

ATTI DEL  
II° CONVEGNO NAZIONALE SIRAM  
Società Italiana di Ricerca Applicata alla Molluschicoltura

28 - 29 novembre 2013

Centro Ricerche Marine  
Cesenatico (FC), Viale A. Vespucci 2

---

Con la collaborazione di:



---

Segreteria Scientifica:  
Dott. Giuseppe Arcangeli  
Dott.ssa Manuela Dalla Pozza



# PROGRAMMA

Il Convegno Nazionale  
Società Italiana di Ricerca Applicata  
alla Molluschicoltura

# Trasparenza tra produttori autorità di controllo e consumatori

**29 novembre 2013**

**Cesenatico (FC)**

Centro Ricerche Marine, Viale A. Vespucci 2

# Venerdì 29 novembre 2013

## 9:00 - 9:30

Saluti delle Autorità

Conferimento della qualifica di Socio onorario SIRAM al Prof. Remigio Rossi, Università di Ferrara

## 9:30 - 10:00

Esperienza della grande distribuzione nella vendita di bivalvi

Valentina Tepedino

Direttore Eurofishmarket

## 10:00 - 10:30

Esperienza della ristorazione

Paolo Fagioli

Veterinario consulente settore ristorazione

## 10:30 - 11:00

Conservazione e prodotti innovativi a base di molluschi bivalvi

Marisa Di Matteo

Dipartimento di Ingegneria Industriale, Università di Salerno

## 11:00 - 11:30 *coffee break*

## 11:30 - 12:00

La corretta informazione del consumatore nel consumo di bivalvi

Stefania Crovato

Osservatorio sulle esigenze del cliente, IZSVE

## 12:00 - 12:30

Molluschi bivalvi: prodotto biologico?

Pino Lembo

Presidente Comitato permanente di esperti sull'agricoltura biologica (EGTOP), Commissione Europea

## 12:30 - 14:00 *Pranzo*

## 14:00 - 14:30

Esperienza di campionamento congiunto ASL e Produttori in Veneto

Piergiorgio Fumelli

Servizi veterinari, Az. ULSS 19 Adria

## 14:30 - 15:00

Esperienza di analisi con metodi rapidi in regime di autocontrollo per biotossine in FVG

Monia Cocchi

Laboratorio diagnostica clinica Sezione di Udine, IZSVE

**15:00 - 15:30**

Esperienza di analisi con metodi rapidi per colimetrie

Mario Latini

Centro di Referenza Nazionale per il Controllo Microbiologico e Chimico dei Molluschi Bivalvi Vivi, IZSUM

**15:30 -16:00**

Come uniformare a livello nazionale il controllo dei bivalvi

Giuseppe Lediani

Ufficio III Igiene prodotti di origine animale, Ministero della Salute

**16:00 - 16:30**

Discussione finale

**16:30 - 17:00**

Test di apprendimento ECM e compilazione scheda di gradimento

# POSTER PRESENTATI

## **Identificazione genetica di molluschi bivalvi freschi e conservati mediante Pyrosequencing™**

Abbadi M., Marciano S., De Battisti C., Civettini M., Tosi F., Cattoli G., Arcangeli G.

## **Risultati del piano di monitoraggio per il controllo delle patologie dei molluschi nel periodo 2007-2012**

Bille L., Ceolin C., Dalla Pozza M., Toson M., Trolese M., Arcangeli G.

## **FVGgis: il portale webgis veterinario per la molluschicoltura del Friuli Venezia Giulia**

Bille L., Pelagatti L., Trolese M., Ustulin P., Mazzucato M., Cocevari M., Cobianchi M., De Vescovi P., Bortolotti L., Ferrè N., Dalla Pozza M., Palei M.

## **Monitoraggio di *V.splendidus* e *V.aestuarianus* in differenti specie di molluschi bivalvi**

Caburlotto G1., Zambon M.1, Travers M.A.2, Arcangeli G1.

## **Monitoraggio microbiologico delle zone di raccolta delle vongole (*Chamelea gallina*) nella Regione Marche: valutazione delle differenze tra i risultati delle diverse stazioni di campionamento all'interno delle singole zone classificate**

Ciccarelli C., Di Trani V., Semeraro A. M.

## **Indagine sull'interazione *Crassostrea gigas* – OsHV-1 $\mu$ var in un allevamento in ambiente lagunare del Mediterraneo centro-occidentale**

Civettini M., Pais A., Saba S., Pinna M.G., Gorla A., Magnabosco C., Zambon M., Pretto T., Arcangeli G.

## **Applicazione di tecnologie molecolari per il monitoraggio di acque marine, sedi di impianti di miticoltura in Sicilia, interessate da fioriture algali di *Alexandrium* spp**

Costa A.1, Giacobbe M.G.2, Gangemi E.2, Penna A.3, Borzi S.2, Alio V.1, Pisano P. 1, Rabito A. 4, Di Noto A.M. 1

## **Indagine Sanitaria: l'esperienza dell'Area Vasta n. 4 di Fermo–ASUR Marche**

Gentili V., Angellotti A., Fichera S.

## **Esperienza di verifica della funzionalità di un impianto di depurazione a circuito chiuso su mitili di provenienza spagnola**

Giulini G., Maffei M., Micci C., Prioli C., Villan G., Fagioli P.

## **30 anni di ricerca e sperimentazione in ostricoltura: una selezione della bibliografia italiana**

Pellizzato M., Prioli G., Rossetti E., Turolla E., Zentilin A.

## **Il monitoraggio della qualità microbiologica delle aree di produzione dei molluschi bivalvi nell'ambito della Direttiva sulla Strategia Marina**

Petochi T.1, Gazzea N.1, Di Marco P.1, Latini M.2, Barchiesi F.2, Conte A.3, Barile N.3, Caruso G.4, Zaccone R.4, Cavallo R. A.4, Croci L.5, Mancini L.5, Marino G.1

## **Uso di strumenti geostatistici per la valutazione di uno stock di vongole filippine (*Venerupis philippinarum*; Adams & Reeve, 1850) in un'area nursery della laguna di Venezia**

Ponis E., Cacciatore F., Boscolo Brusà R.,

**Gestione della positività per acido okadaico nelle vongole veraci della sacca di goro**

Rubini S., Boschetti L., Baldi D., Lorito S., Padovani A., Bolognesi E., Fedrizzi G., Menotta S., Pompei M., Milandri A.

**Ostreid herpes virus-1  $\mu$ var: un rischio per l'ostricoltura**

Serracca L., Arcangeli G., Rossini I., Battistini R., Terarolli A., Imberciadori M., Varrella P., Ercolini C.

**Ricerca industriale applicata ai sistemi per la depurazione dei molluschi bivalvi. Risultati di una collaborazione pluriennale fra università e impresa**

Serratore P., Ciulli S., Bignami G., Zavatta E.

**Il trapianto attivo di mitili per la valutazione dello stato di contaminazione del mar Mediterraneo**

Scarpato A., Romanelli G., Giovanardi F., Giovanardi O.

**In-house validation of a colony hybridization method for the enumeration of total and potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood**

Suffredini E., Cozzi L., Ciccaglioni G., Croci L.

**Ostriche responsabili di gastroenterite da Norovirus: valutazione dei livelli di contaminazione nel tempo in lotti provenienti dalla stessa area**

Suffredini E., Serracca L., Ercolini C., Cozzi L., Croci L.

**Risposta immunitaria di *Chamelea gallina* (L. 1758) in funzione della taglia.**

Tiscar P.G., Mosca F.

**Inattivazione di norovirus murino mediante cottura tradizionale in vongole (*ruditapes philippinarum*) infettate sperimentalmente**

Toffan A., Brutti A., De Pasquale A., Cappelozza E., Pascoli F., Cigarini M., Di Rocco M., Terregino C., Arcangeli G.

**Tecniche di reintroduzione della specie *Nassarius mutabilis* L. in alcune aree adriatiche**

Troli E., Felici A., Pellizzato M.



# **RELAZIONI AD INVITO**



## ESPERIENZE NELLA RISTORAZIONE

*Tepedino V.<sup>1</sup>, Fagioli P.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Direttore Eurofishmarket

<sup>2</sup> Veterinario consulente settore ristorazione

Eurofishmarket Snc collabora da anni con numerose aziende specializzate nella vendita alla ristorazione collettiva ed alla ristorazione medio alta per consulenze specifiche utili all'aggiornamento su problematiche igienico sanitarie legate ai molluschi bivalvi, sulla normativa in vigore e sulle novità offerte dal mercato.

Le criticità principali evidenziate nel mondo della ristorazione sono in linea generale determinate dalla scarsa possibilità degli addetti ai lavori di aggiornarsi in materia di novità normative e problematiche di mercato poiché non esiste attualmente una associazione di categoria utile allo scopo. Numerosi sono i ristoratori non a conoscenza del divieto di acquistare i molluschi che non sono vivi e vitali così come che devono essere etichettati come previsto dalla normativa.

Ancora c'è scarsa conoscenza del concetto di depurazione e stabulazione ed molluschi bivalvi vengono spesso messi a decantare nei lavandini con acqua e sale per meglio eliminare la sabbia presente nel liquido intervalvare. Molti ristoratori acquistano questi prodotti da intermediari di fiducia.

Dalla nostra esperienza, anche nelle località di mare e di acqua dolce, meno del 10% acquista direttamente dai pescatori o dai consorzi. I prodotti subiscono nella filiera un importante ricarico economico ma ridurre la filiera è notevolmente complesso soprattutto a causa della difficoltà dei produttori di organizzarsi a livello logistico per la distribuzione alla rete ristorativa. Anche nel settore della ristorazione collettiva e non la maggioranza dei molluschi bivalvi è di importazione e spesso arriva già lavorata (in particolare vongole del pacifico, cappesante del pacifico, cozze cilene, ecc). I molluschi destinati a questo mercato arrivano per oltre il 60% congelati.

Numerose sono le segnalazioni degli Organi addetti al Controllo sulle non conformità in merito alla non segnalazione sul menù di prodotti congelati proposti come freschi e di prodotti esteri proposti per nostrani.

# LA CORRETTA INFORMAZIONE SUL CONSUMO DI BIVALVI

Crovato S.

IZSVE. Osservatorio sulle esigenze del cliente

Negli ultimi anni il settore ittico ha subito numerose trasformazioni non solo rispetto al profilo produttivo ma anche riguardo ad aspetti economici, sociali e ambientali. Si è assistito, infatti, a un tendenziale aumento dei consumi di pesce e molluschi a cui ha fatto seguito una maggiore diversificazione delle richieste dei consumatori (Trevisan e Mauracher, 2005). All'interno di tali mutamenti il ruolo del consumatore diviene sempre più rilevante nella gestione del rischio alimentare. Nonostante i dati di Eurobarometro (2010) indichino che in Europa negli ultimi 30 anni vi sia stato un miglioramento del livello di preparazione degli individui sulle questioni riguardanti le scienze bio-mediche, il consumatore risulta ancora poco informato sull'origine e sulla gestione delle tossinfezioni alimentari. Sul territorio nazionale sono presenti numerose attività di controllo sanitario dei molluschi, tuttavia l'informazione riguardante i rischi per la salute è spesso diffusa esclusivamente a livello esperto. Ad oggi le iniziative di comunicazione e prevenzione riguardanti i rischi legati al consumo di molluschi bivalvi e rivolte ai consumatori risultano ancora limitate.

Sulla base di tali premesse l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie presenta il progetto "Applicazione del nominal group technique (NGT) per la costruzione di una comunicazione del rischio destinata agli enti sanitari istituzionali competenti in materia di sicurezza alimentare. Il caso dei rischi legati al consumo di molluschi bivalvi", finanziato dal Ministero della Salute, nell'ambito della RC 02/11. Il progetto, grazie alle competenze dell'IZVE in campo sanitario nel settore ittico e quelle sviluppate nell'ambito della ricerca sociale (Tiozzo, 2011, Trifiletti, Crovato 2012; Mascarello, Crovato 2014), intende definire e validare un modello sperimentale di comunicazione efficace, applicabile al settore della sicurezza alimentare, e riproducibile nell'ambito di tutto il territorio nazionale. Lo studio intervento presentato e realizzato dall'Osservatorio sulle esigenze del cliente dell'IZSVE, si caratterizza come un'efficace strategia per la tutela della salute pubblica dei consumatori, realizzata attraverso lo sviluppo di azioni rivolte a colmare i gap conoscitivi sui rischi derivanti dal consumo dei molluschi bivalvi.

## Bibliografia

1. Eurobarometro (2010). *Rischi associati agli alimenti*. Eurobarometro, speciale 354. Dicembre 2010
2. Mascarello G., Crovato S., Pinto A., Gallina A., Siegrist M., Ravarotto L., (2014). Communicating chemical risk in food to adolescents. A comparison of web and print media, *Food Control*, 35, 1, 407-412, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-120
3. Tiozzo B., Mari S., Magauidda P., Arzenton V., Capozza D., Neresini F., Ravarotto L. (2011). *Development and evaluation of a risk-communication campaign on salmonellosis*. *Food control*, 22, 109-117
4. Trevisan G., Mauracher C., (2005). *Indagine sul consumo di prodotti ittici nell'Alto Adriatico. Esperienze di cooperazione nel settore ittico dell'Alto Adriatico*. Osservatorio socio economico della pesca nell'Alto Adriatico, 35-40
5. Trifiletti E., Crovato S., Capozza D., Visintin E. P., Ravarotto L., (2012). Evaluating the Effects of a Message on Attitude and Intention To Eat Raw Meat: Salmonellosis Prevention, *Journal of Food Protection*, 17 (2), pp. 394 – 399

## MOLLUSCHI BIVALVI: PRODOTTO BIOLOGICO?

*Lembo P.*

COISPA Tecnologia & Ricerca, Bari

I molluschi bivalvi, e le altre specie che non sono alimentate dall'uomo ma si nutrono di plancton naturale, per essere conformi alle norme europee sull'acquacoltura biologica, devono ottenere il soddisfacimento di tutti i bisogni nutrizionali dalla natura, tranne nel caso del seme allevato negli schiuditoi.

Inoltre, i molluschi bivalvi devono essere allevati in acque che rispondono ai criteri previsti per le zone di classe A o B di cui all'allegato II del regolamento (CE) n. 854/2004. Le zone di allevamento devono essere di qualità ecologica elevata secondo quanto definito dalla direttiva 2000/60/CE e, in attesa dell'attuazione della stessa, di qualità equivalente ad acque designate ai sensi della direttiva 2006/113/CE.

La molluschicoltura può essere praticata nello stesso specchio d'acqua in cui sono praticate l'itticoltura e l'alghicoltura biologiche in un sistema di policoltura documentato nel piano di gestione sostenibile.

Può essere utilizzato seme selvatico di molluschi bivalvi raccolto al di fuori dell'unità di produzione e proveniente da:

- a) colonie a rischio di sopravvivenza nelle condizioni climatiche invernali o in soprannumero rispetto al fabbisogno, oppure
- b) insediamenti naturali di novellame su collettori.

Gli operatori conservano, a fini di tracciabilità, i documenti giustificativi attestanti la data, il luogo e le modalità di raccolta del seme selvatico.

Gli organismi incrostanti sono rimossi a mano o con mezzi fisici ed eventualmente restituiti al mare a debita distanza dal sito di coltura. Una sola volta durante il ciclo di produzione, i molluschi bivalvi possono essere trattati con una soluzione di calce per combattere gli organismi incrostanti competitivi.

La molluschicoltura di fondo è autorizzata a condizione che non vengano arrecati danni rilevanti all'ambiente nei siti di coltura e di raccolta. L'operatore è tenuto a dimostrare l'impatto ambientale minimo fornendo all'autorità o all'organismo di controllo uno studio e una relazione sull'area interessata. La relazione è aggiunta, in quanto capitolo distinto, al piano di gestione sostenibile.

# ESPERIENZA DI CAMPIONAMENTO CONGIUNTO ASL E PRODUTTORI IN VENETO

Fumelli P.

Servizi veterinari, Az. ULSS 19 Adria

## Premessa

Il Regolamento UE n. 854/04 nell'Allegato II, Capo II, lettera B, p.to 5 stabilisce che: " Il prelievo di campioni ai fini dell'analisi delle tossine nei molluschi deve avere, come regola generale, cadenza settimanale nei periodi in cui è consentita la raccolta"[ ...]. E' l'Autorità Competente (AC) ad effettuare tale campionamento. Considerate le modalità di distribuzione delle positività per presenza di biotossine algali, che spesso si rinvencono con una diffusione non omogenea nei vari allevamenti di mitili siti lungo il litorale, i piani di monitoraggio in Veneto prevedono che il campionamento settimanale sia basato sul singolo allevamento come unità fondamentale di monitoraggio.

L'impegno del Servizio Veterinario quale AC designata al campionamento, risulta spesso troppo gravoso rispetto alle reali disponibilità di mezzi e personale in dotazione e di conseguenza risulta estremamente difficile garantire la frequenza MINIMA di campionamento per la ricerca di biotossine algali negli attuali 30 allevamenti a mare e i numerosi ambiti lagunari (laguna di Venezia e Sacca degli Scardovari) destinati alla mitilicoltura.

Ciononostante ad oggi la più efficace azione di prevenzione per ridurre il rischio di immissione in commercio di prodotto "contaminato" resta il costante, frequente e più dettagliato possibile monitoraggio delle zone di produzione.

Nel tentativo di dare garanzie con l'azione di campionamento sulle zone di produzione di Molluschi Bivalvi vivi (MBV) nel rispetto dei dettami della normativa comunitaria in una situazione di sempre maggior deficienza di risorse disponibili all'Autorità Competente, da un paio di anni è stata avviata in Veneto una procedura sperimentale di esecuzione del campionamento per la ricerca di biotossine in collaborazione con gli Operatori del Settore Alimentare (OSA).

## Procedura

La procedura è attualmente applicata al monitoraggio degli allevamenti di mitili (*M. galloprovincialis*) per la ricerca di biotossine algali e prevede:

- 1 Incontro formativo con gli OSA. Si svolge ogni anno con gli operatori prima dell'inizio della campagna di raccolta (febbraio – marzo). Durante l'incontro viene illustrata la procedura soprattutto nella parte di competenza dell'allevatore e vengono decise le modalità logistiche del prelievo (p.to sbarco e giorno di campionamento);
- 2 Identificazione e georeferenziazione delle resti da campionare. Dopo l'incontro formativo e prima dell'inizio dell'attività di raccolta, personale del Servizio Veterinario esegue sull'impianto di produzione un sopralluogo durante il quale identifica con propri idonei sigilli antimanomissione numerati un sufficiente numero di resti di mitili (30 - 50) da campionare durante il periodo di raccolta. L'identificazione comprende la georeferenziazione e l'acquisizione di uno schema dell'allevamento con indicata l'ubicazione delle resti numerate. In questa fase viene acquisita formale dichiarazione scritta del Produttore di adesione alla procedura sperimentale e di osservanza delle modalità operative descritte nel protocollo operativo;
- 3 Informativa. Durante la campagna di monitoraggio il Servizio Veterinario (SV) può comunicare all'impresa, con il minimo preavviso possibile compatibile con la fattibilità del prelievo (con mail, fax, telefonata o sms), il numero della resta che sarà oggetto di campionamento. Eccezionalmente, in caso di perdita della resta o di impossibilità di reperirla nell'impianto per avverse condizioni meteo-marine, l'OSA concorderà con il Servizio Veterinario la consegna di una resta con numerazione diversa da quella richiesta;
- 4 Campionamento. Il giorno e l'ora prestabiliti l'OSA consegna al punto sbarco la resta contrassegnata per l'esecuzione del campione che viene completato dall'operatore del Servizio Veterinario. Quest'ultimo verifica l'integrità dei sigilli e preleva un campione rappresentativo di mitili sottocampionando da tre livelli di profondità della resta (testa, corpo centrale e coda).
- 5 Verifiche: periodicamente (proposta: almeno 3 volte all'anno) il Servizio Veterinario esegue delle uscite in barca presso i vivai per verificare la corretta gestione delle resti identificate redigendo apposito verbale di sopralluogo.
- 6 Integrazione delle resti da campionare. Ammessa la possibilità che soprattutto condizioni meteo marine avverse possano comportare la perdita delle resti identificate o degli stessi sigilli di identificazione, a

necessità possono essere identificate nuove reste apponendo su queste nuovi sigilli e aggiornando lo schema/registo dell'impianto.

In caso di campionamenti successivi a positività, eseguiti per la riapertura degli impianti, il prelievo viene svolto presso l'impianto di allevamento direttamente dal personale del Servizio Veterinario.

### **Conclusioni**

Negli anni 2011 e 2012 il Servizio Veterinario dell'Az.ULSS 19 di Adria (RO) ha testato, in via sperimentale, la procedura al fine di valutarne l'efficacia constatando che:

- Il numero di campionamenti eseguiti per biotossine ha registrato un trend positivo di crescita dovuto alla riduzione dei tempi di campionamento;
- Il numero di provvedimenti di sospensione temporanea della raccolta di mitili per positività a biotossine algali è significativamente aumentato (da una media di 4,5 provvedimenti all'anno registrata nel quadriennio 2007-2010, si è passati a 20 provvedimenti nel 2011).
- Non si sono rilevate non conformità sull'applicazione della procedura di campionamento da parte degli allevatori interessati. Anzi, quest'ultimi hanno dimostrato una maggiore sensibilità alla problematica delle biotossine algali dimostrandosi disponibili ad una costruttiva collaborazione con l'autorità competente allo scopo di abbreviare i tempi di indagine, aumentare la capacità preventiva del piano di campionamento per evitare la messa in commercio di prodotto positivo alle biotossine riconoscendo in questo evento un reale pericolo per la salute pubblica e un ingente danno materiale e di immagine per le Imprese coinvolte.
- I contrassegni identificativi delle reste da campionare sono risultati sufficientemente resistenti mantenendosi integri e leggibili. Al contrario, si sono rivelati poco resistenti i sigilli con i quali i contrassegni sono stati legati alle reste: per questo si è ritenuto di rinforzare l'ancoraggio dei sigilli alle reste applicando ANCHE una fascetta di plastica inamovibile a supporto del sigillo antimanomissione dell'Az.ULSS.

L'aumento del numero di campioni eseguiti per biotossine algali derivante dall'applicazione della sopra descritta procedura può significativamente aumentare anche l'efficacia del piano di monitoraggio nel prevenire l'immissione in commercio di partite di MBV positive alle stesse biotossine.

Non si può non considerare che l'evoluzione della normativa comunitaria e nazionale relativa all'igiene della produzione, trasformazione, commercializzazione dei prodotti alimentari di origine animali, coinvolge sempre più gli OSA responsabilizzandoli per gli aspetti relativi alla sicurezza igienico sanitaria delle loro produzioni. L'AC, in quest'ottica, deve adottare procedure che tengano conto anche della collaborazione dell'OSA (come prospettato anche in fase di classificazione e monitoraggio dal Reg. CE n. 854/2004).

In conclusione si ritiene che l'AC, vincolata sempre di più dalle limitate risorse messe a propria disposizione, debba organizzare la propria attività in linea con gli obiettivi prefissati dalla normativa e nel rispetto di questa, unicamente aumentando l'efficienza della propria attività.

Si ritiene che i primi risultati ottenuti dall'applicazione sperimentale della procedura di campionamento per biotossine algali al p.to sbarco, si siano dimostrati coerenti con gli obiettivi prefissati dalla normativa.

## **ESPERIENZA DI ANALISI CON METODI RAPIDI IN REGIME DI AUTOCONTROLLO PER BIOTOSSINE IN FVG**

*Cocchi M.*

IZSVe. Sezione territoriale Udine

Presso la regione Friuli Venezia Giulia è attivo dal 2012 un protocollo di intesa tra le Autorità Competenti per i controlli veterinari e gli OSA.

Detto protocollo definisce altresì i criteri e le modalità operative per i controlli effettuati da parte degli OSA, in autocontrollo. Diversi sono i soggetti coinvolti, oltre a quelli sopracitati: Agenzia regionale per l'ambiente (ARPA), l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), il Servizio sicurezza alimentare, igiene della nutrizione e sanità pubblica veterinaria (Direzione Centrale Salute e protezione sociale, FVG).

Per quanto riguarda l'analisi in autocontrollo per la ricerca dell'acido okadaico si è ricorsi all'utilizzo di un metodo rapido, basato su un test ELISA. La collaborazione fra i vari soggetti menzionati permette che i risultati delle analisi, a disposizione entro poche ore dalla consegna del campione al laboratorio, vengano tempestivamente condivisi tra tutti.

L'utilizzo di una tecnica rapida ha consentito di avere risultati in tempi brevi, favorendo l'ottimizzazione delle risorse e aumentando l'efficacia della tutela della salute del consumatore.



## COME UNIFORMARE A LIVELLO NAZIONALE IL CONTROLLO DEI BIVALVI

*Lediani G.*

Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione Uff. III Ministero della Salute

Uniformare il settore dei molluschi bivalvi presuppone una risposta alle domande: perché uniformare, con quali strumenti, in che misura, cosa e chi, con riferimento alle autorità competenti e agli operatori del settore. La presentazione intende fare nella prima parte un breve excursus su quelli che sono i sistemi e le basi legali per l'indirizzo e coordinamento, a livello europeo da parte della Commissione e nazionale da parte del Ministero, per assicurare l'uniformità, l'efficacia e l'efficienza dei controlli sul settore sia al fine di garantire la salute che il mercato stesso. Nella seconda parte la presentazione affronta problematiche specifiche per cui si richiede l'armonizzazione nel settore dei molluschi bivalvi vivi.

La prima ragione è sicuramente quella di garantire la sicurezza alimentare, tuttavia rispondere agli obblighi comunitari è anche essenziale, per fini di sanitari, politici e commerciali. Gravi carenze non risolte in un settore da parte di uno stato membro possono condurre a misure di salvaguardia con grave danno per l'economia. I controlli Ufficiali e le procedure messe in atto dagli operatori al fine di garantire la sicurezza alimentare hanno un costo; una applicazione uniforme, nei limiti delle proprie autonomie, evita anche possibili turbative di mercato.

Al Ministero della salute, nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti, sono affidate prevalentemente le funzioni di programmazione, indirizzo e coordinamento.

La tutela della salute è materia concorrente tra stato e regioni. I rapporti tra stato e regioni sono stati condizionati dalla Legge n.3/2001 "Modifiche al titolo V della parte seconda della Costituzione". Il nuovo articolo 114 della Costituzione recita "La Repubblica è costituita dai Comuni, dalle Province, dalle Città metropolitane, dalle Regioni e dallo Stato". Per favorire la cooperazione tra l'attività dello Stato e quella delle Regioni e le Province Autonome la Conferenza Permanente tra lo Stato, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano opera nell'ambito della comunità nazionale ed è un organo operante presso la Presidenza del Consiglio dei Ministri, nel cui ambito le Regioni trovano tra di loro e con il Ministero competente le Intese/Accordi sulle norme di interesse generale. gli Accordi/Intese adottati sono atti non vincolanti che rappresentano una assunzione d'impegno da parte di tutte le Regioni.

Nell'ambito della CPSR, il Ministero della Salute svolge funzione di anello di congiunzione, costituendo l'elemento unificante al fine di consentire una uniforme applicazione dei Regolamenti del "Pacchetto Igiene". Il Ministero della Salute svolge la sua attività di coordinamento e d'indirizzo anche mediante la emanazione di note ministeriali indirizzate essenzialmente alle autorità competenti, associazioni, centri di referenza, laboratori nonché attraverso l'istituzione di tavoli tecnici.

Ancora un importante strumento del Ministero a questo fine è l'Audit. Gli audit svolti sui sistemi regionali di prevenzione in sicurezza alimentare e sanità pubblica veterinaria riguardano anche il settore dei molluschi bivalvi. Da notare come il sistema di audit sia un sistema a cascata, Commissione EU, Ministero, Regioni, AASSLL, OSA. Ricordiamo che possiamo ritrovare la definizione di audit nel regolamento (CE) 882/2004 come "un esame sistematico e indipendente per accertare se determinate attività e i risultati correlati siano conformi alle disposizioni previste, se tali disposizioni siano attuate in modo efficace e siano adeguate per raggiungere determinati obiettivi".

Per fornire alle autorità di controllo uno strumento efficace per lo scambio di informazioni sulle misure adottate per rispondere a seri rischi individuati negli alimenti e mangimi e materiali a contatto è stato messo in atto il sistema di allerta rapido per alimenti e mangimi RASSF. Presso la DGISAN si trova il punto di contatto italiano.

Le Amministrazioni coinvolte nell'assicurare la tutela della salute del consumatore, contrasto delle contaminazioni ambientali, in relazione alle produzioni agro-zootecniche, difesa delle produzioni nazionali, tutela della salute e del benessere animale sono molteplici e interessano anche Ministeri diversi. In riferimento ai citati obiettivi, le amministrazioni competenti, ivi compresi gli uffici del Ministero della Salute, collaborano all'attivazione dei necessari tavoli tecnici di confronto ed alla definizione di specifici piani congiunti di intervento, che saranno poi ricompresi nel documento di Programmazione annuale nazionale e rendicontati in sede di Relazione annuale al PNI (Piano Nazionale Integrato dei Controlli), al fine di monitorare il livello di raggiungimento degli obiettivi stabiliti.

La Commissione Europea, nel suo ruolo di guardiano del trattato comunitario, ha la responsabilità di assicurare che la legislazione comunitaria sulla sicurezza alimentare, salute degli animali e delle piante e benessere animale sia correttamente applicata e fatta rispettare. Come servizio della Commissione, il Food and Veterinary Office (FVO) gioca un ruolo importante nello svolgimento di questo compito.

L'FVO ha effettuato un audit in Italia dal 16 al 26 ottobre 2012 allo scopo di verificare che i controlli ufficiali sui molluschi bivalvi vivi, tra cui echinodermi, tunicati e gasteropodi marini siano effettuati in conformità ai requisiti della normativa UE. Dall'AUDIT sono scaturite numerose raccomandazioni. Molte di queste sono strettamente correlate e presuppongono un certo livello di armonizzazione nazionale del settore.

La prima raccomandazione richiede proprio che l'Autorità Centrale debba garantire che i controlli ufficiali di molluschi bivalvi vivi siano correttamente attuati dalle autorità regionali in tutte le regioni italiane. L'Autorità Centrale dovrebbe inoltre garantire un coordinamento efficiente ed efficace e la cooperazione tra le autorità come previsto dall'articolo 4.5 del regolamento (CE) n 882/2004. A questo scopo il Ministero della Salute ha disposto un "Tavolo tecnico di coordinamento" composto da 3 rappresentanti del Ministero della salute e da 5 rappresentanti delle Regioni/Province autonome.

Le autorità competenti devono garantire che i requisiti per quanto riguarda le indagini sanitarie del punto 6 del capitolo II dell'allegato II del regolamento (CE) 854/2004 siano presi in considerazione per la classificazione e, se necessario, per la riclassificazione delle aree. Le Regioni si sono impegnate a classificare tutte le nuove aree di produzione MBV ai sensi del reg. CE 854/2004 allegato II, capitolo II, lettera A; riclassificare le zone di produzione, stabulazione classificate dopo l'entrata in applicazione del reg. CE 854/2004 qualora non abbiamo tenuto in considerazione tutti i requisiti previsti; riclassificare tutte le aree classificate prima dell'entrata in applicazione della normativa comunitaria ai sensi del reg. (CE) 854/2004.

In generale viene rilevata dalla Commissione Europea, con una serie di raccomandazioni specifiche la necessità dell'Italia ad uniformarsi appieno a tutta una serie di disposizioni sul settore dei molluschi bivalvi che derivano dal pacchetto igiene.

Di non secondaria importanza, come risposta del Ministero, per soddisfare appieno le esigenze di controllo sul settore da parte delle autorità per i ruoli di propria competenza, vi è l'approntamento del nuovo sistema informativo ad integrazione del sistema SINVSA. Esso permetterà l'inserimento, il monitoraggio e la gestione in tempo reale dei campionamenti, risultati di analisi e stato sanitario delle aree di produzione.

In conclusione armonizzare il settore dei molluschi bivalvi a livello nazionale comporta uno sforzo congiunto e necessario di tutte le autorità coinvolte, laboratori e OSA per salvaguardare la sicurezza alimentare e l'economia del settore.

# **ABSTRACT POSTER**



# IDENTIFICAZIONE GENETICA DI MOLLUSCHI BIVALVI FRESCHI E CONSERVATI MEDIANTE PYROSEQUENCING™

*Abbadì M., Marciano S., De Battisti C., Civettini M., Tosi F., Cattoli G., Arcangeli G.*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

**Keywords:** PCR, bivalvi, pyrosequencing, frodi alimentari

## Introduzione

Il commercio di molluschi bivalvi ha registrato in questi ultimi anni un aumento sia in campo nazionale che internazionale con conseguente incremento delle frodi commerciali a carico di prodotti preparati e/o trasformati ove la lavorazione rende difficile l'identificazione corretta delle specie.

A seguito dell'entrata in vigore di nuovi regolamenti comunitari (Gil 2007), il settore agro-alimentare europeo ha dovuto affrontare la realizzazione di un sistema di controllo affidabile per contrastare il fenomeno delle frodi alimentari, tutelare la salute pubblica e fornire una corretta informazione al consumatore.

I metodi di identificazione di specie tradizionali, quali l'analisi morfologica e l'isoelettrofocalizzazione, sono difficilmente applicabili ai prodotti trasformati poiché le caratteristiche morfologiche e proteiche sono spesso assenti o degradate. Le analisi biomolecolari (Rasmussen 2008) possono invece determinare "l'impronta digitale" di ogni singolo campione consentendo l'identificazione rapida ed univoca delle specie in esame a partire sia da prodotti interi che trasformati.

In questo lavoro abbiamo sviluppato un metodo SQA (Sequence Analysis) di pirosequenziamento (Ronaghi 2001) in grado di identificare in modo univoco specie di molluschi bivalvi da campioni freschi e conservati.

## Summary

In the last years, the national and international seafood industry/commerce/trade has significantly increased due to the changes in the eating habits. This has inevitably implied an escalation in the number of commercial frauds, especially in the case of processed or transformed seafood products where identification of the species is extremely difficult.

After the entry into force of the most recent Community regulations (Gil 2007), the European agricultural food sector has had to come to terms with this phenomenon and has implemented a reliable control system in order to a) limit the potential damages from willful or unintentional frauds, b) protect public health and c) supply accurate and correct information to the consumers.

The traditional methods for species identification, i.e. isoelectrofocusing, are not suitable to be used in processed products, considering that the morphological characteristics are often absent and the proteins degraded. On the other hand, biomolecular analysis (Rasmussen 2008) can determine the "finger printing" of every single specimen, thus allowing the univocal and rapid identification of the species in both unharmed or processed products.

In this work we have developed a SQA (Sequence Analysis) method with pyrosequencing (Ronaghi 2001) able to identify univocally bivalve molluscs species belonging to processed and/or unprocessed products.

## Materiali e metodi

Il disegno dei primers di amplificazione e sequenziamento è stato eseguito allineando con il software MEGA 4 le sequenze di regioni mitocondriali conservate, 16S e COI, di specie differenti ottenute da GenBank e BOLD: ciò ha portato all'identificazione di due zone conservate sulle quali disegnare i primer di amplificazione (16S\_BIV For1a 5'-gacganaagaccrcrt-3', 16S\_BIV For1b 5'-gacragaagaccrcygt-3', 16S\_BIV biot Rev 2 5'-caacatcgaggtscaawc-3', COI\_BIV biot For1a 5'-trattgtactgctcayg-3', COI\_BIV biot For1b 5'-trrtgtactgcycatg-3', COI\_BIV Rev2a PCR/Seq 5'-garaaaatamcataatccayag-3', COI\_BIV Rev2b PCR/Seq 5'-gaaaraataacraatccatag-3', COI\_BIV Rev3a PCR/Seq 5'-cgaggaaahgcyatatcagg-3', COI\_BIV Rev3b PCR/Seq 5'-cgaggaaaagctatrchgg-3'). All'interno del prodotto di amplificazione è evidenziabile una zona polimorfica discriminante di 30 bp, in grado di differenziare tra loro la maggior parte delle specie considerate, a ridosso della quale è stato disegnato il primer di sequenziamento (16SBIV For2-Seq 5'-agytachbcyrggataacag-3', COI\_BIV Rev2a PCR/Seq, COI\_BIV Rev2b PCR/Seq, COI\_BIV Rev3a PCR/Seq, COI\_BIV Rev3b PCR/Seq).

100 ng di DNA genomico, estratto a partire da 50-100 mg di mantello o di polpa mediante il kit High Pure PCR Template Preparation kit (ROCHE), è stato amplificato usando il Platinum Taq kit (Invitrogen) in un volume finale di 50 µl secondo il protocollo: 1x PCR buffer 10x, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,6 µM dei primer di PCR specifici, 1U Platinum Taq 5U/µl. La reazione di amplificazione è avvenuta nel termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) con le seguenti condizioni: 2 min a 94°C; 30 sec a 94°C, 30 sec a 50°C (per 16S) o 30 sec a 52°C (per COI) e 20 sec a 72°C per 50 cicli; 7 min a 72°C. La presenza dell'amplificato specifico è stata rilevata mediante corsa elettroforetica in gel di acrilamide al 7% e colorazione in argento nitrato. 40 µl di prodotto di PCR biotinilato è stato immobilizzato su 5µl di beads

Streptavidine Sepharose™ (GE Healthcare, Uppsala) in 40 µl di binding buffer in agitazione per 30 min a temperatura ambiente. Mediante PyroMark™ Vacuum Prep Workstation (Biotage, Uppsala, Svezia) si è ottenuto un filamento singolo biotinilato di DNA che è stato ibridizzato con il primer di sequenziamento specifico (concentrazione finale 0,5 µM in 40 µl di annealing buffer) a 80°C per 4 min e raffreddato a temperatura ambiente per 10min (SQA-16S) oppure a 90°C per 2 min, 52 °C per 10 min e raffreddato a temperatura ambiente per 5 min (SQA-COI). La reazione di pirosequenziamento è stata condotta sullo strumento PyroMark ID [Biotage (Uppsala, Svezia, acquistata da Qiagen nel 2008)] utilizzando i reagenti del kit Pyro Gold (Qiagen) secondo le indicazioni del produttore. Le sequenze ottenute sono state analizzate e comparate con una banca dati, specifica per le specie studiate, creata mediante il software dedicato all'applicazione di pirosequenziamento IdentiFire™. Ogni match riscontrato è caratterizzato da un valore di score indicante l'omologia rilevata con l'eventuale sequenza corrispondente in libreria.

### Risultati e discussione

In questo studio abbiamo sviluppato due protocolli di pirosequenziamento mediante la metodica SQA Pyrosequencing™, SQA-16S e SQA-COI, che hanno permesso di identificare correttamente, in silico, 21 specie (*Flexopecten glaber*, *Aequipecten opercularis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus chilensis*, *Mytilus edulis*, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Donax trunculus*, *Ensis directus*, *Ensis minor*, *Ruditapes decussata*, *Tapes philippinarum*, *Meretrix meretrix*, *Meretrix lyrata*, *Paphia undulata*, *Venus gallina*, *Chamelea gallina*, *Venus verrucosa*, *Pecten jacobaeus*, *Pecten maximus*, *Callista chione*) appartenenti a 6 famiglie di molluschi bivalvi (Pectinidae, Mytilidae, Ostreidae, Donacidae, Pharidae, Veneridae).

Prove su campioni freschi, precedentemente riconosciuti morfologicamente, hanno consentito di identificare univocamente 15 specie (*Flexopecten glaber*, *Aequipecten opercularis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Donax trunculus*, *Ensis directus*, *Ruditapes decussata*, *Tapes philippinarum*, *Meretrix meretrix*, *Meretrix lyrata*, *Paphia undulata*, *Venus gallina*, *Chamelea gallina*, *Venus verrucosa*).

I protocolli di pirosequenziamento, applicati anche su campioni conservati (surgelati, al naturale, sott'olio), hanno consentito l'identificazione corretta delle specie. Il pirosequenziamento si configura come una metodica promettente per una rapida ed univoca identificazione di molluschi bivalvi (Pectinidae, Mytilidae, Donacidae, Ostreidae, Pharidae, Veneridae) spesso oggetto di frodi commerciali.

### Bibliografia

1. Ronaghi, M., 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome research*, 11(1), 3-11.
2. Luis Asensio Gil, 2007. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology* 18: 558-566.
3. Rosalee S. Rasmussen and Michael T. Morrissey, 2008. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol 7: 280-295.
4. Espiñeira M, González-Lavín N, Vieites JM, Santaclara FJ., 2009. Development of a method for the genetic identification of commercial bivalve species based on mitochondrial 18S rRNA sequences, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 495-502.

# RISULTATI DEL PIANO DI MONITORAGGIO PER IL CONTROLLO DELLE PATOLOGIE DEI MOLLUSCHI NEL PERIODO 2007-2012

Bille L. \*, Ceolin C., Dalla Pozza M., Toson M., Trolese M., Arcangeli G.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

**Keywords:** Marteilia, Bonamia, Perkinsus, Ostreid Herpesvirus, Molluschi bivalvi

## Introduzione

L'Italia è il terzo produttore europeo di molluschi bivalvi, dopo Spagna e Francia. La produzione italiana si basa essenzialmente su due specie: la vongola filippina (*R. philippinarum*) e il mitilo (*M. galloprovincialis*); il nostro paese è, infatti, il primo produttore europeo di vongole e il secondo a livello mondiale, dopo la Cina, e il terzo produttore mondiale di mitili, dopo Cina e Spagna. Patologie causate da agenti batterici, parassitari e virali costituiscono potenziali cause di perdite economiche in tutte le attività zootecniche. Da diversi anni in Italia, le regioni che producono molluschi bivalvi, svolgono un'attività di monitoraggio su base volontaria per il controllo della presenza dei patogeni inclusi nella lista OIE o nell'allegato IV della Direttiva 2006/88/CE, e per il riscontro di eventi di mortalità anomale.

Lo scopo di questo lavoro è quello di illustrare i risultati di tale piano di monitoraggio ottenuti nel periodo compreso tra 2007 e 2012.

## Summary

Italy is the third European producer of molluscs. Like in all animal production bacteria, parasites and viral pathogens are a potential cause of economical losses. A monitoring programme to check the presence of pathogens which are included in the OIE list or in Annex IV of the Directive 2006/88/EC and to ensure an early detection of abnormal mortality events, is in force for many years in Italy.

The aim of this paper is to highlight the results of the 2007 to 2012 monitoring plan when a total of 68605 diagnostic tests were performed.

## Materiali e metodi

La ricerca degli agenti patogeni causa di patologie incluse nella lista OIE o nell'allegato IV della Direttiva 2006/88/CE, sono state svolte con le seguenti tecniche:

- *Bonamia sp.* e *Marteilia refringens* in ostrica piatta (*O. edulis*): esame citologico e istologico
- *Perkinsus marinus* e *Microcytos mackini* in ostrica concava (*C. gigas*): esame istologico
- Ostreid herpes virus 1 microvariant in ostrica concava: PCR
- *Marteilia refringens* in mitili (*M. galloprovincialis*): esame citologico e istologico
- *Perkinsus olseni* in vongola filippina (*R. philippinarum*): esame colturale e istologico.

I risultati positivi dei test condotti di routine sono confermati mediante PCR.

I dati riguardanti i risultati le analisi svolte nel periodo tra 2007 e 2012, sono stati raccolti ed elaborati. La maggior parte dei controlli riguarda mitili e vongole perché sono le specie maggiormente prodotte in Italia.

## Risultati e discussione

In totale nel periodo considerato sono state svolte 68.605 analisi.

Per verificare la presenza di *Bonamia spp.* o *Marteilia refringens* nell'ostrica piatta, sono stati testati 2259 individui; *Bonamia spp.* è stata individuata in 42 di questi (P 1.8%, 95%CI 1.3-2.5) mentre *Marteilia refringens* in 33 (P 1.5%, 95%CI 1.0-2.0). *Bonamia exitiosa* è stata riscontrata negli anni 2007 e 2010 mentre *Bonamia Ostreae* nel 2007 e 2008, ma senza essere mai stata causa di episodi di mortalità anomale. *Marteilia* è stata ritrovata nel 2007 e 2008 in assenza sintomatologia e solo in un caso è stata associata a un basso tasso di mortalità (inferiore al 5%).

*Marteilia refringens* è stata ricercata in 42184 mitili allevati ed è stata confermata in 263 di essi (P 0.6%, 95%CI 0.5-0.7). La presenza di questo parassita è stata confermata sia in soggetti raccolti lungo la costa Adriatica (prevalenza inferiore all'1%) che in quella Tirrenica (prevalenza tra 10% e 20%) in tutti gli anni del periodo preso in considerazione, ma non è mai stata causa di mortalità.

*Perkinsus olseni* è stato ritrovato costantemente in tutti gli anni considerati nelle vongole filippine allevate nelle regioni del Nord Est Italiano (24162 individui testati, 11663 dei quali risultati positivi, P 48.3%, 95%CI 47.6-48.9). Solo nella parte più meridionale della Laguna di Venezia nel 2011 è stato riscontrato un episodio di mortalità pari al 10%.

L'Ostreid Herpes Virus è stato ritrovato nel 2010, senza mortalità, in allevamenti off-shore long-lines lungo le coste dell'Adriatico, in ostriche concave importate dalla Francia. Nel 2012 un episodio con il 50% di mortalità è stato registrato in giovanili in una laguna nella parte settentrionale della Sardegna.

L'impatto e la frequenza delle malattie infettive nelle aree di produzione di molluschi bivalvi sono sottostimati e ciò è dovuto alla mancanza di informazioni epidemiologiche esaustive e al fatto che spesso, gli eventi di

mortalità anomala non sono individuati o, comunque, non sono approfonditi fino a determinarne la causa. Per questo motivo è importante mantenere e implementare le attività di monitoraggio, nonostante la bassa frequenza di mortalità associata alla presenza di patogeni riportata nelle attività di molluschicoltura in Italia.

## **Bibliografia**

1. Consiglio Europeo (2006). Direttiva 2006/88/CE del Consiglio del 24 ottobre 2006 relativa alle condizioni di polizia sanitaria applicabili alle specie animali d'acquacoltura e ai relativi prodotti, nonché alla prevenzione di talune malattie degli animali acquatici e alle misure di lotta contro tali malattie. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 24-11-2006.
2. V. Narcisi, I. Arzul, D. Cargini, F. Mosca, A. Calzetta, D. Traversa, M. Robert, J. P. Joly, B. Chollet, T. Renault, P. G. Tiscar. (2010) Detection of *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* (Haplosporidia) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Diseases Of Aquatic Organisms*. Vol. 89: 79–85, 2010 doi: 10.3354/dao02167
3. W. G. Dundon, I. Arzul, E. Omnes, M. Robert, C. Magnabosco, M. Zambon, L. Gennari, A. Toffan, C. Terregino, I. Capua and G. Arcangeli. (2011). Detection of Type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1  $\mu$ var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. *Aquaculture*. April 2011, Volume 314, Issues 1-4, Pages 49-52  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.005>

*Database Repository ISPRA - Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare - Commissione Europea.*



# FVGgis: IL PORTALE WEBGIS VETERINARIO PER LA MOLLUSCHICOLTURA DEL FRIULI VENEZIA GIULIA

*Bille L.<sup>(1)</sup>, Pelagatti L.<sup>(2)</sup>, Trolese M.<sup>(1)</sup>, Ustulin P.<sup>(3)</sup>, Mazzucato M.<sup>(1)</sup>, Cocevari M.<sup>(4)</sup>, Cobianchi M.<sup>(1)</sup>, De Vescovi P.<sup>(4)</sup>, Bortolotti L.<sup>(1)</sup>, Ferrè N.<sup>(1)</sup>, Dalla Pozza M.<sup>(1)</sup>, Palei M.<sup>(5)</sup>*

<sup>(1)</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie; <sup>(2)</sup>Azienda per i Servizi Sanitari n. 5 "Bassa Friuliana"; <sup>(3)</sup>Azienda per i Servizi Sanitari n. 2 "Isontina"; <sup>(4)</sup>Azienda per i Servizi Sanitari n. 1 "Triestina"; <sup>(5)</sup>Servizio di Sicurezza Alimentare Igiene della Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria della Direzione Centrale Salute, Integrazione socio-sanitaria e Politiche Sociali - Regione Friuli Venezia Giulia

**Keywords:** WEB-Gis, Molluschicoltura, Sistema Informativo

## Introduzione

La molluschicoltura rappresenta storicamente, nelle regioni del nord-est, una realtà produttiva di grande rilevanza. In Friuli Venezia Giulia (FVG) tale attività è concentrata principalmente nel Golfo di Trieste e da sempre caratterizzata dalla produzione di mitili di elevata qualità con un circuito commerciale ben definito. Nel 2010 tale settore produttivo è stato parzialmente compromesso a seguito di un episodio di intossicazione alimentare che ha coinvolto circa 150 persone, conseguente al consumo di mitili contaminati da biotossine algali (acido okadaico) provenienti da alcuni allevamenti del Golfo di Trieste. Questo episodio ha reso improcrastinabile l'attivazione e la gestione di adeguati piani di monitoraggio in grado di evidenziare precocemente la presenza di biotossine algali in molluschi e di minimizzare il rischio di intossicazioni alimentari.

Dal 2011, il Servizio Sicurezza Alimentare, Igiene della Nutrizione e Sanità Pubblica del FVG, con la collaborazione dei produttori, ha realizzato e messo in atto un efficace piano di monitoraggio e di allerta rapida, basato sulla combinazione di controlli ufficiali ed autocontrolli promossi dagli allevatori, questi ultimi effettuati con l'applicazione di test rapidi di screening, al fine di garantire tempi di risposta ancora più brevi e in grado di alimentare il sistema di allerta regionale. In tale contesto, la Regione Autonoma FVG, per migliorare e rendere ancora più efficace il sistema di sorveglianza messo in atto ha promosso, in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE), la progettazione e realizzazione di un sistema informativo territoriale dedicato alla gestione di dati relativi all'attività di sorveglianza igienico-sanitaria in molluschicoltura. Tale sistema permette di integrare le informazioni relative alle zone di produzione dei molluschi con quelle derivanti dalle analisi di laboratorio al fine di renderle immediatamente fruibili da parte dell'autorità sanitaria. Scopo del presente lavoro è quello di descrivere il sistema WEB-GIS denominato FVGgis, le logiche di realizzazione e le sue funzionalità.

## Summary

Shellfish industry is mainly located in north-eastern part of Italy, and one of the main shellfish production area is located in Friuli Venezia Giulia Region (FVG), particularly in the Gulf of Trieste where there is an important mussels production. After an intoxication episode occurred in 2011, involving about 150 people having eaten mussels contaminated with okadaic acid, Regional veterinary authorities of FVG region, with the collaboration of molluscs producers, has put in place a monitoring program and a rapid alert system based on official controls and own-checks

In order to improve the management of information arising from the above mentioned monitoring activity of harvesting and relaying areas, FVG Veterinary Regional Authority, with the technical support of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) designed and implemented a WEB-oriented Geographic Information System, able to collect, store, merge and analyse productive and geographical data of molluscs production areas and farms, and laboratory results. This WEB-GIS tool (FVGgis) allows competent authorities at regional and local level and other organizations involved in shellfish farming, to visualize geographical data and information deriving from monitoring activities in shellfish production areas in order to implement the sanitary survey.

The aim of this paper is to describe the features of this web based management information system (FVGgis).

## Materiali e metodi

Per la realizzazione del sistema è stato costituito un gruppo di lavoro, coordinato dal Servizio Sicurezza Alimentare, Igiene della Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria della Regione FVG e composto da Servizi Veterinari delle Aziende per i Servizi Sanitari di competenza, rappresentanti del mondo produttivo e da personale dell'ufficio GIS e del Laboratorio di epidemiologia applicata all'ambiente acquatico dell'IZSVE. Sono stati realizzati incontri periodici per la definizione delle funzionalità del sistema, al fine del suo utilizzo nella gestione dei piani regionali di monitoraggio igienico sanitario dei molluschi bivalvi. La scelta tecnica è stata quella di indirizzarsi verso una piattaforma WEB-GIS in grado di integrare tra loro dati anagrafici, geografici e derivanti dall'attività di monitoraggio (risultati di laboratorio). L'Ufficio GIS dell'IZSVE ha condotto

il coordinamento tecnico della realizzazione del progetto, ha tenuto i rapporti con le autorità regionali depositarie delle informazioni geografiche rilevanti ai fini della realizzazione del sistema, ha curato l'interscambio dei dati tra diverse basi informative (la Banca dati Nazionale degli allevamenti, la banca dati geografica delle zone di produzione, e la base informativa gestionale dei laboratori dell'IZSVE) nonché il loro costante aggiornamento, e il collaudo finale del sistema. Il laboratorio di epidemiologia applicata all'ambiente acquatico dell'IZSVE, insieme al personale veterinario delle Aziende per i Servizi Sanitari, ha effettuato l'analisi della domanda informativa (modalità operative di svolgimento del piano di monitoraggio igienico sanitario regionale, della procedura in uso per la gestione delle non conformità riscontrate in fase di monitoraggio e relativi flussi informativi). Inoltre è stata realizzata un'analisi della base dati disponibile relativa ai risultati di laboratorio presso l'IZSVE; sono state infine studiate le modalità di realizzazione di mappe tematiche per visualizzare in modo rapido ed efficace i risultati del monitoraggio regionale e le relative situazioni di non conformità.

### **Risultati e discussione**

Il sistema FVGgis, è stato realizzato su una piattaforma webGIS che consente l'accesso e la condivisione di informazioni di tipo geografico-epidemiologico, tra gli attori coinvolti nel settore della molluschicoltura della Regione FVG; esso infatti integra informazioni costantemente aggiornate provenienti da più Enti ed è predisposto per l'integrazione anche con ulteriori basi dati.

Il portale è organizzato in una sezione pubblica, strutturata per rendere disponibili dati in forma aggregata e mappe tematiche sulle caratteristiche e sullo stato sanitario delle zone di produzione dei molluschi, ed una sezione ad accesso riservato ad utenti del settore, in cui sono accessibili dati di dettaglio sulle aree di produzione, sugli allevamenti e sui risultati dell'attività di monitoraggio.

La parte ad accesso riservato è organizzata in moduli, fra cui:

- **Zone Di Produzione Molluschi:** permette di consultare l'elenco e le caratteristiche delle zone di produzione del FVG classificate secondo la normativa regionale vigente.
- **Gestione Anagrafe Allevamenti Molluschi:** permette l'importazione e la visualizzazione dei dati informatizzati nella Banca Dati Nazionale degli allevamenti, con la possibilità di poterli integrare con informazioni di dettaglio (ad esempio relative alle specie allevate).
- **Visualizzazione Risultati Analisi di Laboratorio:** consente la consultazione dei dati, costantemente aggiornati, riguardanti le analisi microbiologiche, chimiche e biotossicologiche svolte nell'ambito del piano di monitoraggio e provenienti dal gestionale di laboratorio dell'IZSVE.
- **Gestione provvedimenti:** permette di informatizzare i provvedimenti di sospensione della raccolta di molluschi o obbligo al trattamento di depurazione, che vengono emessi in caso di riscontro di non conformità.
- **WebGIS Molluschi:** contiene il visore geografico, un'applicazione web che permette di contestualizzare informazioni anagrafiche, sanitarie e ambientali inerenti l'attività di molluschicoltura in FVG, in base alla loro posizione geografica. Attraverso questo strumento, l'utente può ottenere la visualizzazione su mappa delle informazioni gestite dal sistema, come la distribuzione delle zone di produzione molluschi in funzione della classificazione sanitaria assegnata, la localizzazione geografica degli allevamenti di molluschi bivalvi e delle stazioni di campionamento; è inoltre possibile visualizzare, per ogni zona di produzione, la presenza di non conformità, il numero di controlli effettuati, il tempo trascorso dall'ultimo controllo, suddivisi per tipologia di parametro valutato e la presenza di provvedimenti di restrizione alla raccolta di molluschi. Il sistema, oltre a mettere a disposizione in forma di mappe tematiche dinamiche le informazioni gestite, consente anche di effettuare interrogazioni *ad hoc* e di poter visualizzare, stampare o estrarre dati dettagliati su ogni singola zona di interesse.

Il software FVGgis è attualmente in fase di rifinitura, e nel prossimo futuro il suo utilizzo costituirà un valido supporto informatico per le autorità regionali, per i Servizi Veterinari delle ASS e per il mondo produttivo, nella gestione e la salvaguardia degli aspetti sanitari di questa produzione, a garanzia della sicurezza dei consumatori.

### **Bibliografia**

1. Gipponi G., and Rosato P. (1999). Agricultural land use changes and water quality: a case study in the Watershed of the Lagoon of Venice. *Water Science and Technology*. 39(3). 135-148
2. Rosselli R. (1999). Gis per il monitoraggio ambientale dell'ecosistema complesso della laguna di Venezia. *MondoGIS*. Novembre 1999. 45-48

# MONITORAGGIO DI *V.SPLENDIDUS* E *V.AESTUARIANUS* IN DIFFERENTI SPECIE DI MOLLUSCHI BIVALVI

Caburlotto G<sup>1</sup>., Zambon M.<sup>1</sup>, Travers M.A.<sup>2</sup>, Arcangeli G<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione di Adria (RO)

<sup>2</sup>Laboratoire de Génétique et de Pathologie de La Tremblade, Ifremer, France

**Keywords:** *Vibrio splendidus*, *Vibrio aestuarianus*, bivalvi

## Introduzione

Le specie *Vibrio* sono molto abbondanti nelle acque costiere e sono comunemente isolati dai bivalvi edibili i quali sono in grado di accumulare grandi quantità tramite la loro capacità di filtrare. Tra di esse *Vibrio splendidus* è ampiamente distribuito e considerato una specie dominante, costituendo un clade che comprende numerosi membri ad elevata variabilità genetica [3]. Da tempo diversi ceppi batterici correlati a questa specie sono stati associati a mortalità estive interessando soprattutto la produzione di *Crassostrea gigas* in varie parti del mondo [1,2]. Scarsi sono i dati relativi alla presenza di tale batterio in altre specie di bivalvi ed incompleti sono i dati ambientali correlati [6] e di conseguenza risulta difficile attribuirgli in generale un ruolo opportunisto o patogeno. Un'altra importante specie *Vibrio*, da tempo considerato il responsabile di mortalità di *Crassostrea gigas*, è *Vibrio aestuarianus* diffusamente isolato lungo le coste francesi [4]. Anche per questa specie non esistono dati relativi alla sua presenza in specie di bivalvi differenti da *Crassostrea gigas*.

## Summary

*Vibrio* species are very abundant in coastal waters and are commonly isolated from edible bivalves being these molluscs able to accumulate large numbers of bacteria as a consequence of their filter-feeding habit. Among them *Vibrio splendidus* is widely distributed in marine ecosystems considered a dominant *Vibrio* species in seawater and it constitutes a clade with numerous member presenting high genetic variability. For several years different strains phenotypically related to this species have been associated with the summer mortalities affecting the production of *Crassostrea gigas* oyster worldwide [1]. The present controversial status of *V.splendidus*, pathogenic or opportunistic, seems to persist. A few data exist on the role of this species in other bivalve other than oysters. This study aimed to a better understanding of the ecology and of the role of this bacteria, monitoring *V.splendidus* in different species of bivalves in different periods of the years. From 2010 to September 2013, we analysed 115 samples of different species of molluscs for the presence of *V.splendidus* and *V.aestuarianus* applying cultural and molecular methods. From data obtained, we observed occurrence of *V.splendidus* in 53/115 samples. There is no strict correlation with sea water temperature and salinity. A further investigation has to be performed including other environmental parameters.

## Materiali e metodi

**Campionamento:** Da Marzo 2010 a Settembre 2013 sono stati analizzati 117 campioni di differenti specie di molluschi bivalvi: *Ruditapes philippinarum* (16), *Mytilus galloprovincialis* (8), *Crassostrea gigas* (75), *Ostrea edulis* (2), *Callista chione* (16), *Camalea gallina* (2). I campioni sono stati raccolti prevalentemente in diversi siti del Delta Del Po'. Sono stati trasportati sotto refrigerazione e processati nell'arco delle 24 ore. Per alcuni campioni sono noti idati relativi ai parametri ambientali quali temperatura dell'acqua, salinità.

**Batteriologico:** I campioni sono stati processati osservando due protocolli diversi a seconda delle specie a cui appartenevano. Per ciascun campione appartenente alle specie *Ruditapes philippinarum*, *Mytilus galloprovincialis*, *Callista chione*, *Camalea gallina*, è stato preparato un pool di soggetti e liquido intervalvare con un peso minimo di 50g finali. Dall'omogenato è stata prelevata un'ansa e seminata su TCBS (agar saccarosio tiosolfato citrato e sali biliari). I campioni appartenenti alla specie *Crassostrea gigas* sono stati processati in maniera differente (EURL website). Nel caso di larve o spat (< 6 mm), sono stati preparati pool, omogenizzati in acqua marina sterile e successivamente preparate le diluizioni 1/10, 1/100, 1/1000. Nel caso di soggetti adulti sono stati prelevati branchia e mantello, e processati come sopra descritto. Le diluizioni sono state seminate su TCBS ed incubate per 96 ore a 22°C. Le colonie sospette appartenere al genere *Vibrio* sono state selezionate e sottoposte a prove fenotipiche e biochimiche (API 20E).

**Analisi molecolare:** Le colonie identificate biochimicamente come possibili *Vibrio splendidus* e *Vibrio aestuarianus* sono state sottoposte ad un protocollo di PCR Real-time qualitativa (Saulnier et al., 2009; EURL website). Per l'estrazione del DNA si è proceduto secondo il seguente protocollo: la singola colonia è stata stemperata in 200 µl di acqua sterile e sottoposta a bollitura per 10 minuti. Dal surnatante sono stati prelevati 5 µl e sottoposti al protocollo molecolare. Per la PCR Real-time si sono utilizzate sonde fluorocrome specifiche rispettivamente per *V.splendidus* e *V.aestuarianus*.

## Risultati e Discussione

Relativamente agli anni 2010-2011 e 2012 i campioni di *Crassostrea gigas* pervenuti si componevano esclusivamente di soggetti adulti (23), di cui 15 (62.5%) sono risultati positivi per *V.splendidus*. Analizzando i dati relativi ai campioni della stessa specie (52) pervenuti nel 2013, *V.splendidus* è presente sia nei soggetti adulti (12) che nelle forme larvali-spat (40), con una incidenza maggiore nei soggetti adulti (100%) rispetto agli stadi larvali-spat (32.5%). Interessante notare che l'ammontare della specie *V.splendidus* differisce tra i due gruppi con un range di  $10^2$  CFU/g nello stadio adulto e  $10^3$ - $10^5$  CFU/g nelle forme larvali-spat. L'aumento della specie in esame non correla strettamente con i valori di temperatura dell'acqua che rientravano in un range di 10-22.6°C, né tantomeno con quelli di salinità (29-33 PSU). Per quanto concerne le specie *Ostrea edulis* e *Camalea gallina* pervenute nel corso del 2010-2011 unicamente a seguito di mortalità anomale, è stata rilevata la presenza di *V.splendidus* con una percentuale del 50%. Considerando la specie *Mytilus galloprovincialis*, pervenuta esclusivamente nell'ambito di monitoraggi, le analisi evidenziano la presenza di *V.splendidus* nel 50% dei campioni. Analizzando la specie *Callista chione*, ben 12/16 campioni (75%) sono risultati positivi per *V.splendidus*, e solamente un campione proveniva da una mortalità anomala. Per la specie *Ruditapes philippinarum* ben 9/16 campioni (56%) sono risultati positivi, alcuni riferibili a mortalità anomale. Considerando il totale dei campioni, uno solo, appartenente alla specie *Mytilus galloprovincialis*, è risultato positivo per *V. aestuarianus*. Dall'analisi complessiva dei dati, *V.splendidus* è stato rilevato sia nei periodi più freddi con temperature intorno ai 10°C che nel mese estivo con picchi di 26°C. Per l'incompleta disponibilità dei dati ambientali non è stato possibile correlare la presenza di *V.splendidus* ad uno specifico parametro. E' noto comunque in letteratura che le specie *Vibrio* sono influenzate non da un singolo parametri ma da molteplici fattori. Da anni ceppi batterici fenotipicamente correlati a *V.splendidus* e *V.aestuarianus* sono stati descritti come importanti cause di mortalità di molluschi, soprattutto *Crassostrea gigas*. Nelle regioni temperate *V.splendidus* è il vibrioplankton dominante [5]. L'analisi della diversità e le dinamiche annuali dei ceppi correlati a *V.splendidus* isolati dall'acqua rivelano un'estrema diversità genotipica con un migliaio di differenti genotipi che persistono a basse concentrazioni ambientali e scegliendo condizioni ambientali anche nettamente diverse tra loro [7]. Il significato adattativo di questa variabilità rimane sconosciuto ed incerto dunque il ruolo da attribuire a questa specie batterica, opportunistica o patogeno. Più chiaro sembra invece il ruolo, patogeno, assunto da *V.aestuarianus*, ampiamente isolato durante i casi di mortalità estiva nelle coste francesi. E' significativa la quasi completa assenza di *V.aestuarianus* nei campioni analizzati in questo studio. E' da considerare certamente che i parametri ambientali quali temperatura dell'acqua, salinità, le specie e la ciclicità del fitoplankton e zooplankton possono differire nelle nostre coste e dunque creare un ecosistema diverso da quello che si può ritrovare in altre zone geografiche in cui sembra più evidente il ruolo delle due specie.

## Bibliografia

1. Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M, Nicolas JL. (2007). Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecol.* ;53(2):187-96.
2. Gay M., Renault T., Pons AM., Le Roux F. (2004). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis aquatic org.* 62: 65-74.
3. Hunt DE, David LA, Gevers D, Preheim SP, Alm EJ, Polz MF. (2008). Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. *Science.* 320 (5879): 1081-5.
4. Labreuche Y, Le Roux F, Henry J, Zatylny C, Huvet A, Lambert C, Soudant P, Mazel D, Nicolas JL. (2010). *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish Shellfish Immunol.* 29(5):753-8.
5. Le Roux F. and Austin B. (2006). *Vibrio splendidus*. In Thompson F.L., Austin B., Swing J. *The Vibrios*. American Society for Microbiology Press. Pp.285-296.
6. Prado S., Dubert J., Da Costa F., Martinez-Patino D., Barja JL (2013). Vibriosis in hatchery cultures of the razor clam, *Solen marginatus* (Pulteney). *J Fish Dis* (Epub ahead of print).
7. Thompson JR., Pacocha S., Pharino C., Klepac-Ceraj V., Hunt DE., Benoit J. (2005). Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science.* 307: 1311-1313.

# MONITORAGGIO MICROBIOLOGICO DELLE ZONE DI RACCOLTA DELLE VONGOLE (*CHAMELEA GALLINA*) NELLA REGIONE MARCHE: VALUTAZIONE DELLE DIFFERENZE TRA I RISULTATI DELLE DIVERSE STAZIONI DI CAMPIONAMENTO ALL'INTERNO DELLE SINGOLE ZONE CLASSIFICATE

Ciccarelli C., Di Trani V., Semeraro A.M.

ASUR Marche Area Vasta 5 di San Benedetto del Tronto – Servizio Veterinario di Igiene degli Alimenti O.A.

**Keywords:** *E. coli*, *Chamelea gallina*, monitoraggio microbiologico

## Introduzione

Nell'Unione Europea la classificazione delle zone di produzione dei molluschi bivalvi utilizzati per il consumo umano è basata sullo studio dell'impatto delle fonti di contaminazione (Indagine Sanitaria) e sul costante monitoraggio, anche microbiologico, di tali aree.

Il monitoraggio microbiologico è basato sulla ricerca di *E. coli* in campioni prelevati da stazioni di campionamento individuate come rappresentative di ciascuna zona.

Nella Regione Marche, ai fini della raccolta di vongole *Chamelea gallina*, la quasi totalità della costa è stata inizialmente classificata in 53 distinte zone. A partire dal 2002 il monitoraggio microbiologico è stato eseguito individuando, all'interno di ciascuna zona classificata, due stazioni di campionamento: la prima (I) corrispondente alla batimetria di 3-6 metri e la seconda (II) alla batimetria di 6-9 metri. Tutta la costa marchigiana, escluso il tratto del Monte Conero, ha una morfologia costante per cui le stazioni I sono generalmente localizzate a circa 0.6-0.7 km dalla riva, mentre le stazioni II sono a 1.2-1.3 km dalla riva. In alcuni casi le apparenti differenze tra i risultati delle due stazioni, all'interno della stessa zona, hanno indotto la Regione Marche a rivedere la classificazione prevedendo livelli sanitari diversi tra l'area entro il primo quarto di miglio, corrispondente alla stazione I, e l'area oltre il primo quarto di miglio, corrispondente alla stazione II (Regione Marche, 2013). Alcuni studi, eseguiti nel distretto di San Benedetto del Tronto, hanno già messo in evidenza differenze, significative dal punto di vista statistico, tra i risultati delle stazioni di campionamento, anche della stessa zona, se confrontati con gli effetti delle precipitazioni atmosferiche (Ciccarelli *et al.*, 2012), o valutandone il carattere di stagionalità (Ciccarelli *et al.*, in corso di pubblicazione).

Scopo del presente lavoro è valutare la significatività statistica delle differenze riscontrate, tra i risultati delle due stazioni di campionamento, all'interno di ciascuna delle zone classificate dalla Regione Marche per la raccolta di vongole *Chamelea gallina*.

## Summary

In the European Union, the classification of bivalve harvesting areas depends on a Sanitary Survey carried out to check all the contamination sources and on a monitoring plan searching for *E. coli* level in bivalve samples, collected from the sampling sites supposed to be representative of each area. Marche Region classified 53 clam (*Chamelea gallina*) harvesting areas and, since 2002, samples were collected from 2 sampling sites: the first (I) 0.6-0.7 km offshore, 3-6 m deep, and the second (II) 1.2-1.3 km offshore, 6-9m deep. Different *E. coli* levels between the 2 sampling sites in each area allowed the regional authority to distinguish 2 different subareas, individually classified. In the district of San Benedetto del Tronto (South Marche), the influence of precipitations and a seasonality for *E. coli* levels in each clam harvesting area and subarea were investigated (Ciccarelli *et al.*, 2012; Ciccarelli *et al.*, publishing). In this study, the authors evaluated the difference in *E. coli* values between the 2 sampling sites in all of the areas of Marche Region by statistical tools.

## Materiali e metodi

Sono stati presi in considerazione i risultati del monitoraggio, già utilizzati dalla Regione Marche per l'ultimo procedimento di riclassificazione terminato nel 2013 (Regione Marche, 2013), e riferiti al periodo che va dal 2007 al 2011. I relativi campioni di vongole sono stati prelevati mediante draga idraulica, con strisciate di 500 metri circa, nelle stazioni di campionamento I e II di ciascuna zona classificata, rispettivamente alla batimetria di 3-6 metri ed a quella di 6-9 metri. L'esame per *E. coli* è stato eseguito, con il metodo ISO/TS 16649-3:2005, presso le sezioni dell'I.Z.S. Umbria e Marche di Pesaro, Ancona, Macerata e Fermo competenti per territorio. I risultati, espressi come MPN/100g, sono stati trasformati nel loro  $\log_{10}$  e, ai fini del calcolo, i *censored data*, cioè i valori al di sotto del limite di rilevazione (<20 MPN/100g), sono stati trasformati nel logaritmo della metà del valore minimo rilevabile cioè 1. Sono stati utilizzati i risultati di 47 delle 53 zone classificate in quanto, solo per queste, erano disponibili i risultati di entrambe le stazioni di campionamento I e II. Complessivamente sono stati valutati 3442 risultati divisi in 94 stazioni di campionamento, ciascuna con un numero di risultati oscillante tra 12 e 59 (in media 36).

Per ciascuna coppia di stazioni di campionamento all'interno delle singole zone sono state verificate:

- la significatività della differenza tra le mediane (me) delle due distribuzioni con il test U di Mann-Whitney con ipotesi nulla  $H_0: me_I=me_{II}$  e  $p \leq 0,05$ ;
- la verifica della normalità delle distribuzioni mediante i test di Shapiro-Wilk e Anderson-Darling, entrambi con ipotesi nulla  $H_0$ : distribuzione normale e  $p \leq 0,05$ ;
- la verifica dell'omogeneità delle varianze (QM) con il test F con ipotesi nulla  $H_0: QM_I=QM_{II}$  e  $p \leq 0,05$ ;
- la significatività della differenza tra le medie delle due distribuzioni con il test t di Student con ipotesi nulla  $H_0: \mu_I=\mu_{II}$  e  $p \leq 0,05$ , dopo aver verificato l'omogeneità delle varianze;
- la significatività della differenza tra le medie delle due distribuzioni con la statistica di Welch con ipotesi nulla  $H_0: \mu_I=\mu_{II}$  e  $p \leq 0,05$ , se non è verificata l'omogeneità delle varianze;
- la significatività della differenza delle frequenze dei risultati non conformi (NC) al criterio di sicurezza microbiologica (>230MPN/100g) previsto dal Reg. CE/2073/2005, mediante test esatto di Fisher con ipotesi nulla  $H_0: NC_I=NC_{II}$  e  $p \leq 0,05$ .

Nell'esecuzione dei calcoli per il test esatto di Fisher è stato utilizzato il software Graphpad e per gli altri test il software PAST vers. 2.17c.

## Risultati e Discussione

I risultati hanno mostrato come, per le stazioni di campionamento I e II all'interno di ognuna delle zone classificate, non sia possibile riconoscere differenze significative né tra le medie, pur utilizzando tests (il t e la statistica di Welch) legati ad assunti di validità in questo caso non sempre pienamente rispettati (p.e. la normalità delle distribuzioni), né tra le mediane e neanche tra le frequenze delle non conformità. Infatti:

- per nessuna coppia di distribuzioni è stata dimostrata la significatività della differenza delle relative mediane: con il test di Mann-Whitney, solo per le zone H1 e L, il valore di p (rispettivamente 0,0934 e 0,0561) si è solo avvicinato alla soglia per la significatività statistica;
- la normalità delle distribuzioni di entrambe le stazioni è stata riconosciuta, con uno dei test di Shapiro-Wilk o Anderson-Darling, solo per le zone 16.2, M1 e 18;
- per le distribuzioni delle zone 6.2 e 9BIS2, per le quali il test F ha confermato l'omogeneità della varianza, il test t non ha permesso di dimostrare la significatività della differenza delle relative medie;
- la statistica di Welch, applicata alle restanti coppie di distribuzioni, per le quali non era stata riconosciuta l'omogeneità della varianza, non ha permesso di dimostrare la significatività della differenza delle relative medie;
- da ultimo, il test esatto di Fisher non ha permesso di riconoscere la significatività statistica delle differenze delle frequenze delle non conformità per nessuna delle coppie di stazioni I e II, all'interno della stessa zona.

In questo caso, se non sono dimostrabili differenze significative, e quindi non è possibile negare che i risultati provenienti dalle due stazioni di campionamento appartengano alla stessa popolazione di dati, verrebbero a mancare i presupposti scientifici che hanno giustificato un livello sanitario differenziato all'interno di alcune zone classificate, come invece previsto dalla regione Marche e, da ultimo, nel citato provvedimento di revisione della classificazione (Regione Marche, 2013).

Tuttavia, riguardo all'opportunità di utilizzare entrambe le stazioni di campionamento, questi risultati non sono sufficienti per giungere a conclusioni definitive. Infatti, i risultati sono riferiti ai dati del solo periodo 2007-2011 ed, inoltre, già precedenti studi, riferiti a dati ottenuti in altri periodi (Ciccarelli *et al.*, 2012; Ciccarelli *et al.*, in corso di pubblicazione), hanno potuto mettere in evidenza differenze significative tra i valori per alcune delle coppie di stazioni di campionamento.

## Bibliografia

1. Ciccarelli C, Semeraro AM, Aliventi A, Di Trani V, Capocasa P. Valutazione dell'impatto delle precipitazioni sulla contaminazione fecale delle vongole (*Chamelea gallina*) raccolte nel distretto di San Benedetto del Tronto (AP). It J Food Safety 2012;1:46-9. <http://www.pagepressjournals.org/index.php/ijfs/article/view/1430>
2. Ciccarelli C, Semeraro AM, Aliventi A, Di Trani V, Capocasa P. Seasonal variations of *Escherichia coli* contamination in clams (*Chamelea gallina*) harvested in the Adriatic Sea (district of San Benedetto del Tronto, Italy) . It J Food Safety (in corso di pubblicazione).
3. Deliberazione della Giunta Regionale Marche N. 593 del 18/02/2013, 2013. Revisione della classificazione sanitaria delle zone di produzione dei molluschi bivalvi vivi ai sensi del Reg. CE/854/2004, approvata con DGRM n. 1300/2009. [http://www.norme.marche.it/Delibere/2013/DGR0593\\_13.pdf](http://www.norme.marche.it/Delibere/2013/DGR0593_13.pdf)
4. Helsel DR, Hirsch RM. Hydrologic analysis and interpretation, chapter A3: Statistical methods in water resources. 2002. <http://pubs.usgs.gov/twri/twri4a3/>

# INDAGINE SULL'INTERAZIONE *CRASSOSTREA GIGAS* – OSHV-1 MVAR IN UN ALLEVAMENTO IN AMBIENTE LAGUNARE DEL MEDITERRANEO CENTRO-OCCIDENTALE

Civettini M.<sup>1</sup>, Pais A.<sup>2</sup>, Saba S.<sup>2</sup>, Pinna M.G.<sup>2</sup>, Gorla A.<sup>3</sup>, Magnabosco C.<sup>1</sup>, Zambon M.<sup>1</sup>, Pretto T.<sup>1</sup> e Arcangeli G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Adria (RO)

<sup>2</sup>Sezione di Scienze Zootecniche, Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, Sassari

<sup>3</sup>Compagnia Ostricola Mediterranea, San Teodoro (OT)

**Keywords:** Pacific cupped oyster, Ostreid Herpes virus 1  $\mu$ var, coastal lagoons, Mediterranean Sea

## Introduzione

Gli elevati tassi di mortalità registrati a partire dal 2008 negli allevamenti di ostrica concava del Pacifico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) sono stati causati da un nuovo genotipo dell'Ostreid Herpes virus Type 1 (OsHV-1), denominato OsHV-1  $\mu$ var (Segarra et al., 2010). L'OsHV-1 appartiene alla Famiglia Herpesviridae ed è noto per infettare diverse specie di Bivalvi (Farley et al., 1972; Renault et al., 2000). Ultimamente, tuttavia, è stato proposto di includere l'OsHV-1 alla nuova Famiglia Malacoherpesviridae appartenente all'Ordine Herpesvirales (Davison et al., 2009).

La particolarità di questo virus risiede nel suo apparente stato di quiescenza a temperature dell'acqua inferiori ai 16°C, al di sotto delle quali non sono stati registrati casi di mortalità (EFSA Panel on Animal Health and Welfare, 2010). Quando invece i valori termici dell'ambiente di coltura si innalzano (Vigneron et al., 2004), in concomitanza con la primavera inoltrata e l'inizio dell'estate, periodi durante i quali si ha la massima attività fisiologica delle ostriche (Costil et al., 2005), si assiste ad una recrudescenza del virus con una conseguente ricomparsa di ragguardevoli tassi di moria dei molluschi.

Una recente ricerca condotta in un impianto *off-shore* ubicato nel Mar Adriatico ha evidenziato la presenza dell' OsHV-1  $\mu$ var senza tuttavia accertare fenomeni di mortalità degli esemplari di ostrica concava allevati (Dundon et al., 2011). Scopo della presente ricerca, invece, è stato quello di valutare l'interazione tra *C. gigas* e OsHV-1  $\mu$ var in un'azienda di ostricoltura situata in un ambiente lagunare del Mar Tirreno in cui, negli ultimi anni, sono stati registrati rilevanti eventi di moria di questa specie.

## Summary

Aim of this work was to monitor the presence of OsHV-1  $\mu$ var in a farm of *C. gigas* in lagoon environment in order to test the interaction with environmental parameters. The virus has been found in association with mortality and temperature rise, although in the months before the oysters were negative.

## Materiali e metodi

In un allevamento di ostriche ubicato in Sardegna, nel periodo compreso tra Novembre 2011 e Giugno 2012 a partire da un lotto di semina (taglia T4: in grado di attraversare le maglie di un setaccio di 4 cm) proveniente da uno schiuditoio francese, con frequenza mensile sono stati prelevati campioni costituiti da 30 esemplari di *C. gigas* che sono stati immediatamente fissati in etanolo al 70% per le successive analisi. Contestualmente, campioni equivalenti di ostriche appartenenti allo stesso lotto sono stati trasportati ogni mese in laboratorio e mantenuti per 2 settimane in una cella termostata a 20°C in condizioni controllate (salinità 30 PSU; pH 8,2; O<sub>2</sub> in sovrasaturazione; fotoperiodo 12h luce:12h buio), alimentati *ad libitum* con *Isochrysis* sp. Dopo questo periodo di mantenimento, finalizzato ad evidenziare un'eventuale recrudescenza del virus ad una temperatura >16°C, anche questi esemplari di *C. gigas* sono stati fissati in etanolo al 70%. Durante le fasi di mortalità alcuni campioni sono stati fissati in liquido di Carson per le successive indagini istologiche.

Esame istologico: inclusione in paraffina, taglio, colorazione Ematossilina-Eosina/floxina, lettura al microscopio ottico immersione.

Esame biomolecolare: tutti i campioni sono stati analizzati tramite PCR real-time utilizzando la procedura suggerita dall'EURL per l'individuazione dell'OsHV-1 (<http://www.eurl-mollusc.eu>).

I campioni risultati positivi sono stati successivamente sottoposti a PCR nested secondo il metodo diagnostico previsto dal reg. UE 175/2010 che permette di discriminare il genotipo reference dalla variante  $\mu$ var tramite la rilevazione di una delezione di 12 pb nella regione C del genoma virale. Inoltre, i campioni risultati positivi all'analisi real-time sono stati sequenziati per avere un'ulteriore conferma della presenza della variante  $\mu$ var.

## Risultati e discussione

Le analisi condotte a partire dal mese di novembre e proseguite fino al mese di luglio, sono risultate positive per OsHV-1  $\mu$ var nei mesi di maggio, giugno e luglio, in corrispondenza di un aumento di temperatura, superiore a 16 °C. I valori di salinità sono invece rimasti costanti durante l'intero periodo, intorno a 2,5‰, non

essendoci stati importanti fenomeni piovosi. I valori di CT alla prova Real-time sono stati rispettivamente: maggio: 33, giugno: 37 e luglio: 36. A maggio c'è stato anche un fenomeno di moria del 50% del prodotto, quando la taglia dei soggetti era di 3-4 cm.: tale percentuale è scesa al 5% nei due mesi successivi per poi arrestarsi. I campioni risultati positivi sono stati ritestati ed al sequenziamento sono risultati positivi per OsHV-1  $\mu$ var. La mortalità ha coinvolto soprattutto esemplari di taglia più grossa. All'esame istologico sono state rilevate aree di necrosi multifocale con flogosi nel tessuto connettivo del mantello in prossimità dei tubuli gonadici con presenza di emociti granulari e ialinociti. Non sono stati rilevati corpi inclusi e nemmeno cellule con marginalizzazione della cromatina.

Dai dati ottenuti appare verosimile che OsHV-1  $\mu$ var abbia giocato un ruolo determinante nello scatenare la mortalità, avvenuta quando la temperatura dell'acqua ha superato il valore di 16°C. Gli esami condotti nei mesi precedenti il mese di maggio, pur essendo stati eseguiti anche su ostriche mantenute in ambiente condizionato a 20°C, sono sempre risultati negativi, il che apre all'ipotesi che se presente il virus non è rilevabile per la bassa carica (fase di latenza), oppure che i soggetti siano effettivamente negativi e che il virus sia contratto dal biota selvatico.

## Bibliografia

1. Costil K., Royer J., Ropert M., Soletchnik P. e Mathieu M., 2005, Spatio-temporal variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Normandy (France). *Helgoland Marine Research*, 59, 286-300.
2. Davison A.J., Eberle R., Ehlers B., Hayward G.S., McGeoch D.J., Minson A.C., Pellett P.E., Roizman B., Studdert M.J. e Thiry E., 2009, The order Herpesvirales. *Archives of Virology*, 154, 171-177.
3. Dundon W.G., Arzul I., Omnes E., Robert M., Magnabosco C., Zambon M., Gennari L., Toffan A., Terregino C., Capua I. e Arcangeli G., 2011, Detection of Type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1  $\mu$ var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. *Aquaculture*, 314, 49-52.
4. EFSA Panel on Animal Health and Welfare, 2010, Scientific opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *EFSA J.* 8, 1-60, 1894.
5. Farley C.A., Banfield W.G., Kasnic G. e Foster W.S., 1972, Oyster herpes-type virus. *Science* 178, 759-760.
6. Renault T., Le Deuff R.M., Chollet B., Cochennec N. e Gérard A., 2000, Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 42, 173-183.
7. Segarra A., Pépin J.F., Arzul I., Morga B., Faury N. e Renault T., 2010, Detection and description of a particular Ostreid Herpes virus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research*, 153, 92-99.
8. Vigneron V., Sollic G., Montanie H. e Renault T., 2004, Detection of Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) DNA in seawater by PCR: influence of water parameters in bioassays. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62, 35-44.



# APPLICAZIONE DI TECNOLOGIE MOLECOLARI PER IL MONITORAGGIO DI ACQUE MARINE, SEDI DI IMPIANTI DI MITICOLTURA IN SICILIA, INTERESSATE DA FIORITURE ALGALI DI *ALEXANDRIUM* SPP

Costa A.<sup>1</sup>, Giacobbe M.G.<sup>2</sup>, Gangemi E.<sup>2</sup>, Penna A.<sup>3</sup>, Borzì S.<sup>2</sup>, Alio V.<sup>1</sup>, Pisano P.<sup>1</sup>, Rabito A.<sup>4</sup>, Di Noto A.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia “A.Mirri” Palermo <sup>2</sup>Istituto per l’Ambiente Marino Costiero-Messina, <sup>3</sup>Dip Scienze Biomolecolari Sez Biologia Ambientale Univ di Urbino <sup>4</sup>ARPA Siracusa

**Keywords:** tossine algali PSP, fitoplancton, PCR

## Introduzione

Il problema delle fioriture algali tossiche (HAB) e della presenza delle tossine algali nei molluschi ha assunto negli ultimi decenni grande rilevanza dal punto di vista economico ed igienico-sanitario. Ciò è dovuto, probabilmente, al flusso commerciale internazionale dei molluschi che vengono posti in zone di stabulazione, oppure veicolati dal traffico navale. La presenza di tossine nei molluschi bivalvi oltre i limiti stabiliti dalla normativa vigente, ne comporta il divieto di raccolta e di commercializzazione ai fini della tutela della salute pubblica. E' noto che i molluschi bivalvi vivi possono concentrare pericolose tossine, prodotte da varie specie microalgali, e pervenire così all'uomo a seguito del loro consumo, anche dopo cottura. In particolare, la tossina PSP (Paralyzing Shellfish Poison) responsabile di sindromi neurotossiche e rappresentata dalla saxitossina e dai suoi analoghi, è prodotta da microalghe come i dinoflagellati *Alexandrium* (*A. minutum*, *A. tamarense*, *A. catenella* e *A. taylori*) e *Gymnodinium* (*G. catenatum*), con ampia distribuzione geografica e presenti in varie zone del mar Mediterraneo. La presenza di alghe tossiche per PSP (*A. minutum*) è riportata già da alcuni anni anche nelle acque del Porto di Siracusa presso il quale sono ubicati degli impianti di miticoltura, classificati come acque “zona B”. Precedenti nostri lavori riportano nel contempo la positività per tossina PSP nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) con concentrazioni di saxitossina superiori al limite di legge, e contemporanea presenza di specie tossiche (*A. minutum*) nelle acque della stessa zona. In questo lavoro vengono riferiti episodi di recenti fioriture algali da *Alexandrium* spp nelle acque della stessa zona riportando per la prima volta la presenza di *A. catenella*, con l'applicazione di metodiche molecolari per l'identificazione delle specie algali tossiche.

Summary- One of the main problems in such regions worldwide is the increased frequency of HABs (Harmful Algal Blooms), including blooms of toxic dinoflagellates, such as several *Alexandrium* species producing potent neurotoxins (saxitoxins and/or gonyautoxins). Bloom impact on aquaculture may be dramatic, with economic consequences and risks for human health. Recent toxic blooms of *Alexandrium* spp (Dinophyceae), *A. minutum* and first records of *A. catenella*, are reported in an Ionian bay of Sicily, the Syracuse harbour, hosting shellfish aquaculture practices.

## Materiali e metodi

Lo studio di microalghe tossiche da noi effettuato nelle acque del Porto di Siracusa ha previsto l'applicazione di tecniche di biologia molecolare, come valido supporto al monitoraggio di specie tossiche e problematiche HAB, in accoppiamento alle metodiche tradizionali di microscopia per lo studio morfologico. In particolare tale studio includeva:

1) identificazione di specie tossiche come *Alexandrium* spp. in base alle caratteristiche morfologiche osservate al microscopio ottico; 2) identificazione e conferma della specie bersaglio mediante tecnica PCR quantitativa Real Time.

Estrazione del DNA e amplificazione. I campioni di acqua (10 ml) sono stati centrifugati a 4000 g x 15 min a T.a. per ottenere il pellet cellulare: da questo è stato estratto il DNA mediante DNeasy Plant Mini kit (Qiagen). La prima identificazione molecolare, effettuata mediante PCR utilizzando primers specifici e amplificando la zona ITS-5.8S rDNA, ha permesso la rapida conferma dell'identità di diversi specie tossiche sospette quali *A. minutum* e *A. catenella*. La metodica PCR è descritta in Penna et al.

La presenza di cellule di *A. catenella* nei campioni delle retinate è stata confermata per la prima volta in questa area mediante l'amplificazione della regione 5.8S-ITS.

Attualmente sono in corso studi di tossinogenicità delle colture di *Alexandrium*.

Nel contempo è stata effettuata mensilmente la determinazione di biotossine algali PSP sui campioni di mitili, campionati nella stessa zona, mediante metodo biologico ufficiale AOAC 959.08.

## Risultati e discussione

Lo studio del plancton marino costiero è di primaria importanza ai fini di una corretta gestione delle risorse ambientali, specialmente in aree interessate da attività umane con ricadute di tipo socio-economico sul territorio. Gli ambienti confinati come baie, lagune, porti e mari interni, hanno un ruolo predominante, tra le diverse tipologie di aree costiere, in quanto spesso sono siti idonei ad attività di pesca ed acquicoltura e, allo

stesso tempo, proprio a causa delle loro caratteristiche di segregazione con scarsa circolazione e ricambio delle acque, sono sede di fenomeni eutrofici/distrofici come i bloom algali, che possono causare danni all'ecosistema ed alla sua produttività. A questo si possono aggiungere problemi di tipo sanitario se i bloom sono causati da specie produttrici di tossine, con possibili danni diretti agli stock ittici e/o con l'accumulo di tossine lungo la catena alimentare, per es. attraverso i mitili, fino all'uomo.

La zona del Porto di Siracusa rappresenta come l'area siciliana più idonea allo studio, in termini di area più a rischio a causa della presenza di varie specie fitoplanctoniche produttrici di Harmful Algal Blooms (HAB). Questo sito confinato, che ospita la coltivazione di mitili, è fra l'altro soggetto all'insorgenza ricorrenti fioriture tossiche o nocive di *A. minutum* e di altre specie tossiche di Dinoflagellate, fioriture che si verificano ogni primavera, con una densità massima di  $10^6$  cell/l. Riguardo i risultati ottenuti, la ricerca di tossine algali PSP effettuata sui campioni di mitili mediante *mouse test* ha dato esito negativo. L'analisi del fitoplancton ha invece permesso di evidenziare la presenza di una nuova specie di alga tossica appartenente al genere *Alexandrium*, *A. catenella*, per la prima volta riscontrata nelle acque di questa località mediterranea e confermata dall'approccio molecolare. Si ipotizza una recente introduzione della specie nella nostra regione, poiché i dati ottenuti da precedenti monitoraggi del fitoplancton tossico mediante indagini microscopiche e molecolari non avevano mostrato la presenza di *A. catenella* nelle acque del porto di Siracusa, o in altre località siciliane. Il problema delle alghe tossiche e delle ricorrenti fioriture in varie zone delle coste italiane, sedi di impianti di molluschicoltura, è da tempo noto (1): il conseguente rischio sanitario è soggetto a continua attenzione grazie alle attuali normative comunitarie e nazionali che impongono monitoraggi sistematici di acqua e MBV per rilevare rispettivamente l'eventuale presenza di plancton tossico e di biotossine nelle aree di produzione, nonché provvedimenti di rapida chiusura delle aree di pesca quando accumulate a livelli superiori ai limiti di legge. Riteniamo opportuno nei periodi riconosciuti da anni più a "rischio fioritura", quali la primavera ed inizio estate, tenuto conto anche delle temperature della nostra regione, intensificare le analisi per la ricerca di tossine PSP nei molluschi d'allevamento, al fine di controllare e limitare l'impatto pesante di queste fioriture sulla salute pubblica e sulla molluschicoltura.

(Ricerca finanziata dal Ministero della Salute- RF-IZI-2008-1139874)

## Bibliografia

1. Ade P., Funari E., Poletti R. Il rischio sanitario associato alle tossine di alghe marine (2003) *Ann Ist Sup Sanità* 39 (1):53-68.
2. Costa A., Di Noto A.M., Russo Alesi E.M., Alio V., Milandri A., Pompei M., Poletti R., Giacobbe M.G., Caracappa S. (2007) Presenza di biotossine algali del tipo PSP (Paralytic Shellfish Poison) in mitili allevati nel porto grande di Siracusa, Sicilia *Atti LXI Convegno Nazionale SISVeT*; 375-376
3. L. Galluzzi, A. Penna, E. Bertozzini, M.G. Giacobbe, M. Vila, E. Garcés, S. Prioli, M. Magnani (2005) Development of a qualitative PCR method for the *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) detection in contaminated mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Harmful Algae* 4:973-983.
4. Giacobbe M.G., M. Maso', A. Milandri, A. Penna, R. Poletti. (2006) Plankton toxicity and shellfish contamination by phycotoxins in a new Mediterranean locality. In: Proceedings of the 5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, (Eds K.Henshilwood, B. Deegan, T. McMahon, C. Cusack, S. Keaveney, J. Silke., M. O' Cinneide, D. Lyons, P.Hess). Marine Institute, Rinville, Oranmore, Galway, Ireland, p.206-214
5. A. Milandri, M. Cangini, A. Costa, M.G. Giacobbe, R. Poletti, M. Pompei, E. Riccardi, S. Rubini, S. Virgilio, S. Pigozzi (2008) Caratterizzazione delle tossine PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) in mitili raccolti in differenti aree marine italiane *Biol. Mar. Mediterr.* 2008, 15(1), 38-41
6. Penna A., S. Fraga, M. Masò, M.G. Giacobbe, I. Bravo, E. Garcés, M. Vila, E. Bertozzini, F. Andreoni, A. Lugliè, C. Vernesi. (2008) Phylogenetic relationships among the Mediterranean *Alexandrium* (Dinophyceae) species based on sequence of 5.8S gene and Internal Transcript Spacers of the rRNA operon. *European Journal of Phycology*. 43: 163-178.
7. Penna A., Bertozzini E., Battocchi C., Galluzzi L., Giacobbe M.G., Vila M., Garcés E., Lugliè A., Magnani M. (2007) Monitoring of HAB species in the Mediterranean Sea through molecular methods. *Journal of Plankton Research*, 29 (1): 19-38.
8. Vila M., Giacobbe M.G., Masó M., Gangemi E, Penna A., Sampedro N., Azzaro F., Camp J., Galluzzi L. (2005) A comparative study on recurrent blooms of *Alexandrium minutum* in two Mediterranean harbours. *Harmful Algae*, 4: 673-695.

# INDAGINE SANITARIA: L'ESPERIENZA DELL'AREA VASTA N. 4 DI FERMO-ASUR MARCHE

Gentili V.<sup>1</sup>, Angellotti A.<sup>2</sup>, Fichera S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Medico Veterinario, libero professionista

<sup>2</sup> Servizio Veterinario Igiene degli Alimenti di Origine Animale ASUR MARCHE, Area Vasta n. 4 di Fermo

**Keywords:** *Venus gallina*, *E. coli*, fonti di inquinamento, punto di campionamento.

## Introduzione

La sorveglianza sanitaria è una attività che richiede l'integrazione di informazioni di carattere ambientale e di carattere sanitario, al fine di valutare le possibili contaminazioni organiche e quanto queste impattano su una determinata zona. Dato che i molluschi bivalvi sono strettamente dipendenti dall'ambiente in cui vivono, il Regolamento CE 854/2004 (1) prevede lo svolgimento della sorveglianza sanitaria come requisito obbligatorio e preliminare alla classificazione o alla riclassificazione di un'area per la raccolta dei molluschi bivalvi ai fini del consumo umano, inserendo in questo campo una reale analisi del rischio, con lo scopo di prevenire i possibili pericoli trasmessi dai molluschi bivalvi.

Da tutto questo lavoro di raccolta e valutazione dei dati si arriva infine alla scelta del punto di prelievo per il monitoraggio dei molluschi, da scegliere con cura e solo dopo una ponderata valutazione delle fonti di inquinamento e dove esse incidono maggiormente.

## Summary

Classifying and monitoring fishery waters and the molluscs themselves is fundamental to ensure food safety in shellfish production. The "Area Vasta di Fermo" (Marche Region), in collaboration with "Consorzio per la gestione della pesca dei molluschi bivalvi nel Compartimento marittimo di San Benedetto del Tronto", has started a series of studies on the presence of *E. coli* as an indicator of faecal contamination in the environment, in shellfish and in fishery waters, and on the factors that can affect said presence. The studies include an assessment of sea currents and tides, a census of the sources of human and animal pollution and the evaluation of data regarding organic pollutants dumped off-shore (linked to seasonal variations) in the stretch of coast between the rivers Chienti (at north) and Aso (at south). Additionally, the data resulting from the monitoring of *E. coli* on shellfish harvested in the collection areas in the province of Fermo from 2008 to 2011 was examined. The results showed that in most cases, an increase in the levels of *E. coli* was preceded by more or less abundant weather events.

The conclusions reached make it advisable to carry out a more detailed risk analysis that takes into account the above-mentioned factors.

## Materiali e metodi

L'indagine è stata svolta nel rispetto di quanto disposto dalla Delibera della Giunta Regionale n. 1665 del 22/11/2010 (2) e in applicazione delle Linee Guida del Centro di Referenza Comunitario per la contaminazione microbiologica dei molluschi bivalvi, emanate il 4 agosto 2010 (CEFAS, 2010) (3).

Le informazioni relative alle fonti di contaminazione in parte sono state acquisite dalla documentazione messa a disposizione dai vari Enti competenti (SIAOA, IZS-UM, ARPAM, Regione Marche, Provincia di Fermo, Consorzio Idrico Integrato Provinciale), in parte derivano da rilevamenti diretti effettuati lungo i 26 Km di costa oggetto di studio (dalla foce del fiume Chienti a nord, alla foce del fiume Aso a sud).

La documentazione consultata ha riguardato: informazioni inerenti batimetria ed idrodinamismo nella zona oggetto di indagine, relazioni tecniche degli impianti di depurazione, monitoraggio biologico dei corsi d'acqua afferenti al tratto di mare oggetto di studio, relazioni sulla vulnerabilità ai nitrati delle acque superficiali, dati sul patrimonio zootecnico, mappe con localizzazioni degli allevamenti della regione, dati sul patrimonio di fauna selvatica, dati relativi al monitoraggio delle acque marine costiere.

Tra il 28/03/12 ed il 04/04/12 è stata eseguita l'ispezione diretta della linea di costa, con il supporto di macchina fotografica digitale e GPS per georeferenziare tutte le potenziali fonti di inquinamento, compresi i singoli scarichi artificiali di minore importanza, attivi o meno, gli scolmatori di piena, piccoli fossi, ecc.

Infine, sono stati analizzati i risultati dei monitoraggi per *E. coli* svolti dall'Autorità Competente (A.C.) dal 2008 al 2011 nelle zone di produzione di banchi naturali di *V. gallina* presenti lungo il tratto di costa competente all'Area Vasta n. 4 di Fermo; le zone classificate per l'anno 2011 risultavano essere dieci (Figura 1), suddivise in sottozone sulla base della batimetria (3-6m e 6-9m).

I dati relativi ai prelievi ufficiali per la ricerca di *E. coli* sul prodotto, effettuati dal gennaio 2008 al dicembre 2011, sono stati messi a confronto con i dati storici riguardanti il totale delle precipitazioni giornaliere verificatesi tre giorni prima di ogni prelievo, rilevati in due stazioni di monitoraggio, situate a Civitanova Marche (per le zone di produzione comprese tra Bm.1 e B17.2), ed a San Benedetto del Tronto (per le zone A-B18 ed AQ) (Figura 1).

## Risultati e discussione

Lo studio ed il confronto delle diverse informazioni disponibili hanno consentito di redigere una mappa particolareggiata degli effluenti sulla costa di competenza, con le localizzazioni degli impianti di depurazione costieri e degli scarichi.

Dai dati socio-economici è emerso che i comuni costieri sono quelli più densamente popolati, con conseguente maggiore sviluppo di tutte le attività; l'inquinamento di origine antropica è dunque più rilevante nei pressi del litorale, tenendo anche presente la notevole pressione esercitata sul territorio dall'attività turistica dei comuni costieri nei mesi estivi.

Valutando poi le caratteristiche delle reti fognarie e degli impianti di trattamento di acque reflue si è visto che nei comuni costieri le percentuali di copertura di rete fognaria si aggirano attorno all'80-90% ed i depuratori localizzati nei pressi delle coste in linea di massima presentano capacità adeguate ai carichi di reflui da trattare.

E' importante notare come vi sia una corrispondenza tra l'aumento del valore di *E. coli* nei molluschi e la presenza di precipitazioni pochi giorni prima del campionamento, poiché le acque piovane e di dilavamento dei fiumi, sfociando in mare, sono i principali veicoli dell'inquinamento di tipo organico proveniente da tutto il territorio a monte.

La corrente marina predominante in questo tratto di mare, è inoltre diretta verso sud, pertanto le acque dolci che trasportano il carico organico, hanno maggiore impatto nei confronti delle zone situate immediatamente a sud della foce dei principali corsi d'acqua insistenti nel territorio.

A seguito dello svolgimento dell'intera sorveglianza sanitaria, è stato determinato ed identificato tramite coordinate geografiche per ogni zona classificata, il punto di prelievo che, in base all'analisi del rischio, risulta più rappresentativo e dove pertanto si preleverà il prodotto al momento di svolgere le analisi ufficiali per i parametri microbiologici da parte dell'A.C.

I parametri con cui si è deciso di stabilire tali punti per ciascuna zona di produzione sono stati dunque quelli appena esposti, pertanto la maggior parte dei punti di prelievo sono stati stabiliti immediatamente a sud delle foci dei più importanti corsi d'acqua insistenti nel territorio e più vicino possibile ai litorali (Figura 1).

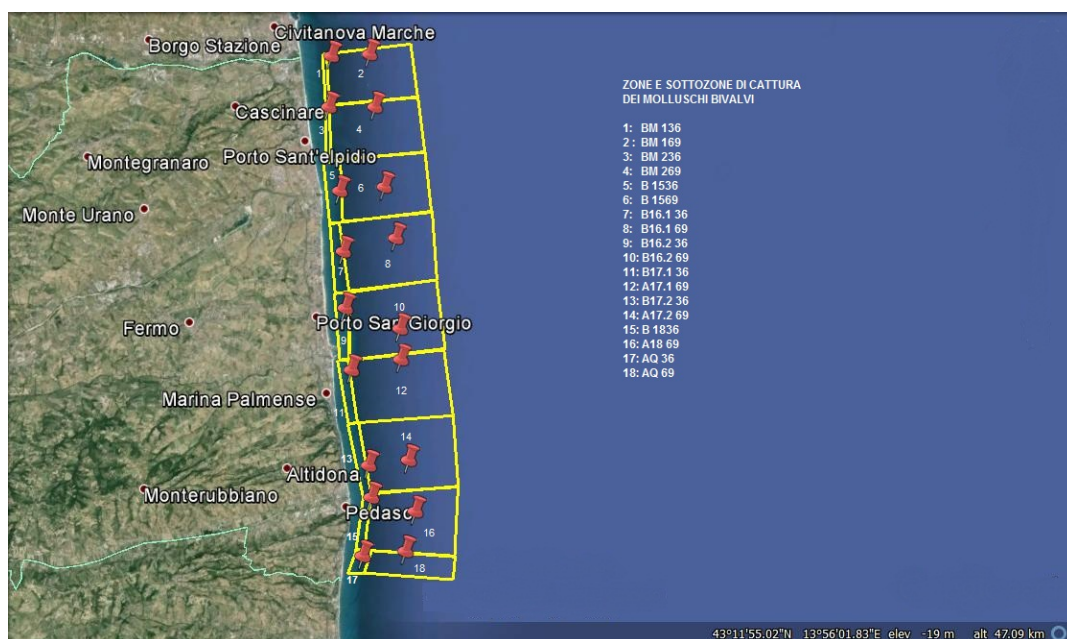


Figura 1. Zone di produzione di *V. gallina* del territorio dell'Area Vasta n. 4 di Fermo e punti di prelievo stabiliti a seguito dell'Indagine Sanitaria.

## Bibliografia

1. Regolamento CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 n. 854 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano e s.m.i. G.U.U.E. n. L139 del 30/04/2004
2. Deliberazione della Giunta Regionale n. 1665 del 22/11/2010. Recepimento intesa ai sensi dell'articolo 8, comma 6 della Legge del 5 giugno 2003 n. 131 tra Governo, Regioni e Province Autonome sulle linee guida per l'applicazione del Regolamento CE n. 854/2004 e 853/2004 nel settore dei molluschi bivalvi. B.U.R. Regione Marche n. 107 del 03/12/2010
3. CEFAS (2010). Microbiological Monitoring of Bivalve Mollusc Harvesting Areas – Guide to Good Practice: Technical Application. Issue 4: August 2010

# ESPERIENZA DI VERIFICA DELLA FUNZIONALITÀ DI UN IMPIANTO DI DEPURAZIONE A CIRCUITO CHIUSO SU MITILI DI PROVENIENZA SPAGNOLA

Giulini G.<sup>1</sup>, Maffei M.<sup>1</sup>, Micci C.<sup>2</sup>, Prioli C.<sup>2</sup>, Villan G.<sup>3</sup> e Fagioli P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mare Soc. Coop. a r.l. - Cattolica (RN) [www.coopmare.com](http://www.coopmare.com)

<sup>2</sup> Mare.A Srl - Cattolica (RN) [www.mare-a.com](http://www.mare-a.com)

<sup>3</sup> L'Acquaviva srl - Porto Viro (RO) [www.l-acquaviva.it](http://www.l-acquaviva.it)

**Keywords:** mitili, depurazione, impianto di depurazione a circuito chiuso

## Introduzione

L'importazione in Italia di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) di provenienza spagnola rappresenta un'importante fonte di approvvigionamento di prodotto, in particolare nel periodo in cui si verifica una diminuzione della produzione nazionale (dall'autunno alla primavera).

Anche questa tipologia di prodotto, se proveniente da zone di produzione di classe B, per poter essere immesso sul mercato deve essere sottoposto ad un trattamento in un Centro di Depurazione o a stabulazione, per un periodo variabile a seconda delle caratteristiche microbiologiche della zona di raccolta, al fine di rispondere ai requisiti di sicurezza alimentare previsti nel Reg. (CE) N. 2073/2005.

Il Reg. (CE) N. 1441/2007 della Commissione del 5 dicembre 2007, che modifica il Reg. (CE) N. 2073/2005, definisce per i molluschi bivalvi vivi i limiti quantitativi per *E. coli* e qualitativi per *Salmonella*, definendo *E. coli* come il parametro utilizzato come indicatore di contaminazione fecale in tale matrice.

In questo studio si è voluto verificare la capacità depurativa di un impianto a circuito chiuso annesso ad un Centro di Depurazione Molluschi (CDM), già sottoposto in precedenza a verifica su mitili e vongole veraci (*Tapes philippinarum*) nazionali, con buoni risultati, utilizzando mitili di provenienza spagnola.

Si è preso come riferimento il parametro *E. coli* per valutare la capacità di abbattere nel tempo la carica microbica iniziale di mitili contaminati artificialmente, focalizzando l'attenzione sulle prime fasi del processo depurativo.

Scopo della sperimentazione è mettere a punto un sistema di validazione dell'efficacia depurativa degli impianti di depurazione anche per questa tipologia di prodotto, garantendo la sicurezza alimentare attraverso la conferma dell'adeguatezza delle misure adottate nel piano HACCP per la gestione e il controllo dei pericoli individuati nei processi produttivi del CDM.

## Summary

Mussels collected from class B production areas, in accordance with Regulation (EC) N. 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004, can be placed on the market for human consumption only after treatment in a purification centre or after relaying.

In this study was taken the parameter *E. coli* as a reference to evaluate the depuration rate in a recirculation system for Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) starting from samples artificially contaminated with strain of *E. coli*. The aim of this study was to evaluate the functionality of the depuration rate in different times, by measuring the charge of *E. coli* in contaminated samples of Mussel of spanish origin, for a validation of HACCP plan parameters.

## Materiali e metodi

L'impianto di depurazione utilizzato è realizzato con due linee separate e indipendenti, entrambe verticali, che comprendono 57 bins. I bins sono suddivisi in una linea da 30 (10 file X 3 contenitori) ed una linea da 27 (9 file X 3 contenitori), permettendo la parzializzazione dell'impianto in fase di utilizzo, a seconda dei flussi di carico stagionali e delle tipologie di prodotto da trattare.

Ogni linea è costituita essenzialmente da: 1 Skym per la depurazione dell'acqua mediante polarizzazione elettrica; 1 sistema di Generazione d'ozono; 1 Dispositivo di degerminazione con lampade UV; 1 pompa centrifuga con pre-filtro per la circolazione dell'acqua che preleva l'acqua dalla vasca di accumulo e trattamento interrata, posta a lato dello stabilimento. La portata totale massima dell'impianto risulta pari a 1.710 litri/min (19 docce).

La specie sottoposta ad analisi è stata il mitilo (*Mytilus galloprovincialis*) di provenienza spagnola. I campioni sono stati prelevati da un lotto iniziale di circa 100 kg di mitili. La sospensione batterica contaminante è stata allestita in laboratorio con una soluzione di 1 litro di acqua peptonata tamponata contenente al suo interno un ceppo di *E. coli* ATCC 25922, con un livello di contaminazione batterica pari a  $1 \times 10^9$  UFC/g.

Un contenitore della capienza di 300 l è stato riempito con acqua in ingresso dell'impianto di depurazione (temperatura 13°C e salinità 31‰), e sono stati immessi al suo interno circa 100 kg di mitili. Successivamente è stata immessa all'interno del contenitore anche la soluzione batterica, avendo cura di mescolare il tutto. Per tutta la durata della prova è stato monitorato il livello di ossigeno, che ha mantenuto valori particolarmente elevati (valore medio 12.0 mg/l).

Prima dell'inizio della prova di contaminazione sono stati prelevati dal lotto di molluschi in esame 5 sacchetti in rete plastica, da 1 kg ciascuno, a costituire il campione non contaminato (T0 NC).

Dopo 24 ore di contatto con la soluzione contaminata, sono state eseguite le seguenti operazioni:

- prelievo di 5 kg di mitili contaminati dal contenitore e preparazione di 5 sacchetti in rete plastica, da 1 kg circa ciascuno, con campione contaminato non depurato (T0 C), e successiva conservazione a temperatura di refrigerazione (+2/+4°C);

- depurazione all'interno dell'impianto della restante parte dei mitili del contenitore, secondo le abituali modalità e condizioni di processo adottate dall'azienda, a densità di 200 kg su 400 l.

Dopo 4, 8, 12 e 24 ore dall'inizio del processo di depurazione sono stati preparati 5 sacchetti in rete plastica da circa 1 kg ciascuno, di campione contaminato depurato rispettivamente per 4 (T4), 8 (T8), 12 (T12) e 24 ore (T24) e conservati a temperatura di +2/+4°C, avendo cura di tenere separati i campioni.

Il trasporto in laboratorio è stato svolto in condizioni di temperatura controllata e in contenitori separati in base ai tempi di depurazione.

I campioni sono stati analizzati utilizzando il metodo di prova ISO/TS 16649-03, indicato dal Reg. (CE) N. 1441/2007 come metodo di analisi di riferimento per la determinazione di *E. coli* nei molluschi bivalvi vivi.

## Risultati e discussione

I campioni non depurati e non contaminati (T0 NC), hanno evidenziato un livello di contaminazione medio pari a  $1.3 \times 10^2$  MPN/100 g. I campioni non depurati (T0 C), hanno evidenziato un livello di contaminazione medio pari a  $1.2 \times 10^5$  MPN/100 g.

Dopo 4 ore di depurazione i campioni (T4) hanno evidenziato un decremento della carica batterica, raggiungendo valori di contaminazione medi pari a  $1.9 \times 10^3$  MPN/100 g.

Dopo 8 ore di depurazione i campioni (T8) hanno evidenziato un decremento della carica batterica, raggiungendo valori di contaminazione medi pari a  $1.2 \times 10^3$  MPN/100 g.

Infine i campioni analizzati dopo 12 e 24 ore di depurazione (T12 e T24) hanno mostrato una contaminazione media pari rispettivamente a  $9.8 \times 10^2$  MPN/100 g e a  $1.8 \times 10^2$  MPN/100 g.

I campioni analizzati alle diverse tempistiche di depurazione hanno evidenziato un decremento della carica rispetto alla contaminazione iniziale "T0 C" prodotti contaminati, passando da livelli di contaminazione di circa  $1 \times 10^5$  MPN/100g a circa  $1 \times 10^2$  MPN/100 g nei bivalvi testati dopo 24 ore. Dall'andamento dei grafici si può dedurre come la depurazione abbia un rilevante impatto già dopo 4 ore di trattamento, per poi avere una capacità decontaminante dalle 8 alle 12 ore di depurazione sensibilmente inferiore.

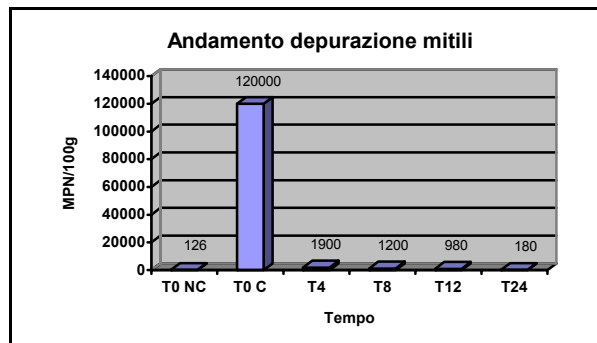


Fig. 1 andamento grafico dei valori di MPN/100 g di *E. coli* ai diversi tempi di depurazione in Mitili di provenienza spagnola.

Continuando la depurazione fino alle 24 ore è possibile verificare un'ulteriore riduzione della contaminazione batterica da *E. coli* evidenziando un'ulteriore capacità depurativa dell'impianto.

In conclusione, in base allo studio effettuato e ai dati ottenuti, l'impianto testato ha dimostrato la sua capacità depurativa anche per questa tipologia di prodotti, che hanno una provenienza diversa da quella delle zone di produzione nazionale e sono sottoposti ad un trasporto di lunga durata prima del trattamento.

I risultati della sperimentazione potranno essere di supporto ai CDM con impianti di depurazione a circuito chiuso nella valutazione del processo di depurazione e nella implementazione di prove di validazione della capacità depurativa dei propri sistemi di trattamento.

## Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato condotto con la collaborazione dell'Azienda L'Acquaviva S.r.l. di Porto Viro (RO).

## Bibliografia

1. Reg. (CE) N. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004.
2. Reg. (CE) N. 1441/2007 della Commissione del 5 dicembre 2007
3. Reg. (CE) N. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
4. FAO. Fisheries Technical Paper N. 511 – Bivalve depuration: fundamental and practical aspects (2008).

# 30 ANNI DI RICERCA E SPERIMENTAZIONE IN OSTRICOLTURA: UNA SELEZIONE DELLA BIBLIOGRAFIA ITALIANA

Pellizzato M., Prioli G., Rossetti E., Turolla E., Zentilin A.  
Soci fondatori S.I.R.A.M.

**Keywords:** *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, ostricoltura, bibliografia

## Introduzione

Nell'ambito delle ricerche applicate in molluschicoltura condotte in Italia negli ultimi 30 anni, l'ostricoltura ha ricevuto più volte e da più parti (mondo della ricerca, istituzioni, produttori, commercianti, consumatori) un'attenzione e un interessamento almeno pari, se non superiore, a quello riservato ad altri bivalvi.

I risultati spesso lusinghieri ottenuti dalle sperimentazioni, purtroppo, non hanno portato gli operatori del settore a sviluppare pratiche di allevamento durature e su ampia scala di questi pregiati molluschi: infatti, le ostriche, pur vantando ancora un'ampia ed innegabile fama nel nostro Paese, vengono prodotte in quantità del tutto marginali.

I giacimenti naturali, un tempo diffusi nei mari e nelle lagune italiane, sono stati depauperati o distrutti, soprattutto tra gli anni '60-'80, per l'eccessiva pressione di pesca condotta con attrezzi particolarmente impattanti (draghe a traino), a causa dei cambiamenti ambientali che si sono verificati nelle aree lagunari e della fascia costiera (distrofie, anossie, copertura macroalgale, modifiche nei parametri mesologici), la diffusione di epizoozie, ecc.

Le ostriche, occupano ancora oggi un posto di primo piano nelle statistiche mondiali dei prodotti da acquicoltura (F.A.O., 2012 - [http://issuu.com/aepdf/docs/002\\_-\\_the\\_state\\_of\\_world\\_fisheries\\_](http://issuu.com/aepdf/docs/002_-_the_state_of_world_fisheries_)), ma in Italia non hanno una adeguata diffusione: si segnalano solo attività produttive episodiche o marginali, benché siano noti diversi sistemi di allevamento e ben conosciute le tecniche per la riproduzione controllata per ottenere il "seme" di questo bivalve in modo relativamente semplice.

Il presente lavoro propone una selezione di pubblicazioni tecnico-scientifiche, frutto di studi e sperimentazioni, come contributo conoscitivo per un possibile rilancio del settore.

## Summary

This paper proposes a selection of publications and technical research, the result of recent studies and experiments in oyster culture, such as cognitive contribution to a possible development of the shellfish industry, once widespread in Italy.

## Materiali e metodi

Attingendo alla bibliografia specifica sull'argomento, sono stati raccolti alcuni dei principali lavori che trattano aspetti conoscitivi di tipo tecnico-scientifico e produttivistico, legati alla pesca e all'allevamento delle ostriche in Italia negli ultimi 30 anni.

E' riportato un elenco bibliografico che riassume, per argomento (allevamento, pesca, insediamento-reclutamento, sicurezza alimentare e divulgazione-informazione), in ordine temporale, con il riferimento bibliografico e copia del lavoro originale.

## Discussione e conclusioni

La selezione bibliografica riportata si propone di fornire la base conoscitiva per affrontare le sfide insite in un futuro sviluppo a fini produttivi dell'ostricoltura in Italia.

Dai lavori sopraelencati si possono trarre le seguenti osservazioni conclusive:

- i banchi naturali di ostriche (generi: *Ostrea* – autoctona; *Crassostrea* – alloctona) sono praticamente scomparsi o depauperati a tal punto da non poter più essere sfruttati a fini commerciali. A tale proposito, ove possibile, si auspicano azioni di ripopolamento per il ripristino dei giacimenti, così come avviene in alcuni Paesi (i.e. U.S.A.);

- la raccolta di giovanili in natura ("seme") risulta attualmente improponibile, sia per la carenza delle larve che per la variabilità annuale degli insediamenti (*spat*);

- le sperimentazioni di allevamento e relative *performances* produttive sono in genere incoraggianti, con buoni tassi di crescita, limitata mortalità, elevata qualità del prodotto; rischi possono derivare da eventi ambientali distrofici, da infestazione di *Polidora* sp., e dai pericoli causati da epizoozie;

- non sembra vi possano essere difficoltà tecniche nella gestione dell'allevamento, in quanto oggi si dispone di sistemi di lavorazione ormai consolidati, anche in mare;

- risulta essenziale approfondire e verificare gli aspetti economici e mercantili (in termini di costi, risorse umane, commercializzazione, ricavi, ...), che rappresentano i principali fattori limitanti per un rilancio della produzione ostreicola italiana su vasta scala.

**RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO**

PELLIZZATO M., DA ROS L., RENZONI A. 1983 - Acclimazione in Laguna di Venezia di Crassostrea gigas (Thunberg) proveniente da schiuditoio. *Quaderni dell'Istituto Brunelli*, **3(2)**:81-94.

PELLIZZATO M. 1984 - Monitoring of oyster spat settlement (Ostrea edulis L. and Crassostrea gigas (Thunberg)) on collectors in the Venice Lagoon (Italy). *Nova Thalassia, Atti XV° Congr. S.I.B.M., Trieste, 27 Sett. - 2 Ott. 1983*, **6(Suppl.)**:683.

PELLIZZATO M. 1984 - Monitoraggio dell'insediamento su substrati artificiali dei bivalvi Ostrea edulis L. e Crassostrea gigas (Thunberg) nella Laguna di Venezia. *Lavori - Soc. Ven. Sci. Nat.*, **9(2)**:219-223.

DA ROS L., PELLIZZATO M. 1984 - Ostricoltura: sperimentazione ed allevamento nella Laguna di Venezia. *Agricoltura Ricerca*, **35/36**:10-19

AA.VV. 1984 - Ricerca sulla possibilità di poter riprestinare l'allevamento di ostriche in laguna di Venezia. pagg.78-83. In: Attività del Centro Ricerche del Co.S.P.A.V. In: Ricerca e sperimentazione in acquacoltura. *Regione Veneto - E.S.A.V.*, pp. 57-92.

PELLIZZATO M., DA ROS L. 1985 - Acclimatization and growth in Venice Lagoon of hatchery seed of Crassostrea gigas related to some physico-chemical parameters. *Atti 2° Congr. S.It.E., Padova, 25 - 28 Giu. 1984*, **5**:505.

PELLIZZATO M., DA ROS L. 1985 - Allevamento sperimentale di Ostrea edulis L. e Crassostrea gigas (Thunberg) in Laguna di Venezia. *Oebalia, Atti XVI° Congr. S.I.B.M., Lecce, 25-30 Sett. 1984*, **11(3)**:891-893.

PERDICARO R., PELLIZZATO M. 1985 - Rilevamenti bioecologici su banchi naturali di ostriche e mitili nella Laguna di Venezia. *Agricoltura e Ricerca*, **56**:7-12.

DA ROS L., PELLIZZATO M. 1985 - Risultati della ricerca applicata in ostricoltura. *Ambiente, Risorse, Salute*, **40**:9-10.

DA ROS L., PELLIZZATO M. 1985 - Pesca, commercializzazione e prospettive di allevamento delle ostriche in Italia. *Il Pesce*, **2(6)**:24-27.

CESARI P., PELLIZZATO M. 1985 - Molluschi pervenuti in Laguna di Venezia per apporti antropici volontari o casuali. Acclimazione di Saccostrea commercialis (Fredale & Roughley, 1933) e di Tapes philippinarum (Adams & Reeve, 1850). *Boll. Malacologico*, **21(10-12)**:237-274.

PELLIZZATO M., RENZONI A. 1986 - Raccolta di seme di Mytilus galloprovincialis Lmk, Ostrea edulis L. e Crassostrea gigas (Thunberg) e loro allevamento in laguna di Venezia. *Nova Thalassia, Atti XVIII° Congr. S.I.B.M., Cesenatico (Fo), 9 - 12 Sett. 1986*, **8(Suppl. 3)**:381-392.

PELLIZZATO M., PERDICARO R. 1987 - Condizioni idrologiche e trofiche della Laguna di Venezia in relazione ai popolamenti di Ostrea edulis, Crassostrea gigas e di altri molluschi eduli. *Mus. Civ. St. Nat. Venezia*, **37**:213-225.

CESCHIA G., ZENTILIN A. 1990 - Indagine parassitologica su di un banco naturale di ostriche piatte (Ostrea edulis) della laguna di Marano. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, **3**:26-27.

PELLIZZATO M. 1992 - Italian lagoon project opens new hatchery. Oysters and scallops join clams in Promar 2000. *Fish Farming International*, **19(10)**:12-15.

ARCULEO M., SCERRA V., SINATRA M. C. 1993 - Andamento stagionale della composizione chimica e della resa in polpa di Ostrea edulis (Linnaeus, 1758) in un banco naturale del porto di Gioia Tauro (RC). - *Atti X Congresso Nazionale. ASPA, Bologna 1993*, pp. 587-592.

ASALM, 1993 - Ricerche pluriennali per lo studio dell'ambiente lagunare e per l'allevamento di nuove specie di molluschi. P.I.M., Misura 4, Rapporto Tecnico.

SORVILLO R., D'ANNA G., BADALAMENTI F., MAZZOLA A. 1993 - Primi dati sull'accrescimento di Crassostrea gigas in un parco sperimentale marino nel Golfo di Castellammare (Sicilia N/O). - *Biologia Marina*, suppl. al Notiziario S.I.B.M., **1**, pp. 263-264.

SORVILLO R., D'ANNA G., BADALAMENTI F., MAZZOLA A. 1994 - Insediamento di Ostrea edulis su collettori nel Golfo di Castellammare (Sicilia Nord Occidentale). - *Biol. Mar. Medit.*, **1(1)**, pp. 437-438.

BOMBACE G., FABI G., FIORENTINI L., PELLIZZATO M., SPERANZA S. 1995 - Valutazione della biomassa di mitili (Mytilus galloprovincialis) ed ostriche (Ostrea edulis e Crassostrea gigas) presenti nella Laguna di Venezia. *Atti VI° Convegno S.IT.E.*, **16**:59-52.

MAFFEI M., PIVA P., PRIOLI G. 1995 - Sperimentazione di un sistema ottimale per l'allevamento di ostriche in mare aperto. Associazione Interprovinciale per la valorizzazione del pesce azzurro e di altre specie massive in Adriatico, pp. 65.

AA.VV. 1995 - Acquacoltura in Friuli: produzione, ricerca e salvaguardia ambientale. Atti Convegno CCIAA Udine, 21 Settembre 1995.

MAFFEI M., PIVA P., PRIOLI G. 1996 - Allevamento sperimentale di Crassostrea gigas (Thunberg, 1793) in mare aperto su filari flottanti semi-sommersi. *Biol. Mar. Medit.*, **3(1)**: 400-404.

PRIOLI G. 1996 - Prove di allevamento per ostrica concava (Crassostrea gigas) e capasanta (Pecten jacobaeus) in area "Paguro". Finanziamento Emilia-Romagna L.R. 3/79.

OREL G., ZENTILIN A., PELLIZZATO M. 1996 - Allevamento di molluschi e gestione dei banchi naturali in Alto Adriatico. Atti Convegno Nazionale: Il contributo dei progetti di ricerca allo sviluppo dell'acquacoltura nazionale. Udine, 17-18 Giugno 1996, pp. 72.

MATTEI N., PELLIZZATO M. 1997 - Mollusk fisheries and Aquaculture in Italy. *NOAA - Fisheries Bulletin, U.S. Dept. of Commerce, Seattle*, **3**:201-216.

ZENTILIN A., PELLIZZATO M. 1997 - La molluschicoltura in Italia. *Atti XX Convegno Nazionale sui problemi della pesca e dell'acquacoltura. Cesenatico (Fo), 11-12/10/96*, pagg. 113-119.

MILIA M., ROSSETTI E. 1997 - Innovazione nel comparto della trasformazione ittica. Associazione Adige Colli, GAL-LEADER, pp. 54.

PELLIZZATO M., LIBRALATO M., NESTO N. 1998 - Molluschicoltura in biotopi marginali della Laguna di Venezia. *Biol. Mediter.*, **5(3)**:1917-1926.

RONCARATI A., MORDENTI O., BENEDETTI S., MELOTTI P. 1998 - Growth performance of diploid and triploid oysters (Crassostrea gigas Thunberg, 1793) reared in the middle Adriatic sea. - *XXXIII International Symposium on New Species for Mediterranean Aquaculture*. Alghero, aprile 1998, pp. 373-377.

LUBRANO LAVADERA S., FABBROCINI A., RISPOLI S., SANSONE G. 1999 - Prove di crescita di Ostrea edulis presso allevamento ittico "off-shore". - *Biol. Mar. Medit.*, **6(1)**, pp. 325-327.

ROSSI R., PRIOLI G., PELLIZZATO M., TUROLLA E., GIULINI G. 2001 - Molluschicoltura. In: Acquacoltura responsabile. A cura di S. Cataudella e P. Bronzi. Roma, *Unimar-Uniprom*, pagg. 422-439.

LUBRANO LAVADERA S., FABBROCINI A., RISPOLI S., MARTELLO A., NASCIMENTO I., SANSONE G. 2001 - Prove di crescita di Crassostrea gigas presso un allevamento ittico in mare. - *Biol. Mar. Medit.* **8(1)**: 580-582.

BALDUCCI A. 2001 - Prospettive ed attualità dell'allevamento dell'ostrica. Tesi di Laurea a.a. 2000-2001. Università degli Studi di Bologna. Facoltà di Medicina Veterinaria.

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE. 2001 - Esperimenti di allevamento lagunare di nuove specie e di allevamento di specie tradizionali in impianti sperimentali. L.R. 6.7.1988, n. 11, Art. 7. Iniziativa Comunitaria PESCA. Report.

BRESSAN M., BARICHELLO B., GATTO T., PELLIZZATO M. 2002 - Utilizzo di substrati artificiali per lo studio dell'insediamento larvale di molluschi bivalvi in Laguna di Venezia. *Lavori - Soc. Ven. Sci. Nat.*, **27**:33-46.

MIETTI N., PRIOLI G., FIORI F., TONTINI N. 2002 - Studi sull'attività riproduttiva di Ostrea edulis L. in medio Adriatico e prove di reperimento di seme selvatico. *Biol. Mar. Medit.* **9(1)**: 145-153.

PELLIZZATO M., PENZO P. 2002 - L'allevamento e la pesca di ostriche, mitili, vongole e granchi. In: Pesci molluschi e crostacei della laguna di Venezia. Risorse ittiche e ambiente lagunare tra storia e innovazione. A cura di M. Pellizzato. Venezia, *Provincia di Venezia, Cicero*, pp. 131-155.

CABERLOTTO S., GALVAN T., PELLIZZATO M. 2003 - Molluschicoltura sperimentale in valle da pesca (Valle Dogà, laguna di Venezia). *Biol. Mar. Medit.*, **10(2)**:412-414.

PRIOLI G., BOSCOLO R. 2003 - Realizzazione di un impianto pilota per l'allevamento e affinamento dell'ostrica piatta (Ostrea edulis) in Laguna di Venezia. Consorzio Risorse Alimentari e Ittiche Soc. Coop. a r.l.



ORBAN E., DI LENA G., MASCI M., NEVIGATO T., CASINI I., CAPRONI R., GAMBELLI L., PELLIZZATO M. 2004 - Growth, nutritional quality and safety of oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in the lagoon of Venice (Italy). *J.Sci. Food Agric.*, **84**:1929-1938.

PRIOLI G., MAFFEI M., MIETTI N., FIORI F., GIULINI G., MATARAZZO D., CONGIU L., DEZFULI S. B., MALORGIO G.A., MATTEI N., MILANDRI A., MONTANARI G., TUROLLA E. 2004 - Studi e sperimentazioni indirizzati allo sviluppo della produzione di *Ostrea edulis* in Italia. MIPAF – 6° Piano Triennale.

PELLIZZATO M., GALVAN T., PENZO P. 2005 - Prospettive di ostricoltura in alto Adriatico. 35° Congresso S.I.B.M. Genova, *Biol. Mar. Medit.* **12(1)**:223-226.

TUROLLA E., ROSSI R. 2005 – Esperienze di allevamento dell'ostrica concava (*Crassostrea gigas*) in Alto Adriatico. Technical Report. Dip. Biologia – Univ. Ferrara, pp. 31.

CHINELLATO A., PELLIZZATO M., BRESSAN M. 2006 - Insemediamento di larve di bivalvi su collettori artificiali in un'area a barriere artificiali nel Nord Adriatico. 36° Congresso S.I.B.M. Trieste, *Biol. Mar. Medit.* **13(1)**:1072-1076.

CHINELLATO A., BRESSAN M., PELLIZZATO M. 2006 - Insemediamento, reclutamento ed accrescimento dei bivalvi eduli su strutture in sospensione nell'area del campo sperimentale. In: Il Campo Sperimentale in Mare: prime esperienze nel Vento relative a elevazioni del fondale con materiale inerte. Regione Veneto, ARPAV, Regione Veneto, ARPAV, pp. 144-164.

TUROLLA E. 2006 – Allevamento in sospensione dell'ostrica concava (*Crassostrea gigas*) su sistemi long-line al largo di Goro (Fe). *Il Pesce*, **3/06**: 6-12.

TUROLLA E. 2006 – Sperimentazione di nuove soluzioni tecnologiche per l'allevamento di ostriche concave su strutture long-line in alternativa alla mitilicoltura. Technical Report. Regione Emilia-Romagna – Relazione finale, pp. 27.

PRIOLI G., MAFFEI M., GIULINI G., MATARAZZO D., PASINI M. 2006 - Studio volto al miglioramento della produzione della specie autoctona ostrica piatta (*Ostrea edulis*) tramite l'individuazione di un disciplinare di produzione e l'adozione di tecniche di raccolta ecocompatibili e responsabili. Finanziamento Emilia-Romagna L.R. 3/79.

TUROLLA E. 2007 – Prove di captazione di novellame di ostriche su strutture long-line. Technical Report. Regione Emilia-Romagna – Relazione finale, pp. 23.

TUROLLA E., SAVORELLI F., PALAZZI D., GELLI F. 2007 – Impiego di tecniche di induzione all'emissione dei gameti in *Crassostrea gigas* per l'esecuzione di test di embriossicità. *Boll. Malacol.*, **43 (1-8)**: 73-77.

AA.VV. 2008. Progetto OSTRICA. Reg.to (CE) n° 2792 del 17/12/1999 art. 17 Asse IV-Sottomisura n° 4.13.E -Bando B.U.R.P. n° 26 del 04.03.2004.

GRASSIA L., VILBOUX F. 2008 - Ostriche. Passioni divine, pp. 207.

ROSSI R. 2011 - Messa a punto di protocolli per l'allevamento dell'ostrica concava (*Crassostrea gigas*) in sistemi long-line in Alto Adriatico. In: La ricerca scientifica a supporto della pesca e dell'acquacoltura. Ripopolamenti ittici in ambienti naturali. Roma, Consorzio Unimar, pp. 182-184.

PRIOLI G. 2011 - Studi e sperimentazioni indirizzati allo sviluppo delle produzioni di *Ostrea edulis* in Italia. In: La ricerca scientifica a supporto della pesca e dell'acquacoltura. Ripopolamenti ittici in ambienti naturali. Roma, Consorzio Unimar, pp. 154-156.

PRIOLI G., FIORI F., GUGNALI A. 2013 - Indagine rivolta alla qualificazione della produzione di ostriche (*Crassostrea gigas*) da acquacoltura in Adriatico. Finanziamento Emilia-Romagna L.R. 3/79.

# IL MONITORAGGIO DELLA QUALITÀ MICROBIOLOGICA DELLE AREE DI PRODUZIONE DEI MOLLUSCHI BIVALVI NELL'AMBITO DELLA DIRETTIVA SULLA STRATEGIA MARINA

Petochi T.<sup>1</sup>, Gazzea N.<sup>1</sup>, Di Marco P.<sup>1</sup>, Latini M.<sup>2</sup>, Barchiesi F.<sup>2</sup>, Conte A.<sup>3</sup>, Barile N.<sup>3</sup>, Caruso G.<sup>4</sup>, Zaccone R.<sup>4</sup>, Cavallo R. A.<sup>4</sup>, Croci L.<sup>5</sup>, Mancini L.<sup>5</sup>, Marino G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale - ISPRA

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise

<sup>4</sup> Istituto per l'Ambiente Marino Costiero - C.N.R.

<sup>5</sup> Istituto Superiore di Sanità

**Keywords:** Strategia Marina, Patogeni microbici, Molluschi bivalvi

## Introduzione

Nell'ambito della valutazione iniziale prevista dalla Direttiva sulla Strategia Marina (Dir. 2008/56/CE; DLgs 190/2010), che istituisce un quadro per l'azione comunitaria nel campo della politica per la tutela dell'ambiente marino, la qualità microbiologica delle aree di produzione dei molluschi bivalvi è considerato un indicatore di qualità di grande rilevanza per l'ambiente e la salute pubblica. La qualità microbiologica dipende dalle diverse fonti di pressione antropica (es. reflui urbani, agricoli e industriali, turismo, ecc.) che insistono in una determinata area (Zaccone et al., 2005; Caruso et al., 2010; Barchiesi et al., 2012; Fusco et al., 2013; ISPRA, 2009, 2011). Le normative vigenti prevedono il monitoraggio di diversi parametri microbiologici, quali: i coliformi fecali per valutare la qualità ambientale delle acque idonee alla vita dei molluschi (All. 2, DLgs 152/2006), *Escherichia coli* per la classificazione sanitaria delle aree di produzione (Reg. CE 854/2004; Reg. CE 2073/2005; CE 1021/2008) e *E. coli* e *Salmonella* spp. quali indicatori di sicurezza sanitaria del prodotto (Reg. CE 2073/2005). Inoltre, sono oggetto di monitoraggio altri agenti infettivi di interesse per la salute pubblica, ancorché non regolamentati, tra cui virus enterici ed epatici di origine antropica quali *Norovirus* e Virus dell'Epatite A (Croci et al., 2009), batteri autoctoni dell'ambiente marino come i *Vibrioni* alofili (Cavallo e Stabili, 2002) e protozoi parassiti zoonotici, tra cui *Giardia*, *Cryptosporidium* spp. e *Toxoplasma gondii* (Giangaspero et al., 2009; Putignani et al., 2011). Questo studio riassume gli esiti dei controlli ufficiali per *E. coli* e *Salmonella* spp. effettuati nelle aree di produzione dei molluschi bivalvi nel triennio 2009-2011 e illustra lo stato della qualità microbiologica per le diverse aree (in funzione della tipologia, della numerosità, della superficie e della qualità ambientale) nelle tre sottoregioni di competenza della Strategia Marina (Adriatico; Ionio e Mediterraneo Centrale; Mediterraneo Occidentale).

## Summary

The microbiological quality of Italian shellfish production areas has been investigated within the Initial Assessment of the Marine Strategy Framework Directive (MSFD) as an index of environmental and public health in relation to the potential impact of different anthropic pressures (e.g. municipal waste water, agricultural and industrial discharges, tourism, etc.). This study outlines the national status of shellfish production areas and summarizes the results of the official controls for *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from 2009 to 2011. Overall results indicate a good condition of the microbiological quality of the production areas that should be protected through the sanitary surveillance plans. Taking into account the frequency of non-compliant samples from certain critical areas, the possible reclassification or the adoption of mitigation strategies of anthropic impact need to be evaluated. Microbial pathogens could further represent a useful indicator for assessing the Good Environmental Status (GES) within the future MSFD policies.

## Materiali e metodi

Le informazioni utilizzate, derivanti dall'applicazione della normativa ambientale e igienico-sanitaria di riferimento (DLgs 152/2006; Pacchetto igiene), sono state raccolte attraverso il contributo delle Amministrazioni Centrali, degli IZZSS e delle ARPA, i decreti di classificazione e il giudizio esperto.

E' stato realizzato un geodatabase in ambiente ArcGIS 10.1 (ESRI® Inc., Redlands, CA) contenente i dati relativi alle aree di produzione dei molluschi bivalvi (es. Regione e Provincia, estensione superficiale dell'area, tipologia di produzione, specie allevate, classe di qualità). Considerata l'eterogeneità dei sistemi di riferimento adottati dalle diverse regioni, ad ogni area è stato associato un punto, identificato da una longitudine e latitudine in gradi decimali in sistema di riferimento ETRS89 e rappresentativo delle aree stesse.

## Risultati e discussione

Sono state individuate circa 460 aree classificate tra allevamenti e banchi naturali, di cui l'80% nella sottoregione Adriatica, il 18% nel Mediterraneo Occidentale e il 2% nel Mar Ionio/Mediterraneo Centrale. La

superficie totale stimata è di circa 6.000 km<sup>2</sup> ed è classificata come area A (78%), B (21%) e C (<1%). Complessivamente i campioni conformi ai valori soglia prelevati in aree A, da cui il prodotto è destinato al consumo diretto senza previa depurazione o stabulazione, oscillano tra 82-91% per *E. coli* e 98-99% per *Salmonella* spp., con un trend migliorativo nel triennio per entrambi i parametri. I casi di non conformità si registrano soprattutto durante la stagione invernale, in relazione alle precipitazioni che aumentano il carico di sostanza organica attraverso apporti fluviali e reflui urbani.

I risultati indicano complessivamente una buona condizione della qualità microbiologica nelle aree di produzione, che vanno pertanto tutelate attraverso piani di sorveglianza sanitaria. Per alcune aree critiche, tenuto conto delle non conformità microbiologiche riscontrate, confermate anche a seguito dell'ispezione del Food Veterinary Office della Commissione Europea nel 2012, è necessario rivalutare lo stato di qualità e avviare, ove possibile, piani di mitigazione dell'impatto antropico. La molluschicoltura nazionale (allevamenti e banchi naturali) ha un ruolo strategico per la fornitura di prodotti freschi e contribuisce per circa il 64 % del volume delle produzioni d'acquacoltura e per il 36 % dell'intero comparto ittico (ISMEA, 2012). Il peggioramento della qualità microbiologica nelle aree di produzione e il conseguente declassamento delle aree può avere conseguenze importanti sulla produzione, la redditività delle imprese e i costi sanitari. Pertanto si ritiene necessario, in collaborazione con i diversi soggetti competenti, armonizzare e ottimizzare le attività di monitoraggio ed integrare le informazioni sulla qualità microbiologica ambientale e igienico-sanitaria nelle aree di produzione. Alla luce di quanto emerso, i "contaminanti microbiologici" possono rappresentare un utile indicatore per la valutazione del buono stato ambientale (GES Good Environmental Status) nell'ambito delle politiche future della Strategia Marina.

**Ringraziamenti:** Il presente lavoro è stato condotto anche grazie alla collaborazione della Dr.ssa Alessandra Di Sandro e del Dr. Giovanni Granitto (Ministero della Salute, Direzione Generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione)

## Bibliografia

1. Barchiesi F., Donati D., Ottaviani D., Santarelli S., Masini L., Duranti A., Rocchegiani E. e Latini M., 2012, Zone di produzione delle vongole (*Chamelea gallina*) nella regione Marche: analisi preliminare della contaminazione fecale nel triennio 2008-2010. Italian Journal of Food Safety, 1, 11-14.
2. Caruso G., Leonardi M., Monticelli L.S., Decembrini F., Azzaro F., Crisafi E., Zappalà G., Bergamasco A. e Vizzini S., 2010, Assessment of the ecological status of transitional waters in Sicily (Italy): First characterisation and classification according to a multiparametric approach. Marine Pollution Bulletin, 60, 1682-1690.
3. Cavallo R.A. e Stabili L., 2002, Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). Water Research, 36, 3719-3726.
4. Croci L., Losio M.N., Arcangeli G., Pepe T., Pavoni E., Magnabosco C., Ventrone I. e Suffredini E., 2009, Survey of enteric virus presence in shellfish products in Italy (1999-2008). ICMSS09 – Nantes, France.
5. Fusco G., Aprea G., Galiero G., Guarino A. e Viscardi M., 2013, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., Virus dell'Epatite A e *Norovirus* in molluschi bivalvi nel 2011-12 in Sud Italia. Veterinaria Italiana, 4, 51-54.
6. Giangaspero A., Cirillo R., Lacasella V., Lonigro A., Marangi M., Cavallo P., Berrilli F., Di Cave D. e Brandonisio O., 2009, *Giardia* and *Cryptosporidium* in inflowing water and harvested shellfish in a Lagoon in Southern Italy. Parasitology International, 58, 12-17.
7. ISMEA, 2012, Report Ittico. Analisi e dati di settore 2011 e 2012.
8. ISPRA, Annuario dei dati ambientali. Ed. 2009 cap. 8 Idrosfera; Ed. 2011 cap. 4 Qualità delle acque.
9. Putignani L., Mancinelli L., Del Chierico F., Menichella D., Adlerstein D., Angelici M.C., Marangi M., Berrilli F., Caffara M., Frangipane di Regalbono D.A., e Giangaspero A., 2011, Investigation of *Toxoplasma gondii* presence in farmed shellfish by nested-PCR and real-time PCR fluorescent amplicon generation assay (FLAG). Experimental Parasitology, 127, 409-417.
10. Zaccone R., Mancuso M., Modica A. e Zampino D., 2005, Microbiological indicators for aquaculture impact in Mar Piccolo (Taranto, Italy). Aquaculture International, 13, 167-173.

Database Repository ISPRA-Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare-Commissione Europea

# USO DI STRUMENTI GEOSTATISTICI PER LA VALUTAZIONE DI UNO STOCK DI VONGOLE FILIPPINE (*VENERUPIS PHILIPPINARUM*; ADAMS & REEVE, 1850) IN UN'AREA NURSERY DELLA LAGUNA DI VENEZIA

Ponis E.\*, Cacciatore F., Boscolo Brusà R.

ISPRA – Istituto Superiore per la Ricerca Ambientale; Loc. Brondolo, 30015 Chioggia (VE)

\*Contacting author [emanuele.ponis@isprambiente.it](mailto:emanuele.ponis@isprambiente.it)

**Keywords:** Laguna di Venezia, Venericoltura, Stock assessment, Analisi spaziale, Kriging

## Introduzione:

La laguna di Venezia rappresenta uno dei principali siti di produzione della vongola filippina (*Venerupis philippinarum*) in Europa. Dopo la sua introduzione agli inizi degli anni '80 del secolo scorso la specie ha rapidamente colonizzato i fondali lagunari ritrovando condizioni idrologiche, morfologiche e trofiche ideali e il suo sfruttamento commerciale è presto diventato un importante sbocco produttivo ed occupazionale. Negli ultimi anni sono emerse una serie di criticità di natura ambientale e gestionale che hanno portato ad un drastico decremento delle produzioni in laguna di Venezia, passate da 40.000 tonnellate annue nel 1999 a circa 10.000 tonnellate nel 2011 (Zentilin et al., 2008; GRAL, 2011). Una delle principali priorità individuate per incrementare la sostenibilità (economica, ambientale) delle pratiche di venericoltura riguarda l'approvvigionamento e la valorizzazione del seme naturale da sottoporre ad allevamento; a monte di tali attività risulta dunque fondamentale una corretta valutazione degli stocks disponibili nelle aree nursery. Le tecniche di quantificazione degli stocks di bivalvi generalmente in uso si basano sulla stima del prodotto raccolto con attrezzi da pesca trascinati lungo transetti di dimensione nota. Nel caso di distribuzioni spaziali discontinue tali strumenti portano a restituzioni cartografiche solo parzialmente rappresentative della reale numerosità degli stocks presenti; attraverso una corretta utilizzazione di metodi geostatistici è possibile interpolare i dati in funzione della loro distribuzione, ottenendo quindi una rappresentazione più conforme dello stato reale.

L'obiettivo del presente lavoro è quello di descrivere l'uso di strumenti geostatistici per la valutazione di uno stock di vongole filippine (*Venerupis philippinarum*) in un'area nursery della laguna di Venezia. Lo studio è stato effettuato presso un'area lagunare (superficie: 1134 ha) del bacino centrale della laguna di Venezia posta in prossimità del polo industriale di Porto Marghera ed oggetto di interventi di ripristino ambientale (Boscolo et al., 2013); tale area è stata precedentemente identificata come una delle più importanti zone nursery della laguna (Casale et al., 2001; Penzo et al., 2003; Pessa e Mion, 2005).

I dati ottenuti nell'ambito di questa caratterizzazione, effettuata a novembre 2009 su 46 stazioni, sono stati sottoposti ad analisi spaziale al fine di valutare le distribuzioni degli esemplari per classi di taglia e di età, per stimare gli stock presenti nell'area indagata e per valutare le relazioni con la tessitura del sedimento, utilizzando allo scopo dei dati prelevati dal Magistrato alle Acque di Venezia relativi ad una campagna condotta nell'area nel 2006 (221 stazioni campionate).

## Summary:

This work aimed at assessing Manila clam stocks (spat, adults) in an area of the Venice lagoon, located near the industrial zone of Porto Marghera. The investigation was carried out on an area, previously identified by other studies as one of the most important clam natural settlement sites in the Venice lagoon, of 1134 ha approx. Stock assessment (animals were grouped per size and year classes), biomasses and correlations with sediment texture were evaluated.

In consideration of the patchy-distribution of clams found (adult, juveniles), a geostatistical approach based on a previous work (Warren et al., 1997) was used and, where possible, ordinary kriging was applied. Obtained results and comparisons with previous studies allowed an estimation of clam recruitment and an estimation of the exploitable areas.

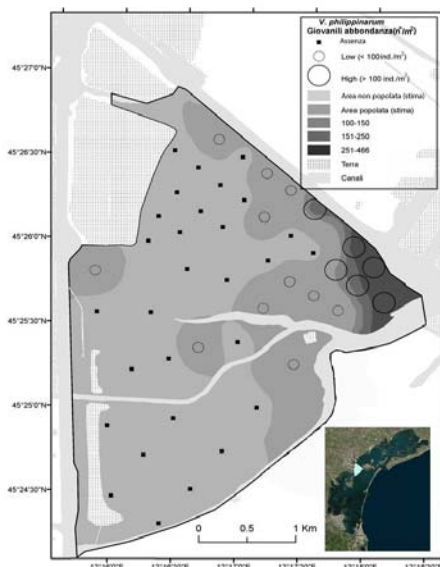
## Materiali e metodi:

I campionamenti di sedimento sono stati effettuati utilizzando una benna Ekman-Birge (superficie della bocca 225 cm<sup>2</sup>; ciascuna stazione campionata in 5 repliche). I sedimenti recuperati sono stati vagliati su di un setaccio a maglia 1 mm<sup>2</sup>; gli individui di *V. philippinarum* recuperati in tal modo sono stati misurati (arrotondamenti al millimetro) e pesati (arrotondamenti al milligrammo). Le analisi spaziali (abbondanza e biomassa su dati prelevati) sono state condotte utilizzando ArcMap 10 (ESRI). Laddove la natura dei dati lo consentiva le mappe di interpolazione sono state ottenute mediante "Ordinary kriging". In considerazione della presenza di un numero non trascurabile di valori nulli è stata adottata una procedura a due fasi (Warren, 1997): 1) utilizzo di una variabile indicatore (0, 1) per verificare la presenza/assenza delle vongole nell'area investigata; 2) "Ordinary kriging" sulla media condizionale delle stazioni dove le vongole sono risultate presenti. Nel caso degli individui di taglia commerciale (< 29 mm) il variogramma ottenuto è risultato

scarsamente definito a causa della distribuzione frammentata; in questo caso, in alternativa al kriging, la mappa di distribuzione è stata ottenuta mediante la "Inverse Distance Weighting Technique".

### Risultati e discussione:

L'area è caratterizzata prevalentemente da un sedimento di tipo sabbia-limosa o limo-sabbioso, con la granulometria più grossolana presente nell'area nord-orientale. Dall'analisi della granulometria rilevata in prossimità delle stazioni campionate nel corso del survey si osserva come le maggiori abbondanze (max. 500 individui per m<sup>2</sup>) siano associate alle granulometrie più grossolane; per le biomasse (max. 1950 g per m<sup>2</sup>) il pattern risulta meno definito. Esempari di *V. philippinarum* sono stati rilevati in 26 stazioni, ovvero nel 57 % delle stazioni indagate. L'analisi delle taglie ha permesso di identificare una distribuzione multimodale per classi di reclutamento. Le mappe ottenute hanno stimato una presenza di individui sul 55,6% dell'area investigata, identificando nella porzione nord-orientale dell'area indagata le maggiori abbondanze sia per



**Fig. 1** Mappa delle abbondanze del seme ( $L < 20\text{ m}$ ) di *V. philippinarum* (n° ind. m<sup>-2</sup>; ordinary kriging).

quanto riguarda i giovanili (<math>< 20\text{ mm}</math>) che gli individui di taglia commerciale (>29 mm). Il confronto con gli studi precedenti indica un evidente decremento delle abbondanze e delle biomasse sia di adulti che di giovanili, in coerenza con quanto osservato a scala lagunare negli ultimi anni (Melaku Canu et al., 2011). In base alle interpolazioni geostatistiche effettuate è stata identificata un'area di 59 ha sfruttabile per la raccolta del seme selvatico (abbondanza > 100 individui per m<sup>2</sup>, Fig. 1). In quest'area è stato stimato uno stock di  $180 \times 10^6$  animali. L'area in cui sono presenti individui di taglia commerciale (>29 mm) a densità sfruttabili (>1 kg per m<sup>2</sup>) è risultata invece troppo frammentata per poter ipotizzare un suo razionale sfruttamento. In conclusione, lo studio ha dimostrato l'efficacia dell'approccio geostatistico per ottenere una mappatura dettagliata della distribuzione dei giovanili di vongola presenti nell'area nursery, dimostrandosi un utile strumento da utilizzare per una corretta programmazione delle attività di venericoltura.

I dati di questo lavoro derivano da uno studio più ampio effettuato dal Magistrato alle Acque di Venezia attraverso il suo Concessionario Consorzio Venezia Nuova.

### Bibliografia:

1. Boscolo Brusà R., Cacciatore F., Ponis E., Molin E., Delaney E., 2013. Clam culture in the Venice lagoon: stock assessment of Manila clam (*Venerupis philippinarum*) populations on a nursery site and management proposals to increase clam farming sustainability. *Aquat. Living Resour.* Vol. 26 (1): 1-10.
2. Casale M., Giovanardi O., Grimm F., Orel G., Pessa G., 2001. Distribuzione ed abbondanza delle principali specie di molluschi bivalvi nella laguna di Venezia nell'estate 1999, con particolare riguardo per *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *Biol. Mar. Medit.* 8(1), 413-423.
3. G.R.A.L., 2011. Piano per la gestione della in laguna di Venezia, p. 101.
4. Melaku Canu D., Camprostrini P., Dalla Riva S., Pastres R., Pizzo L., Rossetto L., Solidoro C., 2011. Addressing sustainability of clam farming in the Venice Lagoon. *Ecology and Society* 16 (3), p. 26.
5. Penzo P., Galvan T., Pellizzato M., 2003. Reclutamento ed accrescimento del seme di *Tapes philippinarum* in un area della laguna di Venezia. *Biol. Mar. Medit.*, 10(2), 473-476.
6. Pessa G., Mion D., 2005. Variazioni nella distribuzione ed abbondanza di *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) e *Cerastoderma glaucum* (Poiret, 1789) (Mollusca Bivalvia) in laguna di Venezia tra il 1999 ed il 2002. *Biol. Mar. Medit.*, 12(1), 303-306.
7. Warren W.G., 1997. Spatial analysis of marine populations. *Proc. of the Survey Method Section, SSC Annual Meeting, Florence Italy*, pp. 145-150.
8. Zentilin A., Pellizzato M., Rossetti E., Turolla E., 2008. La venericoltura in Italia a 25 anni dal suo esordio. *Il Pesce* /3

# GESTIONE DELLA POSITIVITA' PER ACIDO OKADAICO NELLE VONGOLE VERACI DELLA SACCA DI GORO

Rubini S<sup>1</sup>, Boschetti L<sup>2</sup>, Baldi D<sup>1</sup>, Lorito S<sup>3</sup>, Padovani A<sup>4</sup>, Bolognesi E<sup>1</sup>, Fedrizzi G<sup>1</sup>, Menotta S<sup>1</sup>, Pompei M<sup>5</sup>, Milandri A<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; <sup>2</sup> Azienda USL Ferrara – Servizio Veterinario; <sup>3</sup> RER, Servizio Geologico, Sismico e dei suoli; <sup>4</sup> RER Servizio Veterinario e igiene degli alimenti; <sup>5</sup> Fondazione Centro Ricerche Marine – Cesenatico (FC)

**Keywords:** Biotossine marine lipofile, Acido okadaico, vongole veraci, *Tapes philippinarum*, *Prorocentrum lima*, *Gracilaria vermiculophylla*

## Introduzione

Il gruppo delle biotossine marine lipofile comprende diversi gruppi di sostanze biologicamente attive:

- Acido okadaico (OA) e derivati (dinofisitossine - DTXs)
- Pectenotossine (PTXs)
- Yessotossine (YTXs)
- Azaspiracidi (AZAs)

In Italia l'acido okadaico e i suoi derivati dinofisitossina-1 (DTX-1), dinofisitossina-2 (DTX-2) e dinofisitossina-3 (DTX-3) sono i composti maggiormente responsabili della sindrome diarroica, un tempo denominata DSP (Diarrhetic Shellfish Poison). Questi composti lipofili si accumulano soprattutto nella ghiandola digestiva dei molluschi (Yasumoto et al., 1985). Si tratta di composti prodotti da alghe appartenenti ai generi *Dinophysis* e *Prorocentrum* (Yasumoto and Murata, 1993) responsabili della contaminazione di molluschi bivalvi in diverse aree del mondo (Hallegraeff, 2004).

La presenza di queste tossine nei molluschi eduli comporta rischi per la salute umana in quanto il consumo di frutti di mare contaminati da OA, DTXs e AZAs provoca una sintomatologia gastroenterica caratterizzata da diarrea, nausea, vomito e dolori addominali che inizia 3-12 ore dopo l'assunzione di molluschi contaminati (Hallegraeff, 2004, Yasumoto et al., 1978).

L'OA è un potente promotore tumorale che inibisce l'attività delle proteine fosfatasi tipo 1 e 2A (Fujiki and Suganuma, 1993).

Nel 2012 in un'area della Sacca di Goro, la sub-area C5-6 (Figura 1), è stata riscontrata la presenza di OA e suoi derivati nelle vongole veraci.

Il presente lavoro intende illustrare le azioni intraprese per la gestione del singolare fenomeno.

## Summary

In 16 years of monitoring, the Manila clams (*Tapes philippinarum*) of the Sacca di Goro (Northern Adriatic Sea) always resulted negative for the presence of marine biotoxins. In May 2012 okadaic acid and its derivatives appeared for the first time in the area due to the presence of the toxic benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. Our work illustrates the management of the positive results for lipophilic biotoxins in the Manila clams: shellfish monitoring activities were increased in frequency and geographic coverage. On the basis of the obtained results a new sampling strategy was defined.

## Materiali e metodi

Il Piano di Monitoraggio dei molluschi bivalvi in provincia di Ferrara è iniziato nel 1997. I campioni destinati all'esame biotossicologico venivano prelevati con frequenza trimestrale e gli esiti sono risultati sempre negativi. Dal 1997 al marzo 2012 la ricerca delle biotossine lipofile veniva effettuata con prova biologica su topo (Mouse test). Da marzo 2012 si è passati definitivamente al metodo chimico: la cromatografia liquida con rivelatore di massa a triplo quadrupolo (LC-MS/MS). Le biotossine sono estratte con metanolo. Una frazione dell'estratto è sottoposta direttamente ad analisi LC-MS/MS per la determinazione di OA e DTXs non esterificati, YTXs, PTXs e AZAs, mentre un'altra frazione è sottoposta a processo di idrolisi alcalina prima della determinazione analitica di OA e DTXs totali.

Nel maggio 2012 sono comparsi i primi risultati positivi. La concentrazione di biotossine lipofile nei primi campioni era ben al di sotto dei limiti di legge, ma l'insolito risultato ha imposto un innalzamento della soglia di attenzione, nonché un aumento della frequenza e della copertura geografica dei campionamenti. Da maggio 2012 ad ottobre 2013 sono stati quindi prelevati 46 campioni di vongole veraci provenienti dalla sub-area C5-6.

Contestualmente ai campioni di vongole veraci venivano prelevati anche campioni di acqua e sedimenti.

## Risultati e discussione

Dei 46 campioni analizzati, 34 sono risultati positivi per presenza di acido okadaico e suoi derivati: 11 di questi campioni contenevano biotossine lipofile in concentrazioni superiori al limite di legge di 160 µg OAeq./kg di parte edibile.

Si è quindi proceduto a suddividere la sub-area C5-6 in due zone di campionamento: C5 e C6. Questa operazione ci ha consentito di verificare che la distribuzione della positività non era uniforme all'interno della sub-area C5-6.

Negli ultimi anni si è assistito alla comparsa in Sacca di Goro di una macroalga esotica, *Gracilaria vermiculophylla* (Foto 1), che ha praticamente sostituito la macroalga autoctona *Ulva lactuca*.

Il prelievo di *Gracilaria vermiculophylla* e sedimenti ha consentito di evidenziare la presenza di alte concentrazioni di *Prorocentrum lima*, alga bentonica ed epifita. Nei campioni di acqua di mare prelevati dalla colonna d'acqua *P. lima* non era presente.

Quando si riscontrano livelli di biotossine marine superiori ai limiti di legge la raccolta dei molluschi viene sospesa con un atto di divieto dell'Autorità Competente. La raccolta potrà essere nuovamente consentita dopo l'esecuzione di 2 esami con esito negativo a distanza di non meno di 48 ore.

Dal momento che la distribuzione delle biotossine non era uniforme all'interno della sub-area C5-6 si è ritenuto necessario rideterminare la stessa. Si sono quindi create due distinte stazioni di campionamento denominate C5 e C6. La suddivisione è stata fatta seguendo la direttrice Nord-Sud in quanto gli esami eseguiti hanno permesso di constatare che il fenomeno di decontaminazione aveva un andamento da Ovest verso Est.

## Bibliografia

1. Fujiki H. and Suganuma M. (1993). Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv. Cancer Re.* 61, 143-194.
2. Hallegraeff, G.M., 2004. Harmful algal blooms: a global overview. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO, Paris, pp. 25–49.
3. Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K., Clardy, J., (1985). Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41, 1019–1025.
4. Yasumoto T., Oshima Y. and Yamaguchi M. (1978). Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 44, 1249-1255.
5. Yasumoto, T., Murata, M., (1993). Marine toxins. *Chem. Rev.* 93, 1897–1909.

Figura 1 – Sacca di Goro

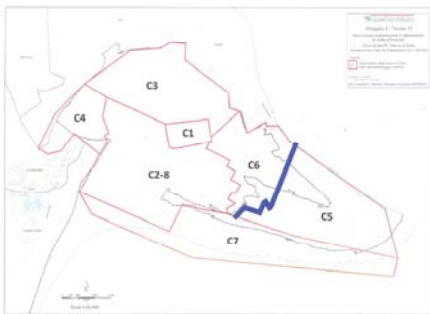


Foto 1 – *Gracilaria vermiculophylla*



# IL TRAPIANTO ATTIVO DI MITILI PER LA VALUTAZIONE DELLO STATO DI CONTAMINAZIONE DEL MAR MEDITERRANEO

Scarpato A.<sup>1</sup>, Romanelli G.<sup>1</sup>, Giovanardi F.<sup>1</sup>, Giovanardi O.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ISPRA – Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma.

<sup>2</sup>ISPRA – Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Chioggia.

**Keywords:** Mussel watch, contaminazione chimica, biomonitoraggio

## Introduzione

L'utilizzo dei bivalvi filtratori per valutare i livelli dei contaminanti chimici presenti nella colonna d'acqua è stato per la prima volta proposto intorno alla metà degli anni '70 da Goldberg (Goldberg, 1975). Il *Mussel watch* si basa sulla capacità dei molluschi filtratori di bioaccumulare i contaminanti, in quantità proporzionale alla loro presenza nell'ambiente acquatico (George and Coombs, 1977; Cossa, 1988).

Negli ultimi decenni l'impiego dei mitili come bioindicatori nell'ambito del monitoraggio è stato utilizzato mediante due differenti approcci: utilizzo di popolazioni indigene *in situ* (biomonitoraggio passivo) o trapianto di mitili da un sito di riferimento alle aree da studiare (biomonitoraggio attivo) (Andral et al., 2004). Quest'ultima costituisce una prima evoluzione nell'applicazione della metodica risolvendo, in particolare, il problema del monitoraggio di zone costiere dove le popolazioni di mitili sono scarse e permettendo di controllare variabili quali la provenienza, l'età e lo stadio di maturità sessuale, fattori in grado di influenzare il grado di bioaccumulo. ISPRA è impegnata dal 2004 in una serie di progetti internazionali finalizzati a creare una rete di sorveglianza nei confronti della contaminazione chimica delle acque marino costiere a scala di intero bacino Mediterraneo mediante l'applicazione della metodologia del *mussel watch* attivo. Tali progetti, denominati Mytilos (2004-2006: monitoraggio Mediterraneo occidentale), MytiMed (2006-2007: monitoraggio costiero del Mediterraneo orientale) e MytiAd (2008: monitoraggio del mar Adriatico) hanno permesso di costruire una *baseline* della contaminazione chimica che costituisce una base di partenza per provvedimenti di salvaguardia di bacino finalizzati alla riduzione e al contenimento della contaminazione, in coerenza con le più recenti politiche comunitarie (Direttiva Quadro sulle Acque 2000/60 e Strategia Marina 2008/56/CE).

L'efficacia della metodica del *mussel watch* attivo è testimoniata, in primo luogo, dalla percentuale di recupero dei mitili trapiantati, pari a oltre il 90%, ottenuta su oltre 300 stazioni artificiali di biomonitoraggio posizionate in Mediterraneo. In questo lavoro viene posta attenzione nei confronti dei risultati analitici ottenuti e sull'evoluzione delle tecniche di trapianto, volte da una parte a minimizzare gli effetti sul bioaccumulo delle variabili ambientali e dall'altra a ricercare sistemi che permettano il trapianto in un numero sempre maggiori di siti. A tal proposito vengono presentate delle nuove gabbie ideate da ISPRA (microimpianti di molluschicoltura) utilizzate nell'ambito del monitoraggio di piattaforme estrattive *off-shore* in Adriatico.

## Summary

The use of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in monitoring programmes is now widely used. This is based on the assumption that levels of trace contaminants accumulated in biological tissues are proportional to the concentration of these contaminants in the surrounding waters. In this study, the experience of ISPRA in active biomonitoring for the EU projects "Mytilos", "MytiMed" and "MytiAd" is discussed. The projects aimed at assessing the contamination levels in the whole Mediterranean basin, developing a chemical contamination map to improve knowledge of inputs, fate and to monitor the dynamics of the phenomena. Advantages of the mussel watch methodology and a short description of results obtained using this technique in the Mediterranean sea are shown.

## Materiali e metodi

I mitili utilizzati nel *mussel watch* attivo nel Mediterraneo sono prevalentemente della specie *Mytilus galloprovincialis*. Questi vengono prelevati presso allevamenti a mare, in aree caratterizzate da un basso impatto antropico, valutabile attraverso un'analisi di *screening* preventiva sui tessuti degli animali.

Per garantire l'omogeneità dei lotti, si scelgono individui di taglia pari a 5-7 cm, corrispondente a dei giovani adulti sviluppati in 18-24 mesi in acque con un buon grado di trofismo. Ciascuna gabbia è composta da un lotto di mitili stoccati all'interno di una sacca da molluschicoltura. Successivamente al trapianto, i mitili rimangono immersi nell'ambiente acquatico da monitorare per un periodo di alcune settimane, sufficienti per bioaccumulare contaminanti organici ed inorganici. Le strutture idonee per il trapianto sono generalmente costituite da una gabbia zavorrata appesa ad un galleggiante sub-superficiale. Nell'ambito del monitoraggio, questa viene mantenuta in prossimità della superficie per mezzo di boe di segnalazione oppure, come nella metodologia ISPRA, mantenute ad una profondità di 6-8 m, quindi al disotto della quota di navigazione, in modo da minimizzare i rischi di perdita delle stesse. Una volta recuperate le gabbie, vengono effettuate una serie di misure biometriche utili a valutare il tasso di crescita degli organismi. Le carni vengono raccolte e



preparati dei pool di organismi su cui verranno effettuate le analisi chimiche. Le analisi su tutti i campioni sono state condotte da laboratori accreditati francesi (Ifremer). Ai fini dell'intercalibrazione, repliche su analiti specifici sono state condotte sugli stessi campioni dai laboratori dei partner internazionali coinvolti.

### Risultati e discussioni

L'evoluzione della tecnica del *mussel watch* ed il suo utilizzo sempre più frequente nei programmi di monitoraggio ha affermato questa metodica come uno dei principali strumenti di indagine della contaminazione chimica degli ambienti marino-costieri. Sulla base dei dati acquisiti nel corso dei tre progetti internazionali sopracitati è stato possibile disegnare una mappa della contaminazione chimica a scala di bacino Mediterraneo, utilizzando una metodologia standardizzata da parte di tutti i *partners* coinvolti. Le analisi effettuate hanno riguardato diversi tipi di contaminanti: metalli pesanti, composti organo clorurati, idrocarburi policiclici aromatici, diossine e furani, alchilfenoli, radionuclidi (Cs 137). Le aree indagate sono state scelte sulla base dei potenziali *input* di origine antropica e non (foci di fiumi, zone a prevalente uso agricolo, porti civili e/o industriali, ecc.) mentre altri siti individuati in aree a basso impatto antropico sono stati scelti come riferimento o "bianco". Lo scopo è stato quello di testare la validità della metodica e la sua "sensibilità" ad un inquinamento specifico e di valutare l'entità della contaminazione stabilendo valori di *background* per le sostanze considerate cui far riferimento per valutare misure di contenimento e *trend* successivi. Alcuni risultati hanno portato a conclusioni più o meno "attese", evidenziando come zone a maggior impatto antropico (aree *hot spot*) sono costituite principalmente dai grandi centri urbani ed industriali costieri (Marsiglia, Napoli, Taranto, Barcellona) e le foci dei grandi fiumi (Ebro, Rodano, Po). In queste zone risultano elevati i valori di quasi tutte le classi di contaminanti analizzate, se paragonate ai livelli trovati nelle altre aree. In altre località costiere è stato possibile evidenziare una contaminazione sito-specifica, come nel caso dei pesticidi, rilevati maggiormente in corrispondenza di foci di fiumi (Sarno, Ebro, Neretva) e dove si riscontra una importante attività agricola (zone lagunari costiere del sud della Francia, costa Algerina), (Scarpato et al., 2010). Infine, la metodica ha permesso di individuare siti con inaspettati alti livelli di contaminazione, non spiegabili al tempo in cui furono condotte le indagini, come nel caso dell'arcipelago della Maddalena.

### Conclusioni

Ancor prima che il processo mediatico portasse alla luce situazioni di criticità in alcune località costiere italiane, per mezzo del *mussel watch* erano già emersi risultati preoccupanti in almeno tre casi: contaminanti organici a La Maddalena, verosimilmente originati da una nota discarica abusiva (Progetto Mytilos 2005), diossine nel golfo di Napoli, probabilmente legate allo smaltimento illegale dei rifiuti (Progetto Mytilos 2005-2006).

L'evoluzione della metodologia del *mussel watch* prosegue nella direzione di un ampliamento dei campi di applicazione.

Dalle "classiche" categorie di contaminanti, quali ad esempio i metalli pesanti, i pesticidi, ecc., la peculiarità di questi molluschi filtratori di bioaccumulare le sostanze biodisponibili in acqua ha permesso di integrare nel monitoraggio nuove classi di contaminanti ritenute oggi di particolare rilevanza ambientale, come i ritardanti di fiamma, i radionuclidi artificiali e naturali, ecc.

Allo stesso tempo nuove strutture per il trapianto dei mitili vengono congegnate per permettere indagini in un numero di siti sempre maggiori, come ad esempio nei porti e nelle strutture estrattive *off-shore* nell'ambito di progetti di ricerca nazionali ed internazionali.

### Bibliografia

1. Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging, *Marine Pollut. Bull.* 49, 704–712.
2. Cossa, D., 1988. Cadmium in *Mytilus* spp.: Worldwide survey and relationship between seawater and mussel content. *Mar. Environ. Res.* 26, 265–284.
3. George, S.G., Coombs, T.L., 1977. The effects of chelating agents on the uptake and accumulation of cadmium by *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 39, 261–268.
4. Goldberg E.D., 1975. The Mussel Watch - a first step in global marine monitoring, *Marine Pollut. Bull.* 6, 111.
5. Scarpato A., Romanelli G., Galgani F., Giovanardi F., Giordano P., Calvo M., Caixap J., BenBrahim S., Sammari C., Deudero S., Boulahdid M. & Andral B., 2010. Western Mediterranean coastal waters - Monitoring PCBs and Pesticides accumulation in *Mytilus galloprovincialis* by active mussel watching: the Mytilos project. *J. Environ. Monit.* 12 : 924–935

# OSTREID HERPES VIRUS-1 $\mu$ VAR: UN RISCHIO PER L'OSTRICOLTURA

Serracca L.<sup>1</sup>, Arcangeli G.<sup>2</sup>, Rossini I.<sup>1</sup>, Battistini R.<sup>1</sup>, Terarolli A.<sup>1</sup>, Imberciadori M.<sup>1</sup>, Varrella P.<sup>3</sup>, Ercolini C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, sezione La Spezia; <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie; <sup>3</sup>Ostricoltore

**Keywords:** Ostreid herpes virus, *Vibrio aestuarianus*, *Crassostrea gigas*

## Introduzione

Ostreid Herpes virus 1 è un virus a DNA, non patogeno per l'uomo, che fa parte della famiglia Herpesviridae. A partire dal 2008 è stata identificata una variante del virus Ostreid Herpes virus type 1 (OsHV-1  $\mu$ var) associata a casi di mortalità, che in alcune zone della Francia e dell'Irlanda ha coinvolto fino al 100% degli esemplari di ostriche concave (*Crassostrea gigas*). La virulenza di OsHV-1  $\mu$ var sembra essere correlata a fattori ambientali, come l'innalzamento della temperatura dell'acqua oltre i 16°C, e alla presenza di batteri del genere *Vibrio* tanto che oggi tale patologia viene denominata *Sindrome da OsHV-1  $\mu$ var*. Per prevenire l'ulteriore diffusione della malattia la Commissione Europea ha emanato un regolamento (N. 175/2010) nel quale ha disposto la ricerca di OsHV-1  $\mu$ var in tutte le aree degli stati membri soggette a mortalità; inoltre ha stabilito e regolamentato le modalità di movimentazione della merce, ai fini di allevamento e stabulazione, tra zone soggette a misure di contenimento e zone dove non è stato ancora rilevato il virus. Oltre a ciò viene data facoltà agli Stati membri di istituire programmi di campionamento e test mirati per il rilevamento tempestivo del virus per ottenere informazioni sulla sua circolazione nelle zone dell'UE non ancora interessate dalla malattia. Il regolamento aveva lo scopo di controllare questa patologia fino al 31 dicembre del 2010 ma considerata l'aggressività della malattia e i possibili danni economici eventualmente derivanti è stato prolungato fino al 31 Aprile 2011, attualmente però manca un'indicazione normativa per questa problematica. Nell'intento di tutelare gli allevamenti locali di *Crassostrea gigas*, con potenzialità produttive di circa 100 quintali all'anno, siti nel golfo di La Spezia è iniziato ad aprile 2011 un monitoraggio con il fine di approfondire il legame esistente tra condizioni ambientali, presenza di vibrioni e OsHV-1.

## Summary

Since 2008 it was identified a variant of Ostreid Herpes virus type 1 (OsHV-1  $\mu$ var), previously associated with farmed oysters mortality, in some areas of France and Ireland, where it involved up to 100% of *Crassostrea gigas* species. The disease is now called *Syndrome OsHV-1  $\mu$ var* due to the OsHV-1  $\mu$ var virulence that seems to be related to environmental factors, such as the water temperature above 16 °C, and the presence of bacteria of the genus *Vibrio*. A monitoring took place in April 2011 in order to protect the farms of *Crassostrea gigas* in the Gulf of La Spezia (NW Italy), and to establish a relationship between environmental conditions, presence of vibrios and OsHV-1. Oyster samples were taken monthly during the periods of the year when the water temperature exceeded the critical value required for the development of this disease. The analyzed samples were subjected to morphological investigation, then it was carried out the search of *Salmonella*, *E. coli*, *Vibrio* spp. *Vibrio harvey*, *Vibrio aestuarianus*, *Vibrio splendidus* and OsHV-1  $\mu$ var. In the period of three year there were no phenomena of mortality and growth parameters were found in the standard for this area. With regard to the microorganisms of the *Vibrio* genus, so far only one sample was positive for the presence of *Vibrio aestuarianus* and one for *Vibrio alginolyticus*. At the time, the absence of abnormal phenomena of mortality makes difficult to create any correlation between the temperature parameters measured and the presence/absence of these microorganisms. The data are preliminary and only at the end of the two years of sampling it will be assested if there are significant correlations.

## Materiali e metodi

Nel triennio 2011-2013 sono stati effettuati campionamenti mensili di ostriche nei periodi dell'anno in cui la temperatura dell'acqua superava il valore critico richiesto per lo sviluppo di questa patologia. Nel 2011 e 2012 sono stati analizzati rispettivamente 57 e 42 soggetti tutti di provenienza francese, mentre nel 2013 sono stati analizzati 41 soggetti tutti di provenienza italiana. I campioni analizzati sono stati sottoposti ad un'indagine morfologica in cui sono stati annotati i seguenti parametri: numero soggetti, peso, lunghezza, larghezza, spessore, presenza/assenza del blister superiore/inferiore; successivamente si è proceduto alle indagini microbiologiche. La ricerca di *E. coli* è stata effettuata applicando la ISO/TS 16649-3:2005, mentre la ricerca di *Salmonella* spp. è stata eseguita nel rispetto delle norma ISO 6579:2002. Successivamente è stata effettuata la ricerca di *Vibrio* spp secondo la metodica ISO/TS 21872/1:2007. La ricerca di batteri appartenenti al genere *Vibrio* si è concentrata in particolare su tre specie: *Vibrio harvey*, *Vibrio aestuarianus*, e *Vibrio splendidus*. Sono state prelevate porzioni di mantello e branchie in quantità di 0.025g ed è stato estratto il DNA da questi tessuti mediante l'utilizzo di un kit commerciale basato su resine a scambio ionico, QiAmp DNA Mini Kit (QIAGEN). Il DNA dei campioni è stato eluito in 100 $\mu$ l. La ricerca di *V. harveyi* e *V.*

*splendidus* è stata eseguita mediante un test di PCR classica per la ricerca rispettivamente del gene hly, utilizzando la coppia di primer Vh-hlyF e Vh-hlyR (Haldar et al., 2010), e del gene 16S-23S intergenic spacers (IGSs) utilizzando la coppia di primer VSPN-F e VSPN-R ( Lee et al., 2002). La ricerca di *V. aestuarianus* è stata condotta mediante un metodo di Real time PCR per la ricerca del gene *dnaJ* utilizzando la coppia di primer F1 e R1 precedentemente pubblicati (Saulnier et al., 2009). Infine la ricerca di OsHV-1  $\mu$ var è stata eseguita, in accordo al Regolamento 175/2010, mediante un metodo in PCR classica utilizzando la coppia di primers CF-CR (LGP-Ifremer, av De Mus de Loup, 17390 La tramlade, Francia).

### **Risultati e discussione**

Nel biennio 2011-2012 sono state analizzate ostriche di origine francese e le percentuali di positività per la ricerca del genoma di OsHv-1  $\mu$ var sono state rispettivamente del 96,5% e 54,8%. Le analisi di ostriche di origine italiana relativamente all'anno 2013, tuttora in corso, hanno invece mostrato il 100% di negatività dei campioni. Nonostante le positività riscontrate nel biennio 2011-2012, tutti i soggetti hanno presentato un accrescimento nella norma e non si sono verificati casi di mortalità anomala. Tuttavia in due campionamenti sono stati ritrovati fattori concomitanti lo sviluppo della patologia infatti *V. aestuarianus* e *Vibrio alginolyticus* sono stati riscontrati nello 0,8 % (1/125) rispettivamente nel campionamento di maggio e agosto 2011 durante i quali è stato registrato un valore di temperatura dell'acqua di 20,56°C e 25,67°C. Da alcuni esperimenti di contaminazione artificiale è emerso che la mortalità sopraggiunge solo quando le larve infette sono tenute in condizioni di stress, dimostrando che togliendo questa condizione la mortalità diminuiva (Ranualt, dati non pubblicati; Schikorski et al., 2011), quindi possiamo ipotizzare che le condizioni di allevamento locale abbiano contribuito positivamente nel proteggere le ostriche arrivate infette dalla Francia. Il 100 % dei campioni sono risultati negativi per la presenza di *V. parahemolyticus*, *V. cholerae*, *V. splendidus* e *V. harveyi*. Gli esiti relativi ai parametri microbiologici (*Salmonella spp.*, *E. coli*) sono stati sempre conformi. I valori di contaminazione fecale riscontrati sono sempre rimasti compresi nel range tra 230 e 4600 MPN/100g caratteristiche delle Zone classe B (Decreto Regionale n° 961 del 20/04/11) in cui le ostriche sono allevate. Al momento data l'assenza di fenomeni di mortalità anomala nelle ostriche indagate non è possibile fare alcuna correlazione né con i parametri di temperatura misurati né con la presenza/assenza di questi microrganismi. Questi dati sono quindi da considerarsi preliminari e solo al termine dei tre anni di campionamento si potrà verificare se esistano correlazioni significative.

*Ricerca effettuata con fondi del Mistero della Salute, Ricerca corrente 2010.*

*Si ringrazia Ifremer per il contributo fornito.*

### **Bibliografia**

1. Lee SKY, Wang HZ, Law SHW, Wu RSS, Kong RYC, (2002). Analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine Vibriosis for species specific signature DNA sequences; Mar Pollut Bull, 44: 412-420.
2. Haldar S., Neogi S.B., Kogure K., Chatterjee S., Chowdhury N., Hinenoya A., Asakura M., Yamasaki S. Development of a hemolysin gene-based multiplex PCR for simultaneous detection of *Vibrio Campbellii*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*; Lett. Appl. Microbiol, 50: 146-152.
3. Saulnier D, De Decker S, Haffner P, (2009). Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiological studies; J Microbiol Methods, 77: 191-197.
4. Schikorski D, Faury N, Pepin JF, Saulnier D, Tourbiez D, Renault T, (2011). Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by p-PCR in seawater and in oyster samples; Virus Res, 155: 28-34.

# RICERCA INDUSTRIALE APPLICATA AI SISTEMI PER LA DEPURAZIONE DEI MOLLUSCHI BIVALVI. RISULTATI DI UNA COLLABORAZIONE PLURIENNALE FRA UNIVERSITÀ E IMPRESA

Serratore P., Ciulli S., Bignami G. e Zavatta E.

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria Alma Mater Studiorum Università di Bologna

**Keywords:** molluschi bivalvi, depurazione, *Vibrio* spp., HAV, biofiltrazione

## Introduzione

Il processo di depurazione dei molluschi bivalvi, così come disposto dal Reg. CE 853/2004 (6), risulta efficace su molluschi moderatamente contaminati da *E. coli* (3), ma, secondo molti autori, non sui più importanti agenti di zoonosi alimentare ad essi associati, quali i Norovirus ed il Virus dell'Epatite A (HAV) (5, 8) nonché i batteri marini quali *Vibrio* spp.(2), comprendenti specie patogene per l'uomo tra cui *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Inoltre sono ben note alcune criticità del processo, con particolare riguardo alla biofiltrazione, per la rimozione dei cataboliti azotati nei sistemi con ricircolo, affidata ai batteri nitrificanti *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*. È infatti frequente il riscontro di picchi di nitriti anche in presenza di bassi livelli di ammoniaca e nitrati, anche con l'utilizzo di matrici per biofiltro ben bilanciate. In questo contesto, il nostro Dipartimento ha sviluppato una serie di ricerche di carattere industriale, a partire dal 2005 e tuttora in corso, in collaborazione con Adriatic Sea Aquarium and Equipment, azienda leader nella produzione di impianti per l'acquacoltura. Alcuni risultati interessanti vengono presentati in questa sede.

## Summary

The effectiveness and efficiency of the purification process, as laid down by EC Regulation 853/2004, were investigated from 2005, in cooperation with Adriatic Sea Aquarium and Equipment, company leader in the production of recirculating systems for aquaculture. The effectiveness of the process, tested with natural and artificial sea-water on *Venus (Chamelea gallina)*, *Mytilus galloprovincialis* and *Tapes philippinarum*, resulted inconsistent on endogenous *Vibrio* spp., giving that after 7 days (T7), the amount was 0,5-2 log higher than at the origin (T0), and a batch of *V. gallina*, the only one positive for Hepatitis A Virus at T0, was still positive after 7 days (T7). The efficiency of the process, was investigated considering the activity of UV-C and Ozone on the circulating bacteria, and the behavior of the nitrifying bacteria *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. The bactericidal effect of UV-C alone was effective on circulating *Vibrio* spp., lowered of 1 log in 1-2 days, and on *Nitrobacter*, scattered from the bio-filter all over the system, that was lowered of 1-2 log. Similar effects were registered for Ozone, and a synergic action was evident by the combination of both. The administration of cultured *Isochrysis galbana*, sterilized at 121°C for 15 minutes, produced in *Tapes philippinarum* the decrease of *Vibrio* spp. of 1 log at T2.

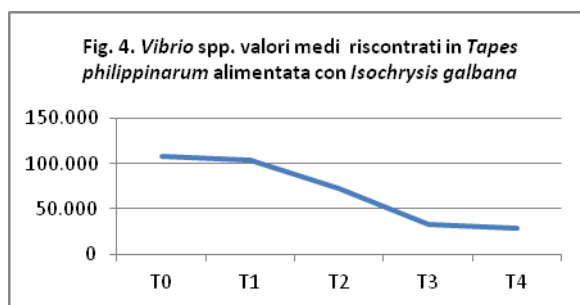
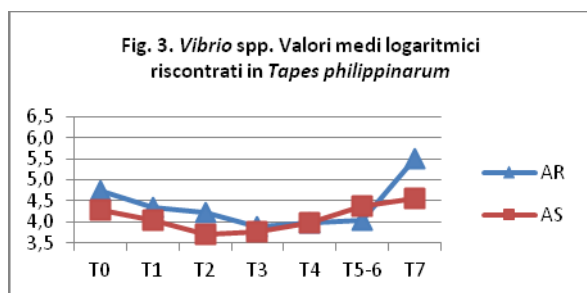
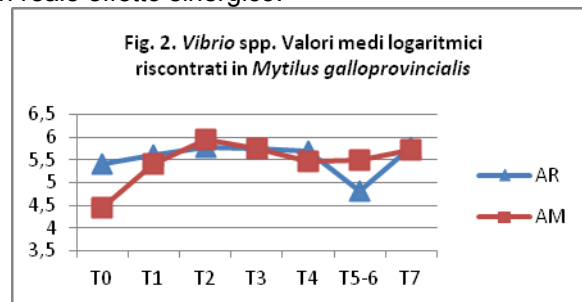
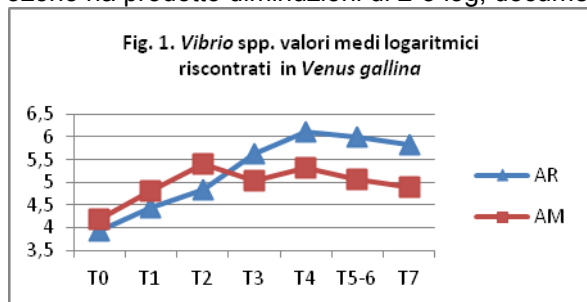
## Materiali e metodi

Sono stati utilizzati 2 impianti con ricircolo forniti da Adriatic Sea, di cui uno alimentato con acqua marina (AM) ed uno alimentato con acqua ricostituita (AR), e tre specie di molluschi: *Venus (Chamelea gallina)*, *Tapes philippinarum* e *Mytilus galloprovincialis*. Il trattamento di depurazione è stato effettuato per 7 giorni (T7), utilizzando quali criteri microbiologici *Vibrio* spp., (7), ed HAV (4), e mantenendo costanti i parametri chimico-fisici: T 15°C, O<sub>2</sub> saturo, salinità 30-32‰, pH 8. L'attività battericida dei dispositivi ad UV-C ed ozono, sia come effetto specifico che sinergico, è stata valutata sulla quota circolante di *Vibrio* spp. (7), *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* (1). Infine sono state condotte prove di depurazione su molluschi sottoposti ad alimentazione con substrati microalgali di *Isochrysis galbana* forniti dalla Goro Acquicoltura.

## Risultati e discussione

42 lotti di molluschi del peso di 10-20 kg, di cui 14 di *V. gallina*, 16 di *M. galloprovincialis*, 12 di *T. philippinarum* sono stati sottoposti a depurazione fino a 7 giorni (T7). Le cariche endogene rilevate, relative a *Vibrio* spp., sono riportate nei grafici di figura 1-3. All'origine (T0) *Vibrio* spp. è risultato compreso fra 3,9 e 5,3 log, mostrando poi andamenti leggermente diversi nelle diverse specie: un aumento di 1 log passando al T2-T3 in *Mytilus* e *Venus*, per poi rimanere pressoché costante, ed una diminuzione di 1 log in *Tapes* con successivo aumento al T5-6. Al T7 tutti molluschi mostravano valori superiori all'origine con differenziale compreso fra 0,5 e 2 log, senza differenze di rilievo tra il trattamento con AR e quello con AM. Un solo lotto di *V. gallina*, è risultato positivo per HAV all'origine (T0), e tale è rimasto anche al T7. La sperimentazione ha mostrato che i batteri del biofiltro tendono a diffondere nel sistema, in quanto i valori riscontrati nell'acqua interstiziale del biofiltro sono risultati sostanzialmente sovrapponibili a quelli riscontrati nell'acqua delle vasche. L'azione degli UV-C senza ozono è risulta efficace su *Vibrio* spp. circolante, con diminuzioni di carica dell'ordine di 1 log, ed ancor più su *Nitrobacter*, con diminuzione di 1-2 log, ininfluente su

*Nitrosomonas*. Effetti analoghi sono stati riscontrati con l'utilizzo dell'ozono. L'impiego simultaneo di UV-C ed ozono ha prodotto diminuzioni di 2-3 log, documentando un reale effetto sinergico.



Le prove di alimentazione sono state effettuate su 3 lotti di *T. philippinarum*, utilizzando colture algali di *Isochrysis galbana*. La somministrazione di colture attive ha prodotto sulla quota endogena di *Vibrio* spp. aumenti di circa 1 log per giorno fino a 3 giorni (valori non riportati), mentre la somministrazione di colture sterilizzate in autoclave a 121°C per 15 minuti, ha prodotto una diminuzione di 1 log tra il primo e il secondo giorno, mostrando una tendenza a diminuire anche fra il secondo ed il terzo giorno come mostrato in fig. 4. Questo riscontro sembra testimoniare che, con alimento disponibile in vasca, i molluschi rilasciano più facilmente una quota dell'alimento precedentemente tesaurizzato, tra cui anche i batteri marini quali *Vibrio* spp. In conclusione, è confermata l'impossibilità di incidere sulla quota endogena dei molluschi relativa a *Vibrio* spp. con trattamento di depurazione standard, ma ciò non dipende dall'inefficacia dei sistemi degerminanti quali UV-C ed ozono, che al contrario si dimostrano attivi sulla quota circolante, bensì dal mancato rilascio da parte dei molluschi. Abbiamo potuto dimostrare che i batteri del biofiltro non restano nella sede di inoculo, ma diffondono nel sistema, ove *Nitrobacter*, subisce un progressivo depauperamento ad opera di UV-C ed ozono, con conseguente diminuzione dell'attività di riduzione dei nitriti, la cui quota aumenta nel sistema anche per effetto dell'attività nitrato-riducente di *Vibrio* spp. L'alimentazione con substrati microalgali sembra stimolare l'eluizione di *Vibrio* spp. probabilmente per una sorta di scambio biologico tra alimento tesaurizzato e nuovo alimento.

## Bibliografia

- Alexander M. 1982 Most Probable Number method for microbial populations. In: Methods in Soil Analysis. Eds. A L Page, R H Miller and D R Keeney: pp 815–820. Agronomy 9, part 2, 2<sup>nd</sup> ed. ASA, SSSA, Madson, WI.
- Groubert T. N., Oliver J. D. 1994. Interaction of *Vibrio vulnificus* and the Eastern Oyster, *Crassostrea Virginica*. Journal of Food Protection, 57 (3): 224-228.
- Jackson K.L., Ogburn D.M. 1999. Review of depuration and its role in shellfish quality assurance. FRDC Project No. 96/355. NSW Fisheries Final Report Series No. 13. ISSN 1440-3544.
- Le Guyader F, Dubois E, Menard D, Pommepuy M. (1994). Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-seminested PCR. Appl Environ Microbiol. 60(10):3665-71.
- Moore N., Margolin A. B. 1994. Detection of poliovirus post disinfection with chlorine, chlorine dioxide, uv and ozone by nucleic acid probes. App. Environ. Mic 11:4189- 4190.
- Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004. GU L 139/55, 30/04/2004.
- Serratore P., Turtura G.C., Rinaldini E., Milandri S., Presepi D. 1999. Phenotypic characterization of some bacterial populations belonging to the genus *Vibrio*. Annali di Microbiologia ed Enzimologia: 49, 79-88.
- Sobsey M. D., Jaykus, L-A., 1991. Human enteric viruses and depuration of bivalve molluscs. In: W. S. Otwell, G. E. Rodrick and R. E. Martin (eds). Molluscan Shellfish Depuration, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 71-114.

# IN-HOUSE VALIDATION OF A COLONY HYBRIDIZATION METHOD FOR THE ENUMERATION OF TOTAL AND POTENTIALLY ENTEROPATHOGENIC *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* IN SEAFOOD

Suffredini E., Cozzi L., Ciccaglioni G., Croci L.

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, colony hybridisation, enumeration, quantitative analysis, shellfish, seafood

## Summary

*Vibrio parahaemolyticus*, a natural inhabitant of marine and estuarine environment, can cause gastroenteritis in humans due to the consumption of raw or inadequately cooked seafood. A strong correlation between the possession of particular haemolysin genes – *tdh*, *trh* or both – and the ability to cause disease is widely documented; however, the frequency of *tdh* or *trh* genes in environmental samples and seafood has been reported to be very low (from 0.3 to 3% of total *V. parahaemolyticus* population) in comparison to that in clinical isolates. In Europe the *Vibrio* risk currently appeared to be low, but international experience demonstrated that outbreaks can occur unexpectedly, particularly due to the imported seafood from endemic areas. However current European Regulations (2073/2005) don't report microbiological criteria for seafood in relation to the presence of *Vibrio* species, but the development of an effective standardized method for the detection of this micro-organism has been recommended. Only cultural qualitative methods (ISO/TS 21872-1) are currently available. In the last decade many molecular methods (conventional and real-time PCR) for both detection and identification of *V. parahaemolyticus* have been developed. They are rapid and specific but, because of the presence of amplification inhibitors in the matrix, to be sensitive enough need a previous enrichment step for qualitative analysis or an MPN enrichment step for quantitative determination, making it in the last case a labour-intensive assay. To fill this gap a new DNA colony hybridization method for the enumeration of toxigenic and total *V. parahaemolyticus* strains in seafood has been developed. The method was subjected to an in-house validation using a great number of well characterized bacteria, belonging both to the *Vibrio parahaemolyticus* and other species, experimentally and naturally contaminated seafood.

## Materials and methods

The colony hybridisation method included two subsequent hybridisation steps (Fig. 1), the first for potentially pathogenic *V. parahaemolyticus*, targeting *tdh* and *trh* genes, the second one for total *V. parahaemolyticus* enumeration, targeting the *toxR* gene. A set of three controls (process, hybridisation and detection control) was included in the method. Digoxigenin-labelled probes were designed for the *toxR* gene of *V. parahaemolyticus* and for the genes *tdh1*, *tdh2*, *trh1* and *trh2*. A total of 426 strains, including 70 reference strains from international culture collections and 356 isolates from fishery products, environmental sources and clinical cases were used to define inclusivity and exclusivity of the probes (percentage of true positive or true negative upon expected positive or negative results). Accuracy and linearity of the enumeration was evaluated through linear regression and R squared calculation on pure and mixed cultures and on experimentally contaminated food matrices, using four *V. parahaemolyticus* control strains (ATCC 27519 for *toxR*, ATCC 43996 for *tdh1* and *tdh2*, CCUG 43364 for *trh1*, ATCC 17802 for *trh2*). For tests on food matrices, a mixed culture of pathogenic and non-pathogenic strains was prepared and tenfold dilutions were used to inoculate 10 g aliquots of four food types selected: shellfish (*Mytilus galloprovincialis*), finfish (*Sparus aurata*), crustacean (*Penaeus japonicus*) and cephalopods (*Octopus vulgaris*) to obtain final concentrations ranging from  $10^0$  to  $10^5$  *V. parahaemolyticus* per gram ( $10^4$  for pathogenic strains). Tests on naturally contaminated samples were performed on 104 shellfish samples (including *Mytilus galloprovincialis*, *Tapes decussatus*, *Venus gallina*, *Crassostrea* spp., *Solen* spp., etc.), subjected to colony hybridisation analysis and analysed parallelly according to ISO/TS 21872-1 and using an MPN enumeration format (3 tubes, 3 dilutions). Comparison of results was performed using the relative accuracy and the correlation coefficient (*r*).

## Results and discussion

Inclusivity of the probes was 96.7% for *tdh* detection, 97.8% for *trh* detection and 99.4% for *toxR* gene, while exclusivity was 100.0% for all the target genes and only a weak signal, compared to the control, was obtained from the *trh* sequence of one *trh+* *V. alginolyticus* tested.

The experiments on pure and mixed cultures showed good linearity of the method within the range from  $10^1$  to  $10^7$  ( $10^8$  for total *V. parahaemolyticus* enumeration) cfu/ml, and the agreement between colony hybridization and expected counts, expressed by the slope of the regression lines, varied from 0.957 of *tdh2* probe to 1.058 of *trh2* probe, while the coefficient of determination  $R^2$  was  $\geq 0.989$  for all reactions.

The results on the experimentally contaminated seafood matrices (Fig. 2, panel A and B) confirmed the linearity of the enumeration of potentially pathogenic *V. parahaemolyticus* within the range from  $10^1$  to  $10^4$

cfu/g, with curves' slopes varying from 0.895 for finfish to 0.987 for cephalopods ( $R^2 \geq 0.965$ ). For total *V. parahaemolyticus* enumeration an even higher correlation was obtained in all four matrices within the range from  $10^1$  to  $10^5$  cfu/g (slopes from 0.965 to 1.073 and  $R^2 \geq 0.981$ ).

Of the 104 naturally contaminated samples analysed, 38 were detected positive by both ISO/TS 21872-1 and by MPN procedure, while the colony hybridization method detected *V. parahaemolyticus* in 31 of these samples and in 12 other samples negative by ISO procedure (relative accuracy of 81.7%). Analysis of the results obtained for total *V. parahaemolyticus* enumeration with colony hybridization and MPN (Fig. 2, panel C) showed a correlation coefficient of 0.744. No correlation could be established for the quantitative analysis of potentially pathogenic *V. parahaemolyticus*, due to the limited number of results.

The described method for the quantitative determination of *V. parahaemolyticus* in shellfish is effective, simple to perform and does not require specialized personnel or specific precautions to avoid cross-contamination as for real-time analysis. The use of the different controls (process, hybridisation and detection control) allows full monitoring of analytical procedure with, despite their number, a minimal increase of work and reagents consume. The method, that present good characteristics in terms of accuracy and linearity, allows the enumeration of low numbers of *V. parahaemolyticus* (both pathogenic or not) in seafood samples also in presence of a predominant background flora.

**Acknowledgments:** This work has been partially supported by 7th European Framework projects, Grant agreement 222738; "Selection and improving of fit-for-purpose sampling procedures for specific foods and risks" (<http://www.baselineurope.eu/>).

## References

Roche Diagnostics. 2008. DIG Application Manual for Filter Hybridization ([http://www.roche-applied-science.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05353149001\\_08.08.pdf](http://www.roche-applied-science.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05353149001_08.08.pdf))

Fig. 1: Flow-diagram of the colony hybridisation method

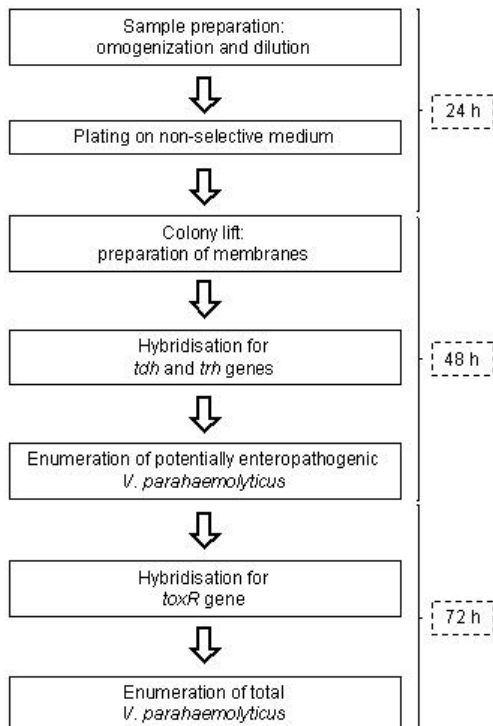
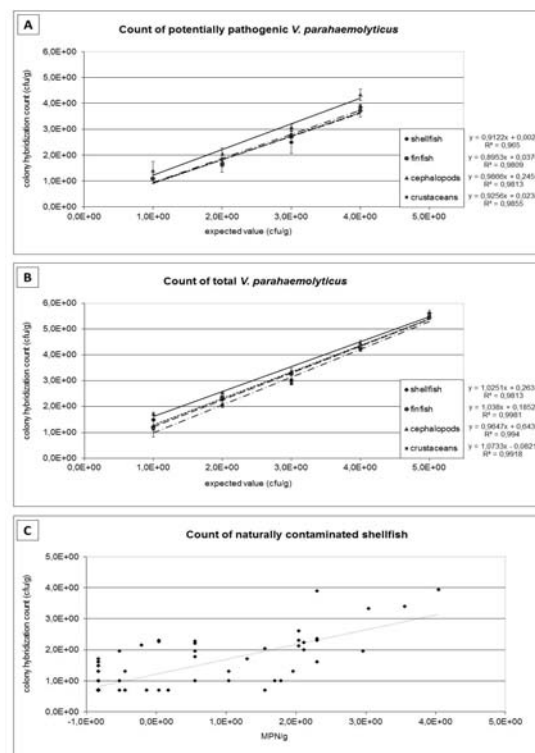


Fig. 2: Enumeration on experimentally contaminated seafood matrices and on naturally contaminated shellfish



# OSTRICHE RESPONSABILI DI GASTROENTERITE DA NOROVIRUS: VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI CONTAMINAZIONE NEL TEMPO IN LOTTI PROVENIENTI DALLA STESSA AREA

Suffredini E.<sup>1</sup>, Serracca L.<sup>2</sup>, Ercolini C.<sup>2</sup>, Cozzi L.<sup>1</sup> e Croci L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare – Roma

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – La Spezia

**Keywords:** Norovirus, ostriche, molluschi, analisi quantitativa, dose infettante, depurazione

## Introduzione

I molluschi bivalvi sono un veicolo di trasmissione virale ampiamente documentato (Lees 2000). Le attuali misure di controllo sanitarie presenti nel Reg. EU 854/2004 (classificazione delle aree di raccolta, monitoraggio delle aree di produzione per *E. coli*, trattamenti post produzione) e nel Reg. 2073/2005 (*E. coli* e *Salmonella* come criteri di sicurezza per i prodotti al commercio), hanno l'obiettivo di controllare la contaminazione fecale dei molluschi. Queste misure, tuttavia, si sono mostrate meno efficaci nel controllo delle contaminazioni virali, anche in considerazione della prolungata sopravvivenza dei virus in acqua di mare e nei sedimenti ed epidemie da Norovirus (NoV) associate al consumo di molluschi sono state frequentemente riportate in Europa ed in altri Paesi (Koopmans and Duizer 2004). Allo scopo di implementare la legislazione europea, definendo criteri microbiologici anche per i NoV nei molluschi bivalvi, è necessaria la raccolta di dati quantitativi sui livelli di questo patogeno in molluschi associati ad epidemie o casi sporadici. La definizione dei trend della carica virale nelle zone collegate a prodotti coinvolti in episodi di gastroenterite, consentirebbe inoltre di migliorare i criteri per la gestione della chiusura e riapertura delle aree di produzione. In questo studio sono fornite informazioni su un'epidemia di piccole dimensioni associata a consumo di ostriche: i NoV erano rilevati nel campione sospetto ad una concentrazione di 2,9E+03 copie/g e la contaminazione virale nell'area di produzione relativa alle suddette ostriche persisteva nei successivi due mesi.

## Summary

Bivalve molluscs are a well documented source of viral infection. Current sanitary measures, reported in the EU Reg. 854/2004 (classification of harvest areas, monitoring of production areas for *E. coli*, post harvest treatments) and Reg. 2073/2005 (*E. coli* and *Salmonella* as food safety criteria for marketed products), have the objective to control the faecal contamination of shellfish. These measures, however, have been less efficient against enteric viruses, whose survival in seawater and sediments may be prolonged. A large number of shellfish-associated outbreaks, in fact, have been attributed to these pathogens, particularly Norovirus (NoV). In order to implement the European Regulations, establishing microbiological criteria also for Norovirus in bivalve molluscs, quantitative data on the levels of these pathogens in shellfish associated to outbreaks or sporadic cases need to be supplied. Furthermore, for the improvement of harvesting management, information are needed on the decrease of viral load in shellfish production areas to which outbreaks-related molluscs track back. In this study information on a small oyster-related outbreak are reported: NoV were detected at 2,9E+03 copies/g in the suspected sample and viral contamination in the production area from which oysters were collected was still present after two months.

## Materiali e metodi

Nel gennaio 2013 veniva notificato nella città di Massa un episodio di gastroenterite, che vedeva coinvolte tre persone. La sintomatologia, in base delle dichiarazioni degli soggetti coinvolti e ai riscontri clinici, indirizzava ad un'infezione di tipo virale e, con maggiore probabilità, ad un'infezione da Norovirus (NoV); non venivano tuttavia prelevati campioni clinici per ulteriori accertamenti diagnostici. I pazienti avevano consumato due giorni prima (12.01.2013), presso un ristorante di La Spezia, una cena che comprendeva, insieme ad altre pietanze, ostriche di provenienza francese. Nel corso delle indagini effettuate a seguito della segnalazione, nel medesimo ristorante venivano prelevati due campioni di ostriche: uno dei campionamenti veniva effettuato su un lotto aperto (data di spedizione 28.12.2012), presumibilmente il medesimo in uso la sera della cena oggetto dell'indagine. L'altro prelievo era effettuato su un lotto ancora sigillato, spedito in data 09.01.2013, costituito da ostriche provenienti dalla medesima area di produzione della precedente fornitura. I campioni prelevati erano sottoposti ad analisi per la ricerca di NoV mediante metodica validata ed accreditata presso I.Z.S. del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, sezione di La Spezia e i campioni erano successivamente conferiti all'Istituto Superiore di Sanità per ulteriori accertamenti. La presenza di NoV di genogruppo I e II era quindi confermata mediante metodo ISO/TS 15216-2 e la quantizzazione era effettuata secondo le modalità descritte nella ISO/TS 15216-1. Successivamente alla notifica al Sistema Rapido di Allerta (RASFF) per il caso descritto, venivano intensificati i controlli sui prodotti al commercio. Nei due mesi successivi, nel corso di tali controlli, venivano prelevati, fra gli altri, altri due campioni di ostriche spediti



rispettivamente in data 13.02.2013 e 26.02.2013 e provenienti, in base alle informazioni di etichettatura, dalla medesima zona di produzione dei campioni investigati a seguito della tossinfezione.

### Risultati e discussione

I campioni prelevati nel corso dell'indagine per la tossinfezione risultavano entrambi positivi per presenza di NoV. Il quantitativo totale di NoV (i.e. somma di GI e GII) era pari a 5,2E+03 copie/g nel campione proveniente dal lotto presumibilmente consumato in occasione della cena oggetto della notifica, e a 5,9E+03 copie/g nel lotto presente ancora intatto presso il medesimo ristorante (Tab. 1). Le analisi effettuate sugli altri due campioni di medesima provenienza evidenziavano la persistenza di NoV nell'area di produzione: infatti nella fornitura del 13.02.2013 (ovvero 46 giorni dopo la data di produzione del lotto prelevato per l'episodio tossinfettivo) le ostriche contenevano livelli di NoV pari a 2,9E+03 copie/g, livelli quindi sostanzialmente sovrapponibili a quelli riscontrati nel campione consumato dai pazienti, mentre nella fornitura del 26.02.2013 (t = 59 giorni) si rilevava la presenza di NoV in concentrazioni pari a 5,3E+02 copie/g, ovvero una riduzione di circa un logaritmo rispetto al campione associato all'epidemia segnalata.

Tali risultati, oltre a fornire indicazioni relativamente alla quantità di NoV contenuta in ostriche (ovvero in una tipologia di molluschi comunemente consumata cruda) presumibilmente legate ad un episodio di gastroenterite, evidenziano come i Norovirus – pur nell'impossibilità di determinarne l'infettività – permangano a livelli quantitativamente rilevabili nelle aree di produzione coinvolte da contaminazione, anche per periodi prolungati (nella fattispecie, nei due mesi successivi). Tali informazioni devono essere tenute in considerazione nell'ambito della gestione delle aree di produzione, in particolar modo per un migliore definizione dei criteri per la chiusura e riapertura delle zone per le quali sia stato evidenziato un collegamento con prodotti coinvolti in episodi di gastroenterite.

Tab. 1: Analisi quantitativa dei livelli di Norovirus in lotti di ostriche provenienti dalla medesima area di produzione

Campione	tempo (gg)	NoVGI (copie/g)	NoVGII (copie/g)	NoV tot (copie/g)
lotto del 28.12.2012	0	2,1E+03	3,1E+03	5,2E+03
lotto del 09.01.2013	+11	2,2E+03	3,0E+03	5,9E+03
lotto del 13.02.2013	+46	1,7E+03	1,2E+03	2,9E+03
lotto del 26.02.2013	+59	6,6E+01	4,6E+02	5,3E+02

**Ringraziamenti:** Il presente lavoro è stato in parte finanziato dal 7° Programma Quadro, Grant agreement 222738; "Selection and improving of fit-for-purpose sampling procedures for specific foods and risks" (<http://www.baselineurope.eu/>).

### Bibliografia

1. Koopmans M. e Duizer E., 2004, Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol*, 90, 23-41.
2. Lees D., 2000, Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol*, 59, 81-116.

# RISPOSTA IMMUNITARIA DI *CHAMELEA GALLINA* (L. 1758) IN FUNZIONE DELLA TAGLIA.

Tiscar P.G., Mosca F.

Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo

**Keywords:** Vongola; Taglia; Emociti; Fagocitosi; Circolarità; Ossido nitrico

## Introduzione

La vongola Adriatica *Chamelea gallina* (L 1758) rappresenta una importante risorsa alieutica del mare Mediterraneo ed il progressivo depauperamento dei banchi naturali è stato attribuito nel corso dei decenni a condizioni di eccessivo prelievo in associazione a fattori di stress naturali ed antropici (Romanelli et al., 2009). Il sistema immunitario innato dei molluschi bivalvi marini risiede principalmente nell'attività fagocitaria di cellule circolanti, note come emociti, distinguibili morfologicamente in due principali tipologie, ialinociti e granulociti (Hine, 1999). In particolare, i granulociti possiedono spiccate caratteristiche morfo-funzionali in grado di consentire una risposta aspecifica a stimoli fagocitari di varia natura attraverso l'acquisizione di una conformazione ameboide e la produzione di radicali liberi responsabili dei processi di chemiotassi, inglobamento e degradazione del materiale fagocitato (Mosca et al., 2013). Nel presente studio, taluni parametri emocitari sono stati misurati mediante saggi di fagocitosi *in vitro* in vongole di taglia differente al fine di verificare possibili variazioni di immunocompetenza correlabili all'età degli organismi.

## Summary

The clam *Chamelea gallina* (L 1758) represents an important shellfish resource along Mediterranean coasts and its progressive depletion has been ascribed both to the overexploitation of stocks and to environmental or anthropic stressors. In this context, the investigation on immune parameters could represent a valid approach to measure the clam homeostasis condition and its possible influence on population dynamics. On this basis, the innate immune system, mainly represented by hemocyte phagocytosis, was investigated in organisms of different size. The results indicated a better phagocytic response in larger clams, strictly related to a greater concentration of granulocytes. A such variation in hemolymph composition appeared not dependent on environmental or endogenous factors, but rather on clam aging.

## Materiali e metodi

Campionamenti di vongole (N=10) sono stati condotti in un arco temporale mensile da banchi naturali presenti nel medio Adriatico mediante metodi non invasivi. Circa 200 soggetti erano prelevati in ciascun campionamento e successivamente suddivisi in due gruppi di ugual numero (n=10), costituiti rispettivamente da vongole di taglia inferiore ai 20 mm e superiore ai 30 mm. L'emolinfa di ciascun organismo era prelevata dal muscolo adduttore mediante siringa ipodermica e raccolta in pool per ciascun gruppo. Un'aliquota dei pools era impiegata per effettuare una conta differenziale delle popolazioni emocitarie in microscopia ottica previa colorazione (Hemacolor). Una seconda aliquota era utilizzata nei saggi di fagocitosi mediante stimolazione *in vitro* con lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*), misurando la capacità ameboide ed ossidativa. In particolare, la risposta morfologica degli emociti alla stimolazione è stata misurata con il parametro circolarità (Vi-Cell, Beckman Coulter) in grado di esprimere il livello di rotondità delle cellule, mentre la risposta ossidativa è stata valutata in micrometodo (Packard Fusion, Perkin Elmer) previo impiego di un tracciante fluorescente specifico (DAF-2DA) nella rilevazione di ossido nitrico (NO). Infine una terza aliquota dei pools è stata sottoposta a specifico protocollo con gradiente di Percoll al fine di separare le differenti popolazioni emocitarie. Le frazioni ottenute in tal modo sono state testate nei saggi fagocitari, avvalendosi inoltre dell'impiego della citometria a flusso (XL Epics, Beckman Coulter).

## Risultati e discussione

Gli organismi di taglia superiore ai 30 mm risultavano caratterizzati da una maggiore percentuale di granulociti all'esame microscopico e da una maggiore risposta fagocitaria, sia in termini di decremento del parametro circolarità quale indicatore della produzione di pseudopodi sia in relazione alla produzione di ossido nitrico. La separazione delle popolazioni emocitarie mediante gradiente ha permesso di ottenere due frazioni ben distinte con un elevato livello di purezza, costituite da ialinociti e granulociti. Le prove di fagocitosi condotte su tali frazioni hanno confermato la superiore reattività granulocitaria nei confronti della stimolazione. Il presente studio ha evidenziato quindi una migliore risposta fagocitaria in vongole di taglia superiore ai 30 mm, presumibilmente soggetti di circa tre anni di età, rispetto ad organismi di taglia inferiore ai 20 mm, stimabili intorno ai 12 mesi di vita (Arneri et al., 1995). Tali differenze sembrerebbero ascrivibili all'aumento percentuale della quota granulocitaria nei soggetti più adulti, considerando la maggiore attitudine

fagocitaria di tali cellule rispetto agli ialinociti. In conclusione, l'influenza di variabili endogene sulla risposta immunitaria dei molluschi bivalvi marini costituisce un interessante settore di indagine, con potenziali risvolti nella comprensione delle dinamiche di popolazione degli stock naturali.

## **Bibliografia**

1. Ameri E, Giannetti G, Polenta R, Antolini B. Age and growth of *Chamelea gallina* (L.) in the central Adriatic Sea obtained by thin sections. Rapp. Comm. Int. Mer. Médit. 1995;34: 17.
2. Hine PM. The inter-relationships of bivalve hemocytes. Fish Shellfish Immun 1999;9: 367-85.
3. Mosca F, Lanni L, Cargini D, Narcisi V, Bianco I, Tiscar PG. Variability of the hemocyte parameters of cultivated mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk, 1819) in Sabaudia (Latina, Italy) coastal lagoon. Mar Environ Res 2013; (in press) doi: 10.1016/j.marenvres.2013.09.021.
4. Romanelli M, Cordisco CA, Giovanardi O. The long-term decline of the clam *Chamelea gallina* (Bivalvia:Veneridae) fishery in the Adriatic sea: is a synthesis possible?. Acta Adriat 2009;50:171-205.

# TECNICHE DI REINTRODUZIONE DELLA SPECIE *NASSARIUS MUTABILIS* L. IN ALCUNE AREE ADRIATICHE

Troli E.\*, Felici A.°, Pellizzato M.°

\*Blu Marine Service, Via Cadore, 11 - 63039 S. Benedetto del Tronto (AP)

°Università di Camerino - Scienze Mediche Veterinarie, Viale A. Scipioni, 6 - 63074 S. Benedetto del Tronto (AP)

**Keywords:** *Nassarius mutabilis*, ripopolamento, Adriatico, gestione, pesca artigianale, sostenibilità.

## Introduzione

Il Codice di Condotta per una Pesca Responsabile (FAO, 1995; Cataudella *et al.*, 2010) e le nuove disposizioni in materia di pesca emanate dall'Unione Europea (Regolamento CEE n. 1967, 2006) impongono di aumentare la sostenibilità delle attività di pesca, anche attraverso l'individuazione di idonei strumenti e corrette prassi gestionali di efficace applicazione.

Nel periodo invernale, lungo la fascia costiera adriatica, la pesca delle lumachine di mare (*Nassarius mutabilis* L.) è tradizionalmente effettuata con attrezzi artigianali (trappole o cestini): elemento critico di tale sistema di pesca è rappresentato dal fatto che la cattura di questi gasteropodi avviene nel corso della deposizione delle uova, in un periodo cruciale del ciclo biologico.

Nell'ambito del Progetto 02/OPI/11, Misura 3.5 misure innovanti, finanziato dalla Regione Marche con fondi F.E.P. 2007-2013, i pescatori del Co.Ge.P.A. hanno condotto una sperimentazione per la messa a punto di tecniche efficaci per effettuare il ripopolamento della lumachina di mare in zone della fascia costiera a Sud della Regione, dove tale risorsa risulta negli ultimi anni notevolmente diminuita ed altalenante.

## Summary

One of the main objectives of Common Fisheries Policy (CFP) is the adoption of conservation measures to prevent the overexploitation of fish stocks. The small-scale fishermen in the Marche Region have conducted an experiment to make more sustainable fishing for *Nassarius mutabilis* with traps in the winter season, during the spawning period. Were used collectors able to recruit an average of 890.000 capsules/m<sup>2</sup> (with peaks than 1.200.000 capsules/m<sup>2</sup>). The success of the collectors tested to acquire capsules berried at high concentration and the ease of use of the structures, it allows to collect large quantities of eggs that can be moved in areas depleted by overfishing today. Even moving juvenile *Nassarius mutabilis* in sandy areas suitable, it can be a useful technique to implement the practices of restocking. Nutritional surveys show a product with a high protein value and low value of the lipid content in which reveals the presence of a percentage of polyunsaturated equal to about 30% of the total fatty acids.

## Materiali e metodi

La sperimentazione è stata condotta nell'area costiera marchigiana compresa da Pedaso a S. Benedetto del Tronto (AP) nel corso della stagione di pesca (da novembre 2012 a maggio 2013). Il progetto ha sperimentato dei collettori (raccolgitori) per capsule ovigere di lumachina di mare (*Nassarius mutabilis*), nelle aree dove la risorsa è ancora frequente, per spostarli in zone fortemente depauperate.

Inoltre, si è realizzato lo spostamento dei giovanili di tali gasteropodi in siti depauperati della risorsa, al fine di mettere a punto una tecnica in grado di contribuire, accelerandola, l'azione di ripopolamento.

Nel corso dell'esperienza finalizzata all'incremento del popolamento dei "bombolini" sono stati analizzati alcuni aspetti biologico-produttivi di questi gasteropodi (mobilità, periodo di deposizione, substrati preferiti, ecc.) in rapporto al loro ambiente elettivo (sedimento, macrobenthos, ecc.). E' stata stimata la composizione della popolazione in rapporto alle taglie sub-commerciali e alle specie consorelle (i.e. *Hinia reticulata*), valutata la quantità delle uova destinate al ripopolamento e analizzate le proprietà nutrizionali.

## Risultati e discussione

Sui collettori è stata riscontrata una concentrazione in media di 890.000 capsule ovigere/m<sup>2</sup>, con punte massime superiori a 1.200.000 capsule/m<sup>2</sup>. In considerazione del fatto che all'interno di ogni capsula ovigera vi sono più uova (mediamente sei), il numero delle lumachine che potenzialmente possono schiudere, risulta essere superiore ai 7.000.000/individui/m<sup>2</sup> di collettore.

Nel caso dei collettori lineari (cima di diametro 12 mm e lunghezza di 10 m), si ha una superficie di circa 0,377 m<sup>2</sup>. Questo sistema, in situazione ottimale, risulta avere un potenziale riproduttivo di circa 2.000.000 uova di lumachina su di un segmento di 10 m.

Nei collettori a piramide, con una superficie disponibile sulle 4 facce laterali di forma triangolare, pari a circa 0,80 m<sup>2</sup>, e una copertura dell'85% (pari a circa 0,68 m<sup>2</sup>), si può ipotizzare una capacità di 605.000 capsule ovigere, pari a circa 3.600.000 uova/collettore a piramide.

Analizzando i dati sulle ricatture di *Nassarius mutabilis* adulti, è risultato che queste avvenivano, anche dopo molti giorni, solo in prossimità dei punti di re-immissione.

Dai dati acquisiti risulta che in oltre 3 mesi, i recuperi più lontani delle lumachine marcate sono avvenuti a circa 300 m dal punto di re-immissione. Si è quindi potuto constatare che la lumachina di mare, se rilasciata su una batimetrica adatta e su un'area con sedimento che ne consenta una adeguata alimentazione, non compie migrazioni o spostamenti rilevanti.

Le carni della lumachina di mare sono caratterizzate da un'alta percentuale di sostanza secca e da un elevato contenuto di proteine (circa il 20%), mentre la componente lipidica è molto contenuta (di poco superiore all'1%).

Il profilo acido è caratterizzato da un'importante presenza di acidi grassi saturi (40-41%) e da una buona percentuale di acidi grassi polinsaturi (29-30%) e monoinsaturi.

Un ulteriore esame della componente lipidica, quella costituita dagli acidi grassi polinsaturi, evidenzia la consistente presenza di acidi grassi polinsaturi per l'alimentazione umana quali l'EPA (C20:5) ed il DHA (C22:6), con una percentuale media del 25% sul totale degli acidi grassi.

## Conclusioni

Lo spostamento dei giovanili di *Nassarius mutabilis* in aree sabbiose idonee, può essere una tecnica utile per attuare pratiche di reintroduzione. La certezza acquisita, anche tramite il monitoraggio effettuato, che le lumachine non compiono grandi spostamenti, conferma l'ipotesi che aree depauperate possono essere ripopolate direttamente anche con lo spostamento dei giovanili.

La capacità dei collettori sperimentati di acquisire capsule ovigere ad elevata concentrazione permette di collezionare una grande quantità di uova che possono essere spostate in altre aree vocate ed impoverite. Determinante per incrementare la sola popolazione di *Nassarius mutabilis* è anche quello di posizionare i collettori di uova in aree in cui la presenza di questa specie è di gran lunga prevalente rispetto a *Hinia reticolata*.

La notevole concentrazione di uova sui supporti utilizzati (soprattutto sui collettori a piramide) evidenzia come le lumachine richiedano sostegni su cui effettuare la deposizione. L'elevato numero di uova depositate sui collettori su più strati (>7.000.000 di individui/m<sup>2</sup>), fa supporre che l'elevata concentrazione sia dovuta anche alla scarsità di substrati utilizzabili oggi poco frequenti sui fondali sabbiosi dell'Adriatico (un tempo esistevano estese praterie di fanerogame marine).

Le indicazioni fornite dalle indagini nutrizionali mostrano un prodotto caratterizzato dall'aver un alto valore proteico associato ad un basso valore del contenuto lipidico in cui emerge una percentuale di polinsaturi pari a circa il 30% del totale degli acidi grassi ed in particolare l'interessante presenza di circa un 25% di acidi grassi essenziali per l'alimentazione umana. Questi dati indicano un prodotto di buon livello da un punto di vista nutrizionale che dovrebbe essere maggiormente valorizzato.

## Bibliografia

1. CATAUDELLA S., FERAIOLI O., LARICCIA M. 2011. L'evoluzione della pesca italiana verso la sostenibilità nel quadro del Codice di condotta per la pesca responsabile (FAO), della Politica Comune della Pesca (PCP) e della Politica marittima integrata, pp.11-31. In: AA.VV. 2011. Lo stato della pesca e dell'acquacoltura nei mari italiani. A cura di Cataudella S. e Spagnolo M., MIPAF, 877 pp.
2. FIORI F., PRIOLI G., MATARAZZO D. 2008. Studi per la valorizzazione del lumachino lungo (*Hinia reticolata*). Regione Emilia-Romagna, Relazione finale, 49 pp.
3. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS 1995. Code of conduct for responsible fisheries. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/v9878e/v9878e00.pdf>
4. FROGLIA C. 2001. La gestione della pesca marittima in Italia. Fondamenti tecnico-biologici e normativa vigente. Istituto di Ricerche sulla Pesca Marittima, Monografie Scientifiche CNR, Roma: 319 pp.
5. FROGLIA C. 2002. Studio biologico-ambientale dell'area proposta per l'istituzione della riserva marina "Parco Marino del Piceno". Il FASE: Fase Implementativa. Ancona, CNR-IRPeM, 184 pp.
6. PICCINETTI C., PICCINETTI MANFRIN G. 1998. Considerazione per la gestione della pesca del lumachino (*Nassarius mutabilis* L.). *Biol. Mar. Medit.*, 1 (2): 77-87.
7. REGOLAMENTO CEE 1967/2006. (Regolamento Mediterraneo).

# INATTIVAZIONE DI NOROVIRUS MURINO MEDIANTE COTTURA TRADIZIONALE IN VONGOLE (*RUDITAPES PHILIPPINARUM*) INFETTATE SPERIMENTALMENTE

Toffan A.\*<sup>1</sup>, Brutti A.<sup>2</sup>, De Pasquale A.<sup>3</sup>, Cappellozza E.<sup>1</sup>, Pascoli F.<sup>1</sup>, Cigarini M.<sup>2</sup>, Di Rocco M.<sup>2</sup>, Terregino C.<sup>1</sup> and Arcangeli G.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Virologia degli animali acquatici, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padova

<sup>2</sup> Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari in Parma (SSICA) Viale Tanara, 31/a, 43100 Parma

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Centro di Referenza Nazionale per le patologie dei pesci, molluschi e crostacei, Viale L. Da Vinci 39, Adria, Rovigo

**Keywords:** Norovirus, vongole veraci, inattivazione, cottura

## Introduzione

Tra i prodotti ittici, i molluschi bivalvi (MB), data la loro caratteristica di animali filtratori, sono senza dubbio l'alimento più a rischio per il potenziale accumulo di microrganismi patogeni per l'uomo. (1). Tra questi patogeni, particolarmente diffuso risulta essere il Norovirus (HuNoV) che causa ogni anno numerosi episodi di gastroenterite (2). Le caratteristiche di infettività (sono sufficienti <100 particelle virali a causare malattia) e di resistenza che caratterizzano HuNoV lo rendono uno dei problemi principali per la sicurezza alimentare. E' noto che la depurazione dei MB, trattamento di dimostrata efficacia per abbattere contaminazioni fecali da *E. coli*, risulta poco efficace sugli agenti virali (3). L'EFSA infatti consiglia di indicare nell'etichetta di tutti i MB "da consumarsi previa cottura" (4), senza però dare indicazioni sulla durata e sulla temperatura da utilizzare. Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare i tempi e le temperature necessarie per la completa inattivazione di Norovirus in vongole con metodi di cottura tradizione (in padella) allo scopo di fornire ai consumatori delle indicazioni chiare e pratiche su come cucinare i MB per ridurre il rischio di infezione alimentare. A tale scopo vongole veraci (*R. philippinarum*) sono state infettate sperimentalmente con il norovirus murino (NMV), quale surrogato di HuNoV che ad oggi non è coltivabile in laboratorio (5).

## Summary

The aim of this work was to evaluate the efficacy of domestic cooking in inactivating manila clams experimentally infected with murine norovirus (MNV). A cooking pan was modified to enable electronic temperature probes to be positioned to record both flesh and environment temperature. Manila clams were infected with  $10^4$  TCID<sub>50</sub>%ml<sup>-1</sup> of MNV. The infected whole-in-shell clams, divided into three replicates, were cooked on an electric stove and groups of 9 clams removed from the pan at fixed intervals. Pools of 3 digestive glands were examined by virus isolation to ascertain residual viral load. Results showed that ten minutes of cooking by a traditional domestic method at a temperature close to 100°C, for at least 2 minutes, can completely devitalize the MNV in infected clams. This is generally the time needed for the majority of valves to open up. At present it is highly recommended to label all lagoon products as "requiring cooking before consumption", but no specifications are given on how long and at what temperature they should be cooked. Our results can provide the consumer with useful indications on how to cook clams to prevent any risk of foodborne illness.

## Materiali e metodi

204 vongole veraci (*R. philippinarum*) di grossa dimensione, non sottoposte a depurazione, sono state raccolte nella sacca di Scardovari (RO) e trasportate nell'acquario sperimentale dell'IZSVE. Dopo 1 giorno di acclimatamento, le vongole sono state infettate tramite immersione per 24 h con  $10^4$  TCID<sub>50</sub>%ml<sup>-1</sup> di NMV. Le vongole così infettate sono state trasportate presso la cucina sperimentale del SSICA dove sono state sottoposte a cottura in padella. Le vongole infettate sono state divise in 5 gruppi: 3 gruppi (n=36 ciascuno) sono stati utilizzati per effettuare in triplicato la prova sperimentale principale, il quarto gruppo è stato utilizzato per una prova sperimentale aggiuntiva, il quinto gruppo è stato utilizzato come controllo positivo (ovvero infettato ma non trattato). Un ulteriore gruppo di 30 vongole non infettate e non trattate è stato utilizzato come controllo negativo. Le vongole sono state cucinate su piastra elettrica (A.D. mod 2F-6-500-450, power 4300W) in una padella antiaderente opportunamente modificata per alloggiare 3 sonde (Ellab Eval-Flex®): la prima sonda, libera in padella, per la misurazione della temperatura ambientale, la seconda posta all'interno di una vongola aperta e la terza posta all'interno di una vongola chiusa per la misurazione della temperatura interna al mollusco. La cottura è stata effettuata chiudendo la padella con un coperchio di vetro in modo da visualizzare i molluschi all'interno della padella.

Gruppi di 9 vongole ciascuno sono stati estratti dalla padella a tempi predefiniti: T<sub>0</sub> ovvero all'apertura del 50% delle valve, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> a 2, 4 e 6 minuti rispettivamente dopo T<sub>0</sub>. Le vongole prelevate sono state immediatamente raffreddate in ghiaccio fondente e congelate a -80°C per essere sottoposte in un secondo momento a isolamento su coltura cellulare. Per l'isolamento, pool di 3 ghiandole digestive sono stati

omogenati, addizionati di antibiotici e inoculati in diluizioni seriali su RAW 264.7. Ogni campione è stato analizzato in triplicato. In caso di presenza di effetto citopatico, l'identità virale è stata confermata con la microscopia elettronica e la real time PCR (6,7). Nella prova aggiuntiva l'unica variazione rispetto all'esperimento principale era che le prime 9 vongole sono state raccolte singolarmente al momento dell'apertura delle valve ( $T_0$ ) e non all'apertura del 50% delle valve dell'intero gruppo sottoposto a cottura.

### Risultati e discussione

L'isolamento virale ha rilevato nelle vongole controllo (infettate e non trattate) un titolo pari a  $10^{4.07}$  TCID<sub>50</sub>/ml<sup>-1</sup> confermando così l'avvenuta infezione dei MB. Al contrario in nessuno dei pool di vongole sottoposte a cottura durante la prova sperimentale principale è stata osservata crescita virale. Infine nella prova sperimentale aggiuntiva si è evidenziato un titolo virale compreso tra  $10^{2.55}$ - $10^{3.05}$  TCID<sub>50</sub>/ml<sup>-1</sup> solo a  $T_0$ , ovvero solo nei pool di nelle vongole raccolte a  $T_0$  (ovvero raccolte al momento dell'apertura delle valve). I risultati ottenuti (in triplicato) hanno quindi dimostrato che la cottura per 7 minuti e 45 secondi ( $\pm 00:00:07$  minuti) ad una temperatura ambientale di  $97.44^\circ\text{C}$  ( $\pm 3.138508$ ) è sufficiente ad inattivare completamente NMV dalle vongole infettate sperimentalmente. Questi parametri corrispondono al tempo/temperatura di apertura delle valve del 50% delle vongole sottoposte a cottura. E' anche vero che nella prova aggiuntiva, prelevando le singole vongole al momento dell'apertura delle valve, era ancora presente una certa carica infettante, probabilmente dovuta alla bassa temperatura di apertura a cui le prime vongole si sono aperte ( $<70^\circ\text{C}$ ). Nondimeno, anche in questa prova, quando la temperatura interna ha raggiunto in  $100^\circ\text{C}$  ( $T_1, T_2$  e  $T_3$ ), non è stato più possibile isolare NMV. Si può quindi affermare che per ottenere una completa inattivazione virale è sufficiente cucinare i MB ad temperatura di circa  $100^\circ\text{C}$  per almeno 2 minuti (per esempio, farli bollire nel sugo per 2 minuti). Questa temperatura generalmente corrisponde al tempo necessario per l'apertura della maggior parte delle vongole sottoposte a cottura. Va sottolineato che nel corso delle prove sperimentali di questo studio, le vongole erano di grosse dimensioni ed inoltre non è stato aggiunto nessun liquido di cottura alle vongole allo scopo di effettuare gli esperimenti nella peggior condizione possibile dal punto di vista della trasmissione del calore. Si può supporre che in presenza di acqua, olio o sugo la temperatura necessaria all'apertura del 50% delle vongole venga raggiunta anche prima dei 7,45 minuti di questo studio. I risultati prodotti da questo studio forniscono ai consumatori delle indicazioni chiare e pratiche su come cucinare i MB per ridurre il rischio di infezione alimentare e dovrebbe essere riportata sull'etichetta di tutti i MB.

### Bibliografia

1. Lees D. (2000) Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol* 59:81-116
2. Lopman, B., Reacher, M., Van Duinhuoven, Y., Hannon, F.X., Brown, D., Koopmans, M. (2003). Viral Gastroenteritis Outbreaks in Europe, 1995–2000. *Emerg Infect Disease* 9, 90-96.
3. Terregino, C., Toffan, A., Mancin, M., Fortin, A., Rossetti, E., Gambarin, P., Arcangeli G. (2012). Valutazione dell'efficacia della depurazione in molluschi naturalmente contaminati da virus responsabili di infezioni alimentari nell'uomo. Atti del 1° convegno SIRAM, Teramo, 10 Novembre 2012, 77-79.
4. EFSA 2011. Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses 1, 9(7): 1–96. doi:10.2903/j.efsa.2011.2190.
5. Wobus, C. E., Thackray, L.B., Virgin, H. W. (2006). Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol* 80, 5104-5112.
6. Doane, F. and Anderson, N. (1987). *Electron microscopy in diagnostic virology. A practical guide and atlas.* Cambridge University Press. The Pitt Building, Trumpington Street, Cambridge CB2 1RP.
7. Baert, L., Wobus, C. E., Van Coillie, E., Thackray, L. B., Debevere, J., Uyttendaele, M. (2008). Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl environ microbiol* 74, 543–546.