STUDIO SULL'EFFICACIA DEI PROCESSI DI DEPURAZIONE NEI MOLLUSCHI BIVALVI

PROGETTO DI RICERCA: IZS AM 04/10RC

UO 2 - Virologia

Depurazione nei confronti di agenti patogeni virali?

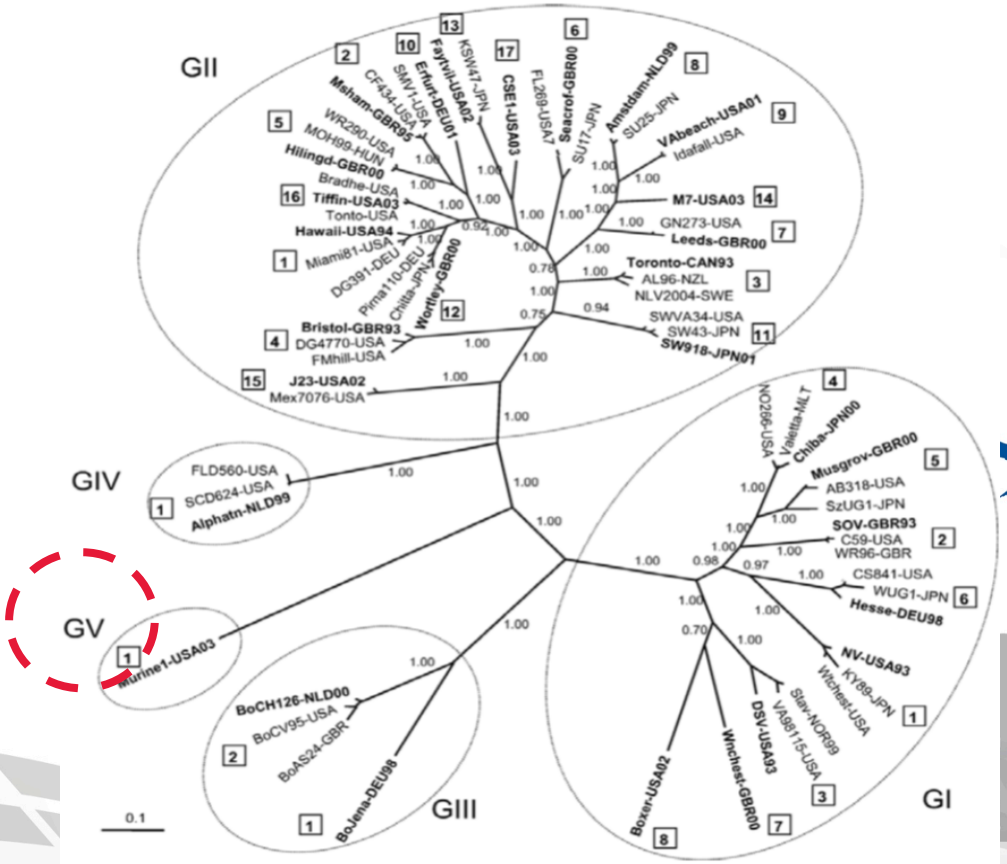
- ***Norovirus***: causa principale di gastroenterite epidemica ad eziologia virale
- La normativa vigente non prevede la ricerca di virus enterici nei molluschi bivalvi

IL PROCESSO DI DEPURAZIONE APPLICATO PUO' ESSERE CONSIDERATO UN EFFICACE STRUMENTO DI RIMOZIONE NEI CONFRONTI DEI NOROVIRUS **???**

Norovirus

- Famiglia *Caliciviridae*
- Precedentemente noto come *Norwalk-like Virus* (ICTV, 2002)
- Privi di *envelope* e dimensioni da 27 a 35 nm
- Genoma costituito da un singolo filamento di RNA a polarità positiva

- GI, GII e GIV: uomo
- GIII: bovini
- GV: murini



Prova di contaminazione artificiale delle vongole

- Contaminazione artificiale di 100 esemplari di *Venus gallina* messe in una vasca contenente 8 litri di acqua di mare artificiale.
- L'acqua è stata contaminata con *Norovirus murino* (NVM-1)in modo da ottenere un titolo finale di 10^4 $TCID_{50}$/ml
- Le vongole sono state esposte all'acqua contaminata per 72h ottenendo un titolo di **$10^{4,80}$ $TCID_{50}$/ml**

Protocollo sperimentale del processo di depurazione

N° **4** prove di depurazione

Campione **A** : vongole non contaminate, non sottoposte al processo depurativo e prelevate al t0 **(controllo negativo)**
Campione **B** : vongole contaminate per 72 h, non sottoposte al processo depurativo e prelevate al t0 **(controllo positivo)**
Campioni **C-D-E-F-G-H** : vongole contaminate per 72 h, sottoposte al processo depurativo e prelevate a diversi intervalli di tempo (h) **_t9-t24-t33-t48-t57-t72**

PROTOCOLLO DI DEPURAZIONE			
CAMPIONI	GIORNO	ORARIO PRELIEVO	DURATA DEPURAZIONE (h)
100 vongole (A)	1°	9:00	t0
100 vongole (B)	1°	9:00	t0
100 vongole (C)	1°	18:00	t9
100 vongole (D)	2°	9:00	t24
100 vongole (E)	2°	18:00	t33
100 vongole (F)	3°	9:00	t48
100 vongole (G)	3°	18:00	t57
100 vongole (H)	**4°**	**9:00**	**t72**

Metodi

- Metodo RT-PCR real time per la ricerca e quantificazione di NMV-1 (*Baert et al,* 2008) **-** campione **positivo** se **Ct<40**

- Isolamento di NMV-1 su tessuto coltura, monostrati di cellule RAW 264.7, per la valutazione della vitalità di NMV-1 **–** campione **positivo** se **presenza effetto citopatico (ECP)**

Risultati

Effetti del processo depurativo- Prova n° 1

Dopo 72h di depurazione → PCR +

→ PRESENZA ECP

DEPURAZIONE n° 1			
CAMPIONE	TEMPO DEPURAZIONE(h)	RT-PCR (Titolo) $TCID_{50}$/ml	Isolamento su tessuto coltura (ECP)
Controllo negativo (A)	0	Negativo	Assenza
Controllo positivo (B)	0	$10^{4,60}$	Presenza
vongole	9	$10^{5,00}$	Presenza
vongole	24	$10^{4,60}$	Presenza
vongole	33	$10^{4,60}$	Presenza
vongole	48	$10^{4,60}$	Presenza
vongole	57	$10^{4,60}$	Presenza
vongole	**72**	**$10^{4,60}$**	**Presenza**

2° prova di depurazione: moria di vongole in vasca……

- Presenza di numerose secrezioni in sospensione nell'acqua
- Evidente sofferenza dei molluschi
- Stato di decomposizione in corso

Risultati

Effetti del processo depurativo- Prova n° 2

DEPURAZIONE n° 2			
CAMPIONE	TEMPO DEPURAZIONE(h)	RT-PCR (Titolo) $TCID_{50}$/ml	Isolamento su tessuto coltura (ECP)
Controllo negativo (A)	0	Inibito	Non esaminato
Controllo positivo (B)	0	Inibito	Non esaminato
vongole	9	Inibito	Non esaminato
vongole	24	Inibito	Non esaminato
vongole	33	Inibito	Non esaminato
vongole	48	Inibito	Non esaminato
vongole	57	Inibito	Non esaminato
vongole	**72**	**Inibito**	**Non esaminato**

Risultati

Effetti del processo depurativo- Prova n° 3

Dopo 72h di depurazione → **PCR +**
→ **PRESENZA ECP**

DEPURAZIONE n° 3			
CAMPIONE	TEMPO DEPURAZIONE(h)	RT-PCR (Titolo) $TCID_{50}$/ml	Isolamento su tessuto coltura (ECP)
Controllo negativo (A)	0	Negativo	Assenza
Controllo positivo (B)	0	$10^{4,17}$	Presenza
vongole	9	$10^{3,17}$	Presenza
vongole	24	$10^{4,17}$	Presenza
vongole	33	$10^{4,17}$	Presenza
vongole	48	$10^{4,17}$	Presenza
vongole	57	$10^{4,17}$	Presenza
vongole	**72**	**$10^{4,17}$**	**Presenza**

Risultati

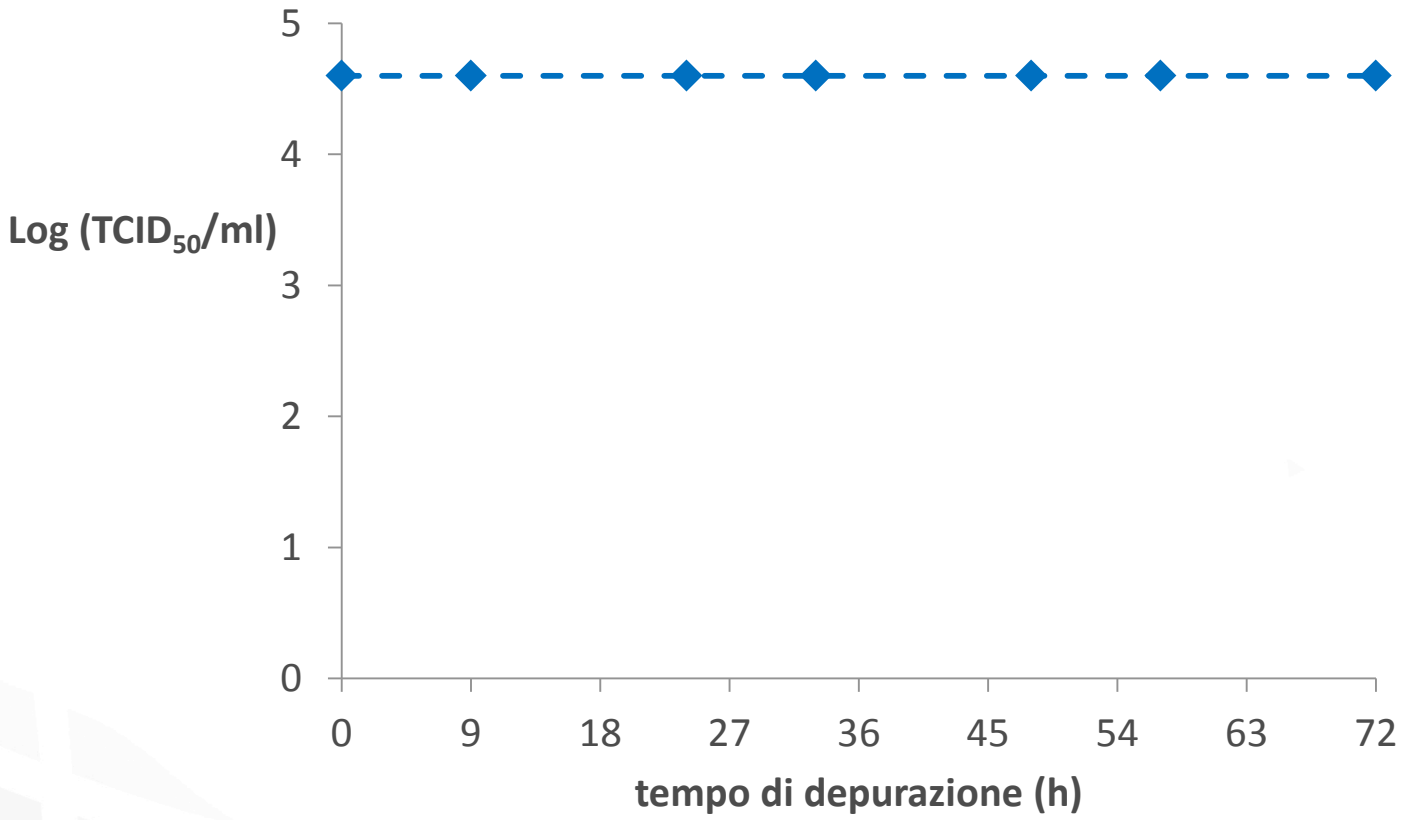
Effetti del processo depurativo- Prova n° 4

Dopo 72h di depurazione → PCR +

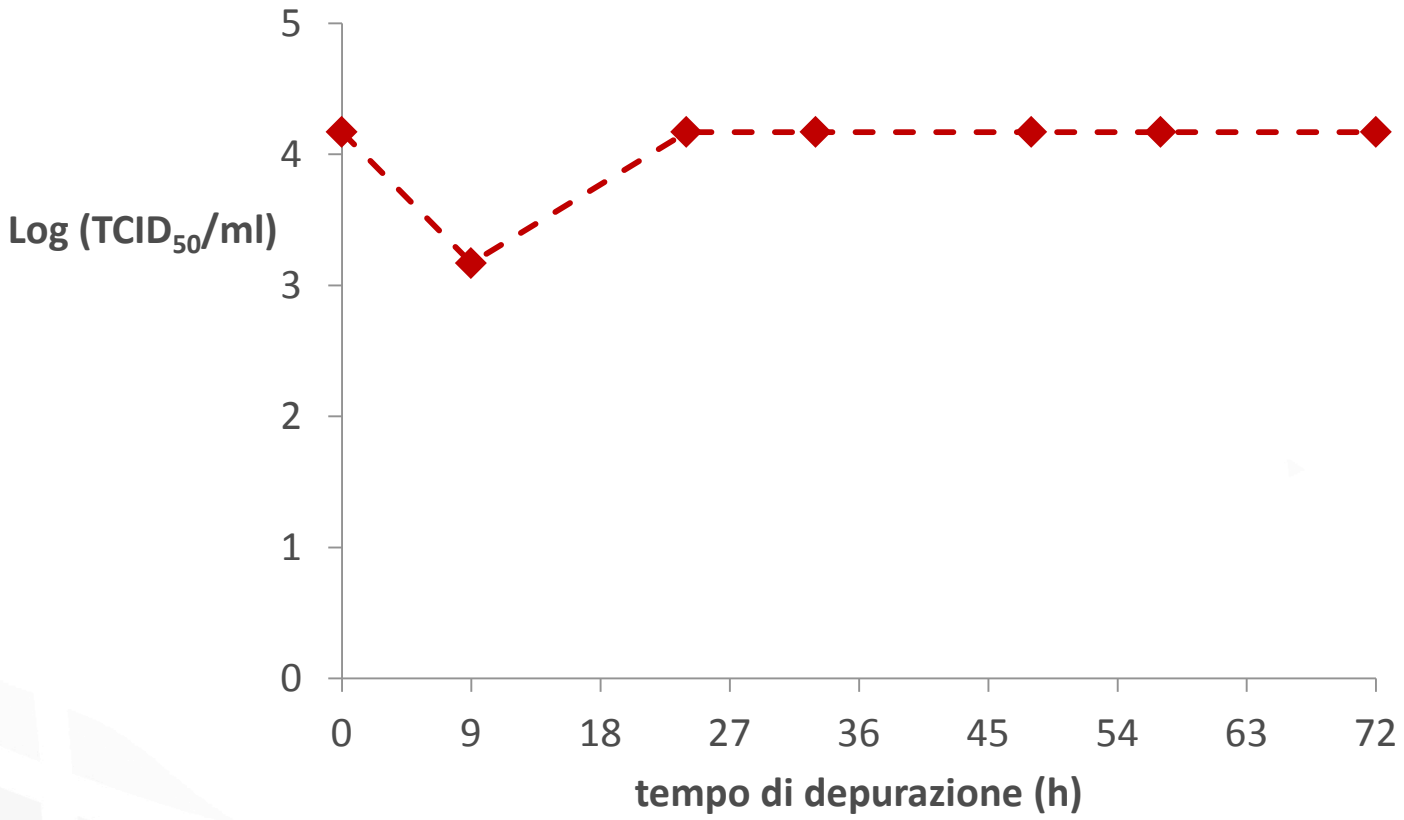
→ PRESENZA ECP

DEPURAZIONE n° 4			
CAMPIONE	TEMPO DEPURAZIONE(h)	RT-PCR (Titolo) $TCID_{50}$/ml	Isolamento su tessuto coltura (ECP)
Controllo negativo (A)	0	Negativo	Assenza
Controllo positivo (B)	0	$10^{4,17}$	Presenza
vongole	9	$10^{3,17}$	
vongole	24	$10^{3,17}$	Presenza
vongole	33	$10^{4,17}$	Presenza
vongole	48	$10^{4,17}$	Presenza
vongole	57	$10^{3,17}$	Presenza
vongole	**72**	**$10^{3,17}$**	**Presenza**

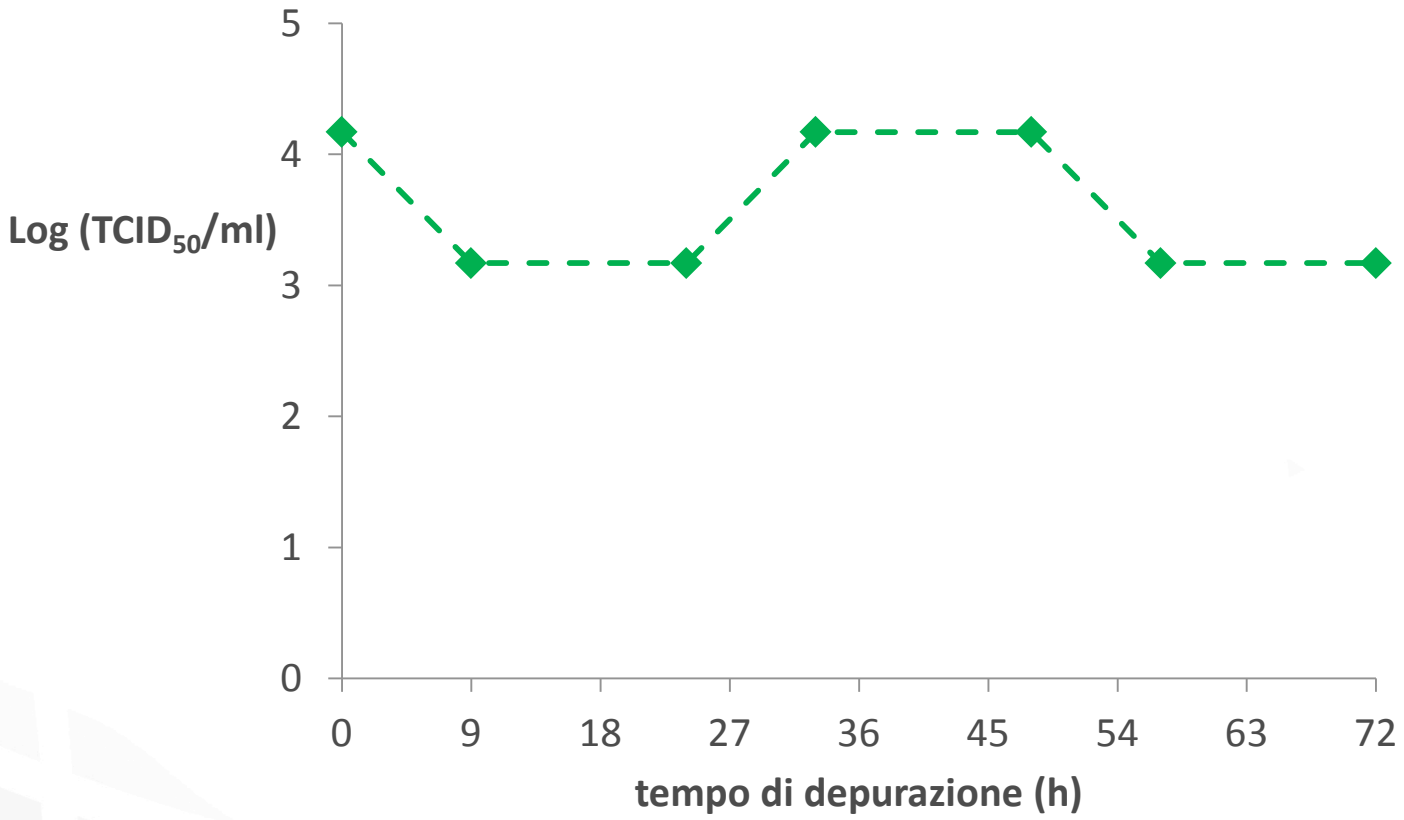
Andamento dei titoli virali nelle prove di depurazione (1ª prova)



Andamento dei titoli virali nelle prove di depurazione (3ª prova)



Andamento dei titoli virali nelle prove di depurazione (4ª prova)



Conclusioni

- I risultati mostrano un'assenza della graduale diminuzione del titolo virale all'aumentare del tempo di depurazione e nel contempo il mantenimento della vitalità dell' agente virale.
- Il sistema depurativo impiegato alle condizioni sperimentali adottate ha esercitato una efficacia inadeguata relativamente alla rimozione virale .
- La vongola *Venus gallina* ha dimostrato una scarsa se non nulla capacità depurativa nei confronti del patogeno virale NMV-1

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

GRAZIE!!!!!!!!!!!

!!!!!!