Progetto finanziato con il POR FESR 2014-2020 Regione del Veneto

Sostenibile, sicuro, di alta qualità: un progetto integrato di ricerca industriale per l'innovazione della filiera molluschicola del Veneto

Enti di ricerca

Biotech

Cooperative

Obbiettivo: innovare i processi di trasformazione della filiera molluschicola al fine di incrementare la qualità e la sicurezza del prodotto

WP1. Sviluppo/ottimizzazione di sistemi di depurazione per l'eliminazione di virus enterici

WP2. Sviluppo di metodi innovativi per garantire la tracciabilità del prodotto

WP3. Miglioramento genetico di vongole e cozze

WP1. Sviluppo/ottimizzazione di sistemi di depurazione per l'eliminazione di virus enterici

Obiettivo dello studio:

Valutare la diffusione dei Norovirus e del virus dell'Epatite E nelle aree delle lagune Venete nei diversi periodi stagionali e l'efficacia del processo di depurazione nel controllo di questo pericolo biologico

Ricerca Norovirus e virus Epatite E: attività di campionamento

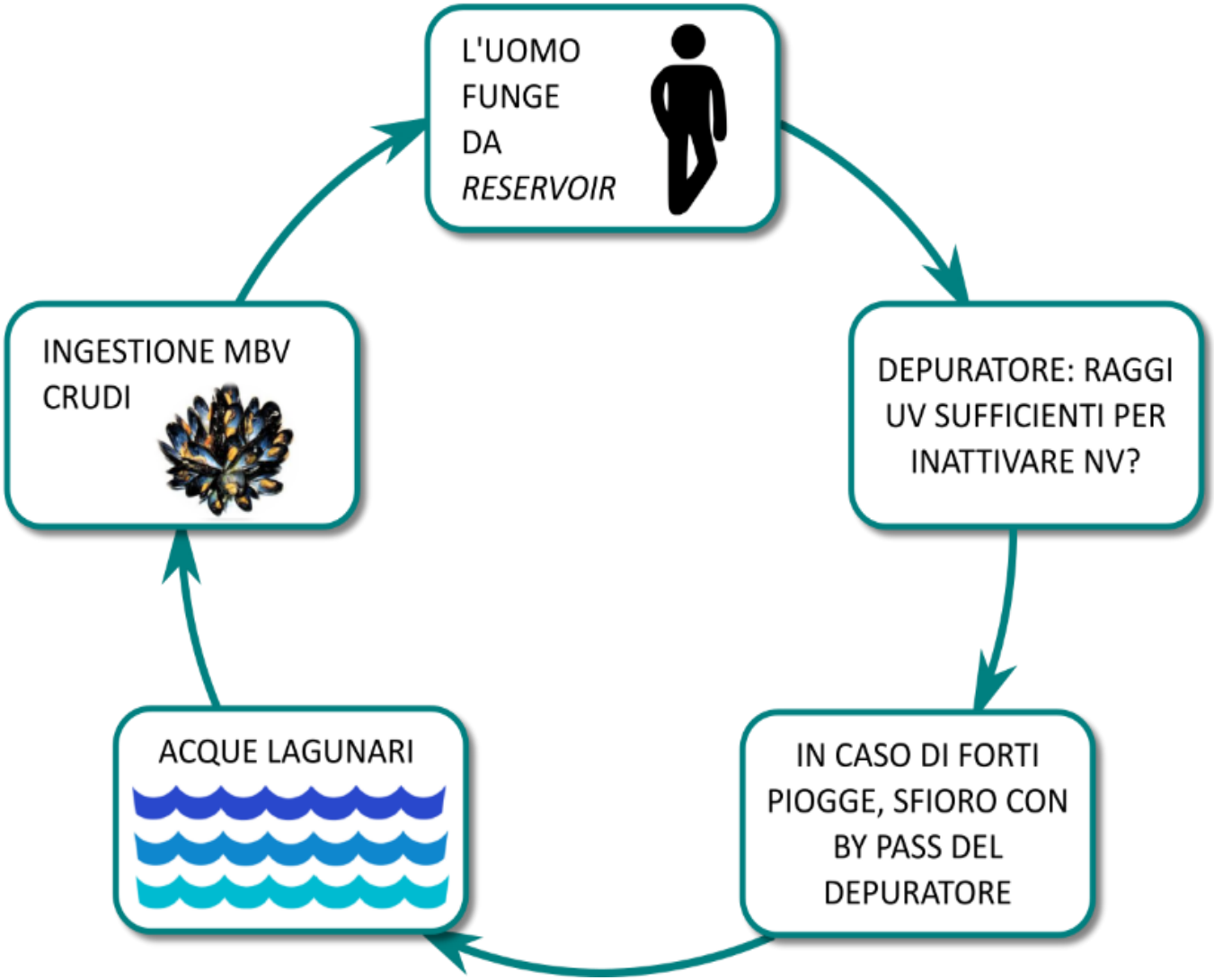
Inizio attività di campionamento: luglio 2018
Termine attività di campionamento: giugno 2020
Molluschi campionati: vongole, mitili e ostriche

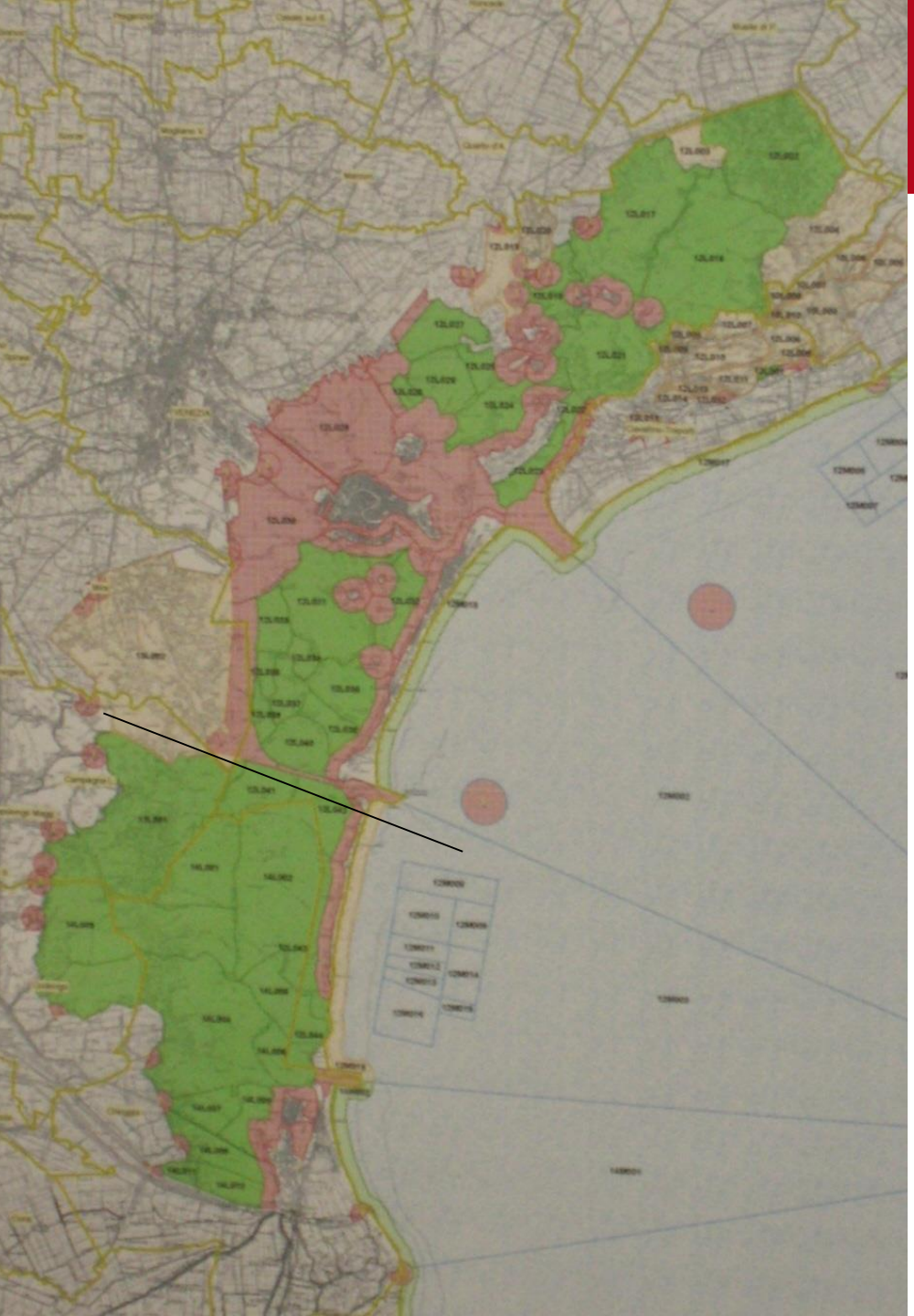
È stata interessata nell'attività di campionamento sia la laguna sud di Venezia che gli ambiti lagunari della Sacca di Scardovari.
Le aree oggetto di campionamento sono tutte classificate di tipo B, quindi con un certo livello di inquinamento da E. coli

Fonti di inquinamento delle aree lagunari

Le acque lagunari risentono fortemente dell'impatto antropico, specie nelle aree densamente popolate

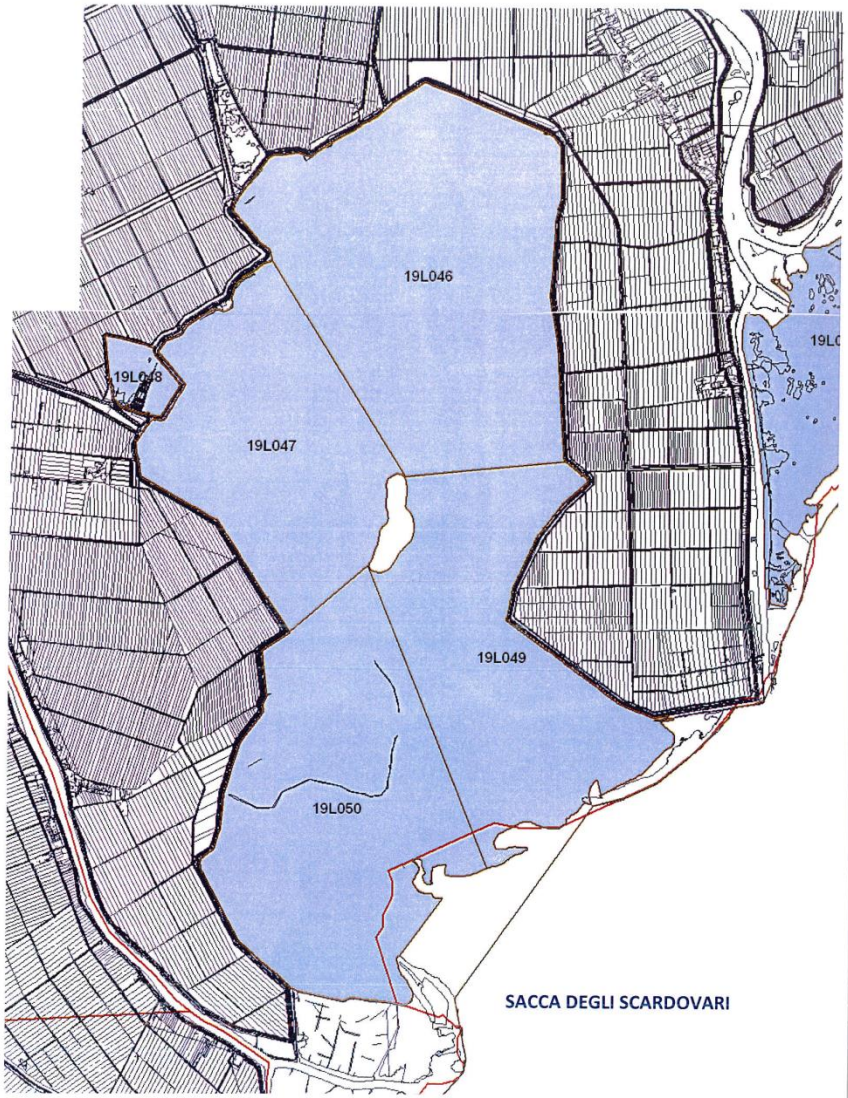
- Corsi d'acqua del bacino scolante che sfociano direttamente in laguna o nelle immediate vicinanze;
- Scarichi di insediamenti civili e industriali
- Scarichi di pubbliche fognature;
- Impianti di depurazione;
- Acque di dilavamento del terreno
- Cantieri, darsene, porti, imbarcazioni, casoni..


L'UOMO FUNGE DA *RESERVOIR*
DEPURATORE: RAGGI UV SUFFICIENTI PER INATTIVARE NV?
IN CASO DI FORTI PIOGGE, SFIORO CON BY PASS DEL DEPURATORE
ACQUE LAGUNARI
INGESTIONE MBV CRUDI



Ambiti oggetto di campionamento nella laguna Sud:

14L001;
14L003;
14L004;
14L007;
14L008;
14L009;
12L054



Ambiti oggetto di campionamento Sacca di Scardovari: 19L046;
19L047;
19L049;
19L050;
19L054;
19L018

Allevamento di mitili nella Sacca di Scardovari

Fase di selezione delle vongole a bordo dell'imbarcazione durante l'attività di campionamento

Ricerca Norovirus e virus Epatite E: attività di campionamento

Gran parte dei molluschi sono stati campionati all'interno degli allevamenti di produzione.

In alcuni casi sono stati campionanti anche molluschi pescati in aree di libera raccolta.

Ogni campione prelevato è stato suddiviso in 4 unità campionarie:

- la prima non è stata sottoposta ad alcun trattamento di depurazione;
- la seconda è stata sottoposta a un trattamento di depurazione di 12 ore nell'impianto sperimentale;
- la terza a un trattamento di depurazione di 24 ore;
- La quarta a un trattamento di depurazione di 48 ore;

Fase di depurazione vongole nell'impianto

- Tutti i campioni al termine del processo di depurazione sono stati sottoposti a congelamento per consentire una migliore gestione del materiale da analizzare.

- Va sottolineato che il congelamento non influenza l'esito delle analisi e la vitalità del virus.

Impianto depurazione sperimentale

Caratteristiche dell'impianto sperimentale

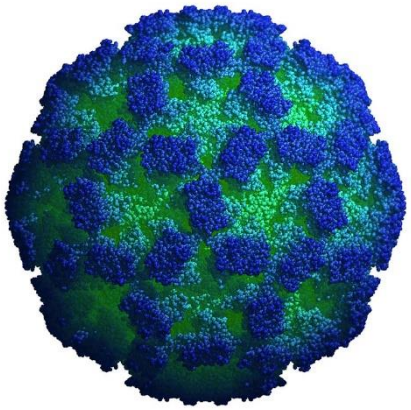
- Impianto a circuito chiuso;
- Filtro a sabbia e a carboni attivi;
- Impianto di refrigerazione dell'acqua in maniera da mantenerla costantemente a temperatura tra i 13°-16°C ;
- Impianti di disinfezione dell'acqua con raggi UV e ozono. Il potenziale redox durante la fase di depurazione è stato mantenuto a valori intorno ai 350 mvolt

Parametri monitorati durante le fasi di depurazione

Parametri	Range di funzionalità
Temperatura dell'acqua	Valori ricompresi tra 13°C e 17°C
Salinità	Valori ricompresi tra 32 e 36
Ph	Valori ricompresi tra 7,9 e 8,2
Ossigeno disciolto	Valore ricompreso tra 70% e 100%
Ammoniaca	Inferiore a 1 ppm
Nitrati	Inferiore a 50 ppm
Nitriti	Inferiore a 0,50 ppm
Pulizia lampade UV	Bimensile
Sostituzione acqua impianto	Ogni tre mesi

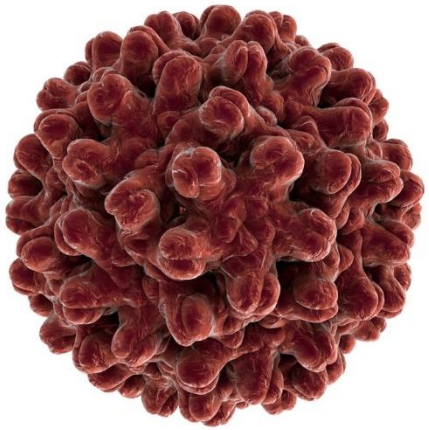
I virus enterici oggetto di sperimentazione

NOROVIRUS (NoV)



Fam. Caliciviridae
35 nm

EPATITE E (HEV)



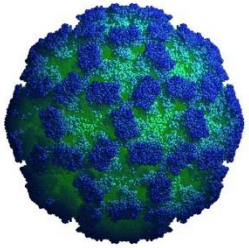
Fam. Hepeviridae
(ex Caliciviridae)

30 nm

Caratteristiche comuni di NoV e HEV

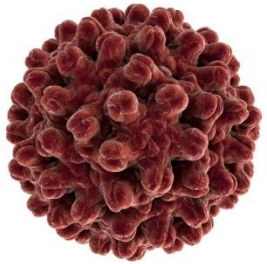
- Virus RNA
- Senza envelope
- Non si moltiplicano al di fuori dell'ospite
- Abbastanza termoresistenti (100°C per 2 min)
- Non esiste vaccino, sperimentazioni in corso

Caratteristiche di NoV



- La causa più comune di gastroenterite: vomito invernale
- Genotipi GI e GII tipici dell'uomo, unico serbatoio
- Modalità trasmissione: diretta (aerosol), feci > acqua contaminata
- Oggetto di normativa negli alimenti
- Non ancora considerato per classificare le aree produzione molluschi
- Vitalità non valutabile in quanto non cresce in coltura cellulare

Caratteristiche di HEV

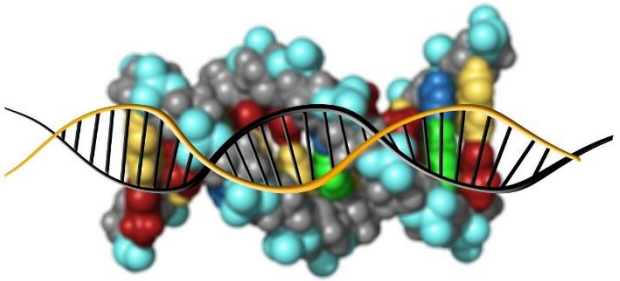


- Causa epatite, anitterica ed autolimitante (simile ad HAV)
- Serbatoio: uomo e suino
- Modalità trasmissione: acqua contaminata da feci
- In aumento nei paesi industrializzati
- Non è oggetto di normativa negli alimenti
- Vitalità valutabile in quanto cresce in coltura cellulare

La ricerca è stata occasione per implementare la diagnostica di laboratorio di questi due virus enterici, nei molluschi bivalvi e verificare l'efficacia della depurazione

NoV: adozione di un metodo biomolecolare quantitativo
ISO: ISO 15216:1 2017

HEV: adozione del metodo biomolecolare qualitativo
ISS: metodo CCM 2016, ISS



Materiali e metodi

set di campioni= costituito da 4 cp per i 4 tempi di depurazione: totale 44 cp (176 al.)

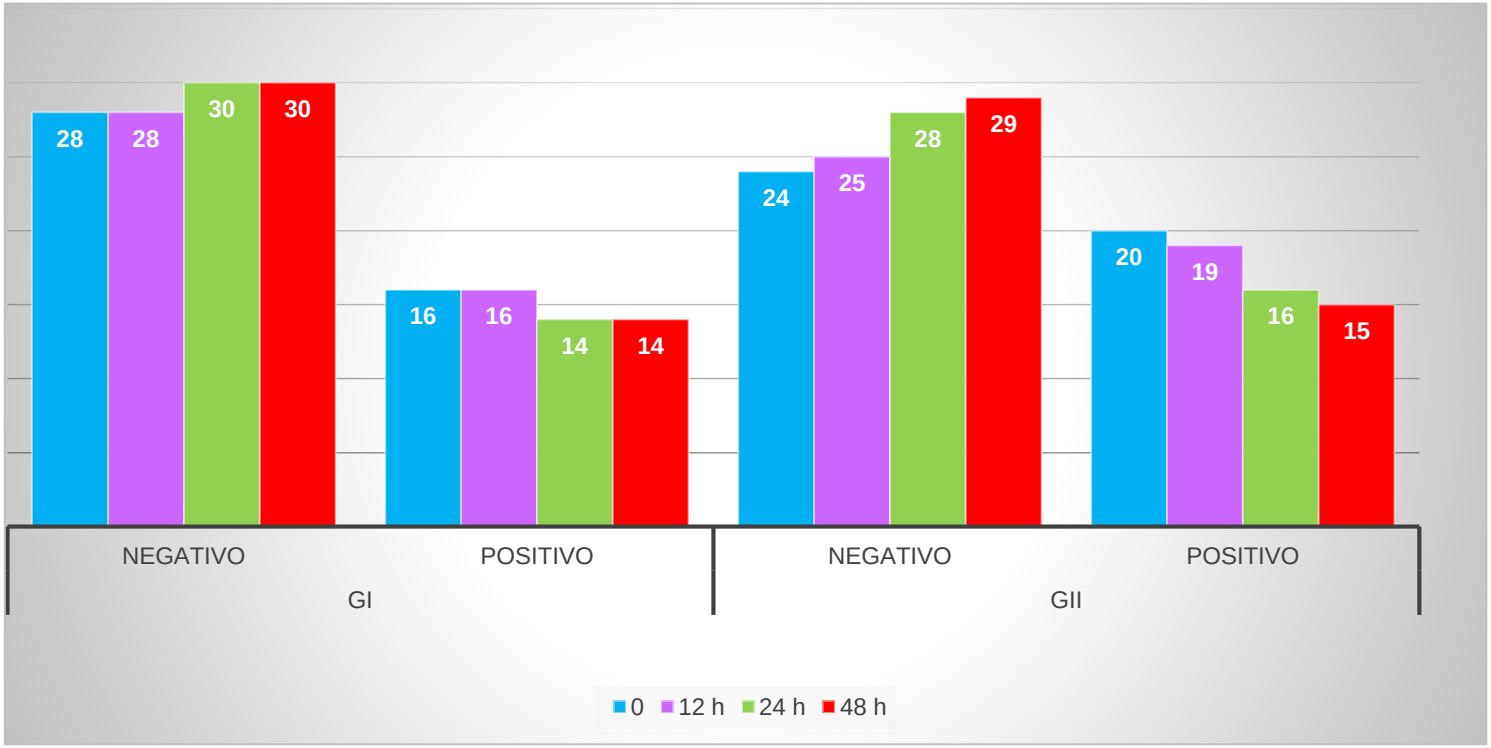
- prelievo= ogni aliquota è costituita da 15-20 individui (cozze), 20-30 individui (vongole) dai quali è stata prelevata la ghiandola digestiva
- ricerca e quantificazione tramite rPCR di norovirus GI e GII (ISO 15216:1 2017) (per la ricerca dei due target genici in un campione necessari 46 pozzetti/reazioni per ctrl, curve standard target, curve standard) controlli = **1 piastra 96-well 2 aliquote**!!!
- LOQ (limit of quantification) per GI e GII (per ogni valore di LOQ **analizzati 960 campioni**/repliche = 10 piastre 96-well per target)

Risultati

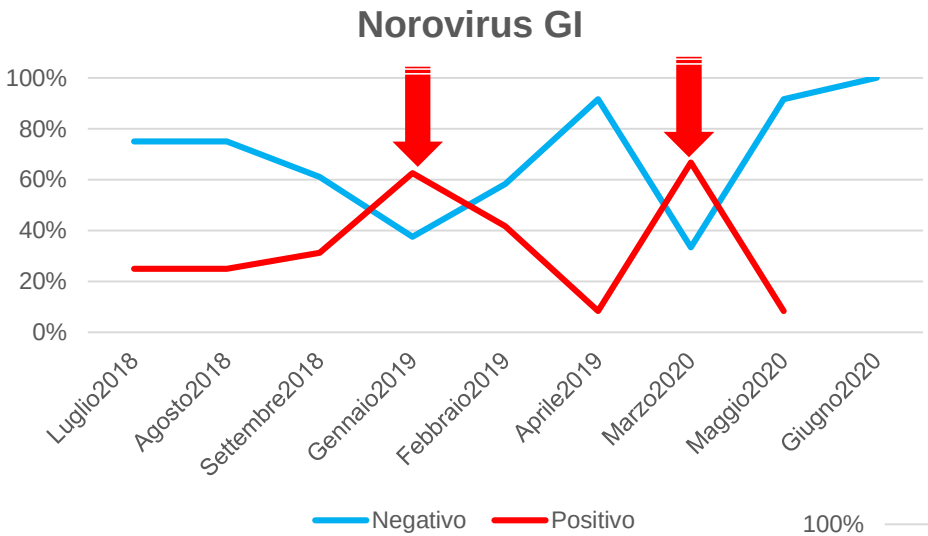
Depurazione (h)	Cozze (47,7%)	Ostriche (2,2%)	Vongole (50%)	Totale set di campioni
0	21	1	22	44
12	21	1	22	44
24	21	1	22	44
48	21	1	22	44
Totale aliquote	84	4	88	**176 aliquote**

N° di campioni analizzati suddivisi per specie e per tempo di depurazione
Set = 4 aliquote in 4 tempi diversi di depurazione

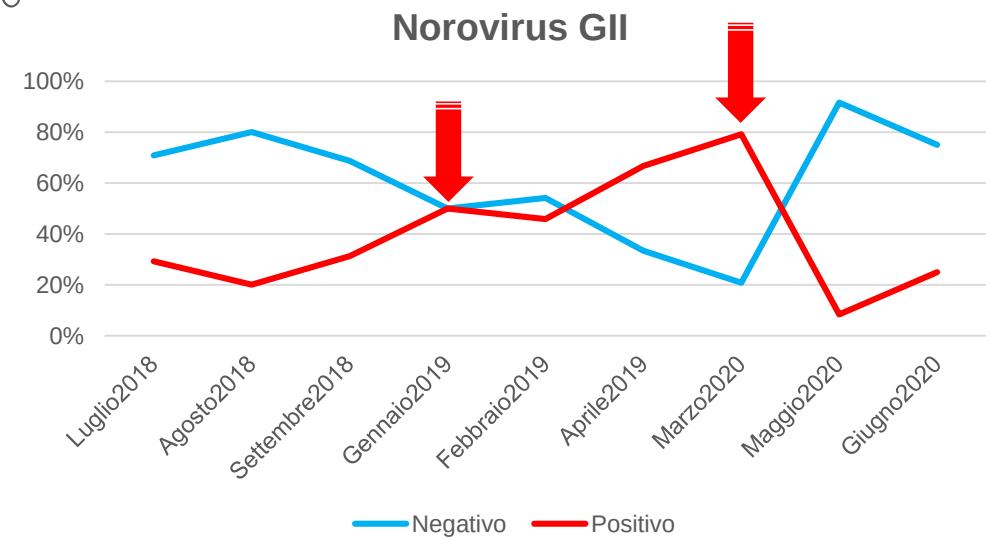
Risultati

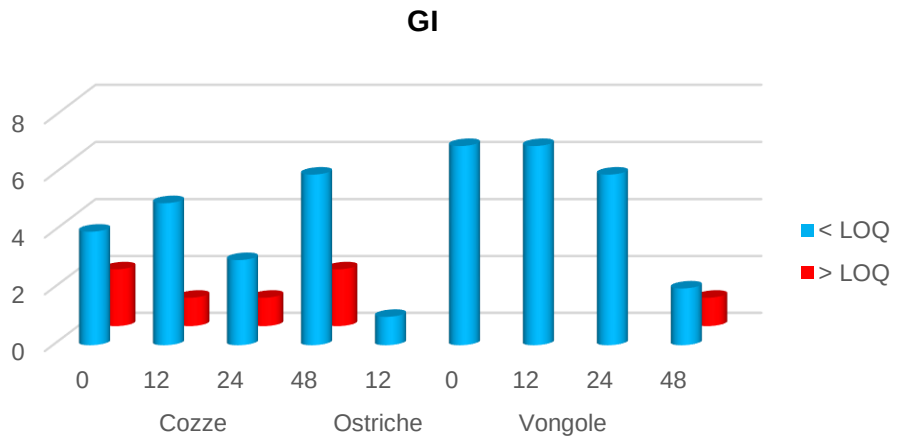


Campioni analizzati per ricerca Norovirus GI e GII distribuiti per tempo di depurazione



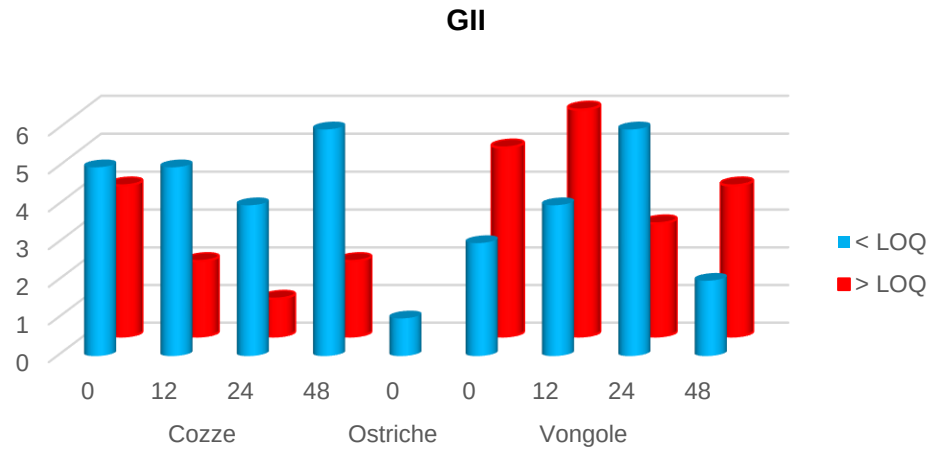
Norovirus sono stati più frequentemente rilevati nei campioni/set raccolti nei mesi «freddi», in particolare il genotipo GII





LOQ GI = 393 cg/2 g epatopancreas

LOQ GII = 203 cg/2 g di epatopancreas



Epatite E Virus

	Cozze		Vongole		Totale complessivo
Depurazione (h)	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	
0	3	2	2	2	9
12	4	1	1	3	9
24	4	1	4		9
48	4	1	4		9
Totale complessivo	15	5	11	5	36

Su un sub-set di campioni (36/176) è stata effettuata la ricerca del virus dell'epatite E

CONCLUSIONI

- Il Norovirus si conferma un potenziale virus enterico problema, soprattutto nei mesi invernali (Genotipo GII)
- Epatite E, virus emergente, patogeno da considerare
- Il trattamento di depurazione a ciclo chiuso è poco efficace anche se protratto fino a 48 ore per NoV, più efficace per HEV
- Disponibilità di prove di laboratorio efficaci per l'individuazione e gestione di aree di raccolta «Virus free»

Personale coinvolto della SCS1 Microbiologia generale sperimentale e del CSI (IZSVe):

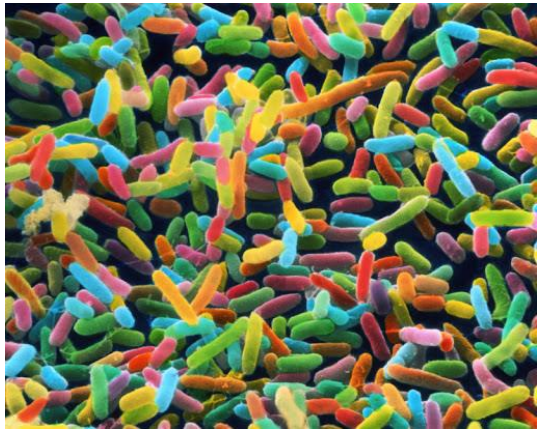
E Ramon, M Antognetti, M Furlan, A Tiengo, M Milan, E Fornasiero, P Zavagnin, E Selmin, E Marafin, G Bozzolan, MC Dalla Pozza, M Mancin, D Giugno, A Garbo, E. Fiocchi, A Vetri, M Gastaldelli, F Tosi, AA Lettini, L Barco, G Arcangeli

WP2. Sviluppo di metodi innovativi per garantire la tracciabilità del prodotto

Obiettivo dello studio

Sviluppo di un metodo innovativo per garantire la tracciabilità del prodotto basato sull'analisi e la caratterizzazione del microbioma.

- Risposta alle crescenti preoccupazioni dei consumatori sulla provenienza dei prodotti alimentari
- Nuove prospettive ad imprese/industrie alimentari interessate alla certificazione dei propri prodotti.



Cos'è il microbiota?

L'insieme di microorganismi simbiotici che convivono con l'organismo.

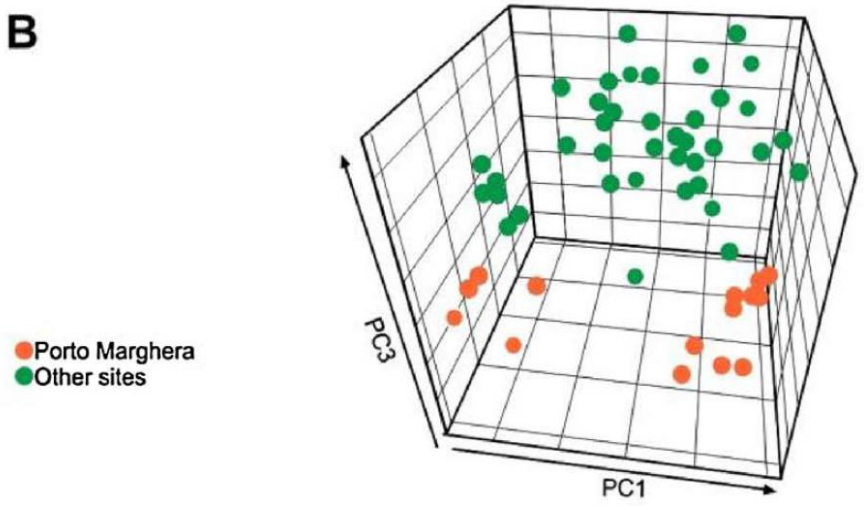
Negli ultimi anni si è prestata sempre maggiore attenzione alle relazioni simbiotiche tra batteri e ospiti (specie animali).

E' stato ampiamente dimostrato che il microbiota dell'ospite ha una importanza vitale nello sviluppo e nella salute dell'ospite, nonché nelle sue risposte a stress ambientali.

Ruolo del microbiota negli invertebrati

- protezione da patogeni
- risposta a stress ambientali
- nutrizione
- resistenza alle malattie
- riduzione della tossicità dovuta a metalli pesanti

Studio di vongole raccolte a Porto Marghera ed in altre aree della laguna di Venezia



- variazioni stagionali nelle comunità microbiche della ghiandola digestiva in tutte le aree

- vongole raccolte a Porto Marghera presentano comunità microbiche sito-specifiche

Specificità geografica delle comunità microbiche: possibile sviluppare uno strumento in grado di risalire alla provenienza del prodotto?

Metodi

Aree investigate:

- Chioggia (2 siti)
- Porto Marghera
- Colmata
- Laguna di Marano
- Scardovari
- Goro

2018 & 2019

Campionamento di **ghiandole digestive** **prima e dopo la depurazione** del prodot

Estrazione DNA e sequenziamento della subunità 16S

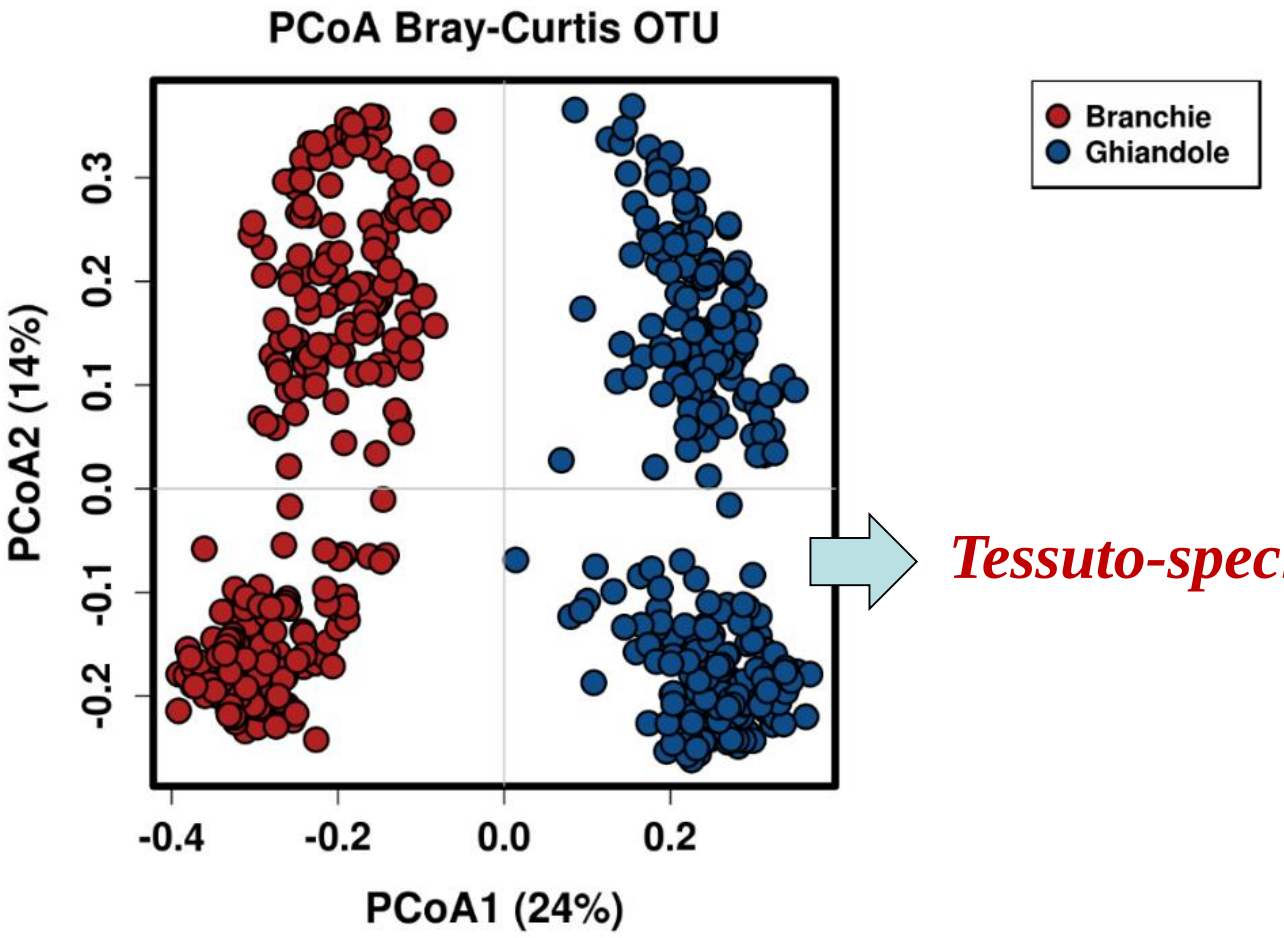
Caratterizzazione delle comunità microbiche

Campioni

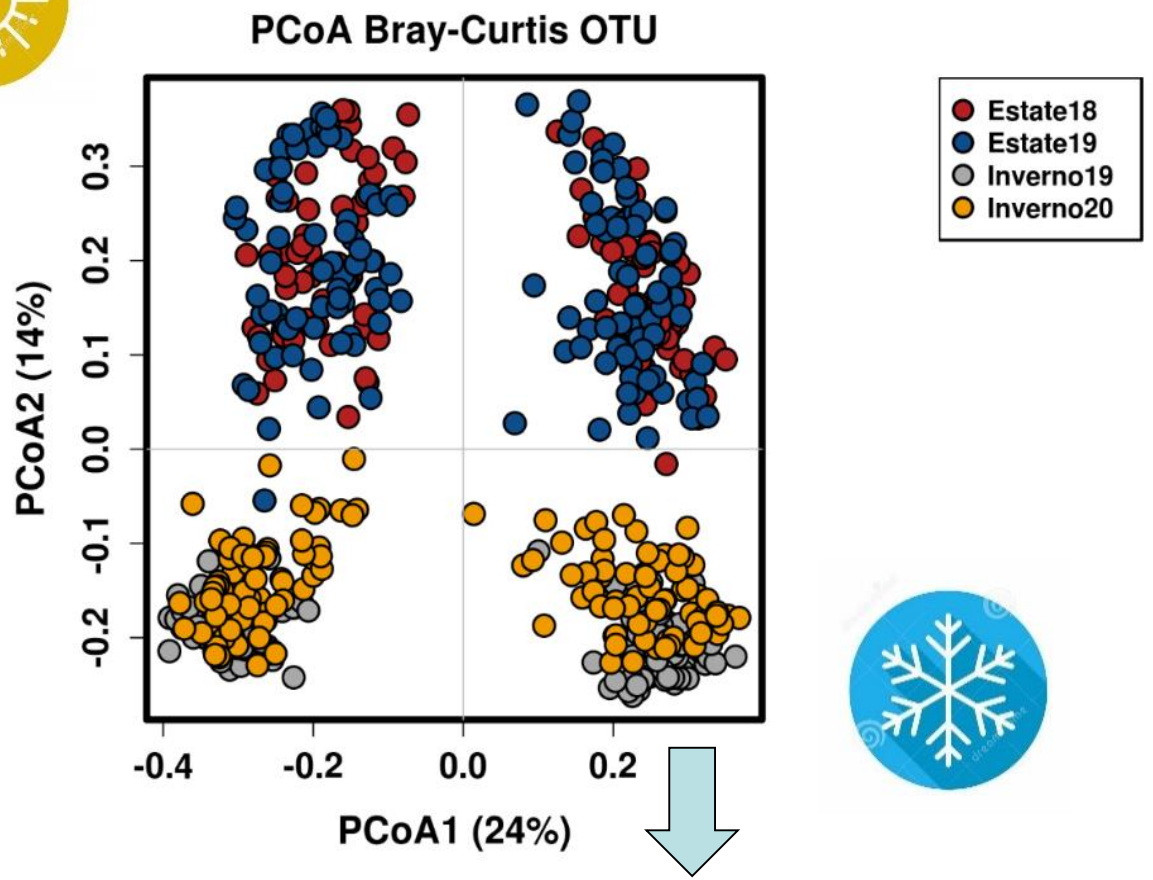
Specie

om biom file

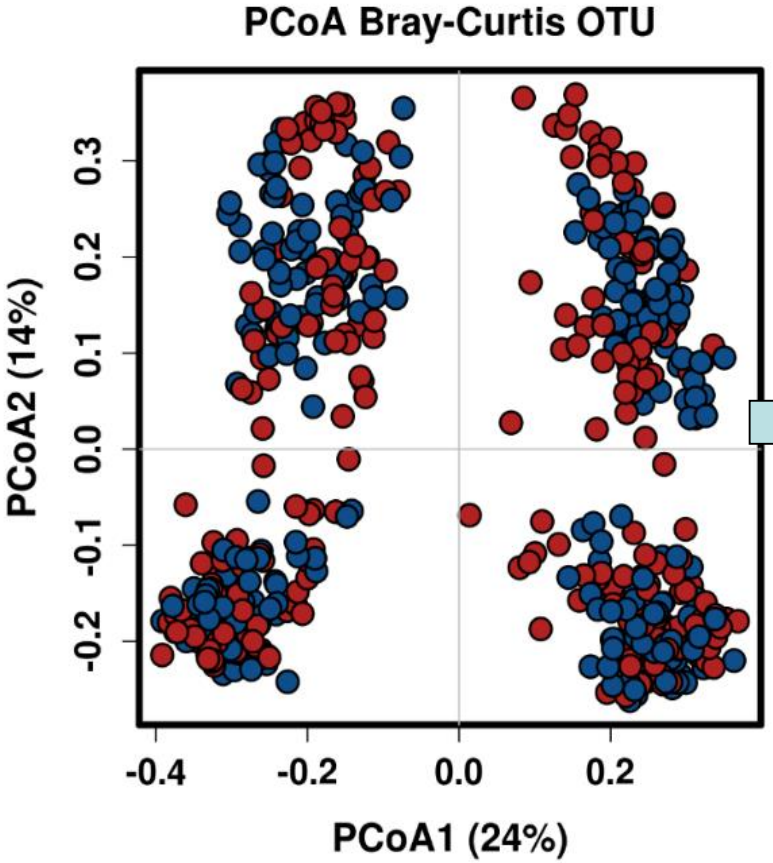
Taxon	PM_Pre-E	PM_Pre-E	PM_Pre-E	PM_Pre-E	PM_Pre-E	PM_Pre-E	MA_Pr
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Alteromonadales;D_4__Colwelliaceae;[							
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Oceanospirillales;D_4__Endozoicomonad	50616	114	128	59	69	60	
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__B2M28;D_4__uncultured gamma proteoba	17	9	193	0	0	11	
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhodobacterales;D_4__Rhodobacteraceae;D	11	13	125	16	16	26	
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Flavobacteriaceae;D_5__uncult	37	25	124	13	5	14	
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__uncultured;D_4__uncultured gamma prote	53	15	182	0	0	36	
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__PeM15;D_4__uncultured Actinomycetales bacteriu	7	24	134	0	7	0	
D_0__Bacteria;D_1__Spirochaetes;D_2__Spirochaetia;D_3__Spirochaetales;D_4__Spirochaetaceae;D_5__Spirochae	739	37	85	24	6	3	
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Flavobacteriaceae;D_5__Tenaci	19	39	205	0	0	39	
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mycoplasmatales;D_4__Mycoplasmataceae;D_5__ucultu	40	215	797	532	38	535	
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Cytophagales;D_4__Cyclobacteriaceae;D_5__Roseivirg	10	9	54	0	0	0	
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mycoplasmatales;D_4__Mycoplasmataceae;D_5__Mycopl	29	1046	1567	2032	655	907	
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mycoplasmatales;D_4__Mycoplasmataceae;D_5__Mycopl	32	147	142	43	10	95	



Tessuto-specificità

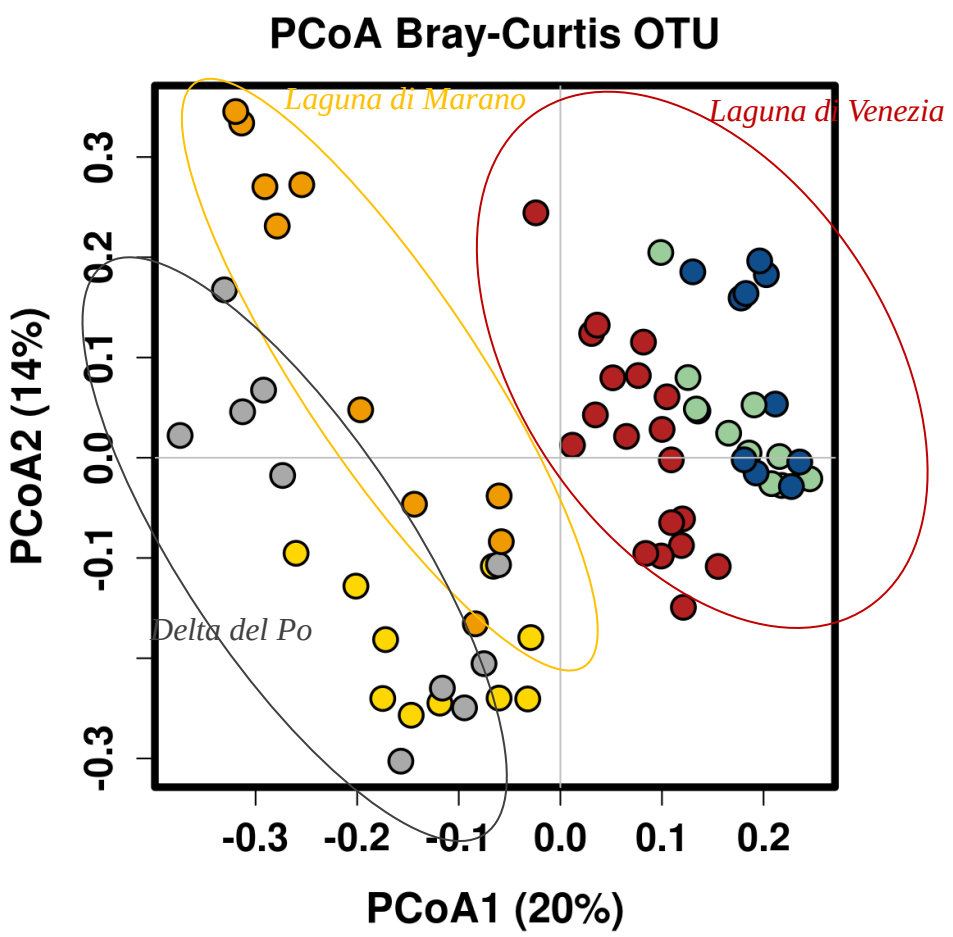


Significative modificazioni stagionali



Nessuna separazione tra campioni pre- e post-depurazione

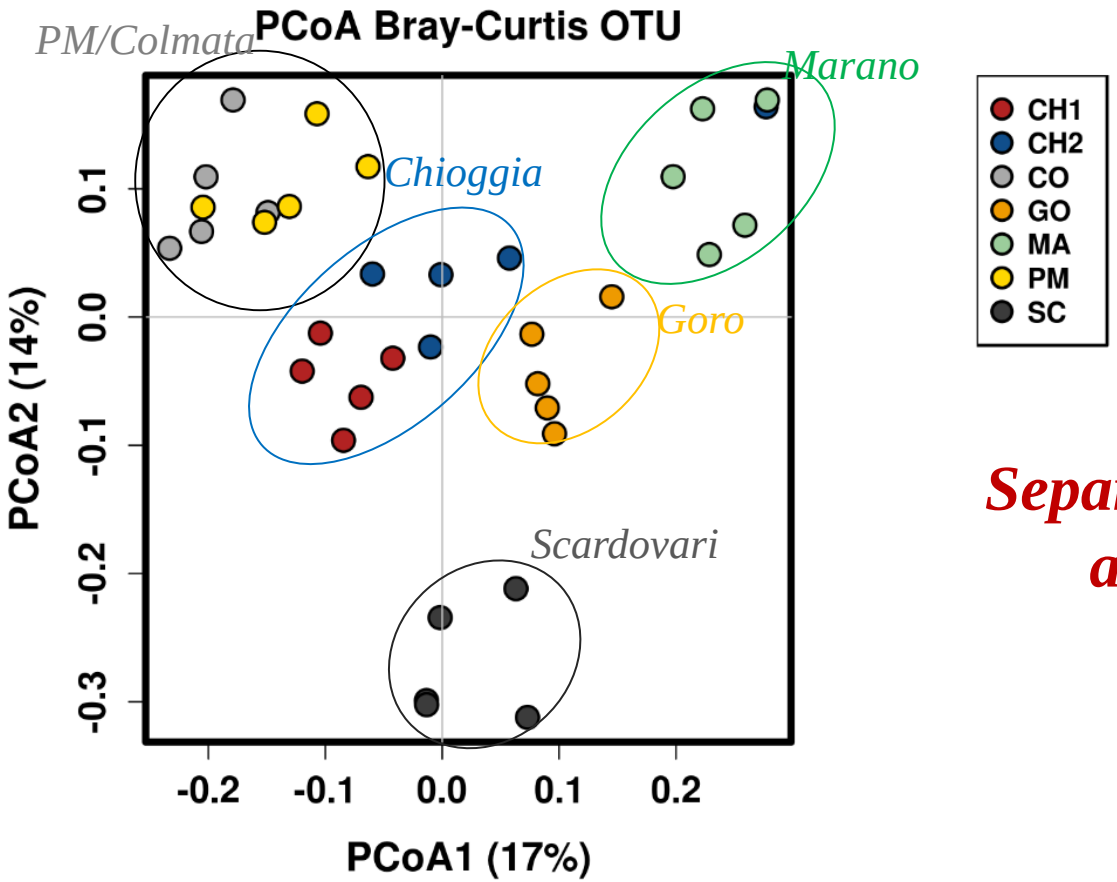
Pre-depurazione / branchie



2018 & 2019

I campioni pre-depurazione si separano tra macroaree indipendentemente dall'anno di campionamento

Post-depurazione / ghiandola digestiva

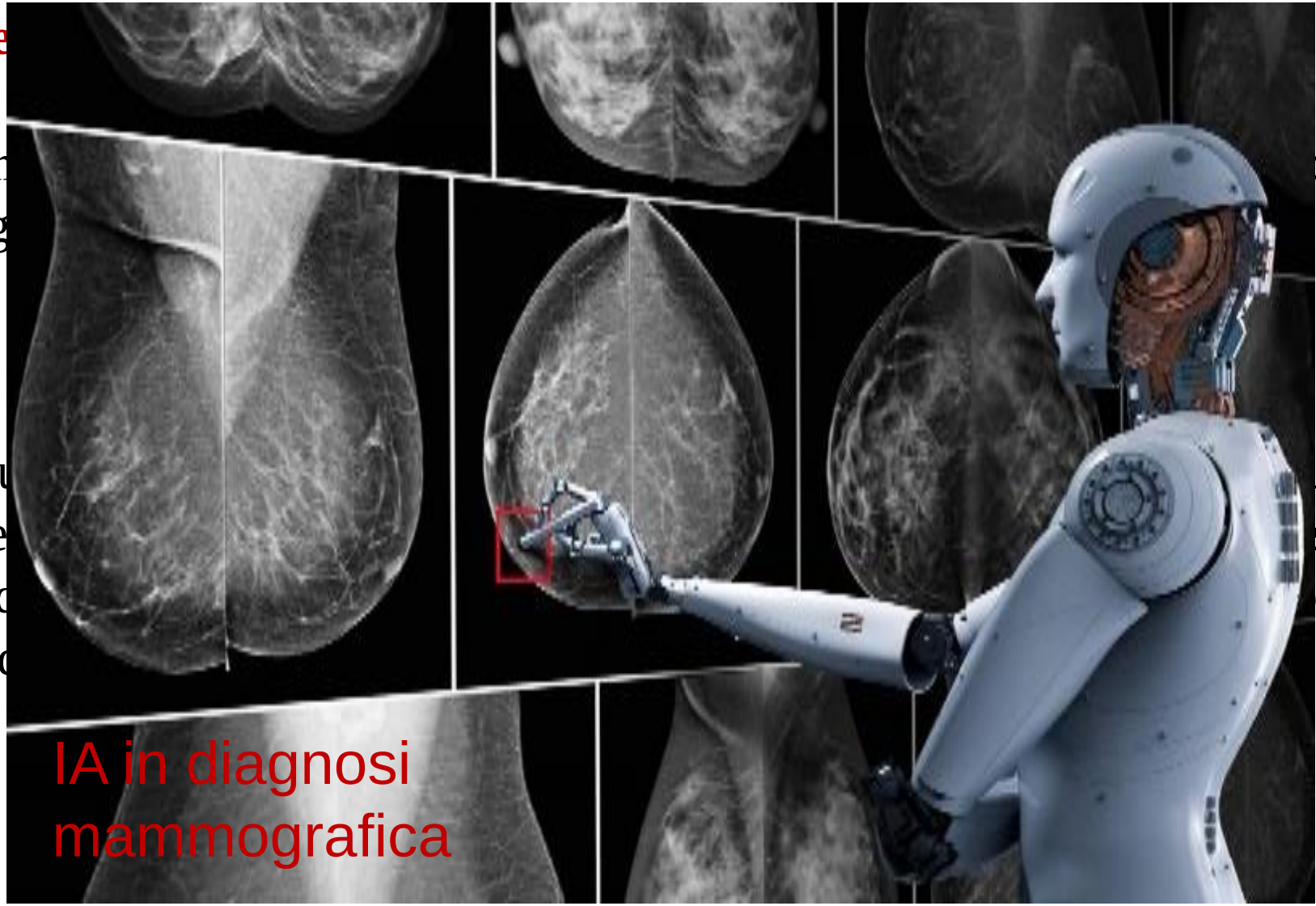


Separazione evidente tra le aree di allevamento

Inte

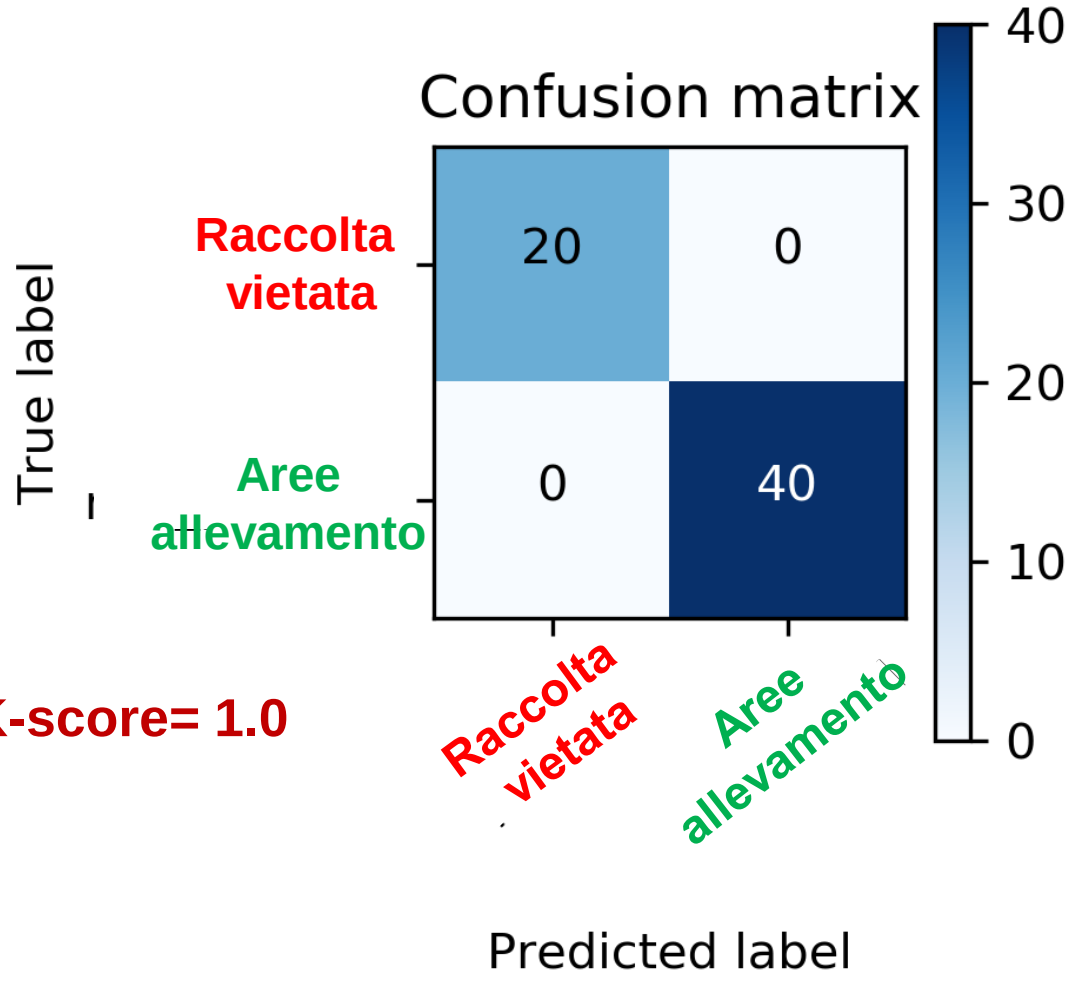
L'in ono o
mig

Attu uando
inte social
mec e per
renc



Machine Learning – Siti inquinati vs siti non-inquinati

Predizione dati secondo anno:



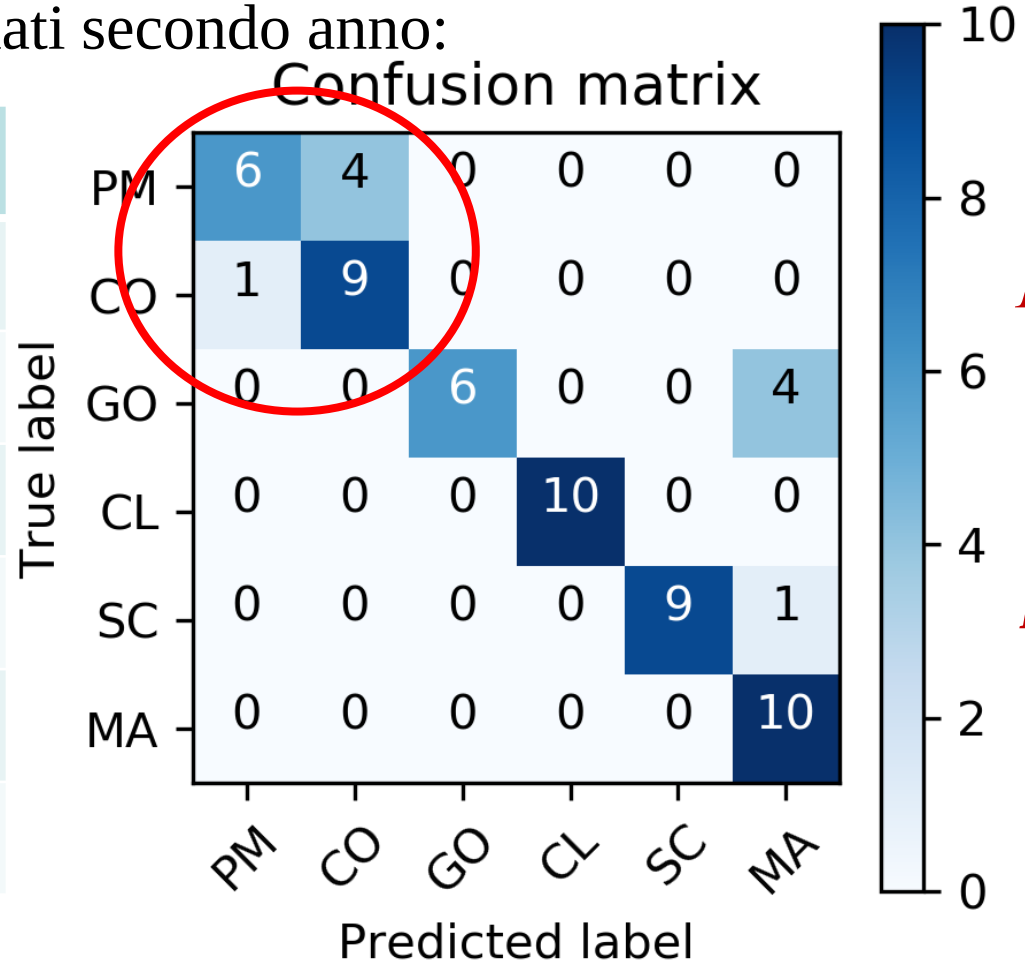
K-score= 1.0

Nonostante la depurazione, è possibile risalire all'origine da aree in cui la raccolta è interdetta (indipendentemente dalla stagione)

Machine Learning – 6 diverse stazioni

Predizione dati secondo anno:

PM (Marghera)
CO (Colmata)
GO (Goro)
CL (Chioggia)
SC (Scardovari)
MA (Marano)



E' possibile risalire all'origine del prodotto dalle singole aree di produzione con un accuratezza superiore all'80%

K-score= 0.8

Conclusioni

- Le comunità microbiche subiscono modificazioni stagionali dovute a variazioni significative in parametri chimico-fisici

- Le singole aree di allevamento presentano comunità microbiche sito-specifiche

- L'applicazione di uno strumento innovativo (intelligenza artificiale) permette l'identificazione di campioni provenienti da aree in cui la raccolta è vietata anche successivamente al processo di depurazione

- Lo stesso strumento permette di risalire all'area originale di allevamento (>80%), suggerendone un possibile utilizzo per la promozione e tutela dei marchi delle aree di produzione

Grazie al…

Gruppo di ricerca del Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (Giulia Dalla Rovere; Luca Peruzza)

Dr. Luciano Boffo

C.R.A.M.E. Cooperativa raccolta allevamento molluschi edibili
Consorzio Cooperative Pescatori del Polesine O.P. Scardovari (Ro)
Blupesca s.r.l. Commercio prodotti ittici e molluschi
clam Soc. Coop.
Finpesca
almar

WP3. Miglioramento genetico di molluschi

***Perkinsus olseni*, il principale patogeno della vongola**

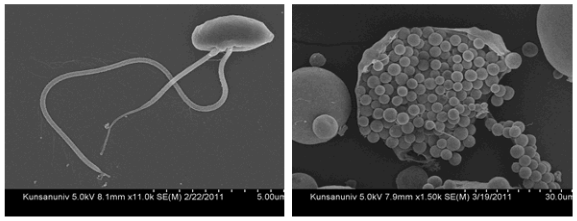


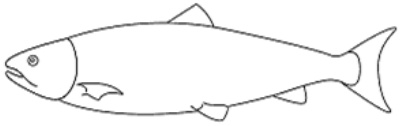
Fig. 1. Zoospore (left) and merozoites (right)of *Perkinsus olseni*.

- **Prevalenza alta in zone con temperature e salinità elevate.**
- **Infezione inizia nelle branchie, creazione di noduli.**
- **↓ respirazione, riproduzione, crescita.**

Kim et al., 2012

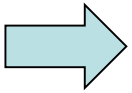
Come limitare le malattie nell'acquacoltura?

Come limitare l'impatto della malattia?



Soluzioni frequenti

- **Antibiotici/parassitari**
- **Vaccinazione**
- **Disinfezione**



Residui, contaminazione delle acque

Inefficace in invertebrati

Necessita strutture costose

Selezione genetica: **sfrutta la variabilità naturale tra individui di una specie per migliorare un carattere di interesse (crescita, colore, resistenza…)**

Obiettivo: valutare il potenziale per il miglioramento della crescita e la resistenza al patogeno *Perkinsus olseni* tramite la selezione genetica

- Esiste una **base genetica** per la resistenza e la crescita nella vongola?

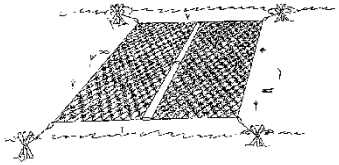
Piano sperimentale

53♀ 57♂

X

F1 *(popolazione sperimentale)*

15mm



1 anno in campo

Misure di **caratteri di interesse**

- Peso totale
- Peso del guscio
- Peso del tessuto
- Dimensioni del guscio
- Livello di infezione

Assegnazione di parentela

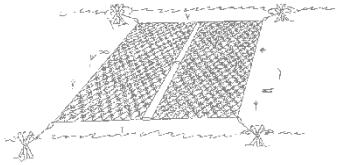
Piano sperimentale

53♀ 57♂

X

F1 *(popolazione sperimentale)*

15mm



1 anno in campo

Stima di **parametri genetici** della **crescita** e la **resistenza** al *Perkinsus*

Assegnazione di parentela

Misure di **caratteri di interesse**

- Peso totale
- Peso del guscio
- Peso del tessuto
- Dimensioni del guscio
- Livello di infezione

Risultati

	Ereditabilità (h^2)
Peso totale	23%
Lunghezza guscio	29%
Altezza guscio	25%
Spessore guscio	30%
Peso del tessuto	19%
Livello di infezione *Perkinsus olseni*	52%

Quanto la variabilità di un carattere è associato a fattori genetici

Valore tra 0 (non genetico) e 1 (genetico)

Risultati

	Ereditabilità (h^2)
Peso totale	23%
Lunghezza guscio	29%
Altezza guscio	25%
Spessore guscio	30%
Peso del tessuto	19%
Livello di infezione *Perkinsus olseni*	52%

Valori medi per le misure legate alla crescita -> **miglioramento possibile** tramite la selezione

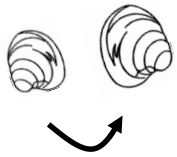
Risultati

	Ereditabilità (h^2)
Peso totale	23%
Lunghezza guscio	29%
Altezza guscio	25%
Spessore guscio	30%
Peso del tessuto	19%
Livello di infezione *Perkinsus olseni*	52%

Valori medi per le misure legate alla crescita -> miglioramento possibile tramite la selezione

Simulazione del miglioramento del peso totale:

$h^2_{\text{peso totale}}$ 23% **X** **Selezioniamo il 5% degli animali che crescono di più** **=**



+14.5%

Media del peso totale

Risultati

	Ereditabilità (h^2)
Peso totale	23%
Lunghezza guscio	29%
Altezza guscio	25%
Spessore guscio	30%
Peso del tessuto	19%
Livello di infezione *Perkinsus olseni*	52%

Stima alta per il livello di infezione -> candidato con **forte potenziale per la selezione**

Risultati

	Ereditabilità (h^2)
Peso totale	23%
Lunghezza guscio	29%
Altezza guscio	25%
Spessore guscio	30%
Peso del tessuto	19%
Livello di infezione *Perkinsus olseni*	52%

→ Stima alta per il livello di infezione -> candidato con forte potenziale per la selezione

Interazioni genetiche tra i caratteri da selezionare: come risponderà la crescita ad una selezione per la resistenza, e vice-versa ?

Risultati

Correlazioni genetiche

	Lunghezza	Altezza	Spessore	Peso tessuto	Livello di infezione *Perkinsus olseni*
Peso totale	0.90	0.76	0.97	0.84	-0.26
Lunghezza		0.81	0.80	0.79	0.16
Altezza			0.87	0.90	-0.15
Spessore				0.86	-0.35
Peso tessuto					-0.14

Buona correlazione genetica tra caratteri morfologici

*La selezione sullo **spessore del guscio avrebbe un effetto positivo sul peso totale** e del tessuto*

Risultati

Correlazioni genetiche

	Lunghezza	Altezza	Spessore	Peso tessuto	Livello di infezione *Perkinsus olseni*
Peso totale	0.90	0.76	0.97	0.84	-0.26
Lunghezza		0.81	0.80	0.79	0.16
Altezza			0.87	0.90	-0.15
Spessore				0.86	-0.35
Peso tessuto					-0.14

Nessuna correlazione genetica tra caratteri morfologici e livello di infezione

*La selezione per la crescita non migliora la resistenza, però **entrambi caratteri possono essere selezionati contemporaneamente** senza rischiare un effetto negativo*

Conclusioni

- La stima di ereditabilità per i caratteri di crescita e di resistenza al *Perkinsus* suggerisce l'esistenza di una **base genetica**, permettendo il miglioramento di questo caratteri tramite la selezione.

- La crescita e la resistenza sembrano **geneticamente indipendenti**, quindi un futuro programma di selezione potrebbe includere entrambi senza rischio.

- **Forte potenziale** per il miglioramento di questi caratteri di interesse tramite lo **sviluppo di un programma di selezione.**

Collaboratori

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Azienda Varagnolo KappaSA

Stazione Idrobiologica di Chioggia

SYSAAF

Satmar Naturellement...
www.satmar.fr

Grazie della vostra attenzione.

800 ANNI 1222 • 2022

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA