

Identificazione di aichivirus e sapovirus in *Mytilus galloprovincialis*

Acquacoltura, Algocoltura e Vertical Farming:
il cibo del futuro

AquaFarm - 26 e 27 gennaio

Pordenone

Dr.ssa Maria Grazia Amoroso
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Mezzogiorno
UOS Diagnostica Virologica

Progetto finanziato dal Ministero della Salute
Ricerca Finalizzata RF-2011-02350023
Responsabile scientifico Dott.ssa Giovanna Fusco

In collaborazione con...

Istituto Superiore di Sanità
Dr.ssa Marina Monini
Dr.ssa Ilaria Di Bartolo

INTRODUZIONE: i molluschi bivalvi

- ❑ Organismi filtratori che trattengono e **concentrano virus e batteri** eventualmente presenti nelle loro acque di allevamento
- ❑ Possono diventare **veicolo di trasmissione dei microrganismi** che trattengono
- ❑ Sono rischiosi per la salute umana specialmente se **consumati crudi o poco cotti** come vuole la tradizione locale



INTRODUZIONE: Zone di produzione

La **qualità igienico sanitaria** delle acque di allevamento dei molluschi è basata sulla ricerca di indicatori batterici quali *Escherichia coli*

Zone di produzione Reg. (CE 854/04)

CLASSE A: i Molluschi Bivalvi Vivi (MBV) **direttamente destinati al consumo umano** (*E. coli* <di 230 MPN /100 g di polpa e di liquido intervalvare).

CLASSE B: MBV possono essere **immessi sul mercato previa depurazione** o stabulazione (*E.coli* ≤ 4.600 MPN /100 g di polpa e di liquido intervalvare).

CLASSE C: MBV immettabili sul mercato ai fini del consumo umano previa stabulazione di lunga durata .
(*E.coli* ≤ 46.000 /100 g di polpa e di liquido intervalvare).

INTRODUZIONE: gastroenteriti virali

Mitilo con **indicatore batterico nei limiti di legge**



Mitilo **senza virus**

La **presenza di batteri** non è rappresentativa del livello di **contaminazione virale**

INTRODUZIONE: gastroenteriti virali

- ❑ I virus hanno una **maggiore persistenza nell'ambiente**
- ❑ I virus sono **più resistenti alla depurazione**
- ❑ In letteratura sono descritti numerosi casi di **gastroenteriti umane da virus** legate al consumo di molluschi bivalvi quali ostriche, cozze o vongole

Tra i virus coinvolti..... VIRUS EMERGENTI

AICHIVIRUS

SAPOVIRUS

Maria Grazia Amoroso

 Istituto Zooprofilattico
Sperimentale
del Mezzogiorno

INTRODUZIONE: sapovirus



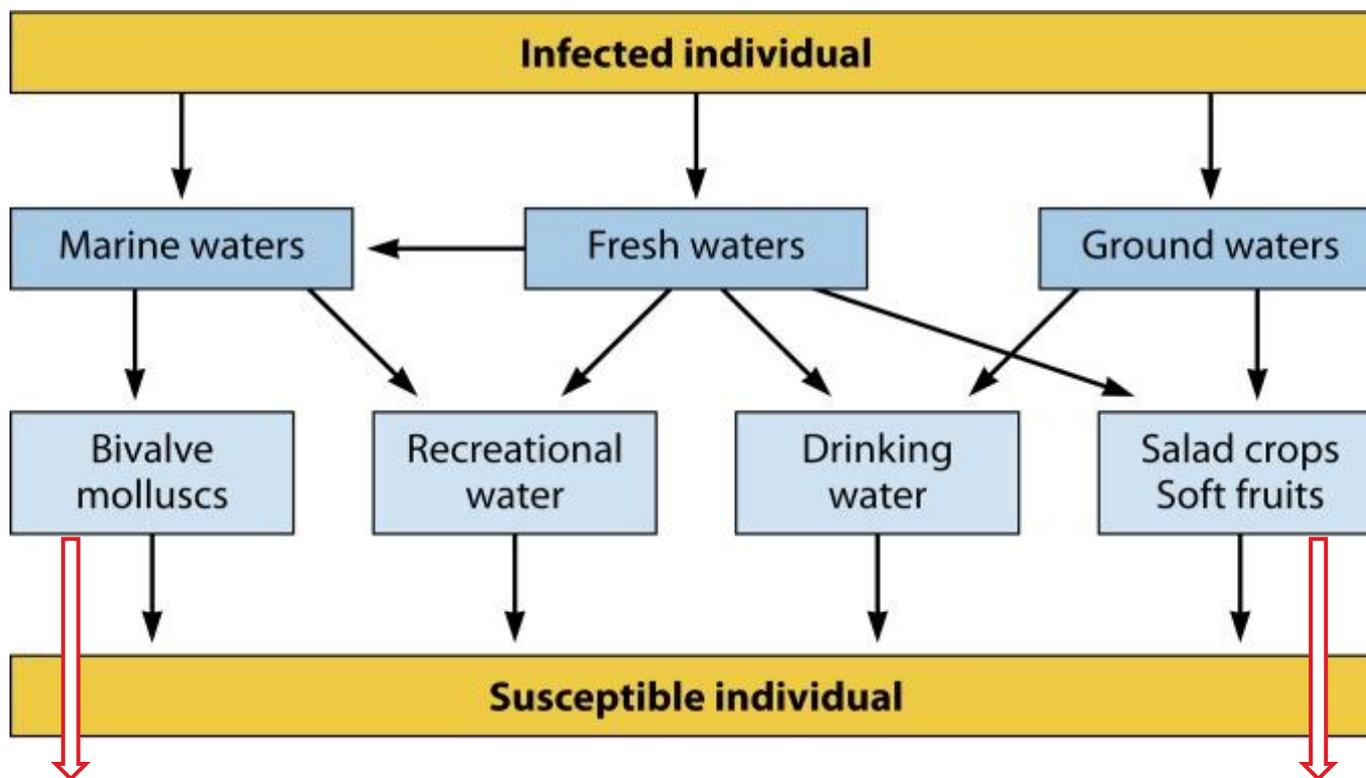
- ❑ Importante causa di **gastroenterite** nei bambini di età inferiore a 5 anni
- ❑ Virus identificato in feci di individui asintomatici e campioni ambientali
- ❑ Descritto un **numero crescente** di casi tra gli adulti
- ❑ La sintomatologia gastroenterica nell'adulto è **piuttosto lieve**, ed è **difficilmente denunciata alle autorità sanitarie**, si pensa quindi che la **frequenza di infezione** da questo virus **sia fortemente sottostimata.**

INTRODUZIONE: aichivirus



- Poche notizie sulla sua epidemiologia
- Molti studi riportano **AiV in campioni ambientali** (acqua e reflui)
- Rinvenuto in feci di **pazienti affetti da gastroenterite**
- Nessun ritrovamento in campioni di mitili**

INTRODUZIONE: vie di trasmissione dei virus



Questi **alimenti** subiscono trattamenti tecnologici molto lievi che **non eliminano i virus enterici**

MATERIALI E METODI

233 campioni di *Mytilus galloprovincialis* (cozza)



Prelevati in **Regione Campania** da allevamenti di **classe A e B** durante un periodo di 36 mesi **(2014-2016)**.



**Ricerca dell'RNA di aichivirus e sapovirus
mediante Real time RT-PCR**

MATERIALI E METODI: estrazione del virus

- ❑ L'estrazione del virus è stata eseguita da 2 g di epatopancreas seguendo le indicazioni della **ISO/TS 15216-1: 2013**
- ❑ Gli acidi nucleici sono stati estratti mediante 2 strumentazioni automatiche



MagMAX Express



Qiasymphony

MATERIALI E METODI: Real time RT-PCR

- ❑ La ricerca dell'RNA virale per ciascun virus è stata effettuata mediante Real time RT-PCR su termocicizzatore Real Time 7500 Fast con un **primers e sonde da letteratura**
- ❑ Ciascun campione è stato analizzato in triplicato
- ❑ Il risultato è stato considerato positivo se almeno una delle repliche dava **$C_T \leq 40$**

MATERIALI E METODI: sequenziamento

I campioni positivi sono stati ulteriormente analizzati mediante
PCR end point

e successivo **sequenziamento Sanger** dell'amplicone ottenuto
mediante elettroforesi capillare

RISULTATI: positività

49 campioni (**21%**) positivi ad **almeno uno dei virus cercati**

5 campioni positivi ad **entrambi i virus**

I positivi si sono riscontrati maggiormente tra febbraio e aprile

RISULTATI: prevalenza dei virus

Viruses detected	Samples positive by Real time PCR
	2014-2016
AiV	13 (5.58%)
SaV	29 (12.44%)

RISULTATI: POSITIVITA' PER CLASSI

SAPOVIRUS

29 Campioni positivi



4 (14%) da allevamenti di
CLASSE A....

AICHIVIRUS

13 Campioni positivi



2 (15%) da allevamenti di
CLASSE A....

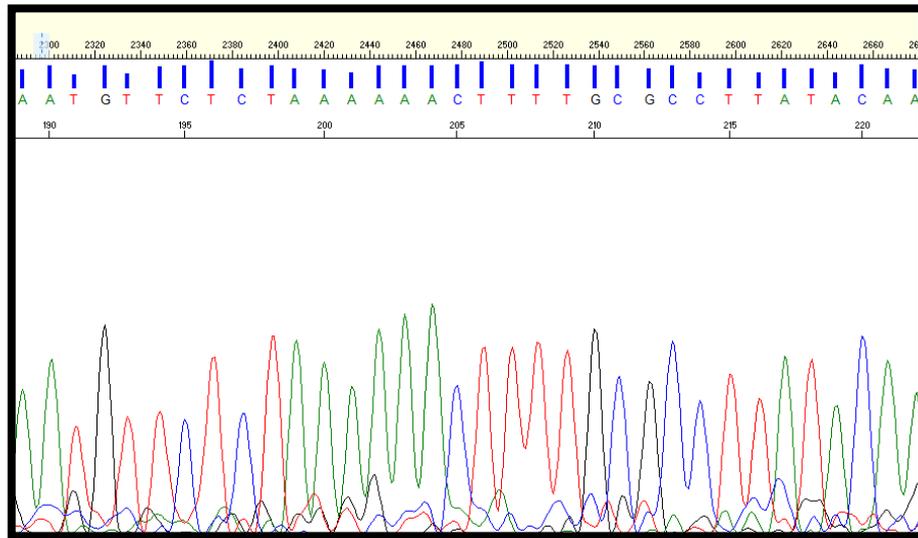
cozze pronte per il consumo....

**2 campioni DA ALLEVAMENTI DI CLASSE A positivi
ad entrambi i virus**

RISULTATI: Analisi filogenetica sapovirus

2 campioni positivi alla Real time PCR hanno dato risultato positivo anche alla PCR end point

Sequenziato mediante elettroforesi capillare
sequenze depositate in GENBANK



SaV genotipo GI.1

con 99% di identità
nucleotidica con altri ceppi
di **sapovirus umano**

DISCUSSIONI: SAPOVIRUS

La presenza di sapovirus è stata descritta:

- In **molluschi** in **Marocco**
- In **ostriche** e **vongole** in **Giappone**
- In **ostriche** in **Spagna**

Questo studio riporta **1 rilievo** di **sapovirus in mitili in Italia**

DISCUSSIONI: AICHIVIRUS

La presenza di aichivurs è stata descritta:

- In ostriche associate a gastroenterite in **Giappone** e in **Francia**
- In molluschi in **Tunisia**

Questo studio riporta **1 rilievo** di **aichivirus** in **Mytilus galloprovincialis nel mondo**

CONCLUSIONI

AiV e SaV identificati ad una frequenza non trascurabile
(**5.58%** e **12.44%**)



Circolazione di questi virus nell'ambiente



Ruolo attivo nelle gastroenteritis umane

CONCLUSIONI

PRESENZA nelle cozze **di virus enterici di origine umana**



Contaminazione fecale dell'acqua in cui sono allevati



Potenziale rischio per la salute umana

CONCLUSIONI

- ❑ 4 campioni allevamento di **Classe A**: pronti per il consumo
- ❑ 45 campioni allevamento di Classe B da commercializzare previa depurazione. La depurazione (come è attualmente effettuata) non è efficace nell'eliminazione dei virus

Molluschi a norma di legge...INFETTI da virus gastroenterico....

Gli indicatori batterici non sono sufficienti a garantire la qualità igienica dei molluschi...

WORK IN PROGRESS.....

❑ **NGS di campioni di cozze positive a sapovirus e aichivirus**

(In collaborazione con IZSTO)

❑ **Studio della cinetica di depurazione dei mitili dai virus**

In collaborazione con Università degli studi di Napoli
Dipartimento di Agraria (Criaq)

CONCLUSIONI

- ❑ Le **cozze**, sono una fonte preziosa di proteine nobili e di **vitamine C e B**
- ❑ Contengono **potassio**, **sodio**, fosforo, iodio e zinco
- ❑ L'alto **contenuto di potassio** aiuta a controllare la pressione e la ritenzione idrica.
- ❑ E poi sono buone.....



NO



SI