

STUDIO SULLA PRESENZA DI NOROVIRUS IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* SOTTOPOSTI A DEPURAZIONE IN DUE C.D.M. DELLA REGIONE SARDEGNA

STUDY ON THE NOROVIRUS PRESENCE IN MYTILUS GALLOPROVINCIALIS SUBJECTED TO DEPURATION IN TWO C.D.Ms. IN THE SARDINIA REGION

Bazzardi R.¹, Pisanu M.¹, Fattaccio M.C.¹, Canu A.¹, Marongiu E.¹, Serra S.², Fadda G.³

¹Dipartimento di Igiene degli Alimenti – Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari;

²Servizio Veterinario – ASL n°2, Olbia;

³Servizio Veterinario ASL n°5, Oristano

SUMMARY

Noroviruses (NoVs), known as Norwalk-Like Viruses (NLV) or Small-Round-Structured-Viruses (SRVS), are among the most frequent causes of acute viral gastroenteritis in human beings, often associated with food poisoning, if raw or poorly cooked bivalve molluscs (mussels, clams and oysters) are ingested. In compliance with EU regulations, the safety of these products is evaluated according to bacteriological parameters (*Salmonella* and *E.coli*) as provided for by Regulation (EC) No. 2073/2005, biotoxicological parameters, as provided for by Regulation (EC) No. 853/2004, and chemical parameters, as provided for by Regulation (EC) No. 1881/06. This essay focuses on the evaluation of NoV concentration levels in *Mytilus galloprovincialis* populations, farmed in 2009 in two different Mussels Depuration Centers (CDMs) in Sardinia (Italy). During the assessment procedures, Noroviruses were detected for the first time on the regional territory with one-step TaqMan real-time RT-PCR.

KEYWORDS

Norovirus, Real-Time PCR, Bivalve mussels.

INTRODUZIONE

I Norovirus (NoVs) rappresentano la causa principale di gastroenterite epidemica non batterica nel mondo coinvolgendo il soggetto adulto e i soggetti in età pediatrica (1). Le informazioni epidemiologiche sulle gastroenteriti virali provocate da NoVs nel nostro paese sono scarse e frammentarie ed in particolar modo in Sardegna i casi riportati di AGE (epidemie di gastroenterite acuta) e/o infezioni umane da Norovirus sono sottostimati (2). L'infezione è frequentemente associata, secondo i dati riportati in letteratura e dal Centre of Disease Control (CDC) di Atlanta (U.S.A.), al consumo di mitili crudi (3, 4). I NoVs appartengono al gruppo dei Virus Enterici e sono piccoli virus con genoma a RNA costituito da un singolo filamento a polarità positiva (5). Sono sufficienti poche particelle

virali (dose infettante 10-100 unità virali) per causare un'infezione. La trasmissione virale avviene più frequentemente tramite ingestione di alimenti contaminati. Il contagio può avvenire anche per via aerea, attraverso la trasmissione di particelle di aerosol (5). Il Genere Norovirus appartiene alla famiglia Caliciviridae, sono virus altamente eterogenei dal punto di vista genetico ma la loro ecologia globale non è ancora nota. Sulla base delle differenze riscontrate nelle sequenze aminoacidiche della proteina del capsido, i Norovirus sono stati suddivisi in 5 genogruppi: I, II e IV che provocano infezione nell'uomo e III e V che determinano infezione negli animali (5). I molluschi lamellibranchi, in quanto organismi filtratori, durante la loro continua ed intensa attività di filtrazione hanno la capacità di trattenere e concentrare nel loro organismo non solo il plancton, necessario al loro metabolismo, ma anche batteri, parassiti, mi-

croalghe tossiche e virus (6, 7, 8, 9, 10, 11). Per tale motivo sono considerati animali ad alto rischio di infezioni. Il presente lavoro è stato condotto durante l'anno 2009. La commercializzazione di questi animali era regolamentata, in quell'anno, da diverse normative europee (Regolamenti CE n.853/04, 854/04, 2073/05, 2074/05, 1881/06 e successive modifiche ed integrazioni) che stabilivano i requisiti igienici microbiologici e chimici (REg. CE 2073/05 e Reg.1881/2006). In particolare il Reg. 2073/05 fissava i requisiti microbiologici basandosi solo sulla determinazione di alcuni "parametri batteriologici" (*Salmonella* ed *E.coli*). Lo stesso regolamento sottolineava però, che la determinazione degli indicatori fecali non poteva risultare affidabile per dimostrare l'assenza di contaminazione virale e per valutare i tempi dei processi di depurazione. Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare la presenza di NoVs in *Mytilus galloprovincialis* prodotti e commercializzati in due Centri di Depurazione Molluschi (CDM) della regione Sardegna, in seguito al verificarsi di alcuni casi di contaminazione virale (NoVs) in mitili bivalvi vivi provenienti da Zone di classe B (sottoposti a depurazione come da regolamento comunitario) già presenti sul mercato locale. Sono state analizzate un totale di 46 aliquote e 9 (19,56%) di queste sono risultate positive per NorVs. Per l'individuazione del target patogeno è stato applicato il protocollo: one-step TaqMan Real Time RT-PCR (12, 13, 14).

MATERIALE E METODI

Lo studio è stato condotto contemporaneamente in due Centri di Depurazione Molluschi (CDM A e CDM B) della regione Sardegna tra il mese di Giugno e quello di Settembre del 2009, per un periodo di 10 settimane nel CDM A e 13 settimane nel CDM B. In ciascun impianto di mitilicoltura è stato effettuato settimanalmente un prelievo, da un lotto di produzione giornaliero scelto a caso, di un campione di molluschi per la ricerca di NoVs. Successivamente ogni campione è stato suddiviso in n.2 aliquote: la prima, non sottoposta a processo depurativo, è stata analizzata al tempo zero, mentre la seconda è stata analizzata in fase post depurativa dopo 48h. Non sono state analizzate aliquote tra il tempo zero e la fase post depurativa. Sono stati eseguiti i campionamenti esclusivamente per la ricerca di NoVs su un totale di 46 aliquote, al fine di poter valutare l'effetto della depurazione sul prodotto prima della commercializzazione. Nel CDM A sono stati prelevati in totale n.10 campioni e n.13 campioni nel CDM B. L'unica specie oggetto di studio è stata *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Tutti i molluschi provenivano da Zone di classe B. Delle n.20 ali-

quote del CDM A n.10 sono state analizzate prima della depurazione al tempo zero, e le restanti n.10 sono state analizzate dopo il processo di depurazione di 48h (Tabella 1); allo stesso modo, delle n.26 aliquote prelevate dal CDM B n.13 sono state analizzate al tempo zero e n.13 dopo le 48h di depurazione (Tabella 2). Per il ciclo di depurazione entrambi i CDM hanno utilizzato vasche a circuito chiuso, dotate di sistemi di filtrazione meccanica e chimica e sistema a bins (15). L'acqua di mare utilizzata nel circuito è stata trattata con lampade a raggi UV (λ 254 nm, capaci di eliminare organismi enterici) e chimicamente con ozono per evitare contaminazioni microbiche. Sulla base dei tempi di depurazione applicati da entrambe le aziende (12-24h) per il controllo di *Escherichia Coli* e *Salmonella spp.* e considerando che i tempi di rilascio dei virus enterici sono più lunghi di quelli necessari per i batteri di origine fecale o batteri patogeni, si è deciso di portare a 48h il tempo massimo di depurazione (16). Ciò si è reso necessario poiché nel periodo in cui è stato effettuato lo studio non erano stabiliti dei tempi di depurazione atti a ridurre il rischio virale, a garanzia del consumatore e del produttore. Nel corso di ciascun campionamento sono stati monitorati la temperatura, la salinità e il pH dell'acqua utilizzata per la depurazione. La preparazione di tutti i campioni consisteva nel prelievo di 2.0 ± 0.2 g di epatopancreas da ciascun pool a cui sono stati addizionati 2.0 ml di soluzione di proteinasi K (30 U/mg), incubati a 37.0 ± 1.0 °C in agitazione per 60 ± 5 min e successivamente sottoposti ad una seconda incubazione a 60.0 ± 2.0 °C per 15 ± 1 min in bagnomaria. E' stata eseguita una centrifugazione a 3000g per 5 min., successivamente è stato recuperato il surnatante e portato a volume di 3 ml con PBS sterile (pH 7.3) (17). L'estrazione degli acidi nucleici è stata eseguita utilizzando il mini kit QIAamp® Viral RNA (Qiagen) seguendo le istruzioni del produttore. E' stato utilizzato il metodo in uso presso il LNR (Laboratorio Nazionale di Riferimento – I.S.S.) per la scelta dei primers e dei probes (17). La retrotrascrizione e la PCR Real Time one-step sono state effettuate con strumento ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) mediante l'utilizzo del Superscript III Platinum® one-step qRT-PCR kit with ROX (Invitrogen). La retrotrascrizione è stata effettuata a 55° C per 60 min, seguita da denaturazione a 95° C per 5 min e da 45 cicli di PCR (denaturazione a 95° C per 15 s, annealing a 60° C per 1 min, extension a 65°C per 1 min). Ad ogni corsa sono stati affiancati due controlli negativi e un controllo positivo costituito da RNA estratto da Norovirus. I campioni sono stati considerati positivi quando presentavano il Ct \leq di 44.0

in almeno due repliche (17).

RISULTATI

Il protocollo One-step Real Time RT-PCR ha consentito di evidenziare la presenza, nel CDM A di Norovirus in n.4 aliquote (40%) analizzate prima della depurazione e n.1 aliquota (10%) analizzata dopo la depurazione, su un totale di n.20 aliquote (Tabella 1). Nel CDM B sono risultate positive n.4 aliquote (30,77%) analizzate prima della depurazione, e nessuna aliquota positiva dopo il processo di depurazione; su un totale di n.26 aliquote (Tabella 2). I risultati si riferiscono al numero dei campioni prelevati nei due distinti Centri di depurazione A e B. Poiché il numero dei campioni è parso essere di ridotte dimensioni, in considerazione del fatto che le caratteristiche del processo di depurazione erano identiche nei due impianti e che le acque utilizzate avevano parametri chimico-fisici simili, si sono considerati tutti i campioni come provenienti da un unico sito di depurazione (Tabella 3). Sono state confrontate le percentuali ottenute dalle elaborazioni dei dati di entrambi i centri di depurazione per verificare se la loro differenza fosse dovuta al caso oppure no: una è stata quella relativa al totale delle aliquote risultate negative dopo la depurazione, e l'altra quella relativa al totale delle aliquote negative prima della depurazione (Tabella 3). Il test statistico che è stato adottato, considerando l'esiguo numero di campioni e l'insufficiente estensione del disegno sperimentale è stato quello del Test chi-quadrato (χ^2) corretto Yates (Yates 1934). Questo test statistico non parametrico ha consentito di verificare se i valori di frequenza ottenuti tramite rilevazione, fossero diversi in maniera significativa dalle frequenze ottenute con una distribuzione teorica (Tabella 4). Su un totale di n.46 aliquote, n.23 sono state sottoposte a depurazione, e di queste n.22 (95,65%) sono risultate negative. Delle restanti n.23 aliquote analizzate prima della depurazione n.15 (65,21%) sono risultate negative (Tabella 3).

Da ciò è sembrato che il ciclo di depurazione sia stato efficace ai fini della commercializzazione del prodotto e che il ciclo di depurazione sia risultato efficace nell'80,4% dei casi (Tabella 3). Prima però di giungere a considerazioni affrettate è stata presa in considerazione l'ipotesi che in realtà, non esistevano differenze tra la pre e la post-depurazione. Quindi, in uno studio di dimensioni simili a questo, ci si è chiesto che probabilità fosse esistita di riscontrare differenze uguali o superiori a quelle che sono state osservate. I nostri dati hanno dimostrato che indipendentemente dalla pre/post-depurazione, il ciclo di depurazione è risultato efficace nell'80,4% dei casi. Infatti sono risultate nega-

tive complessivamente ed indipendentemente dal ciclo depurativo n.22 + n.15 = n.37 aliquote (80,4%). Abbiamo applicato questa percentuale di successo a ciascuno dei due gruppi di mitili in esame e abbiamo ricavato i dati attesi (Tabella 5). L'analisi statistica, con la comparazione dei due gruppi, eseguita mediante il test del chi quadrato corretto Yates ha dato il seguente risultato: $\chi^2 = 4,97$ (con 1 grado di libertà), portandoci quindi a dire che è esistita una differenza significativa del 5% e rifiutando l'ipotesi nulla (H_0) con una probabilità maggiore del 95% ($P < 0,05$) (Tabella 6).

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I risultati del seguente studio, seppure preliminari e riferiti ad un numero non elevato di campioni, hanno dimostrato che l'isolamento del RNA virale in *Mytilus galloprovincialis* allevato e commercializzato dalle Aziende considerate, evidenzia la presenza di Norovirus. Si è voluto studiare la funzione del processo di depurazione sperimentale di 48h per intervenire sul territorio ai fini di monitorare e ridurre a livelli accettabili la potenziale contaminazione da NoV nei MBV, anche se i dati in letteratura riportano che gli impianti di depurazione presenti nel territorio nazionale non hanno nessun effetto sulla purificazione da NoVs in mitili contaminati (10, 15, 16, 18). Tuttavia il presente lavoro ha voluto, come studio preliminare, mettere in evidenza che il ciclo depurativo portato a 48h nei due CDM in questione, potrebbe essere efficace ai fini della depurazione degli esemplari di *Mytilus galloprovincialis* ($P < 0,05$).

BIBLIOGRAFIA

1. Patel M.M., Hall A. J., Vinjé J., Parashar U.D.. (2009). Noroviruses: A Comprehensive review. *Journal of Clinical Virology* 44, 1-8.
2. <http://www.izs-sardegna.it/primopiano.cfm?id=307>.
3. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). (2009). Noroviruses. CDC, Atlanta.
4. Terio V., Martella V., Moschidou P., Di Pinto P., Tantillo G., Buonavoglia C. (2010). Norovirus in retail shellfish. *Food Microbiology*. 27, 29-32.
5. Scipioni A., Mauroy A., Vinié J., Thiry E. (2008). Animal noroviruses. *The Veterinari Journal*, 178, 32-45.
6. Burkhardt W. & Calci K.R. (2000). Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Appl Environ Microbiol*, 66, 1375-1378.

7. Le Guyader F.S., Loisy F., Atmar R.L., Huston A.M., Estes M.K., Ruvoën-Clouet N., Pompey M. & Le Pendu J. (2006). Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis*, 12, 931-936.
8. Prato R., Lopalco P.L., Chironna M., Barbuti G., Germinaro C. & Quarto M. Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in south Italy. *BMC Infect Dis*, 4, 37.
9. Rizzo C., Di Bartolo I., Santantonio M., Coscia M.F., Manno R., De Vito D., Ruggeri F.M. & Rizzo G. (2007). Epidemiological and virological investigation of a Norovirus outbreak in a resort in Puglia, Italy. *BMC Infectious Dis*, 7, 135.
10. Schwab K.J., Neill F.H., Estes M.K., Metcalf T.G. & Atmar R.L. (1998). Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J Food Prot*, 61 (12), 1674-1680.
11. Corrain C., Arcangeli G., Fasolato L., Manfrin A., Rossetti E., Piazzini E., Mioni R., Pavoni E., Losio N., Sanavio G., Suffredini E., Croci L. (2007). Influenze climatico-ambientali sulla presenza di virus enterici in molluschi bivalvi. *Ind. Alim.-XLVI*, 277-283.
12. Watzinger F., Ebner K., Lion T. (2006). Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 254-298.
13. Uhrbranda K., Myrmelb M., Maunulac L., Vainiod K., Trebbiana R., Nørrunga B., Schultza A. C. (2010). Evaluation of a rapid method for recovery of norovirus and hepatitis A virus from oysters and blue mussels. *Journal of Virological Methods*, 169, 70-78.
14. Chironna M., Sallustio A., Barbuti S., Quarto M. (2005). "Tipizzazione molecolare di ceppi di HAV in molluschi bivalvi analizzati mediante Real Time PCR". *Atti del V Workshop Nazionale Enter-net Italia*, 28.
15. Savini G., Casaccia C., Barile B. N., Paoletti M. & Pinoni C. (2009). Presenza di Norovirus in molluschi bivalvi e verifica dell'efficacia dei sistemi di depurazione. *Veterinaria Italiana*, 45 (4), 529-533.
16. Barile N. B., Scopa M., Nerone E., Masciolongo G., Recchi S., Cappabianca S. & Antonetti L. (2009). Study of the efficacy of a closed cycle depuration system on bivalve mollusks. *Veterinaria Italiana*, 45 (4), 555-566.
17. Croci L. – Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica – Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali dei molluschi bivalvi.

(2009). Protocollo operativo: Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante Real Time PCR.

18. Ueki Y., Shojoi M., Suto A., Tanabe T., Okimura Y., Kikuchi Y, Saito N., Sano D. & Omura T. (2007). Persistence of caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. *Appl Environ Microbiol*, 73 (17), 5618-5701.

Tabella 1. Aliquote analizzate nel CDM A

CDM A	Aliquote negative	Aliquote positive	TOTALE
Pre depurazione (Temp.zero)	6 (60%)	4 (40%)	10
Post depurazione (Temp.48h)	9 (90%)	1 (10%)	10
TOTALE	15 (75%)	5 (25%)	20

Tabella 2. Aliquote analizzate nel CDM B

CDM B	Aliquote negative	Aliquote positive	TOTALE
Pre depurazione (Temp.zero)	9 (69,23%)	4 (30,77%)	13
Post depurazione (Temp.48h)	13 (100%)	0 (0%)	13
TOTALE	22 (84,6%)	4 (15,4%)	26

Tabella 3. Totale aliquote analizzate (CDM A e CDM B)

CDM A e CDM B	Aliquote negative	Aliquote positive	TOTALE
Pre depurazione (Temp.zero)	15 (65,21%)	8 (34,79%)	23
Post depurazione (Temp.48h)	22 (95,65%)	1 (4,35 %)	23
TOTALE	37 (80,4%)	9 (19,6%)	46

Tabella 4. Test del chi quadrato, numero delle aliquote osservate

Test χ^2	Negative	Positive	Totale
Post depurazione (48h)	$a = 22$	$b = 1$	23
Pre depurazione (Tempo 0)	$c = 15$	$d = 8$	23
Totale	37	9	46

Tabella 5. Test del chi quadrato, numero delle aliquote attese

Test χ^2	Negative	Positive	Totale
Post depurazione (48h)	$a = 18$	$b = 5$	23
Pre depurazione	$c = 18$	$d = 5$	23

(Tempo 0)			
Totale	36	10	46

Tabella 6. Valori χ^2

Gradi di libertà	Probabilità		
1	10%	5%	1%
	2,71	3,84	6,63