Louisiana"*. J. Infect. Dis.: 181; 381-86;
2. **Frankhauser R.L., S.S. Monroe, J.S. Noel, C.D. Humphrey, J.S. Bresee, U.D. Parashar, T. Ando and R.I. Glass (2002).** *"Epidemiologic and molecular trends of Norwalk-like viruses associated with outbreaks of gastroenteritis in the U.S."*. J. Infect. Dis.: 186; 1-7;
3. **Godoy P., Nuin C., Alsedá M., Llovet T., Mazana R., Domínguez A. (2006).** *"Waterborne outbreak of gastroenteritis caused by Norovirus transmitted through drinking water"*. Rev. Clin. Esp.: 206(9); 435-437;
4. **Kukkula M. et al. (1997)** "Waterborne outbreak of viral gastroenteritis". Scand J. Infect Dis.: 29 (4), 415-8.
5. **S. Butot, T. Putallaz, G. Sanchez (2007).** *"Procedure of rapid concentration and detection of Enteric Viruses from berries and vegetables"*. Applied and Environmental Microbiology: 73 ; p.186-192;
6. **Svenson L. (2000):** "Diagnosis of foodborne viral infection in patients". Int. J. Food Microbiol. 59: 117-126
7. **V.C. Deneen, J.M. Hunt, C.R. Paule, R.I. James, R.G. Johnson, M.J. Raymond and C.W. Hedberg (2000).** *"The impact of foodborne calicivirus disease: the Minnesota experience"*. Journal of Infection Diseases: 181; pp. S281-S283.