

Presenza di Norovirus in molluschi bivalvi e verifica dell'efficacia dei sistemi di depurazione

Giovanni Savini⁽¹⁾, Claudia Casaccia⁽¹⁾, Nadia B. Barile⁽²⁾, Massimiliano Paoletti⁽¹⁾ & Chiara Pinoni⁽¹⁾

Riassunto

I Norovirus rappresentano una delle maggiori cause di gastroenterite acuta virale nell'uomo spesso associate a tossinfezioni alimentari attraverso il consumo di molluschi crudi. Lo scopo del lavoro è stato di valutare l'efficacia dei sistemi di depurazione attualmente in uso per la purificazione dei molluschi bivalvi nei confronti dei Norovirus. Un totale di 96 campioni di molluschi bivalvi sono stati esaminati attraverso RT-PCR: 58 campioni di cozze (*Mytilus galloprovincialis*) di cui 11 depurati, 35 campioni di vongole veraci (*Tapes decussatus*), di cui 15 depurati e 3 campioni di ostriche (*Crassostrea gigas*) tutti depurati. I risultati ottenuti hanno evidenziato presenza di RNA virale in uno dei 67 campioni non depurati (1.5% intervallo di confidenza 95%, 0.36-7.92%) e in uno dei 29 campioni sottoposti a depurazione (3.4% intervallo di confidenza 95%, 0.82-17.22%). L'elaborazione statistica dei dati ha dimostrato che non esiste differenza statisticamente significativa tra campioni sottoposti a depurazione e quelli non depurati e quindi che i sistemi attualmente proposti non sono in grado di purificare i molluschi bivalvi dalla presenza di norovirus..

Parole chiave

Depurazione, Italia, Molluschi bivalvi, Norovirus, Salute pubblica, Virus.

Introduzione

I Norovirus, conosciuti in passato come Norwalk-like virus (NLVs) sono un gruppo di virus privi di envelope ad RNA positivo a singolo filamento di circa 7,6 Kb comprendente tre *open reading frames* (ORF). Appartengono alla famiglia dei *Caliciviridae*, genere *Norovirus*, e vengono attualmente divisi in cinque genogruppi (GI, GII, GIII, GIV e GV), di cui GI, GII e GIV in grado di infettare l'uomo e 31 clusters genetici (4). In sanità pubblica stanno acquisendo sempre maggior rilevanza come causa di episodi di gastroenterite acute di origine non batterica nei bambini in età scolare e nei soggetti adulti. La via più frequente di diffusione è quella da persona a persona, ma anche alimenti ed acqua contaminati possono avere ruoli importanti (8). In particolare, l'infezione è frequentemente associata al consumo di molluschi bivalvi che a causa della loro capacità di filtrazione (un mitilo può filtrare a 14°C fino a 1,5 litri di acqua/h), accumulano e concentrano patogeni di differente natura nei loro tessuti, in particolare nella ghiandola digestiva (1; 14); il virus è per di più in grado di resistere ai normali trattamenti di depurazione a cui vengono sottoposti i molluschi e, in condizioni ottimali, di persistere per lungo tempo nell'ambiente (7).

(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italia
g.savini@izs.it

(2) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Centro Sperimentale Regionale per la Pesca ed Acquacoltura, Viale Marinai d'Italia 20, 86039 Termoli, Italia

Il seguente progetto ha lo scopo di rilevare la presenza del *Norovirus* in molluschi bivalvi destinati al consumo umano, valutando l'effetto degli attuali sistemi di depurazione.

Materiali e metodi

Campionatura

Lo studio è stato incentrato principalmente su un importante impianto di depurazione di Termoli a cui affluiscono gran parte dei molluschi distribuiti nelle regioni Abruzzo e Molise. Il campionamento dei molluschi è stato effettuato in base alla mole di prodotto lavorato, sia su campioni depurati che non depurati, in modo da poter valutare lo stato sanitario del prodotto destinato al consumo e monitorare contemporaneamente l'effetto dei trattamenti di depurazione sul *Norovirus*.

Ogni campione, costituito da 5 kg di mitili, era accompagnato da una scheda contenente informazioni circa la data e il luogo del prelievo oltre alla tipologia del campione stesso. Nell'ambito del progetto, inoltre, al fine di conoscere lo stato sanitario di tutto il prodotto reperibile nell'area di studio, sono stati analizzati altri lotti di provenienza diversa da quella sopraindicata (Centro di depurazione di Giulianova, pescato della costa teramana e mare Adriatico off-shore).

Durante il periodo considerato sono stati sottoposti ad analisi 96 campioni di molluschi e in particolare:

- 58 campioni di cozze (*Mytilus galloprovincialis*) di cui 47 non depurati e 11 depurati;
- 35 campioni di vongole veraci (*Tapes decussatus*) di cui 20 non depurati e 15 depurati;
- 3 campioni di ostriche (*Crassostrea gigas*) depurati.

Gran parte del pescato è stato depurato in un centro di depurazione a circuito chiuso, con sistema innovativo a bins, e due vasche della dimensione di 1,44 mq con un'altezza di riempimento di 1 metro per un carico d'acqua pari a 100q. L'impianto era composto da 9 bins in grado di contenere 250-300 kg di molluschi ciascuno. Una piccola parte del pescato è stato

invece depurato in impianti a circuito aperto con vasche di circa 29,5 mq cadauna per un totale complessivo di mq. 177 con una altezza di riempimento di 55-60 cm. permettendo un carico specifico Kg di molluschi/mq di superficie di Kg 7.695 per cicli di 24 ore; Entrambi gli impianti hanno usato i raggi UV come metodo di disinfezione delle acque.

Test virologici

Per ogni campione sono state preparate 3 aliquote di 1,5 g, ciascuna costituita da stomaci e diverticoli digestivi prelevati da mitili scelti a caso. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad indagini per la ricerca specifica del *Norovirus* tramite RT-PCR, impiegando il procedimento di estrazione con proteinasi K e esadecil-trimetil-ammonio-bromidio (CTAB) ed utilizzando un kit commerciale (Kit Access RT-PCR System, Promega), con Primers JV12 e JV13.

Per verificare eventuali fenomeni di inibizione della RT-PCR è stato utilizzato un controllo interno di reazione (Armored RNA[®] Norwalk Virus Asuragen[®] Inc., Austin, Texas). Questo veniva addizionato al campione da testare e quindi amplificato da un apposito set di primers (NLV GI SR33: 5'-TGT CAC GAT CTC ATC ATC ACC-3', SR48:5'-GTG AAC AGC ATA AAT CAC TGG-3') mediante una reazione di RT-PCR avente il seguente profilo termico: 48°C per 60', 94°C per 5', 40 cicli costituiti da 1' a 94°C, 1' e 30" a 50°C, 1' a 74°C; 74°C per 7'. Il prodotto dell'amplificazione aveva una dimensione evidenziabile mediante colorazione fluorescente in bromuro di etidio di 123 bp.

Analisi Statistica

I risultati ottenuti con le indagini virologiche sono stati analizzati usando la distribuzione beta ($s+1, n-s+1$) dove s , il numero di successi, è il numero totale dei positivi e n , il numero delle prove, è il numero totale dei campioni esaminati. Il picco della curva di distribuzione rappresenta il valore più probabile della percentuale dei campioni positivi, mentre la larghezza della curva dà informazioni circa l'incertezza della stima dovuta alla dimensione del campione.

Risultati

Simili percentuali di positività sono state riscontrate in campioni di cozze (1,7%, intervallo di confidenza 95%, 0,41-9,09%) e vongole veraci (2,9%, intervallo di confidenza 95%, 0,68-14,53%) (Fig. 1). I tre campioni di ostriche sono risultati negativi. Non sono state riscontrate differenze significative tra campioni sottoposti a depurazione e quelli non depurati (Fig. 2). La presenza di RNA virale di Norovirus è stata rilevata in uno dei 67 campioni non depurati (1,5%, intervallo di confidenza 95%, 0,36-7,92%) ed in uno dei 29 campioni esaminati dopo depurazione (3,4%, intervallo di confidenza 95%, 0,82-17,22%). Sono risultati positivi alla RT-PCR per Norovirus un campione di vongole veraci non depurato (5%, intervallo di confidenza 95%, 2,1-38,5%) ed un campione di cozze depurato (9,1%, intervallo di confidenza 95%, 2,1-38,5%). In Figura 3 sono riportate le distribuzioni delle probabilità di rilevare un campione positivo a NVL nelle cozze e vongole depurate e non.

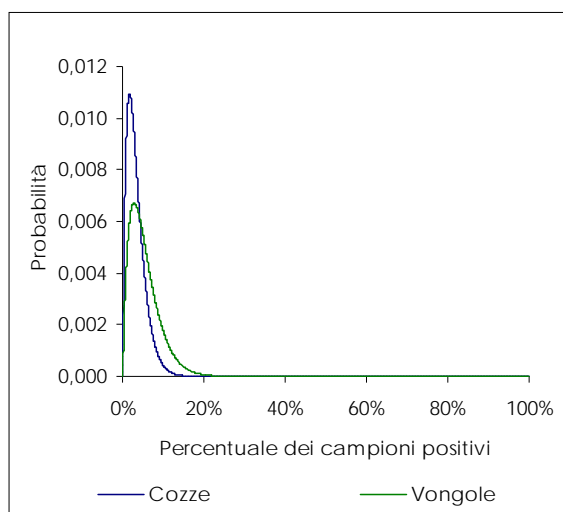


Figura 1
Distribuzioni di probabilità della percentuale di campioni di cozze e vongole positivi alla RT-PCR per Norovirus

Discussioni e conclusioni

L'identificazione di RNA virale nelle vongole e nelle cozze allevate o pescate sulla costa adriatica abruzzese evidenzia la presenza di Norovirus. Questo dimostra che attualmente

NLV rappresenta un potenziale rischio di gastroenterite virale umana nella regione Abruzzo. Ne è a testimonianza il focolaio di gastroenterite che ha interessato un elevato numero di turisti nel litorale abruzzese tra luglio e settembre 2003 in cui i risultati ottenuti su campioni fecali esaminati mediante ELISA e RT-PCR evidenziano presenza di Norovirus

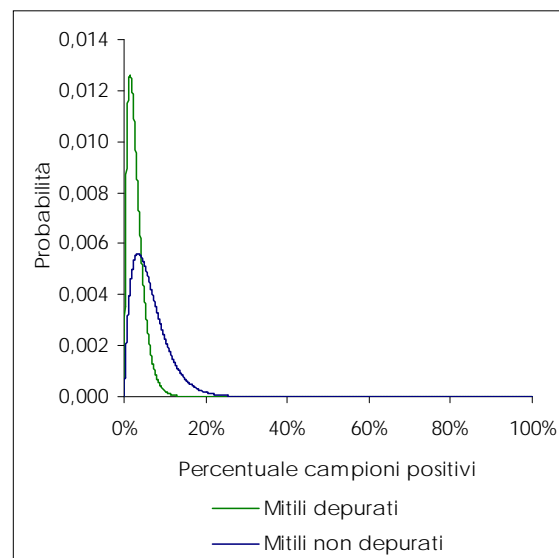


Figura 2
Distribuzioni di probabilità della percentuale di campioni di mitili positivi alla RT-PCR per Norovirus prima e dopo depurazione

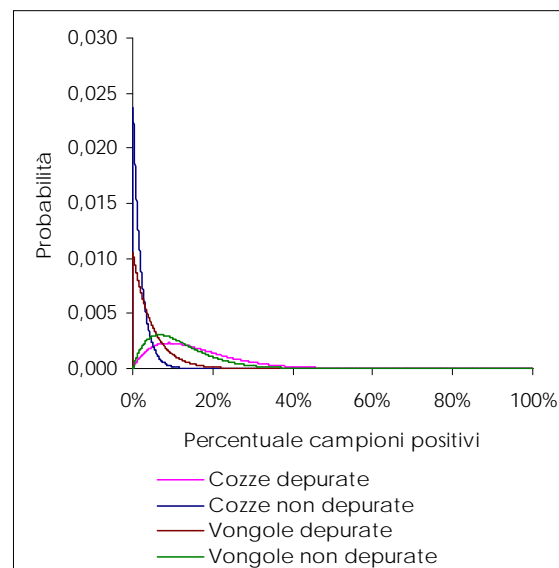


Figura 3
Distribuzioni di probabilità della percentuale di campioni di cozze e vongole positive alla RT-PCR per Norovirus prima e dopo depurazione

genogruppo I e II (17). Altri focolai sono stati segnalati nel sud Italia (2, 13, 15).

La fonte più comune di tossinfezione umana da Norovirus è attraverso l'ingestione di alimenti venuti a contatto con acque contaminate da materiale fecale umano proveniente da sedimenti fognari. Esso può raggiungere le acque di superficie, marine e dei sedimenti (6), permettendo la diffusione negli alimenti a contatto con essa, come nel caso dei molluschi bivalvi (5). Il lavoro ha voluto inoltre dimostrare che gli attuali sistemi di depurazione come quelli dell'impianto di Termoli non hanno nessun effetto sulla purificazione da Norovirus in mitili contaminati. Infatti le indagini di laboratorio non evidenziano alcuna differenza significativa tra presenza di NLV in mitili depurati e non sottoposti a depurazione. Questi dati rispecchiano i risultati riportati da altri autori (18, 19). Ueki ed altri mettono in evidenza che la concentrazione media di Norovirus in ostriche contaminate non diminuiva significativamente a distanza di 3 e 10 giorni dall'inizio del processo di depurazione rispetto a quella di ostriche allevate in acque non depurate (19). Tale situazione è comune anche per altre tipologie di virus quale il virus dell'epatite A (9) mentre in altri, ad esempio gli enterovirus, la depurazione delle acque diminuiva sensibilmente la carica virale in molluschi contaminati (12). La persistenza di Norovirus in ostriche dopo depurazione potrebbe essere attribuita, come descritto da Le Guyader *et al.*, a specifici legami del virione con carboidrati di superficie espressi sul tessuto delle ostriche (10). Esiste quindi, la concreta possibilità che i molluschi infetti con NLV arrivino al consumatore.

Le tossinfezioni alimentari a seguito di ingestione di alimenti contaminati da

Norovirus sono in sensibile aumento e le industrie marine che allevano mitili sono sempre più danneggiate dalla presenza di tali virus (19). La contaminazione avviene attraverso il normale processo di filtrazione del mollusco in cui il virus può permanere per diverse settimane (10). L'accumulo del virus in ostriche può dipendere anche da altri fattori ambientali, quali la temperatura dell'acqua, la produzione di muco da parte delle ostriche, il contenuto di glicogeno del tessuto connettivo (3).

Considerata l'elevata diffusione di questi virus e l'importanza che questa infezione assume in sanità pubblica per l'elevata infettività, le abitudini alimentari quali il consumo di molluschi crudi o poco cotti, il rischio che un soggetto infetto rappresenta per le altre persone (amplificatore virale) e le perdite economiche prodotte dalle epidemie di Norovirus, pur se con basso rischio sanitario, diviene opportuno prevedere delle misure di controllo del fenomeno.

Sebbene la rimozione o l'inattivazione di Norovirus nei molluschi bivalvi attualmente non sia possibile attraverso il sistema di depurazione delle acque all'aperto mediante raggi UV, diventa fondamentale l'impiego di ulteriori misure preventive quali il monitoraggio delle aree di produzione al fine di valutare l'effettiva prevalenza del virus, l'individuazione di aree a rischio e l'attuazione di sistemi di depurazione più efficaci, nonché il preventivo trattamento dei liquami grezzi. Inoltre è preferibile allevare i molluschi in aree costiere non influenzate da acque di scarico domestiche che rappresentano le maggiori sorgenti di contaminazione (11, 16).

Bibliografia

1. Atmar R.L., Neill F.H., Romalde J.L., Le Guyader F, Woodley C.M., Metcalf T.G. & Estes M.K. 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl Environ Microbiol*, **61** (8), 3014-3018.
2. Boccia D., Tozzi A.E., Cotter B., Rizzo C., Russo T., Buttinelli T., Caprioli A., Marziano M.L. & Ruggeri F.M. 2002. Waterborne outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. *Emerg Infect Dis*, **8**, 563-568.

3. Burkhardt W. & Calci K.R. 2000. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1375-1378.
4. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) 2009. Noroviruses. CDC, Atlanta (www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro/norovirus.htm ultimo accesso il 30 novembre 2009).
5. Cheesbrough J.S., Barkess-Jones L. & Brown D.W. 1997. Possible prolonged environmental survival of small round structured viruses. *J Hosp Infect*, **35**, 325-326.
6. Doyle A., Barataud D., Gallay A., Thiolet J.M., Le Guyager S., Kohli E. & Vaillant V. 2004. Norovirus foodborne outbreaks associated with the consumption of oysters from the Étang de Thau France, December 2002. *Eurosurveillance*, **9** (3), 24-26.
7. Dubois E., Agier C., Traoré O., Hennechart C., Merle G., Crucière C. & Laveran H. 2002. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *J Food Prot*, **65** (12), 1962-1969.
8. Kaplan J.E., Goodman R.A., Schonberger L.B., Lippy E.C. & Gary G.W. 1982. Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. *J Infect Dis*, **146** (2), 190-197.
9. Kingsley D.H. & Richards G.P. 2003. Persistence of hepatitis A virus in oysters. *J Food Prot*, **66** (2), 331-334.
10. Le Guyader F.S., Loisy F., Atmar R.L., Huston A.M., Estes M.K., Ruvoën-Clouet N., Pommepuy M. & Le Pendu J. 2006. Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis*, **12**, 931-936.
11. Lodder W.J. & de Roda Husman A.M. 2005. Presence of Norovirus and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 1453-1461.
12. Metcalf T.G., Mullin B., Eckerson D., Moulton E. & Larkin E.P. 1979. Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by the soft-shelled clam *Mya arenaria*. *Appl Environ Microbiol*, **38** (2), 275-282.
13. 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.
14. Richards G.P. 1988. Microbial depuration of shellfish: a review of depuration and relaying. *J Food Prot*, **51** (3), 218-251.
15. 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.
16. Rutjes S.A., Italiaander R., van de Berg H.H.J.L., Ladder W.J. & de Roda Husman A.M. 2005. Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 3734-3740.
17. Savini G., Migliorati G., Monaco F., Di Francesco C.E., Casaccia C., Ripani A., Pinoni C., Giovannini A., Marfoglia C., Principe V. & Ruggeri F.M. 2004. Report of an outbreak of Norovirus gastroenteritis in a tourist resort of the Abruzzo coastal area. In Abstracts 4th National Congress of the Italian Society of Virology (SIV), 20-22 September, Orvieto. Istituto Zooprofilattico Sperimentale Regioni Lazio e Toscana e Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Orvieto, 41.
18. 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.
19. Ueki Y., Shoji 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.