

## Il ruolo degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali nel controllo del rischio microbiologico e tossicologico associato ai prodotti della pesca

Maura FERRARI, Marina Nadia LOSIO, Barbara BERTASI, Chiara PINONI,  
Elena COSCIANI, Paolo BONI, Enrico PAVONI e Silva RUBINI

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna,  
Brescia e Ferrara, Italia*

**Riassunto.** - Gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali rappresentano una cospicua rete di controllo nell'intero territorio nazionale la cui attività si estrinseca in ambito sanitario ed agro-alimentare. Come conseguenza del recente sviluppo dell'acquacoltura, la salubrità dei prodotti ittici sta assumendo importanza sempre più rilevante. A tal fine, scopo della ricerca svolta è stato l'allestimento di metodi diagnostici in grado di rilevare eventuali contaminazioni virali, nonché il possibile impiego di metodi *in vitro* atti a rilevare differenti tossine. I risultati conseguiti hanno consentito di standardizzare metodi di biologia molecolare in associazione all'isolamento in colture cellulari per l'accertamento di contaminazioni/infezioni da parte del virus dell'epatite A e dei più comuni enterovirus. Sono inoltre stati selezionati specifici tipi di colture cellulari in grado di differenziare varie classi di tossine. I metodi allestiti potranno consentire il controllo sistematico e preventivo dei prodotti ittici.

*Parole chiave:* Istituti Zooprofilattici, attività diagnostica, molluschi eduli lamellibranchi, indagini virologiche, tossicologia *in vitro*.

**Summary** (*Role of the Istituti Zooprofilattici Sperimentali in controlling the microbiological and toxicologic risks related to seafood*) - The "Istituti Zooprofilattici" are an important network whose main function is the monitoring of animal health as well as food. As a result of the recent improvements in aquaculture technology interest in the safety of seafood is increasing. Therefore, the purpose of this study was to set up diagnostic methods for the detection of virus contamination, as well as the use of *in vitro* techniques able to identify the different toxins. The results have allowed the development of molecular biology assays which, together with the isolation in cell cultures, can detect contaminations/infections by the hepatitis A virus and the most common enteroviruses. Moreover, specific selected cell lines have led to the detection of different toxins. These laboratory methods will be used in order to control seafood safety.

*Key words:* Istituti Zooprofilattici, diagnosis activities, shellfish quality, virologic analyses, *in vitro* toxicology.

### Introduzione

Gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), enti sanitari di diritto pubblico, costituiscono, sulla base del DL.vo no. 270/93, aziende con competenza regionale o inter-regionale, organizzate in una sede centrale, alla quale fanno capo le strutture amministrative e i laboratori specializzati, e in sezioni periferiche che di norma sono ubicate sul territorio di ciascuna provincia italiana.

Gli IZS operano sulla base della programmazione regionale e nazionale, effettuando ricerche e fornendo prestazioni di laboratorio e produzioni in termini di reagenti e presidi immunizzanti utili e necessari alle azioni di sanità pubblica veterinaria. Il controllo e la

profilassi delle malattie parassitarie, infettive e diffuse del patrimonio zootecnico, il perfezionamento delle condizioni di allevamento e il perseguimento del benessere animale, il controllo e il miglioramento delle produzioni zootecniche, l'accertamento delle caratteristiche di sanità, salubrità e qualità degli alimenti, il supporto tecnico scientifico agli operatori del Servizio Sanitario Nazionale (SSN), la consulenza ad allevatori ed operatori del comparto agro-alimentare costituiscono solo una parte dei compiti che gli IZS sono chiamati a svolgere.

L'organizzazione è regionalmente differenziata per far fronte alle diverse caratteristiche e vocazioni zootecniche, alimentari e socio-economiche presenti sul territorio; gli IZS tuttavia operano a livello nazionale

fornendo prestazioni comuni e uniformi su tutto il Paese sulla base del coordinamento operato dal Ministero della Salute e dell'Istituto Superiore di Sanità. Nel loro insieme le strutture centrali degli IZS e le 88 sezioni sparse sul territorio costituiscono di fatto la più formidabile rete di controllo oggi esistente a livello comunitario.

Rappresentano ulteriori elementi di forza e di valorizzazione della rete degli IZS l'esistenza al loro interno di oltre 20 centri di referenza nazionali o internazionali (FAO e OIE), che fungono da strutture di riferimento per l'intera rete e di raccordo internazionale. E' comunque da sottolineare come tutti e 10 gli Istituti operino in strutture che forniscono esami e prestazioni riconosciute internazionalmente sulla base delle norme UNI-EN CEI 17025 verificate da organismi terzi secondo norme UNI EN-45003.

In considerazione degli oltre 2000 chilometri di sviluppo delle coste marine italiane, ancor più per l'importanza dell'economia legata al mare di intere regioni, che in talune realtà provinciali contemplan una economia totalmente dipendente dalle risorse marine, non possono non rientrare tra gli interessi di tutti e 10 gli IZS i problemi di sanità pubblica collegati alla idrobiologia marina, pesca e allevamento delle specie ittiche, controllo dei prodotti della pesca e perseguimento di garanzie di sanità, salubrità e qualità dei prodotti. Tali interessi, preminenti per non poche sezioni diagnostiche provinciali, si concretizzano nelle prestazioni di laboratorio, nella consulenza a operatori del SSN ed economici, nella pianificazione di ricerche tese ad estendere la gamma dei controlli finalizzati alle garanzie di sicurezza alimentare da fornire al consumatore relativamente ai prodotti di origine nazionale e a quelli di importazione.

In tale ambito, per quanto riguarda l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, lo sviluppo delle coste di quest'ultima regione e l'importanza della pesca e dei prodotti derivati per le popolazioni e l'economia emiliano-romagnole hanno indotto a volgere particolare attenzione a tali problematiche, accentrando parte delle ricerche e delle prestazioni svolte presso la sede di Brescia, e la maggior parte dell'attività riguardante le tematiche del mare e della pesca, da parte di intere sezioni quali Ferrara e Rimini.

Su questa base, anche nell'ambito di laboratori della Sede prevalentemente rivolti ad attività di ricerca, è sorta l'esigenza di indirizzare l'interesse a tali settori, con particolare riferimento alla messa a punto di metodi di controllo in ambito virologico e studio di metodi alternativi nel settore tossicologico.

E' noto infatti come, mentre siano consolidati i metodi diagnostici nei confronti di microrganismi di natura batterica, ancora a tutt'oggi non sia contemplata la ricerca di eventuali contaminanti virali responsabili,

secondo quanto riportato in letteratura, di episodi clinici non solo sporadici, ma anche epidemici [1]. Inoltre, in considerazione della richiesta legislativa, supportata da ragioni etico-scientifiche, di sostituire gli animali da laboratorio nella sperimentazione tossicologica, l'interesse è stato volto alla messa a punto di metodi alternativi sia per la evidenziazione di tossine comunemente presenti nei nostri mari e caratterizzate da elevata variabilità (DSP) che di tossine riscontrabili nel nostro Paese come conseguenza dell'intensificazione degli scambi commerciali (tetrodotossine e ciguatossine). Obiettivi pertanto della ricerca svolta sono stati la messa a punto di metodi diagnostici rapidi ed attendibili da applicarsi in indagini virologiche oltre che la selezione di colture cellulari in grado di evidenziare, tramite sistemi biologici *in vitro*, tossine di differente natura.

## Materiali e metodi

### *Controllo di virus enterici nei molluschi bivalvi*

**Campioni.** - I campioni, rappresentati da molluschi bivalvi (*Mitylus Galloprovincialis*), provenienti da peschiere locali sono stati utilizzati direttamente o allevati in acquari della capacità di 50 litri e contenenti sale marino di grado scientifico (*Coralife®*) dissolto in acqua deionizzata. In ciascun acquario venivano immessi 30 molluschi mantenuti nelle migliori condizioni di filtrazione (temperatura di 13-18 °C, salinità 1,020 kg/l [2], contaminati sperimentalmente con gli agenti virali di seguito riportati.

**Virus.** - L'indagine ha riguardato virus appartenenti alla famiglia Picornaviridae e Caliciviridae. In particolare, per quanto concerne il gruppo degli enterovirus sono stati considerati poliovirus tipo 1, 2, 3, coxsackievirus B5, echovirus tipo 30. Ciascuno di essi è stato propagato in linee cellulari rappresentate rispettivamente da Intestine 407 (*embryonic human intestine*), BGM (*buffalo green monkey*), LLCMK2 (*rhesus monkey kidney*), MRC5 (*embryonic human lung*).

Il virus dell'epatite A, ceppo citopatogeno HM175, è stato coltivato sulla linea cellulare di primate FrhK-4 (*fetal rhesus monkey kidney*) [3].

Per ogni virus è stato allestito uno stock di riferimento ed il titolo infettante accertato previa diluizione seriale ed inoculazione delle diverse diluizioni, nel substrato cellulare sensibile. Il titolo è stato calcolato secondo la formula di Reed e Muench [4].

**Prove sperimentali.** - Sono state condotte con due differenti metodi:

a) aggiungendo diluizioni seriali (da  $10^{1.50}$  a  $10^{7.50}$  dosi citopatiche<sub>50</sub>-DCP<sub>50</sub>/ml) della sospensione virale a 10 g di omogenato di mollusco (contaminazione per assorbimento);

b) contaminando, con le medesime diluizioni virali menzionate, i molluschi allevati negli acquari [1]. La de-terminazione dell'avvenuta contaminazione è stata eseguita su campioni di molluschi raccolti dopo 24 ore [5].

L'esito della infezione è stato determinato mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR) previa trascrizione dell'RNA virale in cDNA oltre che mediante accertamento dell'infettività del virus dimostrata dalla replicazione in colture cellulari [6].

Allo scopo di determinare non solo la sensibilità della reazione, ma anche la specificità, 25 g di mollusco sono stati contaminati con miscele di virus dell'epatite A e poliovirus tipo 1 alla concentrazione di  $10^{3.50} \text{DCP}_{50}/\text{ml}$  per entrambi i virus. Sui campioni di omogenato e sui molluschi contaminati artificialmente sono state eseguite reazioni di RT-PCR specifiche per i due tipi di virus impiegati.

*Estrazione virale.* - È stata condotta omogenizzando 25 g di mollusco diluito in 20 ml di tampone glicina (0,05 M, pH 9,2). Dopo centrifugazione del campione a  $5500 \times g$  per 30 min il supernatante, in volume di circa 30 ml, è stato ricentrifugato alla stessa velocità e per lo stesso periodo di tempo ed il supernatante ottenuto (volume di 12 ml) è stato addizionato a polietilene glicole 8000 (PEG) in rapporto 1:4 e lasciato a contatto per 12 ore a  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Il campione è stato quindi sottoposto ad una ulteriore centrifugazione alle medesime condizioni indicate ed il sedimento risospeso in 2 ml di PBS (phosphate buffered saline) e ricentrifugato alla stessa velocità per 30 min [7].

*Estrazione dell'RNA.* - L'RNA totale è estratto dalla matrice ottenuta utilizzando un kit commerciale Nucleospin®RNAII kit (Macherey-Nagel) basato su:

a) lisi della membrana cellulare e del capsido virale con reagenti contenenti guanidina isotiocianato;

b) legame selettivo tra l'acido nucleico e la membrana di silice attivata all'interno di un'apposita colonna;

c) eluizione dell'RNA tramite acqua priva di RNase e DNase [8].

*Primers ed RT-PCR.* - Per rilevare la presenza dell'RNA del virus dell'epatite A sono stati selezionati *primers* specifici della zona VP1-VP3 del capsido virale [9], mentre per evidenziare una contaminazione da enterovirus sono stati utilizzati *primers* della regione 5' non codificante comune ad oltre 47 sierotipi di enterovirus [10]. È stata esclusa una reattività crociata con altri virus enterici utilizzando il programma BLAST (NCBI).

L'RNA virale è stato retrotrascritto e amplificato utilizzando un kit commerciale (Gene Amp RNA PCR kit; Applied Biosystem) [11]. Per il virus dell'epatite A

è stata adottata una reazione di RT-seminested-PCR, mentre per gli enterovirus una RT-nested-PCR. La reazione di retrotrascrizione è stata ottimizzata in una miscela di 20  $\mu\text{l}$  contenente 3  $\mu\text{l}$  di acido nucleico estratto e 17  $\mu\text{l}$  di miscela di reazione (10mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM di ogni deossinucleotide trifosfato, 2,5 mM esameri random, 20U inibitore dell'RNasi e 50U di trascrittasi inversa (MuLV Moloney murine leukemia virus).

Per la ricerca di virus enterici è stata messa a punto una prima amplificazione utilizzando 10  $\mu\text{l}$  di cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione e 40  $\mu\text{l}$  della miscela di reazione (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM deossinucleotidi trifosfato, 0,5  $\mu\text{M}$  AV1 o ent 1, 0,5  $\mu\text{M}$  di AV2 o ent 2, 1,25U Taq DNA polimerasi e acqua DNase/RNase free). Per la ricerca del virus dell'epatite A la miscela è stata incubata a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  per 5', sono stati impostati 40 cicli (35'' a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1' a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1'15'' a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ ), l'estensione finale è avvenuta per 7' a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Per la ricerca di enterovirus è stato impostato un primo ciclo a  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  per 2',  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  per 1',  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  per 1'45'' seguito da 29 cicli a  $92 \text{ }^\circ\text{C}$  per 1',  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  per 1',  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  per 1'45'' per terminare con un ultimo ciclo  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  per 1',  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  per 1'  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  e l'estensione a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  per 5'. Dieci  $\mu\text{l}$  del prodotto ottenuto dall'amplificazione sono stati addizionati a 40  $\mu\text{l}$  della miscela alle medesime concentrazioni dei reagenti utilizzati nella prima reazione e *primers* interni ai due precedentemente selezionati, AV2-AV3 e ne-ent1- ne-ent2 (Tab. 1).

La seconda amplificazione per il virus dell'epatite A (*seminested*) è stata impostata con una denaturazione di 5' a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , seguita da 30 cicli ( $94 \text{ }^\circ\text{C}$  per 30'',  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  per 30'',  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  per 30''). L'estensione finale è stata di 7' a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ . I cicli impostati per la seconda amplificazione per gli enterovirus (*nested*) sono stati uguali a quelli utilizzati nella prima amplificazione [7]. I *primers* utilizzati sono riportati nella Tab. 1.

*Inoculazione nelle colture cellulari.* - I campioni in cui è stata evidenziata la presenza di RNA del virus dell'epatite A tramite la reazione di biologia molecolare sono stati inoculati nella linea cellulare FrhK-4. A tal fine, l'omogenato di mollusco, diluito 1:10 in PBS (*phosphate saline buffer*) e addizionato della soluzione di antibiotici all'1% (penicillina 1000 UI/ml, streptomina 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e amphotericina B 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) è stato inoculato nella linea cellulare menzionata allestita in piastre a 24 pozzetti in ragione di 100  $\mu\text{l}$  per pozzetto. Dopo assorbimento a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , protratto per 30' per gli enterovirus, sino a 60'-120' per la ricerca del virus dell'epatite A, la coltura cellulare è stata addizionata del terreno colturale in presenza di una percentuale ridotta di siero fetale bovino (3% v/v). L'incubazione è stata quindi protratta per un periodo di circa 7 giorni (enterovirus) e 3 settimane (epatite A) a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  valutando

**Tabella 1.** - *Primers* selezionati per la ricerca del virus dell'epatite A e di enterovirus nei molluschi bivalvi

Virus	Oligonucleotidi	Sequenza (5'-3')	Posizione	Lunghezza amplificato
HAV	AV1	GGAAATGTCTCAGGTACTTTCTTTG	2390-2414	247
	AV2	GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG	2167-2192	
	AV3	CGGTACCTTTGTACGCCTGT	2358-2377	
CV B4*	Ent1	CGGTACCTTTGTACGCCTGT	64-83	540
POLIO1	Ent2	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	578-597	
POLIO1	Ne-ent1	TCCGGCCCCCTGAATGCGGCTA	430-450	
CV B4*	Ne-ent2	GAAACACGGACACCCAAAGTA	547567	

\* sequenza riferita al coxsackievirus B4.

quotidianamente la eventuale comparsa di effetto citopatico (ECP) [3]. La coltura è stata quindi congelata e scongelata per due volte. Il criolisato è stato raccolto e centrifugato (2000 x g per 15') ed il supernatante analizzato in RT-PCR per confermare la presenza del virus [6]. L'identificazione degli enterovirus eventualmente isolati è stata invece effettuata mediante reazione di siero-neutralizzazione condotta con sieri immuni specifici allestiti nel nostro laboratorio.

*Analisi di campioni provenienti dal campo.* - Complessivamente nel periodo 2000-2002 sono stati analizzati 800 campioni di molluschi provenienti principalmente da aree del mare Adriatico. L'indagine relativa all'accertamento della contaminazione da enterovirus ha avuto inizio dall'anno 2001 e 435 sono stati i campioni esaminati.

#### Messa a punto di metodi diagnostici basati sull'impiego di colture cellulari per la evidenziazione di tossine algali nei molluschi bivalvi

##### *Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)*

*Campioni.* - L'analisi è stata condotta su campioni di molluschi pervenuti nel periodo 1999-2000 e analizzati secondo la metodologia classica che prevede l'impiego di animali da laboratorio (topi) e l'accertamento della mortalità dell'animale entro 4-24 ore dall'inoculo. L'attenzione è stata principalmente volta alle tossine del gruppo DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*) in quanto maggiormente diffuse nei mari italiani. Tale indagine viene eseguita routinariamente presso la Sezione diagnostica di Ferrara del nostro Istituto Zooprofilattico.

*Prova biologica.* - La prova biologica ufficiale è stata eseguita inoculando per via intraperitoneale (i.p.) 3 topi con 1 ml di omogenato di mollusco ottenuto secondo la metodica di Yasumoto (DM 31/07/1995;

*GU serie generale* n. 279 del 29/11/1995). La verifica della morte del topo è stata effettuata, inizialmente, entro i limiti delle 5 ore di tempo previste dal decreto legislativo (analisi eseguite presso la Sezione di Ferrara); tale periodo di osservazione è stato successivamente prolungato sino a 24 ore. La morte di almeno due topi entro i limiti di tempo previsti inizialmente (5 ore) è indice della presenza di tossine nel campione in esame.

*Linee cellulari.* - In relazione ai differenti meccanismi di azione e dei diversi organi bersaglio delle sostanze in esame e consistenti nella inibizione delle fosfatasi (acido ocaidaico) e nel tropismo per la sede cardiaca (yessotossina), sono stati selezionati diversi tipi di linee cellulari, allo scopo di verificarne la differente sensibilità nei confronti dei due gruppi di sostanze ad attività tossica [19, 20]. In particolare, per l'indagine relativa alla ricerca delle tossine del gruppo DSP sono state utilizzate la linea cellulare KB (*human epidermoid carcinoma*), nota in letteratura poiché altamente sensibile all'azione dell'acido ocaidaico e la linea di cellule H9C2 (*rat heart mioblast*) di origine cardiaca.

*Preparazione dei campioni.* - L'estratto ottenuto omogenando 25 g di ciascun campione di mollusco (5 g) è stato addizionato a 250 µl di dimetilsolfossido (DMSO), in grado di solubilizzare le tossine (liposolubili). Il campione è stato quindi diluito 1:100 in terreno di coltura MEM (*minimum essential medium*).

*Inoculazione nelle colture cellulari.* - Entrambe le linee cellulari selezionate sono state inoculate in piastre a 96 pozzetti incubate a 37 °C in presenza del 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 48 ore di incubazione le colture cellulari, previo allontanamento del terreno colturale, sono state inoculate con i campioni in esame in ragione di 100 ml per ciascun pozzetto. Le stesse sono quindi state reincubate a 37 °C per 3 ore. La verifica della vitalità cellulare è stata eseguita mediante il test MTT [21].

*Analisi dei risultati.* - L'analisi statistica, al fine di una futura ed auspicabile validazione, è stata eseguita su 96 campioni ed i risultati conseguiti sono stati analizzati mediante il test di correlazione lineare di Pearson per verificare l'effettiva corrispondenza degli esiti conseguiti nelle prove *in vivo/in vitro*.

*Tetrodotossina (TTX)*

L'espansione dei mercati internazionali ha favorito l'introduzione ed il commercio di specie ittiche esotiche potenzialmente pericolose; in particolare i pesci palla (Diodontidi e Tetrodontidi) possono fungere da serbatoio della tetrodotossina, prodotta da microrganismi acquatici, in grado di bloccare i canali del sodio a livello della membrana cellulare. Obiettivo del lavoro svolto è stato quello di valutare la sensibilità di alcune linee cellulari nei confronti della TTX.

*Linee cellulari.* - Sono state utilizzate due linee cellulari originate da neuroblastoma, Neuro 2A ed Na C 1300, rispettivamente di origine umana e murina. La loro scelta è stata motivata dal fatto che le cellule neuronali e muscolari presentano, secondo dati di letteratura [21-23], una maggiore espressione dei canali del sodio.

*Prodotti in esame.* - Per lo studio è stata impiegata la TTX come sostanza pura (Sigma Aldrich s.r.l.) e, quali antagonisti dell'azione della TTX, si è fatto ricorso alla veratridina ed oubaina (Sigma Aldrich s.r.l), rispettivamente allo 0,02 mM e 0,5 mM per le quali l'azione antagonista è attribuibile all'aumento della permeabilità cellulare al sodio e al blocco della pompa sodio/potassio [21, 22].

*Trattamento delle cellule.* - Le colture cellulari, allestite in piastre a 96 pozzetti ed incubate, come in precedenza, a 37 °C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> per 48 ore sono state trattate con soluzioni miste contenenti TTX a differenti concentrazioni (da 100 a 0,001 ng/pozzetto) ed in presenza della veratridina ed oubaina alle due concentrazioni sopra indicate. La vitalità cellulare è stata valutata a distanza di 24 ore dal trattamento mediante il test MTT.

**Risultati**

*Controllo nei confronti dei virus enterici nei molluschi bivalvi*

Le prove sperimentali svolte hanno consentito di evidenziare come la reazione di RT-PCR con *primers* specifici sia risultata in grado di poter evidenziare la presenza di acido nucleico virale nei molluschi conta-

minati sperimentalmente. Essa ha inoltre permesso di rilevare tale contaminazione sino alla concentrazione di 10 DCP<sub>50</sub> evidenziando quindi un'elevata sensibilità della metodica.

I *primers* utilizzati hanno consentito di poter differenziare in maniera specifica le sequenze genomiche del virus dell'epatite A da quelle degli enterovirus suggerendo la possibilità di poter rilevare contaminazioni congiunte da parte di differenti agenti virali.

In tutte le prove condotte contaminando sperimentalmente è stata inoltre dimostrata una perfetta correlazione fra presenza di acido nucleico virale e virus infettante.

*Analisi dei campioni provenienti dal campo.* - L'indagine relativa alla ricerca del virus dell'epatite A ha evidenziato come 38 campioni, degli 800 esaminati, siano risultati contaminati da parte di questo virus (4,75%) (Tab. 2) e come soltanto in 4 (10,5% di 38) fosse presente virus completamente attivo, come dimostrato dalla replicazione virale in coltura cellulare.

Per quanto concerne gli enterovirus soltanto 5 campioni sono risultati positivi (1,14%); di questi due (40% di 5) sono risultati infettanti rispettivamente sulle linee cellulari MRC-5 e Intestine 407. E' in corso la tipizzazione mediante reazione di siero-neutralizzazione.

*Messa a punto di metodi diagnostici basati sull'impiego di colture cellulari per l'evidenziazione di tossine algali nei molluschi bivalvi*

*Diarrhetic shellfish poisoning (DSP).* - Gli esiti delle indagini svolte hanno evidenziato un progressivo incremento della sensibilità della linea cellulare H9C2 rispetto al substrato KB e l'analisi in HPLC ha suggerito come tale comportamento potesse essere attribuibile ad una maggiore presenza di yessotossina rispetto all'acido ocaidaico. Fra i substrati cellulari impiegati la linea KB è risultata inizialmente provvista di elevata sensibilità in quanto la percentuale di corrispondenza con la prova biologica è risultata del 62% nei campioni esaminati (n. 65) nel 1999.

**Tabella 2.** - Risultati del controllo sui virus enterici in molluschi (mediante RT-PCR)

Anno	Campioni n.	HAV		Enterovirus	
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
2000	365	32	333	ne	ne
2001	342	2	340	4	170
2002	93	4	89	1	92
<b>Tot.</b>	<b>800</b>	<b>38</b>	<b>762</b>	<b>5</b>	<b>252</b>

ne = non eseguito.

Viceversa, l'analisi condotta nell'anno 2000 ha posto in rilievo una maggiore percentuale di corrispondenza con la prova *in vivo* condotta con la linea H9C2 e risultata pari all'85%. Tale comportamento suggerisce una possibile variazione del tipo di tossina presente che è rilevata principalmente da questo secondo tipo cellulare. Si sottolinea inoltre come la percentuale di correlazione calcolata debba essere ritenuta sottostimata in quanto campioni risultati negativi alla prova biologica e contenenti tossine, come invece accertato in HPLC, sono risultati positivi nella prova *in vitro*.

Il coefficiente di correlazione ( $r$ ), calcolato su 96 campioni esaminati nella linea cellulare H9C2, è risultato altamente significativo e pari a 0,888, ( $p = 0,001$ ) con un indicatore di linearità ( $R^2$ ) superiore alla soglia minima richiesta del 75% (89%). Tali valori hanno permesso di calcolare il valore massimo di percentuale di vitalità cellulare oltre il quale si osserva la morte del topo che è risultato del 50,2%.

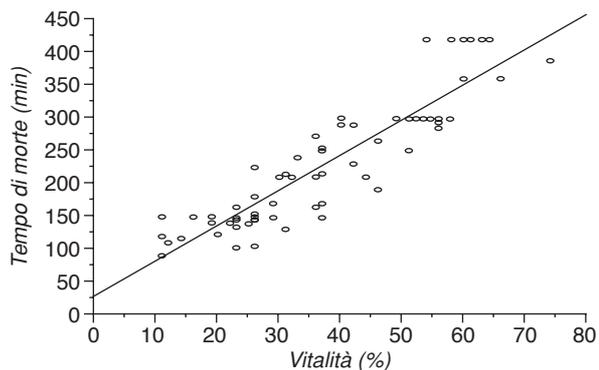
In una seconda analisi statistica sono stati considerati 78 campioni dei 96 originali essendo stati esclusi quelli che presentavano un tempo di sopravvivenza dell'animale inoculato di 500 min. Il coefficiente  $r$  è risultato pari a 0,914 e l' $R^2$  all'84% e la percentuale corrispondente alla morte del 50% degli animali e corrispondente al 50,4% di vitalità cellulare (Fig. 1).

*Tetrodotossina (TTX)*. - La linea cellulare Neuro 2A si è dimostrata più sensibile all'azione della TTX rispetto alle cellule Na C 1300. In particolare, la concentrazione di TTX di 4,5 ng/pozzetto, pari a  $0,03 \times 10^{-3}$  ng/ml, è risultata in grado di indurre una mortalità del 50% delle cellule trattate (IC<sub>50</sub>) (Fig. 2).

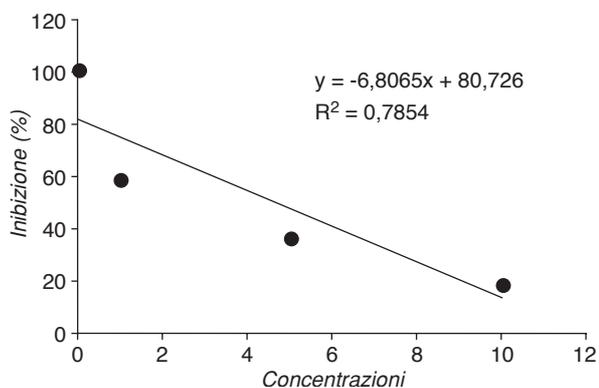
Tale parametro è stato calcolato sulla base della protezione indotta dalla veratridina ed oubaina nei confronti della tetrodotossina. Lo studio effettuato ha permesso di confermare la linea cellulare Neuro 2A come sistema biologico *in vitro* potenzialmente utilizzabile nei metodi di *screening* per la ricerca della TTX, essendo dotato di una sensibilità più elevata rispetto all'animale da laboratorio.

### Conclusioni

I risultati delle prove svolte hanno consentito di evidenziare come la reazione RT-PCR possa rappresentare un valido strumento per la diagnosi di contaminazione di virus enterici nei molluschi bivalvi [15]. Le prove sperimentali condotte hanno infatti evidenziato una elevata sensibilità e specificità della prova e, di conseguenza, una sua attendibilità [11]. Tuttavia, mentre sperimentalmente si è evidenziata una perfetta corrispondenza fra la reazione di biologia molecolare, che consente di evidenziare sequenze nucleotidiche



**Fig. 1.** - Correlazione tra dati ottenuti *in vivo/in vitro* sulla linea cellulare H9c2 a seguito di trattamenti con omogenati contaminati da tossine DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*).



**Fig. 2.** - IC<sub>50</sub> ottenuta sulla linea cellulare Neuro 2A a seguito del trattamento combinato veratridina-oubaina-TTX (tetrodotossina).

virali, e la propagazione sulle colture cellulari, che è direttamente correlabile alla presenza di virus attivo e completamente infettante, nei campioni di campo tale perfetta corrispondenza non è stata riscontrata. Infatti nella maggior parte dei casi è stato possibile evidenziare soltanto l'acido nucleico virale e tale reperto può essere ipoteticamente attribuito alle non perfette condizioni di conservazione/trasporto del materiale inviato e alla natura stessa del mollusco ricco di inibitori virali. L'insieme di questi fattori può essere alla base della perdita dell'integrità strutturale del virus e conseguente perdita dell'infettività principalmente legata a determinanti antigenici superficiali [16]. Come ampiamente documentato in letteratura l'isolamento virale può essere infatti limitato e fortemente condizionato dalle condizioni del campione [17]. D'altro canto la sola persistenza di acido nucleico, a causa della ben documentata lability dell'RNA virale [18] e la presenza di inibitori rende particolarmente complessa la comprensione di tali reperti. Queste considerazioni, associate al fatto che alcuni virus non sono in grado di replicare in

nessun tipo di coltura cellulare (calicivirus umani) o inducono alterazioni evidenti in tempi estremamente lunghi e con molte difficoltà (virus dell'epatite A) suggeriscono come le tecniche di biologia molecolare, altamente sensibili e specifiche, possano fornire un valido strumento per lo *screening* dei campioni prima della immissione nella rete commerciale. Si ritiene comunque importante sottolineare come, anche in questo settore, dovrebbe essere adottata una strategia non solo di controllo, ma soprattutto e principalmente di prevenzione. A tal fine le indagini dovrebbero non tanto essere svolte su campioni già destinati alla rete commerciale, ma ancora nelle sedi naturali di allevamento attraverso l'esecuzione di prelievi ed esami svolti in maniera sistematica. Infatti, la presenza di positività anche in campioni già destinati alla commercializzazione, così come le forti implicazioni sanitarie che tali virus sono in grado di indurre, sottolineano ulteriormente la necessità di una pianificazione dei controlli da eseguirsi a monte della commercializzazione e non limitati alla conferma di tossinfezioni già conclamate.

Il secondo aspetto della ricerca è relativo alle indagini tossicologiche condotte *in vitro* evidenzia come le colture cellulari possano rappresentare un sistema biologico di laboratorio di particolare interesse. Infatti il ricorso a tipi di cellule specifici e derivanti da organi bersaglio delle tossine stesse, può fornire, in tempi brevi e con metodologie attendibili, una chiara indicazione non soltanto della eventuale presenza/assenza di prodotti tossici nei campioni in esame, ma anche una prima indicazione del tipo di tossina eventualmente presente. Ulteriormente, l'impiego congiunto di diversi tipi di colture cellulari può consentire un'analisi ad ampio spettro sullo stesso campione potendo evidenziare presenza contemporanea di tossine di gruppi diversi. Si ritiene inoltre utile sottolineare come tali metodologie, in associazione a quelle in fase di allestimento e basate su metodologie di biologia molecolare, possano trovare largo impiego nel controllo delle condizioni dei bacini idrici marini e d'acqua dolce. Infatti, i recenti cambiamenti climatici rendono sempre maggiori le contaminazioni delle acque da parte di microrganismi di differente natura ed in grado di produrre diversi tipi di sostanze tossiche. La messa a punto di metodi diagnostici in grado non solo di verificarne la presenza, ma anche di effettuare una loro corretta tipizzazione può consentire un monitoraggio costante e una individuazione delle specie potenzialmente produttrici. Da ultimo, si ritiene utile anche la loro quantificazione al fine dell'accertamento dei limiti di contaminazione già esistenti e della loro eventuale ridefinizione.

Quanto esposto evidenzia come l'attività diagnostica, compito principale degli Istituti Zooprofilattici dell'intero territorio nazionale, possa estendersi al controllo delle condizioni sanitarie di prodotti ittici nei

riguardi di differenti agenti patogeni potenzialmente agenti causali di patologie per i consumatori. La messa a punto, la standardizzazione, la divulgazione e l'applicazione sistematica dei metodi proposti, applicati nei laboratori dei dieci Istituti Zooprofilattici del Paese potrebbero consentire un monitoraggio dei prodotti ittici e, indirettamente, una sorveglianza costante sulle condizioni degli ambienti marini e dei bacini d'acqua dolce.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 22 ottobre 2002.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Stolle A, Sperner B. Viral infections transmitted by food of animal origin: the present situation in the European Union. *Arch Virol* 1997;Suppl.13:219-28.
2. Enriquez R, Frosner GG, Hochstein-Mintzel V, Riedemann S, Reinhardt G. Accumulation and persistence of hepatitis A virus in mussels. *J Med Virol* 1992;37:174-9.
3. Flehmig B. Hepatitis A virus in cell culture: propagation of different hepatitis A virus isolates in fetal rhesus monkey kidney cell line (FRhK-4). *Med Microbiol Immunol* 1980;168:239-48.
4. Hoskins JM. *Diagnosi virologica principi e metodi*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana; 1975.
5. Cromeans TL, Nainan OV, Margolis HS. Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63(6):2460-3.
6. De Medici D, Croci L, Di Pasquale S, Fiore A, Toti L. Detecting the presence of infectious hepatitis A virus in mollusco positive to RT-nested-PCR. *Lett in Appl Microbiol* 2001;33:362-6.
7. Croci L, De Medici D, Morace G, Fiore A, Scalfaro C, Beneduce F, Toti L. Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested reverse transcription-PCR. *Intern J Food Microbiol* 1999;48:67-71.
8. Sair AI, D'Souza DH, Moe CL, Jaykus L. Improved detection of human enteric viruses in food by RT-PCR. *J Med Virol* 2002; 100:57-69.
9. Le Guyader F, Dubois E, Menard D, Pommepuy M. Detection of hepatitis A virus, rotavirus and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994;60(10):3665-71.
10. Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human Adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *J Appl Microbiol* 1998; 64(9):3376-82.
11. Le Guyader F, Haugarreau L, Miossec L, Dubois E, Pommepuy M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl Environ Microb* 2000;66(8):3241-8.
12. Pinoni C, Nicolosio L, Galoppi A, Boni P. Identificazione del virus dell'epatite A nei molluschi attraverso la reazione "Reverse transcription seminested PCR" (RT-SN-PCR). In: *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*. Riva del Garda, 28-30 settembre 2000. Messina: Grafiche Scuderi; 2002. 163 p.
13. Pinoni C, Cosciani Cunico E, Rubini S. Accumulo e persistenza del virus dell'epatite A nei molluschi bivalvi. In: *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*. Rimini, 20-22 settembre 2001. Messina: Grafiche Scuderi; 2001. 379 p.

14. Muniain Mujika I, Girones R, Lucena F. Viral contamination of shellfish: evaluation of method and analysis of bacteriophages and human viruses. *J Med Virol* 2000;89:109-18.
15. Vantarakis AC, Papapetropoulou M. Detection of entero-viruses and adenoviruses in coastal waters of SW Greece by nested polymerase chain reaction. *Wat Res* 1998;32(8):2365-72.
16. Lewis GD, Molloy SL, Greening GE, Dawson J. Influence of environmental factors on virus detection by RT-PCR and cell culture. *J Appl Microbiol* 2000;88:633-40.
17. Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by molecular biology - a trip of over 50 years. *Annual Rev Microbiol* 1995; 49:461-87.
18. Richards GP. Limitation of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods. *J Food Protec* 1999; 62(6):691-7.
19. Flanagan AF *et al.* A cytotoxicity assay for the detection and differentiation of two families of shellfish toxins. *Toxicon* 2001; 39:1021-7.
20. La Rosa LA *et al.* Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin. *Biochem Pharmacol* 2001; 61:827-33.
21. Koji Hamasaki *et al.* A biological method for the quantitative measurement of tetrodotoxin (TTX): tissue culture bioassay in combination with a water-soluble tetrazolium salt. *Toxicon* 1996;34:490-5.
22. Derek seng Ann Yeo *et al.* Neuroblastoma cell culture assay shows that *Carcinoscorpius Rotundicauda* haemolymph neutralizes tetrodotoxin. *Toxicon* 1996;34:1054-7.
23. Manger RL. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins and ciguatoxins. *Anal Biochem* 1993;214:190-4.

*Rosanna MANCINELLI e Maria Soccorsa GUIDUCCI*