Utilizzo di idrolati ad attività antivirale nella depurazione di ostriche

L. Cozzi¹, T. Vicenza¹, R. Battistini², C. Masotti², E. Suffredini¹, S. Di Pasquale¹, S. Maccaroni¹, C. Ercolini², L. Serracca²

¹) Istituto Superiore di Sanità - Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Laboratorio Nazionale di Riferimento per i virus negli alimenti - Roma.

²) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - La Spezia.

Keywords: Norovirus, idrolati, molluschi bivalvi, depurazione

Introduzione

Le ostriche sono organismi filtratori capaci di concentrare microrganismi patogeni dall'ambiente acquatico e l'abitudine, ampiamente diffusa, di consumare questi molluschi crudi, espone il consumatore al rischio di gastroenterite. Tra i principali agenti patogeni sono annoverati i norovirus (NoV) che, nel 2019, hanno causato 457 epidemie in tutta Europa, secondo il summary report dell'EFSA [1]. Le attuali strategie di depurazione, funzionali alla rimozione del microrganismo indicatore di sicurezza microbiologica, *E. coli*, prevedono la permanenza dei molluschi in vasche dedicate per 18-24h, ma non sembrano essere efficaci nel processo di rimozione dei NoV, a causa dell'interazione di questi patogeni con particolari ligandi, presenti nei tessuti dell'ostrica. Sebbene alcuni studi suggeriscano la possibilità di prolungare i tempi di depurazione, un approccio alternativo, potrebbe essere dato dall'aggiunta, nelle vasche di depurazione, di sostanze naturali con potere antimicrobico, come oli essenziali o idrolati [2,3,4,5].

In questo studio si vuole valutare l'azione antivirale esercitata da idrolati ottenuti da *Thymus serpyllum*, *Thymus vulgaris* e *Citrus limon* sul norovirus murino (MNV-1), usato come surrogato dei norovirus umani, e testare il loro utilizzo in un processo di depurazione condotto su ostriche sperimentalmente contaminate.

Summary

Oysters are filtering organisms capable of concentrating pathogenic microorganisms from the surrounding waters and, the widespread habit of consuming raw shellfish exposes the consumers to the risk of gastroenteritis. Relevant pathogens associated to bivalves are noroviruses (NoV) which, in 2019, caused 457 outbreaks across Europe, according to EFSA's summary report on zoonoses. The current purification strategies target the indicator micro-organism *E. coli*, and envision the permanence of the shellfish in dedicated tanks for 18-24h, but seem to be less effective in removing NoV, due to the interaction of these pathogens with particular ligands, present in the oyster's tissues. Although some studies suggest the possibility of prolonging the purification times, an alternative approach could be given by the addition of natural substances with antimicrobial activity, such as essential oils or hydrolates, during the depuration treatment. The aim of this study is the evaluation of the antiviral activity of hydrolates derived from *Thymus serpyllum*, *Thymus vulgaris* and *Citrus limon*, against murine norovirus (MNV-1), used as a surrogate for human norovirus, and their use in a depuration process conducted on experimentally contaminated oysters.

Materiali e metodi

Il norovirus murino (MNV-1) è stato replicato sulla linea cellulare RAW 264.7, permissiva per questo virus e in grado di mostrare l'effetto citopatico indotto dall'infezione.

Azione antivirale degli idrolati: Soluzioni in DMEM di ciascun idrolato a diversa concentrazione (0.0125%, 0.025%, 0.05%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2% v/v) sono state testate sulla linea cellulare e non è stato evidenziato alcun effetto citotossico. Le concentrazioni più alte (1% e 2%) sono state scelte per trattare una sospensione di MNV-1 dal titolo di 2.14×10^5 TCID₅₀/ml. Un'aliquota del virus trattato è stata immediatamente congelata a -80°C (t=0), mentre un'altra aliquota è stata congelata dopo aver proseguito il trattamento a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) fino a 24h (t=24h). Aliquote di virus non trattato e soluzioni di ciascun idrolato mantenute nelle medesime condizioni del virus trattato sono state usate, rispettivamente, come controlli nell'esperimento. La diminuzione dell'infettività virale è stata determinata confrontando il titolo del virus trattato e non trattato con ciascun idrolato.

Le titolazioni sono state condotte in piastre da 24 pozzetti, incubate a 37 °C in presenza del 5% di CO₂.

Azione degli idrolati nei processi di depurazione: Le ostriche utilizzate per il trattamento di depurazione sono state fatte acclimatare per 24h in una vasca con 30 litri di acqua di mare, mantenuta ad un intervallo di 19-20°C e areata mediante l'utilizzo di una pompa per acquari. Le ostriche sono state poi trasferite in vasche da 5 litri di acqua di mare (4 ostriche/vasca) sperimentalmente contaminata con 100 µl di una sospensione di MNV-1 (2.14×10^6 TCID₅₀/ml) per 4h e sono state successivamente spostate in vasche contenenti acqua di mare pulita, a cui è stato aggiunto l'idrolato di *T. serpyllum* a concentrazione 1%. Parallelamente, è stato prelevato un campione di ostriche come controllo al tempo zero (t=0 di depurazione), per stabilire l'entità della contaminazione. Il trattamento di depurazione è stato condotto per 24h (t=24h di depurazione) ed un prelievo intermedio è stato fatto dopo 3h (t=3h di depurazione). Per verificare l'efficacia dell'idrolato, lo stesso

trattamento di depurazione è stato eseguito in vasche senza aggiunta di idrolato. I campioni di ostriche sono stati sottoposti alla seguente estrazione: 2g di epatopancreas sono stati omogenizzati in tampone glicina 1:1 (0.05 M, pH 9.2) per 30 min e centrifugati a 8000 $\times g$ per 15 min a 4 °C. Gli omogenati sono stati trattati con una soluzione PEG-NaCl (1:4), posti in agitazione a 120 rpm per 2h a 4 °C e poi centrifugati a 10000 $\times g$ per 30 min a 4 °C. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 2 ml di DPBS e trattato poi con cloroformio al 30%. La miscela ottenuta è stata agitata mediante vortex e centrifugata a 3000 $\times g$ per 5 min a 4 °C, raccogliendone il surnatante. La procedura è stata ripetuta sullo stesso pellet e il surnatante totale (2ml) è stato trattato con cloroformio al 30% e centrifugato a 3000 $\times g$ per 5 min a 4°. I campioni sono stati poi incubati con una soluzione di antibiotico/antimicotico 1:40 per 24h a 4°C e successivamente per altre 2h a 37°C, prima di essere analizzati mediante titolazione su cellule RAW.

Risultati e discussione

Lo stock virale MNV-1 non trattato ha mostrato un decadimento naturale dell'infettività durante le 24 h di incubazione a 20 ± 2 °C, con una riduzione del titolo infettivo di 1.2 log TCID₅₀/ml. L'aliquota di MNV-1 trattata con una soluzione di idrolato di *C. limon* all'1% ha mostrato un'immediata riduzione (t=0) dell'infettività di MNV-1 di 0.9 log TCID₅₀/ml, seguita da un'ulteriore riduzione di 1.2 log TCID₅₀/ml dopo 24 h, ottenendo una riduzione complessiva di 2.1 ± 0.4 log. Una diminuzione simile è stata ottenuta anche con l'idrolato di *C. limon* al 2% (inattivazione immediata di 1.1 log TCID₅₀/ml, seguita da un'ulteriore riduzione di 1.2 log). Al contrario, i trattamenti con gli idrolati di *T. vulgaris* e *T. serpyllum* hanno evidenziato una più alta riduzione immediata dell'infettività virale: riduzione di 1.9 e 2.0 log TCID₅₀/ml con l'idrolato di *T. vulgaris* all'1% e al 2% rispettivamente, mentre, alle stesse concentrazioni, l'idrolato di *T. serpyllum* ha provocato una riduzione dell'infettività di MNV-1 di 2.0 e 1.8 log TCID₅₀/ml. Prolungando l'incubazione a 24h, sono state ottenute variazioni non significative dell'infettività virale. Questi risultati mostrano, in sintesi, che gli idrolati di *T. vulgaris* e *T. serpyllum* esercitano un effetto antivirale immediato maggiore di quello esercitato dal *C. limon*, indipendentemente dalla concentrazione usata. Quindi una prova preliminare di trattamento di depurazione è stata condotta utilizzando l'idrolato di *T. serpyllum* all'1%.

I risultati ottenuti, valutando l'infettività virale, hanno mostrato un bioaccumulo del MNV-1 nelle ostriche di 320 TCID₅₀/ml (t=0). Lo stesso titolo virale è stato riscontrato analizzando i campioni sottoposti a depurazione per 3h e per 24h, sia in presenza che in assenza dell'idrolato di *T. serpyllum*. Tuttavia, in ragione della natura preliminare di questi risultati, ulteriori indagini verranno effettuate per valutare l'effetto degli altri estratti e di diverse concentrazioni di idrolato.

In conclusione, i dati in vitro ottenuti mostrano una potenziale efficacia dell'uso di queste sostanze naturali nel settore della sicurezza alimentare correlata al consumo di ostriche crude. Ulteriori esperimenti in vivo sono però necessari per confermarne l'effettiva attività antivirale in un processo di depurazione.

Acknowledgment: This research was funded by the Italian Ministry of Health, Ricerca Corrente grant number IZS PLV 13/19.

Bibliografia

[1] EFSA 2019. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA Journal 2021;19(2):6406

[2] Pilotto RM, Souza DSM, Barardi CRM. 2019. Viral uptake and stability in *Crassostrea gigas* oysters during depuration, storage and steaming. Marine Pollution Bulletin, 149 (2019) 110524:1-7.

[3] K. Jakubczyk, A. Tuchowska, K. Janda-Milczarek, 'Plant Hydrolates – Antioxidant Properties, Chemical Composition and Potential Applications', Biomed. Pharmacother. 2021, 142, 112033. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112033.

[4] D'Amato S, Serio A, Chaves López C, Paparella A. Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications, Food Control, 86: 126-137, 2018.

[5] Kaewprom K, Chen YH, Lin CF. Antiviral activity of *Thymus vulgaris* and *Nepeta cataria* hydrosols against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Thai J Vet Med, 47(1): 25-33, 2017.