

VII Convegno Nazionale Società Italiana di Ricerca Applicata alla Molluschicoltura

siram

società italiana
ricerca applicata
molluschicoltura



Istituto Zooprofilattico
Sperimentale delle Venezie



Istituto Zooprofilattico
Sperimentale del Mezzogiorno

*“La valutazione del rischio nella
produzione di molluschi bivalvi:
comunicazione ed economia” circolare»*

16 – 17 novembre 2018

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno
Via della Salute, 2 - Portici (NA)



foto Luigi Di Battista

ATTI

VII Convegno Nazionale Società Italiana di Ricerca Applicata alla Molluschicoltura

La valutazione del rischio nella produzione di molluschi bivalvi: comunicazione ed economia circolare

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno
Via della Salute, 2 - Portici (NA)

Segreteria Scientifica Convegno:

*Dr. Giuseppe Arcangeli¹, Dr.ssa Manuela Dalla Pozza¹, Dr. Mauro Esposito², Dr.ssa Yolande Proroga²,
Dr.ssa Giovanna Fusco², Dr.ssa Maria Grazia Amoroso²*

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno

Segreteria Organizzativa Convegno:

Alessandra Silvagni - Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Direttivo SIRAM

Giuseppe Arcangeli (Presidente)
Pietro Giorgio Tiscar (Vice-presidente)
Mario Latini (segretario-tesoriere)
Giuseppe Prioli
Aurelio Zentilin
Paola Venier
Pier Antonio Salvador
Otello Giovanardi
Loredana Cozzi

Collegio Sindacale

Edoardo Turolla
Andrea Fabris
Supplenti:
Emanuele Rossetti
Michele Pellizzato

Collegio dei Probiviri

Manuela Dalla Pozza
Lorenzo Gennari
Emilio Tibaldi

SPONSOR



PROGRAMMA

Venerdì 16 novembre 2018

«Contaminanti bio-tossicologici»

14.00-14.30 Registrazione dei partecipanti

Chairman: M. Latini

14.30-15.00 **TTX una nuova sfida nei bivalvi** (A. Milandri - CRM Cesenatico)

15.00-15.30 **Problemi microbiologici-un aggiornamento** (M. Latini - CEREM IZSUM)

15.30-16.00 coffee break

16.00-17.00 **Relazione orale di 5 poster** (10 minuti + 2 di discussione/poster) -
Chairman: M. Dalla Pozza

17.00-17.30 **Nanoparticelle e bivalvi: prove sperimentali di accumulo e
depurazione** (F. Gallochio - IZS Venezia)

17.30-18.00 **Inquinanti ambientali e tumori nei molluschi: quale correlazione?**
(G. De Vico - UNINA)

18.00-18.30 Direttivo SIRAM

18.30-19.00 Assemblea dei soci SIRAM

Sabato 17 novembre 2018

09.00-09.30 **Apertura dei lavori e saluto delle autorità**

A. Limone (Direttore generale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno)

P. Sarnelli (Direttore Unità Operativa Dirigenziale Prevenzione e Sanità Pubblica Veterinaria Regione Campania)

G. Fusco (Direttore UOC Virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno)

Chairman: P.G. Tiscar

09.30-10.00 **Applicazione e potenzialità di economia circolare in molluschicoltura**
(M.C. Poggese - IPPR)

10.00-10.30 **Fitoplancton e dinamiche delle fioriture algali:** aggiornamenti
(M. Cabrini - OGS Trieste)

10.30-11.15 coffee break - *Conferimento socio onorario: Francesco Paesanti e Francesco Scognamillo, premio miglior poster, proiezione 2 video riguardanti risultati di ricerche Europee su ostrica concava e ostrica piatta*

Chairman: G. Arcangeli

11.15-11.45 **La corretta comunicazione del rischio** (L. Ravarotto - IZS Venezie)

11.45-12.15 **La gestione sanitaria del comparto molluschi bivalvi in regione Campania: esempio di risk management**
(A. Anastasio - Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Zootecniche Università di Napoli)

12.15-13.30 Tavola rotonda

13.30 Chiusura convegno

POSTER PRESENTATI

Allevamento sperimentale di ostriche nel Golfo di Napoli: valutazione della presenza di virus enterici

M.G. Amoroso, A.L. Langellotti, D. Di Concilio, F. Boccia, A. Martello, G. Galiero, G. Fusco

Monitoraggio sulla presenza di acido domoico nelle zone di produzione di molluschi bivalvi

O. Arace, M.G. Buonomo, R. Rossi, V. Castellano, S. Imbimbo, V. Soprano

Next Generation Sequencing per la ricerca di virus enterici in molluschi bivalvi

F. Boccia, A. Anastasio, T. Pepe, B. Kingham, P.M. Fratamico, D. Kingsley, S. Polson, G. Fusco

Il campionamento integrato della colonna d'acqua per la quantificazione del fitoplancton produttore di biotossine: primo studio nella Regione Veneto verso un approccio "Early Warning System"

P. Bordin, G. Arcangeli, P. Antonelli, M. Toson, L. Contiero, L. Barco, M. Dalla Pozza, E. Franzago, I. Servadei, M. Cangini, P. Fumelli, E. Rossetti, L. Bille

Biotossine algali e Fitoplancton nelle aree di produzione di molluschi bivalvi della Regione Veneto: risultati del monitoraggio condotto nel periodo 2015-2018

P. Bordin, M. Toson, L. Bille, P. Antonelli, L. Contiero, L. Barco, M. Dalla Pozza, F. Pino, L. Piccoli, G. Fornasiero, M. Corazza, P. Fumelli, G. Arcangeli

Classificazione delle aree di produzione delle vongole *Chamelea gallina* nella Regione Marche e rispetto del criterio di sicurezza microbiologico basato su *Escherichia coli*: valutazione di tipo probabilistico attraverso l'uso del Teorema di Bayes

C. Ciccarelli, M. Leinoudi, A.M. Semeraro, V. Di Trani, S. Murru, P. Capocasa, E. Ciccarelli, G. D'Aurizio, I. Corti

Confronto di metodi di estrazione di acidi nucleici in campioni di mitili, acque e sedimenti

B. Cioffi, D. Di Concilio, M. Salamone, G. Galiero, M.G. Amoroso, G. Fusco

Monitoraggio dei molluschi bivalvi allevati lungo il litorale campano anni 2016-2018

G. Colarusso, R. Pellicanò, D. Mandato, E. Peirce, S. Cavallo, M. Esposito, V. Soprano, Y. Proroga, M. Della Rotonda, L. Baldi

Molluschi bivalvi di origine extra UE in vendita nel nord Italia con alcuni elementi ispettivi di campo

I. Corti, C. Galimberti, I. Resmini, R. Malandra, G. Arcangeli

Stato dell'arte e prospettive della molluschicoltura in Sicilia

A. Costa, G. Barbera, F. Antoci, G. Palma, G. Arcangeli, D. Lo Monaco

Virus a trasmissione alimentare: prevalenza e quantizzazione in molluschi bivalvi al commercio

L. Cozzi, F. Capuano, Y.T.R. Proroga, L. Lanni, G. La Rosa, O. Di Maro, C. Salzano, T. Vicenza, C. Santana, G. Bonanno Ferraro, P. Mancini, M. Losardo, F. Garofalo, S. Di Pasquale, A. Pesce, E. Suffredini

Determinazione del virus dell'Epatite A in molluschi bivalvi mediante Digital PCR

A. Cutarelli, E. Suffredini, Y. Proroga, L. Cozzi, F. Capuano, F. Corrado

Cinetica di bioaccumulo e depurazione dei molluschi eduli lamellibranchi da virus patogeni:

Rotavirus e Norovirus

D. Di Concilio, A.L. Langellotti, A. Martello, I. Di Bartolo, G. Ianiro, M. Monini, G. Galiero, G. Fusco, M.G. Amoroso

Rilevazione fenotipica della produzione di β -lattamasi a spettro esteso e AmpC in *Escherichia coli* isolati da alcune zone di produzione di *Chamelea gallina* marchigiane: dati preliminari

E.M. Epifanio, S. Orsini, C.F. Magistrali, L. Marchi, F. Agnetti, F. Barchiesi, C. Francescangeli, M. Latini

Determinazione della presenza di metalli pesanti in molluschi bivalvi raccolti in sistemi lagunari della Sardegna ad elevato valore naturalistico

G. Esposito, M.C. Abete, D. Meloni, G. Colombero, M. Mantia, A.G. Mudadu, A.M. Bazzoni, S. Ortu, M. Prearo, S. Squadrone

***Haplosporidium* sp. (Ascetosporea: Haplosporidiidae) come causa di mortalità di massa di *Pinna nobilis* (L.) a Taranto e in Toscana**

G. Fanelli, F. Rubino, B. Paoletti, L. Della Salda, F. Mosca, S. Morelli, G. Dentì, G. Marin, T. Pretto, F. Susini, G. Arcangeli, P.G. Tiscar

Correlazione tra contaminanti ambientali e virus enterici in cozze (*Mytilus galloprovincialis*)

F. Fiorito, M.G. Amoroso, S. Lambiase, F.P. Serpe, B. Cioffi, T. Bruno, R. La Nucara, D. Capozzo, P. Maglio, A. Scaramuzzo, G. Galiero, M. Esposito, G. Fusco

Determinazione di differenti contaminanti ambientali in ostriche (*Crassostrea gigas*) allevate in stazioni sperimentali della regione Campania

F. Fiorito, S. Lambiase, F.P. Serpe, T. Bruno, D. Capozzo, R. La Nucara, A. Scaramuzzo, P. Maglio, A.L. Langellotti, A. Martello, M.G. Amoroso, G. Galiero, G. Fusco, M. Esposito

Nanoparticelle e bivalvi: prove sperimentali di accumulo e depurazione

F. Gallocchio, G. Biancotto, A. Moressa, G. Arcangeli, A. Toffan, F. Pascoli, A. Ricci

Monitoraggio zootecnico e sanitario di ostriche (*Crassostrea gigas*) allevate nel Medio Adriatico: risultati preliminari.

L. Galosi, A. Roncarati, L. Gennari, F. Tosi, S. Satto, G. Arcangeli, G.E. Magi

Traslocazione di ostriche concave (*Crassostrea gigas*) in un allevamento di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) in Campania: aspetti zootecnici e parassitologici

D. Iaccarino, B. Degli Uberti, M. D'Amore, G. De Luca, F. Di Nocera, M. Santoro, D. Di Concilio, L. Langellotti, A. Martello, G. Galiero, M.G. Amoroso, G. Fusco

Studio preliminare sulla circolazione stagionale di *Vibrionaceae* in allevamenti di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) campani

D. Iaccarino, Y. Proroga, D. Cristiano, I. La Tela, F. Di Nocera, G. Smaldone, A. Anastasio, S. Iannella, D. Criscuolo, G. Borriello, M. Santoro, A. Cerrone, G. Galiero, G. Fusco, F. Capuano

Sistemi informativi di comunicazione nel settore della molluschicoltura in Veneto e Friuli Venezia Giulia: stato dell'arte

G. Manca, L. Bille, E. Barbagli, E. Boaretto, L. Lunardi, M. Mazzucato, M. Dalla Pozza, L. Bortolotti, G. Arcangeli, S. Marangon

***Mytilus Galloprovincialis* nell'area di Corigliano Calabro: studio della contaminazione da agenti virali, batterici e protozoi**

G. Mancuso, G. Fusco, M.G. Amoroso, S.D. Cello, M.C. Malagrinò, P. Palermo, L. Barca

Studio microbiologico di episodi di moria anomala in allevamenti di ostrica, *Crassostrea gigas*, in Sardegna

D. Mandas, E. Antuofermo, F. Salati

Bdellovibrio and like Organisms (BALOs): un nuovo approccio per il controllo dei patogeni microbici nei molluschi?

F. Mosca, G. Angelico, D. Ottaviani, S. Chierichetti, C.E. Di Francesco, F. Leoni, P.G. Tiscar

Monitoraggio *Ostreopsis ovata* litorale costiero Regione Campania anni 2008/2018

R. Rossi, O. Arace, M.G. Buonomo, V. Castellano, S. Imbimbo, V. Soprano

I controlli ufficiali sui molluschi bivalvi dopo le modifiche introdotte dal Reg. (UE) 2015/2285

S. Rubini, C. Berardelli, A. Tosi, D. Gigliotti, L. Cozzi, E. Suffredini

Rilevazione e caratterizzazione molecolare e sierologica di *Vibrio parahaemolyticus* in molluschi bivalvi del Nord Adriatico (2011-2016)

S. Rubini, L. Cozzi, M. Losardo, C. Berardelli, M.N. Losio, E. Pavoni, B. Bertasi, E. Suffredini

Metodiche molecolari per la valutazione dello stato sanitario di *Ruditapes philippinarum*

S. Satto, M. Gastaldelli, M. Smits, G. Dalla Rovere, L. Bargelloni, G. Arcangeli

Valutazione dell'incidenza di *Vibrio splendidus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio aestuarianus* e Ostreid Herpes virus-1 in *Mytilus galloprovincialis* nel golfo della Spezia, nel biennio 2015-2017

L. Serracca, R. Battistini, I. Rossini, V. Listorti, C. Ercolini

Elementi per un'analisi del rischio da consumo di vongole veraci della Sacca di Goro: prevalenza e quantificazione dei ceppi enteropatogeni di *Vibrio parahaemolyticus*

P. Serratore, E. Zavatta, L. Lorito, G. Bignami

Analisi metagenetiche del microbiota e del patobiota in popolazioni di *Crassostrea gigas* colpite da episodi di mortalità anomala in Europa

L. Vezzulli, P. Venier, G. Arcangeli, A. Pallavicini

ABSTRACT POSTER

Allevamento sperimentale di ostriche nel Golfo di Napoli: valutazione della presenza di virus enterici

M.G. Amoroso¹, A.L. Langellotti^{2,3}, D. Di Concilio^{1,3}, F. Boccia^{1,3}, A. Martello², G. Galiero¹, G. Fusco¹

¹) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Sanità Animale

²) Università di Napoli Federico II-Dipartimento di Agraria- CAISIAL

³) Università di Napoli Federico II-Dipartimento di Veterinaria

Keywords: ostrica, virus enterici, Real time PCR

Introduzione

In Italia si stima un consumo annuo di ostriche di 8500 tonnellate, di cui solo 500 sono prodotte sul territorio nazionale. Questo dato da una parte rende conto della forte richiesta che tale mollusco ha sul mercato nostrano e dall'altra apre possibili scenari per un incremento della sua coltivazione nei nostri mari. In Campania, regione in cui la molluschicoltura è molto sviluppata (terza voce produttiva nazionale di mitili dopo Liguria e Puglia) non si registrano aziende dedicate all'ostreocoltura. Le aziende esistenti sono tutte votate alla coltivazione di mitili ed essendo aziende mono-prodotto possono essere facilmente messe in ginocchio da eventi naturali e inaspettati (basti pensare all'emergenza Epatite A verificatasi ad inizio 2015). In questo scenario, la diversificazione della produzione sarebbe importante e tornerebbe senz'altro utile per dare maggiore solidità a queste imprese. L'assenza di allevamenti di ostriche sul nostro territorio è probabilmente da attribuirsi alla mancanza di dati scientifici che possano invogliare gli imprenditori ad investire in questo settore che invece da tempo rende notevoli profitti agli ostricoltori di altri paesi europei (come la Francia, primo produttore in Europa). Al fine di valutare la possibilità di coltivare ostriche nel Golfo di Napoli, abbiamo trapiantato animali della specie *Crassostrea gigas* (ostrica concava) provenienti dal mercato olandese in una concessione destinata all'allevamento di mitili. Dal momento che le ostriche (e tutti i molluschi in genere) sono considerate un gruppo di alimenti ad alto rischio per la salute del consumatore in quanto associate all'insorgenza di tossinfezioni alimentari di natura virale [1, 2], gli animali sono stati prelevati a cadenza mensile (per circa 18 mesi a partire da dicembre 2017) al fine di valutare la presenza e la prevalenza di 9 virus enterici. Nel dettaglio è stata valutata, mediante Real time PCR, la presenza di: epatite A (HAV), norovirus GI (NoVGI), norovirus GII (NoVGII), epatite E (HEV), rotavirus (RV), sapovirus (SaV), astrovirus (AsV), aichivirus (Aichi), adenovirus (AdV). Contestualmente sono stati prelevati anche campioni di cozze (*Mytilus galloprovincialis*) allevate nello stesso specchio d'acqua al fine di paragonare i risultati ottenuti e valutare la eventuale diversa affinità dei due animali nei confronti dei contaminanti virali presenti nelle acque di allevamento.

Summary

Presence of nine enteric viruses (*hepatitis A*, *norovirus GI*, *norovirus GII*, *hepatitis E*, *rotavirus*, *sapovirus*, *astrovirus*, *aichivirus*, *adenovirus*) were determined in two economically important bivalve species: oyster (*Crassostrea gigas*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*), co-farmed in the Gulf of Naples. Samples were collected almost monthly between December 2016 and September 2018 and analysed by Real time PCR. Results indicated that 10 of the 16 samples of oysters and 11 of the 16 samples of mussels analysed were contaminated from at least one virus. Data showed different virus presence and prevalence for the two bivalve species analysed.

Materiali e metodi

Nel Settembre 2016, circa 300 ostriche concave della specie *Crassostrea gigas* provenienti dall'Olanda, sono state poste in lanterne in sospensione a circa 8 m dalle coste di un allevamento di mitili antistante il litorale di Monte di Procida (Napoli) con la trave ad una profondità variabile tra i 3 m in primavera ed estate ed i 5 m in autunno ed inverno e le lanterne legate alla trave a circa 70 cm. Da Dicembre 2016 a Settembre 2018 sono stati prelevati 16 campioni di ostriche concave e 16 campioni di mitili. Per ciascun campione, un pool di ostriche e un pool di mitili sono stati sottoposti ad analisi biomolecolare per la ricerca di virus enterici, quali HAV, NoVGI, NoVGII, AsV, SaV, RV, Aichi, HEV ed AdV impiegando protocolli presi dalla letteratura.

Estrazione degli acidi nucleici e Real Time PCR

L'estrazione del virus dai molluschi è stata effettuata secondo quanto indicato nella ISO/TS 15216-1:2013 [3]. Gli acidi nucleici sono stati estratti mediante sistema di estrazione automatico Qiasymphony (Qiagen) utilizzando il kit DSP Virus/Pathogen Midi kit (Qiagen) a partire da 400 µl di estratto virale.

La qRT-PCR è stata eseguita impiegando il kit PCR Real-Time Agpath-ID ONE STEP 2x (Ambion, Applied Biosystem) e primers e sonde riportati in letteratura [3,4].

Risultati e discussione

Dei 16 campioni di ostriche esaminati, 10 (62.5%) sono risultati positivi ad almeno un virus. Il virus maggiormente presente (43.8% dei campioni) è il NoVGII seguito da NoVGI (37%) e RV (25%). I campioni di

cozze hanno dato invece i seguenti risultati: 11 campioni su 16 (69%) positivi ad almeno un virus. Per questi bivalvi, (come illustrato in Figura 1) i virus rinvenuti nel maggior numero di campioni sono stati NoVGI e AsV (43.8% di campioni positivi per entrambi) seguiti da NoVGII (31.3%). Tre dei virus ricercati (HAV, HEV ed Aichi) non sono mai stati identificati nelle ostriche, laddove nelle cozze HAV è stato trovato in due campioni (entrambi campionati nel mese di marzo ma in due annualità diverse) ed aichivirus in un campione. Quasi tutti i virus (tranne NGII e RV) inoltre mostrano una maggiore presenza nelle cozze rispetto alle ostriche. AsV in particolare è stato rinvenuto nel 43.8% dei campioni di cozze contro il 18.8% dei campioni di ostriche. Come è possibile osservare in Figura 2 i molluschi sono più contaminati nei mesi invernali e primaverili. In particolare nel 2017 sia le ostriche che le cozze hanno mostrato un maggiore livello di contaminazione nei mesi di marzo (3 tipi di virus nelle ostriche, 5 nelle cozze) e dicembre, mese in cui in entrambi i molluschi abbiamo trovato 5 diversi tipi di virus (NoVGI, NoVGII, AsV e SaV in entrambi, RV solo nelle ostriche e AdV sono nelle cozze). Nel 2018 i mesi in cui il livello di contaminazione era più alto sono stati gennaio (2 tipi di virus nelle ostriche, 5 tipi di virus nelle cozze) e marzo, mese in cui sono stati registrati 3 tipi di virus nelle ostriche e 5 nelle cozze (di cui in comune solo NoVGI e RV). Come mostrato dai risultati, entrambi i tipi di molluschi risultano essere maggiormente contaminati nello stesso periodo (dicembre-marzo), che coincide con il periodo dell'anno in cui ci sono maggiori influenze nella popolazione e quindi probabilmente un maggior livello di contaminazione delle acque in cui sono allevati. Quanto riscontrato si accorda con la letteratura in cui è riportato un andamento stagionale delle gastroenteriti da NoV dovute al consumo di bivalvi, con un picco di incidenza nella stagione invernale [5]. La stagionalità è attribuibile a diversi fattori tra cui la stabilità di questi virus a temperature dell'acqua più basse, ridotta attività inattivante delle radiazioni solari e bioaccumulo selettivo di questi patogeni nei molluschi [6]. Osservando i dati ottenuti è possibile sottolineare che, nonostante i due molluschi siano stati allevati nello stesso specchio d'acqua e ad una distanza massima di circa 2 metri, essi esibiscono un andamento di contaminazione diverso, sia in termini tipo di virus presente che di stagionalità del livello di contaminazione. I risultati ottenuti sono in accordo con quanto già riportato in letteratura in studi precedenti [7] in cui si descriveva che la cinetica di bioaccumulo ed eliminazione dei virus dai molluschi bivalvi varia a seconda della specie di bivalve, del tipo di microrganismo e delle condizioni ambientali. I risultati preliminari qui riportati, mostrando un livello complessivo di contaminazione virale delle ostriche leggermente inferiore rispetto alle cozze, fa intravedere la possibilità di intraprendere questo tipo di coltivazione nel Golfo di Napoli, con notevoli vantaggi per la filiera della molluschicoltura, sia in termini economici che occupazionali. L'ulteriore anno di sperimentazione previsto dal progetto di Ricerca Corrente (IZSME 03/2016) del Ministero della Salute (che finanzia l'attività descritta) consentirà di consolidare i risultati ottenuti.

Bibliografia

- [1] Baker K., Morris J., McCarthy N., Saldana L., Lowther J., Collinson A., Young M. (2011). An outbreak of norovirus infection linked to oyster consumption at a UK restaurant, February 2010, *Journal of Public Health*, 33: 205-211.
- [2] Guillois-Bécel Y., Couturier E., Le Saux J-C., Roque-Afonso A.M., Le Guyader S., Le Goas A., Pernes J., Le Behec S., Briand A., Robert C., Dussaix E., Pommepuy M, Vaillant V. (2009). An oyster-associated hepatitis A outbreak in France in 2007, *Euro Surveill* 14: 19144.
- [3] ISO/TS 15216-1:2013: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 1: Method for quantification.
- [4] Fusco G., Di Bartolo I., Cioffi B., Ianiro G., Palermo P., Monini M., Amoroso M.G., (2017). Prevalence of Foodborne Viruses in Mussels in Southern Italy. *Food Environ. Virol.* 9: 187-194.
- [5] Rohayem J. (2009). Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clin Microbiol Infect* 15: 524–527.
- [6] Suffredini E., Magnabosco C., Civettini M., Rossetti E., Arcangeli G., Croci L., (2012). Norovirus contamination in different shellfish species harvested in the same production areas. *J Appl Microbiol.* Sep;113(3):686-92.
- [7] Burkhardt W. III and Calci K.R. (2000) Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Appl Environ Microbiol* 66: 1375–1378.

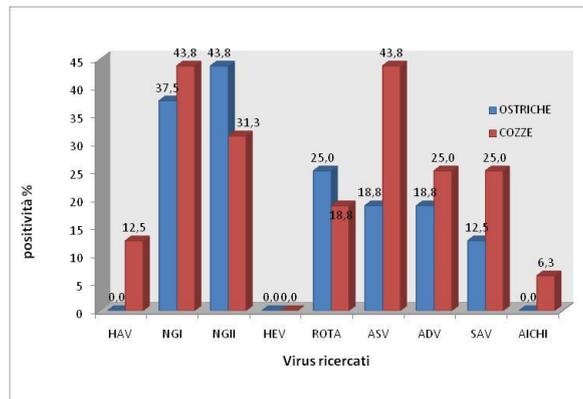


Figura 1. Percentuale di campioni positivi ai diversi virus nei due tipi di molluschi allevati

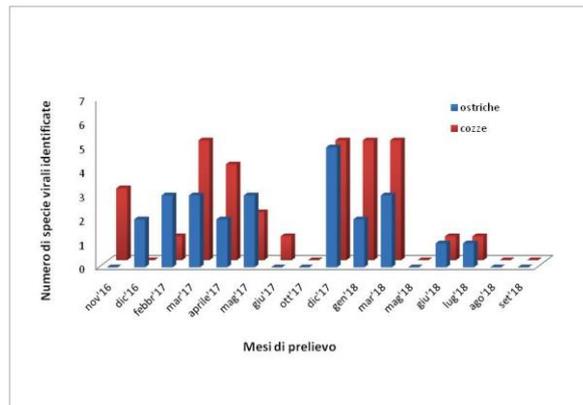


Figura 2 Andamento stagionale della contaminazione virale nei molluschi analizzati

Monitoraggio sulla presenza di acido domoico nelle zone di produzione di molluschi bivalvi

O. Arace, M. G. Buonomo, R. Rossi, V. Castellano, S. Imbimbo, V. Soprano

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, via salute,2 - 80055 Portici (NA)

Keywords: Acido Domoico, Molluschi bivalvi, Spettrometria di massa in alta risoluzione

Introduzione

I molluschi bivalvi, in particolar modo le cozze, che si nutrono di fitoplancton, possono accumulare biotossine algali e diventare esse stesse tossiche. Ci sono stati diversi casi di intossicazione alimentare dal consumo di cozze contaminate. Tali intossicazioni alimentari hanno spinto il nostro sistema sanitario a monitorare i molluschi nel quadro dei piani di monitoraggio delle AASSLL. In questo lavoro riportiamo i risultati ottenuti dal monitoraggio per la presenza di biotossine ASP (Amnesic Shellfish Poisoning), come l'acido domoico (DA), prodotto da alghe di *Pseudonitzschia*. L'analisi è stata condotta utilizzando un metodo sperimentale eseguito con uno spettrometro di massa ad alta risoluzione Q-Exactive Plus (HRMS²). Il 50% dei campioni analizzati in alta risoluzione ha mostrato la presenza di acido domoico.

Il limite di legge per l'acido domoico è attualmente stabilito dal Reg. 853/2004 in 20 milligrammi/Kg di parte edibile di mollusco, e gli II.ZZ.SS. si occupano del controllo ufficiale come indicato nel Regolamento (CE) 882/2004 e nel Regolamento (CE) 853/2004 nel settore dei molluschi bivalvi.

L'attività degli II.ZZ.SS. comprende anche approfondimenti scientifici nell'ambito dei piani di monitoraggio nazionali. L'IZS di Portici ha già rivolto, in anni precedenti, la sua attenzione verso la contaminazione dei molluschi bivalvi da parte di tracce basse, ma costanti, di acido domoico^[1].

Il presente studio è una diretta conseguenza del precedente, effettuato nel periodo GENNAIO/LUGLIO 2015, durante il quale sono stati analizzati, random, 78 campioni prelevati dal controllo ufficiale.

Summary

The mussels, feeding on phytoplankton, can accumulate algal biotoxins to become themselves toxic. There have been several cases of food poisoning by consumption of contaminated shellfish. Such food poisoning have pushed our health care system to provide monitoring of shellfish in the framework of the monitoring plans carried out by AASSLL. In this work we report the results obtained monitoring the presence of ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) biotoxins, like domoic acid (DA), produced by *Pseudonitzschia algae*. The analysis were carried out by using an experimental method performed with a high resolution Q-Exactive Plus mass spectrometer (HRMS²). The 50% of samples analyzed by HRMS², showed the presence of domoic acid. The legal limit for domoic acid is currently established by Reg. 853/2004 in 20 milligrams / kg of edible part of mussels, II.ZZ.SS. carry on the official control as indicated in Regulation (EC) 882/2004 and in Regulation (EC) 853/2004 in the sector of bivalve molluscs.

The activity of the II.ZZ.SS. also includes scientific insights into national monitoring plans.

The IZS of Portici has already focused, in previous years, its attention to the contamination of bivalve molluscs by low but constant traces of domoic acid^[1].

The present study is a direct consequence of the previous one, carried out in the period JANUARY/JULY 2015, during which 78 random samples harvested by the official control were analyzed for the presence of domoic acid.

Materiali e Metodi

Durante il periodo compreso tra maggio ed ottobre 2018, nell'ambito delle attività di monitoraggio ufficiale nelle zone di produzione di molluschi bivalvi nei tratti marino costieri di competenza della Regione Campania, sono stati raccolti dal personale dei Servizi Veterinari delle Aziende AASSLL i campioni su cui è stata verificata l'eventuale presenza di acido domoico (ASP).

L'estrazione è stata così effettuata:

1. 4 grammi di campione vengono omogenati con ultraturrax
2. Si aggiungono 16 mL di MeOH 50% e si omogeneizza nuovamente
3. 10 min di centrifuga a 3000 rpm
4. Il surnatante viene ultracentrifugato e filtrato mediante Millipore Ultrafree da 0.22µm a 12000 rpm per 10 min
5. 5µL dell'estratto vengono infine iniettati nello spettrometro di massa ad alta risoluzione
6. Limite di Quantificazione (LOQ)= 0.001 mg/kg

Risultati e Discussione

Dei 102 campioni di cozze analizzati, 51 (il 50%) hanno evidenziato la presenza di acido domoico e nei restanti 51 (50%) la quantità della biotossina non era quantizzabile (< 0.001 mg/kg).

I risultati delle analisi effettuate nell'arco di tempo che va da maggio ad ottobre 2018 hanno:

- Colmato la mancanza di informazioni del mese di maggio 2015;
- Confermato la positività dei mitili alla presenza di acido domoico nei mesi di giugno e luglio;
- Aggiunto le informazioni per i mesi di settembre ed ottobre (risultati entrambi negativi per la presenza della biotossina).

La costante presenza di acido domoico è indice anche della presenza delle microalghe del genere *Pseudonitzschia* produttrici della biotossina, nei siti di molluschicoltura e quindi un possibile rischio da bloom algali, rendendo necessario il costante monitoraggio.

Bibliografia

[1] Rachele Rossi, Olga Arace, Maria Giovanna Buonomo, Daniela Capozzo, Vincenzo Castellano, Samantha Imbimbo, Vittorio Soprano. Italian Journal of Food Safety 2016; volume 5:5706

Next Generation Sequencing per la ricerca di virus enterici in molluschi bivalvi

F.Boccia¹⁻²⁻³, A.Anastasio³, T.Pepe³, B.Kingham⁴, Pina M- Fratamico⁵, D.Kingsley⁵, S. Polson⁴, G.Fusco¹

¹) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZM)- Via Salute, 2, 80055, Portici, NA

²) Centro di Riferimento Regionale per la Sicurezza Sanitaria del Pescato (CRISSaP) Campania

³) Università degli Studi di Napoli Federico II- Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali- Via F. Delpino 1, 80137 Napoli

⁴) University of Delaware- Delaware Biotechnology Institute, DNA Sequencing & Genotyping Center- 15 Innovation Way Newark, DE 19711 USA

⁵) U.S Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Microbial Food Safety Research Unit. Delaware State University, Dover, Delaware USA

Keywords: Virus enterici, Next Generation Sequencing, Metagenomica

Introduzione:

Tra gli alimenti più pericolosi dal punto di vista igienico-sanitario, i molluschi bivalvi occupano un posto rilevante poiché trattasi di animali filtratori in grado di accumulare nei propri tessuti i contaminanti microbiologici eventualmente presenti nella colonna d'acqua in cui vivono (Fusco et al., 2013, Fusco et al., 2017). A ciò si aggiunge il gusto e le abitudini alimentari dei cittadini italiani, in particolare i giovani, sempre più orientati a consumare prodotti naturali, possibilmente crudi, compreso quelli ittici, ignorando totalmente i pericoli derivanti da tale pratica.

Da quanto premesso, l'impiego di tecniche biomolecolari sensibili e di rapida esecuzione per il rilevamento di agenti virali presenti negli alimenti contaminati, è di fondamentale importanza per la tutela della salute pubblica, anche perché sono sufficienti poche particelle virali nei bivalvi filtratori (nel caso di HAV da 10 a 100) per trasmettere la malattia all'uomo. Un siffatto titolo di virus può essere rilevato solo da una prova analitica altamente sensibile quale quella biomolecolare. Attualmente, la tecnica maggiormente impiegata per il rilevamento di virus nei molluschi bivalvi è il test di PCR quantitativa (RT-qPCR) che prevede necessariamente una conoscenza strutturale a priori dell'agente virale che si voglia ricercare considerato che il metodo utilizza primers e sonde specifiche del suo genoma affinché si amplifichi. Conseguentemente, il sequenziamento tradizionale con tecnica Sanger è limitato dalla lunghezza dell'amplicone, diversamente da quanto avviene nella genotipizzazione tramite *Next generation sequencing* (NGS).

La tecnica NGS è capace di **sequenziare, in parallelo, milioni di frammenti di DNA, segnando una svolta rivoluzionaria nella possibilità di caratterizzare genomi di grandi dimensioni**, rispetto al metodo di sequenziamento di prima generazione Sanger. L'impatto della rivoluzione NGS è evidente soprattutto nel mondo della sicurezza alimentare e della sanità animale tanto è vero che il **genoma completo di molteplici specie di animali è ora disponibile** nelle banche dati pubbliche, così come i **genomi dei patogeni isolati da alimenti e da animali** (virus, batteri, funghi e parassiti). Oltre al rilevamento di virus noti, il sequenziamento con tecnica NGS ha mostrato un grande potenziale per la scoperta di nuovi virus, sia patogeni (Capobianchi et al., 2013) che ambientali (Pantaleo et al., 2010; Wang et al., 2012). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di individuare e caratterizzare la comunità microbica presente nelle ostriche e nelle cozze raccolte in diversi siti di prelievo situati nello stato del Delaware, USA.

Summary:

Whole genome sequencing (WGS) is considered a revolutionary new method that is positioned to replace numerous existing diagnostic and microbial typing technologies with a single new target: the microbial draft genome. The application of traditional sequencing technology (i.e. Sanger) toward the identification of a foodborne viral contamination is generally supplemental to the completion of standard and quantitative RT-PCR and limited by amplicon nucleotide length. Next Generation Sequencing (NGS) technologies, however, with their ability to comprehensively interrogate genome without prior knowledge of their sequence of interest (e.g. foodborne virus), has rapidly expanded in the field of virology. In addition to detection of known viruses, NGS has shown great potential for novel virus discovering from diverse origin, including both clinical and environmental samples. The aim of this work was to investigate the presence of the whole microbial community present in oysters and mussels collected in different sites in the US.

Materiali e metodi:

Quarantotto campioni di molluschi bivalvi sono stati campionati da due differenti siti di prelievo situati sulla costa del Delaware, USA. In dettaglio, 24 campioni di cozze (*Mytilus galloprovincialis*) e 12 campioni di ostriche (*Crassostrea virginica*) sono stati raccolti dalla riva del canale di Lewes-Rehoboth (Delaware's Inland Bays, USA), posto a 70 metri dallo sbocco del Rehoboth Waste Water Treatment Plant (WWTP). L'impianto utilizza la disinfezione con cloro e ha un tasso di scarico medio mensile massimo di 2 anni (calcolato nel 2016) di 2,17 MGD. Dodici campioni di ostriche (*Crassostrea virginica*) sono stati raccolti dal

sito di prelievo di Murderkill (Delaware Bay, USA) a circa 6 miglia a valle dal WWTP della contea di Kent. L'impianto utilizza la disinfezione UV e ha un tasso medio di scarico mensile di 15,4 MGD (calcolato nel 2016). Tutti i campioni sono stati trasportati in condizioni refrigerate all'Università del Delaware a Dover, dove sono stati rapidamente analizzati.

2.1 Estrazione e concentrazione del virus.

Gli omogenati di ostrica e cozze sono stati preparati, utilizzando circa 25 g di tessuto digestivo e miscelati per 3 min con 175 ml di tampone glicina, pH 9,5 (0,1 M glicina, 0,3 M NaCl). L'estratto è stato quindi incubato per 30 minuti a 37 ° C e chiarificato mediante centrifugazione a 15.000 g a 4 ° C. Le particelle virali sono state separate dal surnatante, usando un uguale volume di PEG al 16% (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) con 0,525 M NaCl. Dopo la precipitazione per 1 ora su ghiaccio, i campioni sono stati centrifugati a 10.000 x g per 5 minuti a 4°C.

2.1.1 Isolamento dell'RNA virale.

Dopo precipitazione con PEG, il pellet è stato risospeso in 5 ml di Tri-reagente (Sigma), dopo un'incubazione di 5 minuti a 20°C, ciascun campione è stato trasferito in una provetta da centrifuga da 15 ml di polipropilene al quale sono stati aggiunti 1,2 ml di cloroformio. I campioni, poi, sono stati centrifugati a 12.000 x g per 5 minuti e, lo strato acquoso superficiale contenente l'RNA, è stato precipitato mediante aggiunta 2,5 ml di isopropanolo per 5 minuti a 20°C, seguito da centrifugazione a 5000 x g per 5 minuti. Il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo al 75% a freddo, e quindi risospeso in 300 µl di acqua RNasi-free. Per facilitare la risospensione, i campioni sono stati riscaldati a 90°C, vortexati e fatti reagire con quattrocento microlitri di tampone 20 mM Tris-HCl [pH 7,5], 1,0 M LiCl, 2 mM EDTA. I campioni sono stati nuovamente sottoposti a vortex per 30 s, seguito da riscaldamento a 65°C per 3 min. Per la concentrazione delle particelle virali sono stati aggiunti 100 µl di Dynabeads-oligo (dT) 25 (Dyna, Oslo, Norvegia). I campioni sono stati fatti oscillare delicatamente per 30 secondi e posti in un attrattore magnetico (Stratagene, La Jolla, California) per 1 minuto; successivamente il surnatante è stato rimosso. Le sfere magnetiche (granuli) contenenti l'RNA virale sono state lavate mediante risospensione con 500 µl di tampone di legame e ruotate a 8 rpm sull'agitatore magnetico per 1 minuto; il surnatante ottenuto è stato rimosso e il pellet risospeso in tampone di lavaggio (10 mM Tris-HCl [pH 7,5], 0,15 M LiCl, 1 mM EDTA). Questo processo è stato ripetuto tre volte. I campioni sono stati quindi risospesi in 100 µl di H₂O RNasi-free e infine riscaldati a 90°C per 2 minuti per liberare l'RNA virale dalle Dynabeads. Dopo l'estrazione dell'RNA, i campioni sono stati conservati a -20°C, quindi i campioni sono stati portati all'Università del Delaware, Delaware Biotechnology Institute, presso il Centro di sequenziamento e genotipizzazione del DNA per l'analisi metagenomica.

2.2 Sequenziamento NGS mediante la piattaforma Illumina MiSeq.

Le librerie di sequenziamento del cDNA a doppio filamento sono state costruite partendo da campioni di RNA mediante l'utilizzo del kit Rapid Directional RNA-Seq Kit (BiooScientific) NEXT-flex, utilizzando quantità variabili di RNA per ciascun campione. La concentrazione di RNA estratto è stata misurata utilizzando il Fluorometro Qubit (Invitrogen, CA, USA) con kit dsDNA HS Assay, mentre, la concentrazione della libreria, è stata determinata utilizzando il Fragment Analyzer (Advanced Analytical). Due nanomolari della library preparata sono stati sequenziati mediante piattaforma Illumina MiSeq, utilizzando il MiSeq Reagent Nano Kit (Illumina). Tutti i kit sopra descritti sono stati utilizzati secondo le istruzioni suggerite dal produttore.

2.3 Analisi metagenomica:

L'analisi metagenomica è stata effettuata in primo luogo rimuovendo le sequenze di DNA dell'ospite. In particolare sono stati sottratti i genomi di *Crassostrea virginica* (GCF_002022765) e di *Mytilus galloprovincialis* (GCA_001676915) utilizzando CLC Genomics Workbench (v 10.1.1). Dopo la sottrazione, le letture metagenomiche sono state assemblate utilizzando CLC Genomics Workbench, e i contigs più lunghi di 500 bp sono stati inviati al portale di analisi del metagenoma VIROME (<http://virome.dbi.udel.edu>) (Wommack et al.,2012). Questo portale fornisce informazioni sull'omologia funzionale, tassonomica e ambientale della comunità microbiologica riscontrata. In parallelo, le letture metagenomiche (dopo la rimozione dell'ospite) sono state mappate su tutti i genomi virali ottenuti da Genomics Workbench-RefSeq.

3: Risultati preliminari

L'analisi iniziale indicava un'alta percentuale di acido nucleico ospite nei vari metagenomi. Dopo la sottrazione, i risultati preliminari hanno indicato la presenza di uno o più virus Picorna di tipo Beihei o Wenzhou simili a quelli precedentemente descritti in vari generi di molluschi, in particolare nei campioni di ostriche. I virus Picorna-like sono un'unità tassonomica in rapida crescita, sono virus a RNA a filamento positivo e possiedono un ampio spettro d'ospite. Sono state anche rilevate sequenze da altri lineaggi virali potenzialmente riconducibili a virus dell'Epatite A e dell'Epatite C, appartenenti anch'essi alla famiglia dei Picornavirus; tuttavia, data la presenza di sequenze tipiche dell'ospite, ad oggi non è possibile interpretare il risultato in modo univoco. Ai fini della conferma di identificazione definitiva i campioni analizzati saranno nel

proseguo dello studio sottoposti ad analisi più approfondita, utilizzando la tecnica di “deep sequencing” mediante piattaforma Illumina HiSeq. Ad oggi, infatti, la piattaforma di Illumina HiSeq è ampiamente utilizzata per lo studio del genoma umano, in campo oncologico, e in generale per lo studio di popolazioni cellulari complesse quali quelle presenti in matrici alimentari e/o ambientali. Tuttavia, superati i costi elevati di analisi, e le problematiche derivate dalla presenza di porzioni di genoma dell’ospite possiamo affermare che l’NGS rappresenta un metodo rivoluzionario per la ricerca di patogeni da matrici alimentari e che i molluschi bivalvi, possono essere considerati “animale sentinella” per lo studio di virus patogeni circolanti nell’ambiente.

Bibliografia

- [1] Fusco G., G. Aprea, G. Galiero, A. Guarino, and M. Viscardi. 2013. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., hepatitis A virus and norovirus in bivalve molluscs in Southern Italy. *Vet Ital.* 49:55-58
- [2] Fusco G., I. Di Bartolo, B. Cioffi, G. Ianaro, P. Palermo, M. Monini, and M. G. Amoroso. 2017. Prevalence of foodborne viruses in mussels in Southern Italy. *Food Environ. Virol.*, 9:187-194
- [3] Capobianchi MR, Garbuglia AR, Agrati C, Rianda A, Noto P, Corpolongo A, Cataldo MA, Rosati S, Zaccaro P, Loffredo M, Pompa MG, Girardi E, Scognamiglio P, Ippolito G; GEAS Group. Molecular characterization of hepatitis A outbreak in the province of Rome, Lazio region, Italy, January-July 2013. *Microbes Infect.* 2014 Apr;16(4):362-6 doi:10.1016/j.micinf.2014.01.003. Epub 2014 Jan 28.
- [4] Pantaleo V, Saldarelli P, Miozzi L, Giampetruzzi A, Gisel A, Moxon S, Dalmay T, Bisztray G, Burgyan J. 2010. Deep sequencing analysis of viral short RNAs from an infected Pinot Noir grapevine. *Virology.* 2010 Dec 5;408(1):49-56. doi: 10.1016/j.virol.2010.09.001. Epub 2010 Sep 26.
- [5] Wang M, Chen DL, Song JD, Qu JG, Lu ZZ, Zhao WM, Hong T. The genetic stability of recombinant adenovirus expressing human rotavirus VP6 gene which used Ad41 as vector. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 2012 Dec;26(6):422-4.
- [6] Wommack KE, Bhavsar J, Polson SW, Chen J, Dumas M, Srinivasiah S, Furman M, Jamindar S, Nasko DJ. VIROME: a standard operating procedure for analysis of viral metagenome sequences. *Stand Genomic Sci.* 2012 Jul 30;6(3):427-39. doi: 10.4056/sigs.2945050. Epub 2012 Jul 27.

Il campionamento integrato della colonna d'acqua per la quantificazione del fitoplancton produttore di biotossine: primo studio nella Regione Veneto verso un approccio "Early Warning System"

P. Bordin¹, G. Arcangeli¹, P. Antonelli¹, M. Toson¹, L. Contiero¹, L. Barco¹, M. Dalla Pozza¹, E. Franzago¹, I. Servadei², M. Cangini², P. Fumelli³, E. Rossetti⁴, L. Bille¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD), Italia

²Fondazione Centro Ricerche Marine – Cesenatico (FC), Italia

³Azienda ULSS n.5 Polesana – Adria (RO), Italia

⁴Scardovari - Consorzio Cooperative Pescatori del Polesine – Scardovari (RO), Italia

Keywords: Acido Okadaico, *Dinophysis* spp, molluschi

Introduzione

La molluschicoltura, settore trainante per l'economia nazionale e in particolare per la Regione Veneto che rappresenta una delle aree di maggior produzione di vongole e mitili, negli ultimi anni sta incontrando sempre più frequentemente il problema dell'accumulo di biotossine nei molluschi, subendo per questo notevoli danni economici a causa dei lunghi periodi di divieto di raccolta.

Nell'ottica di implementare un sistema di "early warning", che permetta di rendere più efficace il monitoraggio delle aree di produzione come suggerito dal Regolamento Europeo sull'igiene alimentare [1] e di conseguenza la gestione delle molluschicoltura durante questi eventi, è stato condotto uno studio, finanziato dal Ministero della Salute, che prevede il campionamento integrato della colonna d'acqua per la quantificazione del fitoplancton produttore di tossine contestualmente al prelievo di mitili per la ricerca delle biotossine. I campionamenti sono stati svolti con frequenza settimanale in un prefissato allevamento dell'area marina prospiciente il Delta del Po.

Il dispositivo utilizzato per il campionamento sperimentale dell'acqua è stato costruito sull'esempio del "tube sampler" di Lindhal 1986 [2] ed offre la possibilità di raccogliere informazioni quantitative e qualitative riguardanti le specie fitoplanctoniche presenti lungo tutta l'altezza della resta di mitili [3].

Parallelamente ai campionamenti svolti nell'ambito della ricerca, l'Autorità competente veterinaria ha svolto il monitoraggio del fitoplancton in diversi allevamenti situati nella medesima zona di produzione, sia con retino che con bottiglia di profondità [4]. Scopo del presente lavoro è quello di paragonare i risultati ottenuti con il campionamento sperimentale con quelli derivanti dall'uso della bottiglia di profondità (tecnica in uso), entrambe metodiche che consentono di avere una valutazione quantitativa relativamente alla presenza delle varie specie fitoplanctoniche.

Summary

Shellfish farming is one of the most important economic activity in Italy. Veneto Region is one of the major production areas for clams and mussels and, in recent years, has faced up more and more problems due to biotoxins accumulation in molluscs, which led to significant economic losses due to long time of farm closure. With the aim of developing an "Early Warning system" that could improve shellfish farming management and also monitoring program, as suggested by the European Regulation on food hygiene [1], a study was conducted. The main goal of the study was the collection of integrated water column samples for identification and enumeration of phytoplankton, together with the shellfish samples for biotoxins analyses. Sampling was carried out on a weekly basis at a fixed station in the marine area near the Po River Delta.

The device used for water sampling was built on the example of Lindhal's tube sampler [2] and provides quantitative and qualitative information regarding phytoplankton species present along the water column [3]. At the same time, the veterinary authority monitored harmful phytoplankton in several farms located in the same production area, both with plankton-net and using 1 liter bottles [4]. The aim of this work is to compare the results obtained with the "tube sampler" used in the research project, with the ones from the bottles; both methods allow the evaluation of harmful algae density and composition into the sea water.

Materiali e metodi

Nel periodo aprile 2017 – ottobre 2018 è stato condotto un campionamento contestuale di acqua di mare e di molluschi su base settimanale in una stazione posta in un allevamento di molluschi nel Delta del Po, area a particolare rischio di bloom algali e, di conseguenza, all'accumulo di biotossine nei molluschi filtratori. Il campionamento dell'acqua di mare è stato condotto mediante un dispositivo costituito da un tubo, di lunghezza di 12 mt, con diametro interno di 1" e divisibile in 3 sezioni di uguale lunghezza che permetteva di campionare acqua alle profondità di 0-4 m, 4-8 m e 8-12 m. Le diverse specie di fitoplancton potenzialmente tossiche presenti nell'acqua sono state identificate morfologicamente al microscopio ottico invertito secondo le chiavi tassonomiche ufficialmente riconosciute (WoRMS) e la stima quantitativa è stata fatta secondo la

norma EN 15204:2006 "Water quality – Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermohl technique)". Ai fini del confronto tra l'andamento del fitoplancton e quello delle biotossine nei molluschi, la stima della concentrazione delle diverse microalghe è stata calcolata come valore medio delle concentrazioni nelle tre sezioni.

La quantificazione delle tossine lipofile nei molluschi è stata eseguita mediante tecnica LC-MS/MS, utilizzando il metodo di riferimento europeo [5].

I prelievi di acqua utilizzando la bottiglia sono stati effettuati dal personale dei Servizi Veterinari delle Aziende ULSS nell'ambito del monitoraggio igienico sanitario delle zone di produzione di molluschi bivalvi, secondo quanto indicato dalla normativa nazionale vigente [4].

Durante il periodo di svolgimento dello studio, sono stati raccolti complessivamente 51 campioni integrati di acqua di mare (3 aliquote ciascuno) contemporaneamente ai mitili della resta nelle vicinanze. I 27 campioni di acqua di mare raccolti con la bottiglia sono stati prelevati all'interno della stessa zona di produzione ma in allevamenti diversi rispetto a quello dove era posta la stazione dello studio.

Risultati e discussione

La strategia di campionamento attuata nell'ambito del progetto di ricerca, si è dimostrata utile per indagare un episodio di accumulo di biotossine lipofile, avvenuto nel 2017 nei mitili. La presenza di Acido Okadaico (AO) è stata rilevata da settembre fino a ottobre e durante questi mesi, da valori inizialmente al di sotto del limite di legge [6] ha raggiunto la concentrazione massima di 320 µg eq. AO/kg per poi progressivamente diminuire fino a non essere più rilevabile. L'andamento della concentrazione (cell/L) di *Dinophysis* spp è stato pressoché sovrapponibile a quello delle tossine, ma la loro comparsa con valori di cell/L nell'ordine di grandezza di 10²cell/L, considerata "trigger level" in altri paesi [6], è risultata in anticipo di un paio di settimane rispetto alla prima positività per Acido Okadaico.

In particolare è stata evidenziata la presenza di *Dinophysis fortii*, la cui presenza si è progressivamente rafforzata rispetto alle altre specie dello stesso Genere, fino a diminuire in prossimità della fine dell'evento di accumulo di biotossine nei molluschi

Nei mesi successivi del 2017 e per tutto il 2018, non è stato più evidenziato Acido Okadaico nei molluschi; la popolazione di *Dinophysis* spp, risultava costituita dalle specie a minor tossicità come *Dinophysis sacculus* e *Dinophysis caudata* [7] che comunque si sono mantenute al di sotto del "Trigger level".

Sul totale di 27 campioni raccolti con la bottiglia, nello stesso arco di tempo descritto dallo studio, *Dinophysis* spp è stata trovata in un solo campione risalente a maggio 2018, con una densità di 240 cell/L.

L'informazione sulla correlazione tra l'andamento della densità di *Dinophysis* spp e l'andamento dell'accumulo di tossina nei molluschi non avrebbe mai potuto scaturire dai risultati ottenuti attraverso il campionamento con la bottiglia, sia per la frequenza di campionamento troppo bassa sia per le caratteristiche stesse del campionamento. Alcune specie, e in particolare *Dinophysis* spp, tendono infatti ad aggregarsi formando strati molto sottili all'interno della colonna d'acqua, soggetti a migrazione verticale [7,8] che difficilmente possono essere rilevati da metodiche di campionamento puntuali ad una profondità precisa (0.5 mt circa in laguna e 5 mt circa in mare), come attuato nell'attività di monitoraggio igienico-sanitario delle aree di produzione. Quest'ultimo tipo di campionamento, adatto nei casi di bloom algali a densità più elevata, poco si adatta al monitoraggio per esempio di specie appartenenti al genere *Dinophysis*, che già in concentrazione pari a 10² cell/L possono essere causa di accumulo di tossine lipofile nei molluschi e che pertanto non possono essere rilevate nelle prime fasi della fioritura algale.

Si può quindi che le informazioni che derivano dal campionamento integrato della colonna d'acqua svolto con frequenza almeno settimanale e in concomitanza con quello dei molluschi, possono veramente gettare le basi per definire dei "trigger level" basati sul fitoplancton e per sviluppare un sistema early warning così come avviene in altri Paesi europei ed extraeuropei.

Bibliografia

- [1] Reg.(EU) 854/2004 "Norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale per il consumo umano" - GU UE L 139 del 30 aprile 2004
- [2] Lindahl, Odd. "A dividable hose for phytoplankton sampling." *ICES CM* 50 (1986): 26.
- [3] Reguera B., et al. "Guide for designing and implementing a plan to monitor toxin-producing microalgae." (2016) *IOC Manuals and Guides* 59
- [4] Intesa Stato-Regioni 79/CSR del 8/7/2010 "Linee guida per l'applicazione del Regolamento (CE) 854/2004 e del Regolamento (CE) 853/2004 nel settore dei molluschi bivalvi" <http://statoregioni.it/>
- [5] EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS
- [6] Cefas, "Protocol for sampling and transport of water for the purpose of Official Control Monitoring of classified shellfish production areas under EU Regulation 854/2004", Protocol version 7 – July 2015
- [7] Reguera B., et al., "Harmful *Dinophysis* species: A review", *Harmful Algae* 14 (2012) 87–106
- [8] Reguera B., et al. "Vertical migrations of *Dinophysis acuta* and *D. acuminata*: the problems of being in the right place at the right time", *Book of Abstract ICHA 2018*, Nantes

Questo studio è finanziato dal Ministero della Salute RC 17/15

Biotossine algali e Fitoplancton nelle aree di produzione di molluschi bivalvi della Regione Veneto: risultati del monitoraggio condotto nel periodo 2015-2018

P. Bordin¹, M. Toson¹, L. Bille¹, P. Antonelli¹, L. Contiero¹, L. Barco¹, M. Dalla Pozza¹, F. Pino², L. Piccoli³, G. Fornasiero³, M. Corazza⁴, P. Fumelli⁵, G. Arcangeli¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Legnaro (PD) - Italia

²Fondazione Centro Ricerche Marine - Cesenatico (FC), Italia

³Az-ULss 3 Serenissima Regione Veneto - Italia

⁴Az-ULss 4 Veneto Orientale - Italia

⁵Az-ULss5 Polesana Regione Veneto - Italia

Keywords: Biotossine, Fitoplancton, molluschi bivalvi, Alto Adriatico

Introduzione

L'Alto Adriatico, per la sua particolare conformazione, rappresenta una zona d'elezione per l'allevamento e la raccolta dei molluschi bivalvi ed il Veneto, in particolare, è una delle regioni leader a livello nazionale per la produzione di vongole veraci e mitili. Negli ultimi anni gli eventi di accumulo di tossine algali nei molluschi sono diventati più frequenti, provocando la sospensione della raccolta del prodotto anche per tempi lunghi. La normativa europea [1] prevede il monitoraggio delle zone di produzione di molluschi bivalvi per assicurare il rispetto dei parametri bio-tossicologici [2] e l'analisi quali-quantitativa del fitoplancton tossico presente nella colonna d'acqua come indicatore di una possibile tossicità nei molluschi filtratori. Scopo del presente lavoro è quello di presentare gli eventi di accumulo di biotossine algali nei molluschi allevati nelle aree di produzione della Regione Veneto dal 2015 al 2018 e, quando il dato risulta disponibile, di associarlo alla presenza delle specifiche microalghe tossiche. Attualmente la gestione del problema relativo alle biotossine si basa sulla ricerca delle stesse nei molluschi, indipendentemente dalla presenza o meno del fitoplancton produttore nelle acque. La possibilità di svolgere un monitoraggio delle microalghe tossiche, inteso come stima della densità nella colonna di acqua nel tempo, permetterebbe di creare un sistema di "early warning" sull'accumulo di biotossine da parte dei molluschi, ma anche di evidenziare potenziali nuovi pericoli per la salute umana derivanti dalla migrazione/trasferimento di altre specie dovuto alle correnti e soprattutto alla globalizzazione del commercio via mare. A questo si aggiungerebbe il vantaggio per gli allevatori, di un'ottimizzazione nella gestione della sospensione della raccolta nei casi di tossicità dei molluschi.

Summary

North Adriatic Sea is a suitable area for shellfish production because of its physical conformation (shallow water, sandy bottom, lots of nutrients from rivers and presence of a large lagoon) and Veneto region, in particular, is one of the main producer of clams and mussels. In recent years, the events of accumulation of algal toxins have become more frequent and have caused the suspension of the harvesting of molluscs even for long times. The European legislation [1] provides for the monitoring of the production areas of bivalve molluscs to ensure compliance with the bio-toxicological parameters [2] and the quali-quantitative analysis of the toxic phytoplankton present in the water column as an indicator of the biotoxins accumulation in molluscs. The aim of this work is to present the biotoxins events in molluscs farmed in the production areas of the Veneto Region from 2015 to 2018 and, when possible, the presence of the specific harmful algae. Up to now, management of shellfish biotoxins has been based on their detection in molluscs also when harmful algae were absent. An "early warning system" based on quantitative harmful algae monitoring, could predict shellfish toxicity and also highlight new potential health hazards due to harmful algae migration or transfer by currents and sea trade. It could also minimize economic loss to shellfish farmers.

Materiali e metodi

Nel periodo compreso tra gennaio 2015 ed ottobre 2018, sono stati raccolti circa 6400 campioni di molluschi tra cui mitili, vongole, fasolari, canestrelli e altre specie, sui quali sono state condotte le analisi per la ricerca di Acido Domoico (Amnesic Shellfish Toxins - ASTs) mediante metodo EU-RL LC-MS/MS, Saxitossine ed analoghi (Paralytic Shellfish Toxins - PSTs) mediante EU-RL Mouse Test e tossine lipofile (Diarrhetic Shellfish Toxins - DSTs) mediante metodo EU-RL LC-MS/MS. Nello stesso periodo sono stati raccolti circa 2100 campioni di acqua di mare per la ricerca qualitativa e/o quantitativa delle microalghe tossiche. Tutti i campioni di acqua di mare sono stati osservati al microscopio ottico rovesciato; in particolare l'identificazione delle microalghe è stata condotta con riferimento alle fonti autorevoli del WoRMS ed IOC, mentre la quantificazione è stata eseguita seguendo quanto descritto nella norma UNI EN 15204:2006 "Utermöhl technique".

Il campionamento di molluschi e di acqua di mare è stato svolto dal personale dei Servizi Veterinari delle Aziende ULSS nell'ambito del monitoraggio igienico sanitario delle zone di produzione di molluschi bivalvi nella laguna e tratti marino costieri di competenza della Regione Veneto.

Risultati e discussione

Nel periodo 2015-2018 si sono verificati una serie di episodi di accumulo di biotossine algali nei molluschi bivalvi. In alcuni casi il valore limite previsto della normativa europea è stato ripetutamente superato nel periodo considerato. In altri casi le tossine sono state ritrovate in modo sporadico e con valori al di sotto dei limiti di legge. Complessivamente le tossine rilevate nei molluschi allevati nelle acque di competenza della Regione Veneto comprendono Acido Okadaico (AO) e Yessotossine (YTXs), tossine PSP ed Acido Domoico (AD).

In corrispondenza agli eventi di tossicità nei molluschi, generalmente è stata riscontrata nell'acqua di mare la presenza delle specifiche microalghe produttrici di tossine; la stima della concentrazione come "numero di cellule/Litro" (cell/L) è stata possibile solo occasionalmente e senza continuità nel tempo a causa di una minor frequenza del campionamento di tipo quantitativo e/o limitazioni insite al metodo stesso.

L'**Acido Okadaico** rappresenta al momento il problema più ricorrente per l'Alto Adriatico; nel 2015 era stata osservata una estesa tossicità nei molluschi sia per durata (da ottobre a dicembre) che copertura geografica (tratto marino costiero e laguna di Venezia). Erano risultati contaminati mitili e capesante con una concentrazione massimale nei mitili pari a 535 µg AOeq./kg. Per quanto riguarda il fitoplancton tossico, a partire da fine agosto era stata osservata la presenza di *Dinophysis* spp ed in particolare, dai primi giorni di ottobre, di *D. fortii* (circa 300 cell/L) come specie prevalente assieme a *D. caudata* e *D. sacculus*, sia a mare che all'interno della Laguna di Venezia. Dopo la parentesi del 2016, in cui non sono stati riscontrati casi di tossicità nei molluschi anche in presenza di *D. fortii*, il fenomeno si è ripetuto nel periodo luglio - novembre 2017 con una concentrazione massima di 320 µg eq.AO/kg nei molluschi allevati in mare, e di 130 µg AOeq./kg in quelli presenti in laguna. Anche per questo evento, è stata rilevata la presenza di *Dinophysis* spp in concentrazione massima di 800 cell/L ed in particolare di *D. fortii* a partire da luglio e con una densità massima di 450 cell/L. Dal punto di vista delle condizioni climatiche, gli anni 2015 e 2017 sono stati caratterizzati da vento di Bora mentre 2016 e 2018 da vento di Scirocco, che verosimilmente hanno condizionato il flusso delle correnti superficiali andando rispettivamente a favorire o sfavorire la possibilità di bloom da parte delle microalghe specifiche.

Le **Yessotossine** rappresentano, per frequenza e diffusione, il secondo problema delle molluschicoltura Venete. Nel 2017 sono state riscontrate in concentrazione di 2,8 mg eq. YTXeq./kg nel mese di maggio, all'interno della laguna di Venezia, in presenza di *Protoceratium reticulatum* (320 cell/L nel tratto a mare antistante la laguna). Nel 2018 le YTXs sono state trovate sempre nel periodo maggio-giugno in basse concentrazioni nei mitili (concentrazione massima 0,18 mg eq. YTXeq./kg) in presenza di *Lingulodinium polyedrum* ad una densità pari a 200 cell/L.

A maggio 2017 per la prima volta è stata confermata la presenza di **tossine PSP**, in particolare Gonyautossine, in telline ad una concentrazione di 440 µg STXHC1eq./kg in prossimità della Laguna di Venezia [3]; nell'acqua era presente *Alexandrium* spp (280 cell/L), e in particolare era stata rilevata la presenza di *Alexandrium minutum*.

Presenza di basse concentrazioni di **Acido Domoico** (< 2 mg/kg) sono infine state evidenziate a fine agosto del 2018 in vongole all'interno della stessa laguna; a partire da agosto, *Pseudo-nitzschia* spp era presente con una densità di 10⁵ cell/L; in particolare è stata osservata per un breve periodo a fine mese, la prevalenza di *Pseudo-nitzschia multistriata* proprio all'interno della laguna.

L'aumento della frequenza degli episodi di contaminazione dei molluschi allevati nella colonna d'acqua (mitili) ed anche di quelli a contatto con il fondale (vongole, telline), assieme alla recente comparsa di tossine quali le PSTs e le ASTs, anche se episodica ed al di sotto del limite normativo, permettono di ipotizzare una presenza pressoché stabile delle diverse specie di fitoplancton tossico nelle acque dell'Alto Adriatico, favorita anche dalla possibilità di molte di queste microalghe di produrre cisti di resistenza che sedimentano sul fondale e possono originare *bloom* algali in relazione ai fattori ambientali sempre più favorevoli.

La prospettiva di uno scenario nel quale le acque marino-lagunari delle nostre latitudini saranno sempre più adatte all'insorgenza di *bloom* algali a causa dei cambiamenti climatici, rende necessario l'approfondimento delle conoscenze relative al fitoplancton tossico, la possibilità di stimare e correlare l'andamento quantitativo con l'accumulo di biotossine nei molluschi e l'integrazione di questi dati con quelli ambientali (nutrienti, clorofilla, temperatura, correnti), al fine di creare un sistema previsionale "*early warning*" così come attuato in altri Paesi europei ed extraeuropei.

Bibliografia

[1] Reg.(EU) 854/2004 "Norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale per il consumo umano" - Gazzetta ufficiale UE L 139 del 30 aprile 2004

[2] Reg.(EU) 853/2004 "Norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale" - Gazzetta ufficiale UE L 139 del 30 aprile 2004

[3] S. Pigozzi, A. Ceredi, M. Pompei, P. Bordin, L. Bille, C. Dell'Aversano, L. Tartaglione, L. Sidari, B. Zanolin, A. Cacitti, L. Pelagatti, M. Ricci, A. Milandri "First detection of tetrodotoxin in shellfish from Northern Italy" **Congress: 6th International Symposium Marine and Freshwater Toxins Analysis** October 22-25, 2017. Baiona, Spain

Classificazione delle aree di produzione delle vongole *Chamelea gallina* nella Regione Marche e rispetto del criterio di sicurezza microbiologico basato su *Escherichia coli*: valutazione di tipo probabilistico attraverso l'uso del Teorema di Bayes

C. Ciccarelli¹, M. Leinoudi², A.M. Semeraro¹, V. Di Trani¹, S. Murru¹, P. Capocasa¹, E. Ciccarelli³, G. D'Aurizio⁴, I. Corti⁵

¹) ASUR MARCHE A.V. 5 – San Benedetto del Tronto - Ascoli Piceno (Italia)

²) General Chemical State Laboratory - Thessaloniki (Greece)

³) Biologo – Bracknell (UK)

⁴) Agenzia Regionale Sanitaria Marche - Ancona (Italia)

⁵) ATS Insubria – Varese (Italia)

Keywords: *Escherichia coli*, *Chamelea gallina* clam, microbiological safety criteria, classification, Bayes theorem

Introduzione

La raccolta di vongole *Chamelea gallina* rappresenta, nella Regione Marche, una delle principali attività ed è stato stimato, nell'ultima pubblicazione MIPAAF-IREPA riguardante il 2012 [1], che ponendosi al secondo posto tra le specie più pescate nella regione ed al primo posto per i ricavi, abbia rappresentato più del 30% della produzione nazionale di quell'anno.

Nel corso del 2018 la Regione Marche, con la D.G.R. Marche n. 929/2018 [2], ha provveduto alla revisione della classificazione delle aree di produzione dei molluschi bivalvi, tra cui le vongole, basandosi sui criteri previsti nell'allegato II parte A del Reg. CE/854/2004, come modificato dal Reg. CE/2285/2015 [3].

Tale ultimo regolamento ha anche modificato il criterio di sicurezza (CdS) per *Escherichia coli* nei molluschi bivalvi vivi immessi sul mercato di cui al punto 1.25 dell'allegato I del Reg. CE/2073/2005 prevedendo, in accordo con quanto già previsto dal Codex Alimentarius, un campionamento a tre classi.

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare, attraverso modelli probabilistici, per le vongole raccolte nelle aree classificate della Regione Marche, la probabilità di ottenere risultati conformi o non conformi al CdS e, dall'altro lato, mediante il teorema della probabilità inversa, o Teorema di Bayes, con quale probabilità tali risultati riflettano il livello sanitario dell'area di raccolta delle vongole.

Summary

Lately Marche Region revised classification of *Chamelea gallina* clam harvesting areas, based on Regulation EC/2285/2015. Taking into account the microbiological safety criterion for shellfish, as established by Regulation EC 2073/2005 and using at first the stochastic model, the authors examined the probability of obtaining compliant clams based on the sanitary status of the harvesting area. Additionally, using the Bayes Theorem, the probability of deriving compliant clams from harvesting areas of different sanitary status was investigated. The comparison of these results shows that the latest review of regional classification is strong enough to ensure a suitable safety level for *Chamelea gallina* clams. However, the probability of harvesting non-compliant clams is not entirely negligible. Using the Bayes Theorem the authors show that most of the non-compliant clam specimens originate from Class A or from Class B areas after purification. In fact, as a previous study demonstrated, the probability of obtaining compliant results with the safety criterion is not very high and the criterion of Regulation EC 2073/2005 is not coordinated and nor congruent with the classification criteria of shellfish harvesting areas.

Materiali e metodi

Per lo studio sono stati presi in considerazione i seguenti dati, riassunti nella Tabella 1:

- i risultati del monitoraggio eseguito negli anni dal 2015 al 2017 ed utilizzati per la revisione della classificazione delle aree di raccolta delle vongole di cui alla D.G.R. Marche n. 929/2018,
- le superfici delle aree di raccolta calcolate a partire dalle coordinate riportate nella citata D.G.R.

Per il calcolo della probabilità di ottenere risultati conformi o meno al CdS dalle diverse aree di produzione è stata utilizzata la funzione di probabilità di massa già presentata da Ciccarelli *et al.* nel 2017 [4]:

$$\Pr(x|\theta, r, n) = \sum^k \theta_A^{rA} \cdot \theta_B^{rB} \cdot \theta_C^{rC} \quad [A]$$

dove $k = P_n$ $n = rA + rB + rC = 5$ $\theta \in [0, 1]$ e $\theta_A + \theta_B + \theta_C = 1$

Assumendo che i risultati delle cinque unità campionarie (u.c.) siano indipendenti ed espressione della prevalenza delle tre classi di risultati indicate come θ_A , θ_B e θ_C , indicando con r il numero di ripetizioni di quella classe all'interno delle u.c. e, mantenendo $p_C = 0.01$, è stata determinata la frequenza dei risultati conformi e di quelli non conformi al CdS per ognuna delle aree classificate.

Per il calcolo della probabilità con cui la conformità o meno del CdS possa riflettere il livello sanitario dell'area di provenienza delle vongole è stato utilizzato il teorema di Bayes [5] espresso nella seguente forma:

$$P_{(E|E)} = P_{(Ej)} \cdot P_{(E|Ej)} / \sum^k P_{(Ek)} \cdot P_{(E|Ek)} \quad [B]$$

con $P_{(Ej)} \cap P_{(Ek)} = \emptyset$ e $P_{(Ek1)} + P_{(Ek2)} \dots + P_{(Ekn)} = 1$ ed inoltre E rappresenta l'evento rispetto al CdS mentre Ej rappresenta uno degli eventi Ek riferiti alle diverse classi di prevalenza dei risultati di *E. coli* ≤ MPN/100g per i tre livelli sanitari di classificazione.

Risultati e discussione

La tabella 1 riassume, per ciascuna delle aree classificate ai sensi della D.G.R. Marche n. 929/2018, il livello sanitario, la prevalenza dei risultati di *E. coli* ≤ MPN/100g come ottenuti dal monitoraggio delle aree di produzione nel periodo 2015-2017, e la superficie dell'area marina espressa in 10^{-1} km^2 .

I dati sul livello sanitario di classificazione e sulla superficie delle aree marine classificate sono stati raccolti nella tabella 2A e, assumendo che la produzione di vongole sia, all'incirca, proporzionale alla superficie di raccolta, nella collegata tabella 2B è stata riportata la probabilità di raccolta per classi omogenee di prevalenza e livello sanitario di classificazione: tali dati rappresentano i valori $P_{(Ek)}$ della formula [B].

Mediante la funzione di probabilità di massa di cui al punto [A] è stata calcolata la probabilità di ottenere, per ciascuna classe omogenea di prevalenza individuata, risultati conformi oppure no al CdS.

I risultati, riassunti nella tabella 3A, rappresentano i valori $P_{(E|Ek)}$ della [B]. Nella tabella 3B invece, viene riassunta la probabilità di ottenere risultati conformi o meno al CdS a partire dalla probabilità di raccolta da aree di produzione, suddivise per classi omogenee di prevalenza e livello sanitario di classificazione.

Infine con la formula del Teorema di Bayes di cui al punto [B] è stata determinata la probabilità che le vongole raccolte nella Regione Marche e risultate conformi al CdS possano provenire da aree classificate di livello sanitario A, B e sottoposte ad efficace trattamento di depurazione, oppure B ma senza che il trattamento di depurazione sia stato efficace, posto che tale trattamento sia inefficace nel 15% dei casi. Analoga determinazione è stata eseguita anche per le vongole risultate non conformi al CdS e tutti questi dati sono stati riepilogati nella Tabella 4.

Da quanto ottenuto appare evidente come, per le vongole raccolte nelle aree di produzione classificate della Regione Marche, la probabilità di risultati conformi al CdS sia superiore all'80%; mentre la probabilità di risultati non conformi, anche se le vongole provengono da zona A oppure provenienti da zona B e sottoposte a depurazione non sia trascurabile ed arrivi a valori di poco superiori al 15%.

Tuttavia, il teorema della probabilità inversa ha permesso di dimostrare come i risultati non conformi siano da attribuire, in proporzione superiore al 90% a vongole raccolte in aree classificate A oppure in aree classificate B e sottoposte a sufficiente trattamento di depurazione. Tale risultato, apparentemente contraddittorio, è legato alla limitata sensibilità del CdS nel riconoscere come conformi molluschi bivalvi provenienti da aree classificate A o, se da aree B, sottoposti ad un efficace trattamento di depurazione, come già messo in evidenza da Ciccarelli *et al.* [4].

In conclusione l'analisi dei dati ottenuti con il monitoraggio delle aree di produzione delle vongole della Regione Marche nel periodo 2015-2017 ha permesso di verificare come la recente revisione della classificazione operata dalla D.G.R. Marche n. 929/2018 sia sufficientemente robusta e tale da garantire uno standard di sicurezza elevato. Inoltre gli eventuali risultati non conformi al CdS possono essere riconducibili, con una probabilità superiore al 90%, a vongole raccolte in aree classificate A oppure regolarmente depurate: ciò è dovuto al fatto che i due criteri introdotti dal Reg. CE/2285/2015 e riguardanti la classificazione delle aree di produzione dei molluschi bivalvi e la loro sicurezza alimentare, non sono coordinati e coerenti tra di loro.

Bibliografia

[1] Istituto di Ricerche Economiche per la Pesca e l'Acquacoltura (IREPA). Sistan Dati Regionali 2012. <http://www.irepa.org/it/dati-sistan/dati-regionali/2012.html>

[2] Regione Marche. (2018). Deliberazione della Giunta Regionale del 9 luglio 2018 n. 929 riguardante la Riclassificazione sanitaria delle zone di produzione dei molluschi bivalvi vivi ai sensi del Regolamento CE del 29 aprile 2004, n. 854; revoca della Deliberazione di Giunta del 1 agosto 2016, n. 850. http://www.norme.marche.it/Delibere/2018/DGR0929_18.pdf

[3] EU Commission. (2015) Commission Regulation (Eu) No 2285/2015 of 16 August 2013 amending Annex II to Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption as regards certain requirements for live bivalve molluscs, echinoderms, tunicates and marine gastropods and Annex I to Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union. Series L. 323, 2e4, 09.12.2015.

[4] C. Ciccarelli, M. Leinoudi, A.M. Semeraro, V. Di Trani, S. Murru, P. Capocasa, E. Ciccarelli, G. Consorti, L. Sacchini (2017) I criteri per la classificazione delle aree di produzione dei molluschi bivalvi sono coerenti con il criterio di sicurezza microbiologico basato su *Escherichia coli*? Atti del VI Convegno Nazionale SIRAM di San Benedetto del Tronto (2017) 24-26

[5] Corradi F. (2016) Statistica. Editrice EGEEA Milano (2016)

Tabella 1: dati relativi al livello sanitario, alla prevalenza dei risultati ≤ 230 MPN/100g ed alla superficie delle aree di produzione della Regione Marche classificate ai sensi della D.G.R. Marche n. 929/2018.

Codice area	livello sanitario	E. coli ≤ 230 MPN/100g (%)	Superficie (10-1km2)	Codice area	livello sanitario	E. coli ≤ 230 MPN/100g (%)	Superficie (10-1km2)	Codice area	livello sanitario	E. coli ≤ 230 MPN/100g (%)	Superficie (10-1km2)
1 3-8	B	70.83	11.38	8 8-8	A	100.00	55.25	H3	A	91.67	127.90
1 8-8	B	75.00	21.12	11.1	A	87.50	45.00	H2	A	95.83	173.40
2.13-8	A_estate	75.00	61.08	11.2	A	87.50	166.30	H1	A	100.00	166.40
2.18-8	A	87.50	113.42	11.3	A	87.50	185.00	I3	A	100.00	159.40
2.23-8	B	75.00	17.54	11.4	A	95.83	19.60	I2	A	95.83	59.40
2.28-8	A	91.67	32.56	11.6	B	79.17	14.50	I8	A_estate	91.67	152.90
3 3-8	B	83.33	66.94	12 .1	A	91.67	205.00	I7.2	A	91.67	166.60
3 8-8	A	83.30	122.48	12.2	A	87.50	21.60	I7.1	B	83.33	205.00
4 3-8	A	91.67	16.41	12.3	A_estate	87.50	20.90	I6.2	B	75.00	372.20
4 8-8	A	87.50	34.19	12.6	A	87.50	210.00	I8.1	B	83.33	372.20
6	A	83.33	9.36	12.8 3-8	B	83.33	72.80	I6	A	83.33	163.10
8.1	A	100.00	20.73	12.8 8-8	B	83.33	135.20	M2	A	83.33	145.00
8.2	A	95.83	10.84	9	A	91.67	95.16	M1	C_estate	87.50	130.70
D	A	91.67	66.90	8B181	A	95.83	110.20	18.1 3-8	A	95.83	53.55
E 3-8	A	87.50	11.80	8B182 3-8	A_estate	87.50	31.70	18.1 8-8	A	91.67	99.45
E 8-8	A	91.67	21.90	8B182 8-8	A	91.67	81.00	18.2 3-8	A	95.83	77.00
7.1 3-8	A	87.50	11.45	10.1 3-8	A	87.50	28.40	18.2 8-8	A	100.00	143.00
7.1 8-8	A	91.67	21.25	10.1 8-8	A	87.50	129.00	18.3 3-8	A	91.70	20.72
7.2 3-8	A	83.33	11.45	10.2	A_estate	91.67	184.40	18.3 8-8	A	87.50	36.48
7.2 8-8	A	100.00	21.25	L	B	87.50	49.10	18.4 3-8	A	91.67	18.10
F 3-8	A_estate	91.67	6.65	14.2 3-8	A_inverno	83.33	103.00	18.4 8-8	A	91.67	41.10
F 8-8	A_inverno	91.67	12.35	14.2 8-8	A_inverno	87.50	204.40	18.6	A	100.00	29.00
8 3-8	A	87.50	29.75	14.1	B	75.00	100.20	R	A_estate	91.67	94.80

Tabella 2: livello sanitario e superficie delle aree marine classificate della regione Marche (Tab. 2A) e relativa probabilità di provenienza delle vongole (Tab. 2B).

Tab 2A	A	B	A_estate	A_inverno	C_estate
0.7		11.38			
0.75		525.56			
0.8	451.37	851.14			
0.85	1024.39	49.10	52.6		130.70
0.9	1015.05		499.83	319.75	
0.95	1101.02				

Tab 2B	estate			inverno	
	A - P(Ej)	B - P(Ej)	C - P(Ej)	A - P(Ej)	B - P(Ej)
0.7		0.000289			0.000283
0.75		0.013359			0.013070
0.8	0.076488	0.221572		0.0748306	0.216771
0.85	0.1825039	0.008320		0.169829	0.038529
0.9	0.2567075	0.054184		0.2212905	0.082865
0.95	0.1885759			0.1825332	

Tabella 3: probabilità teorica di ottenere risultati conformi o non conformi al CdS in base alla classe omogenea di prevalenza (Tab.3A) e probabilità di ottenere risultati conformi o meno al CdS nella Regione Marche (Tab. 3B).

Tab. 3A	P(E Ek)	
	conformi	non conformi
Prevalenza E. coli ≤ 230 MPN/100g		
0.70	0.516215	0.483785
0.75	0.616992	0.383008
0.80	0.716800	0.283200
0.85	0.809110	0.190890
0.90	0.885735	0.114265
0.95	0.936682	0.063318

Tab. 3B	P(Ej) · P(E Ej)			
	estate		inverno	
Prevalenza E. coli ≤ 230 MPN/100g	conformi	non conformi	conformi	non conformi
0.70	0.000149	0.000140	0.000146	0.000137
0.75	0.008242	0.005117	0.008064	0.005006
0.80	0.213649	0.084411	0.209020	0.082582
0.85	0.154398	0.036426	0.168584	0.039773
0.90	0.275368	0.035524	0.269401	0.034754
0.95	0.174762	0.011814	0.170976	0.011558
Totale	0.826569	0.173431	0.826190	0.173810

Tabella 4: probabilità che i risultati conformi (Tab. 4A) e non conformi al CdS (Tab. 4B) siano da attribuire a vongole provenienti da aree con differenti livelli sanitari e/o sottoposte a trattamento di depurazione.

Tab. 4A	livello sanitario	Prevalenza E.coli \leq 230 MPN/100g	conformi			P(E E) complessiva
			P(Ej)	P(E Ej)	P(Ej E)	
estate	A	0.8	0.076488	0.716800	0.066330	0.731493
		0.85	0.182504	0.809110	0.178649	
		0.9	0.256708	0.885735	0.275083	
		0.95	0.186576	0.936682	0.211431	
	B non depur.	0.7	0.000289	0.516215	0.000181	0.010152
		0.75	0.013359	0.616992	0.009972	
	B depur.	0.8	0.221572	0.716800	0.192147	0.258354
		0.85	0.008320	0.809110	0.008145	
0.9		0.054184	0.885735	0.058063		
inverno	A	0.8	0.074831	0.716800	0.064923	0.675424
		0.85	0.169829	0.809110	0.166318	
		0.9	0.221291	0.885735	0.237239	
		0.95	0.182533	0.936682	0.206944	
	B non depur.	0.7	0.000283	0.516215	0.000177	0.009937
		0.75	0.013070	0.616992	0.009760	
	B depur.	0.8	0.216771	0.716800	0.188070	0.314639
		0.85	0.038529	0.809110	0.037732	
0.9		0.082865	0.885735	0.088837		

Tab. 4B	livello sanitario	Prevalenza E.coli \leq 230 MPN/100g	Non conformi			P(E E) complessiva
			P(Ej)	P(E Ej)	P(Ej E)	
estate	A	0.8	0.076488	0.283200	0.124899	0.563024
		0.85	0.182504	0.190890	0.200876	
		0.9	0.256708	0.114265	0.169132	
		0.95	0.186576	0.063318	0.068117	
	B non depur.	0.7	0.000289	0.483785	0.000807	0.030309
		0.75	0.013359	0.383008	0.029502	
	B depur.	0.8	0.221572	0.283200	0.361810	0.406667
		0.85	0.008320	0.190890	0.009158	
0.9		0.054184	0.114265	0.035699		
inverno	A	0.8	0.074831	0.283200	0.121927	0.520421
		0.85	0.169829	0.190890	0.186519	
		0.9	0.221291	0.114265	0.145480	
		0.95	0.182533	0.063318	0.066496	
	B non depur.	0.7	0.000283	0.483785	0.000788	0.029588
		0.75	0.013070	0.383008	0.028800	
	B depur.	0.8	0.216771	0.283200	0.353200	0.449991
		0.85	0.038529	0.190890	0.042315	
0.9		0.082865	0.114265	0.054476		

Confronto di metodi di estrazione di acidi nucleici in campioni di mitili, acque e sedimenti

B. Cioffi¹, D. Di Concilio², M. Salamone³, G. Galiero¹, M. G. Amoroso¹, G. Fusco¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Sanità Animale, Via Salute 2, 80055 Portici (NA), Italy.

²Università degli studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Veterinaria

³Università degli studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Biologia

Keywords: mitili, acque, virus enterici, estrazione acidi nucleici

Introduzione

Le malattie virali a trasmissione oro-fecale sono spesso associate all'uso diretto o indiretto di acque contaminate, provenienti prevalentemente da scarichi di reflui non trattati, ed al consumo di mitili allevati in acque contaminate (1). I virus enterici responsabili di epidemie gastroenteriche sono: norovirus, adenovirus, virus dell'epatite E e dell'epatite A, rotavirus e gli emergenti sapovirus, astrovirus ed aichivirus. La ricerca dei virus enterici in campioni di acque e nei mitili prevede l'impiego di metodiche biomolecolari che rilevano la presenza del loro DNA o RNA nei campioni analizzati. Uno step cruciale nell'analisi di target virali con metodi di biologia molecolare, è l'estrazione degli acidi nucleici, la cui efficienza può influenzare negativamente la detection di questi patogeni in matrici quali mitili, acque e sedimenti. Scopo dello studio è stato quello di valutare l'efficienza di estrazione degli acidi nucleici di due differenti sistemi di estrazione, al fine di scegliere quello performante da impiegare in studi volti ad identificare i virus in matrici complesse quali acque marine, mitili e sedimenti. Allo scopo, sono stati messi a confronto due sistemi di estrazione, uno semiautomatico, il Gene-up (Biomerieux) e uno automatico, il QiaSymphony (Qiagen), entrambi basati su una tecnologia di estrazione che prevede l'impiego di particelle magnetiche.

Summary

Viral diseases with oro-fecal transmission are often associated with the direct or indirect use of contaminated water and with the consumption of mussels, when harvested in polluted waters. Enteric viruses, responsible of gastro-enteric outbreaks, are detected by bio-molecular methods whose performance is strongly influenced by the recovery of nucleic acids during the extraction step. Aim of this study was to evaluate the recovery rate of two extraction systems: Gene-up (Biomerieux) and QiaSymphony (Qiagen), in order to determine which is the most suitable extraction system to employ for virus detection. A total of 40 samples (20 mussels, 10 shallow waters and 10 sediments) have been tested for the presence of *murine norovirus*, added to each sample prior to perform the extraction. Results showed that Qiasymphony reaches higher recovery rates when extracting the virus from the three matrixes analysed (mussels, waters and sediments) thus decreasing the number of false negatives results.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati 40 campioni di cui 20 campioni di mitili, 10 campioni di acque superficiali e 10 campioni di sedimenti. I campioni sono stati contaminati con *norovirus murino* alla concentrazione di 10^7 PFU/ml. In particolare, a 10 l di campione di acque superficiali è stato aggiunto 1ml di *norovirus murino* mentre 10 μ l del virus sono stati aggiunti sia a 1g di sedimenti che a 2g di epatopancreas di mitili. Dopo una prima fase di pretrattamento dei campioni (estrazione dei virus dall'epatopancreas per i mitili (2), concentrazione dei virus dai campioni di acque,(3), dissoluzione dei sedimenti in tampone di estrazione), gli acidi nucleici virali sono stati estratti da 400 μ l di campione con le due strumentazioni in esame seguendo i protocolli delle relative aziende produttrici. La performance di ciascun sistema di estrazione è stata valutata calcolando il recupero percentuale dell'RNA del *norovirus murino* mediante One step Real-Time RT-PCR (4) e confrontando il valore soglia (C_t) del virus in ogni campione con il valore soglia del virus in acqua, così come già descritto in letteratura (5). I risultati ottenuti sono stati espressi come percentuale di recupero degli acidi nucleici (efficienza di estrazione).

Risultati e discussione

Il valore medio dell'efficienza di estrazione per i campioni di mitili è risultato essere 6,67 per il QiaSymphony e 1,14 per il Gene-up. Per i campioni di acque il valore medio dell'efficienza di estrazione del QiaSymphony, è risultato essere 29,5, quello del Gene-up è risultato essere 1,07. Per i campioni di sedimenti il valore medio dell'efficienza di estrazione del QiaSymphony, è risultato essere 23,25; quello del Gene-up 0,6. È stato inoltre applicato il test t-Student per valutare se la differenza delle efficienze di estrazione dei due sistemi potesse essere considerata significativa. I valori ottenuti sono $t=2,1$ con un livello di significatività $P=0,04$ per i mitili, $t=2,4$ e $P=0,03$ per le acque e $t=2,28$ e $P=0,04$ per i sedimenti. La differenza osservata tra le medie è statisticamente significativa per $p<0,05$ per tutte le matrici (Tabella 1). Il *norovirus murino* può essere considerato un target semplice da identificare ed affidabile nella valutazione delle efficienze di

estrazione degli acidi nucleici. Dall'analisi dei dati si è evinto che il sistema Qiasymphony presenta una efficienza di estrazione significativamente ($p < 0,05$) superiore rispetto al Gene-up per tutti i tipi di campioni analizzati. Il sistema Qiasymphony ha, inoltre, il vantaggio di poter processare fino a 96 campioni contemporaneamente ed in maniera completamente automatica in circa 5 ore lavorative, laddove il Gene-up ne processa 8 con una conseguente notevole riduzione dei tempi di esecuzione delle analisi.

Bibliografia

[1] La Rosa G, Fratini M, della Libera S, Iaconelli M, Muscillo M. Emerging and potentially emerging viruses in water environments. Ann Ist Super Sanita. 2012;48(4):397-406

[2] ISO 15216-1:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification

[3] Calgua B, Fumian T, Rusiñol M, Rodriguez-Manzano J, Mbayed VA, Bofill-Mas S, Miagostovich M, Girones R. Water Res. 2013 May 15;47(8):2797-810

[4] Baert L, Wobus CE, Van Coillie E, Thackray LB, Debevere J, Uyttendaele M. Appl Environ Microbiol. 2008 Jan;74(2):543-6. Epub 2007 Nov 16

[5] Iaconelli M, Purpari G, Della Libera S, Petricca S, Guercio A, Ciccaglione AR, Bruni R, Taffon S, Equestre M, Fratini M, Muscillo M, La Rosa G. Food Environ Virol. 2015 Dec;7(4):316-24. doi: 10.1007/s12560-015-9207-3. Epub 2015 Jun 27

Tabella 1: Efficienza di estrazione dell'RNA virale dalle 3 matrici analizzate

Matrice	Qiasymphony (Qiagen) Efficienza di estrazione %	Gene-up (Biomerieux) Efficienza di estrazione %
Mitili	6.67	1.14
Acque	29.5	1.07
Sedimenti	23.25	0.62

Monitoraggio dei molluschi bivalvi allevati lungo il litorale campano anni 2016-2018

G. Colarusso¹, R. Pellicanò¹, D. Mandato¹, E. Peirce¹, S. Cavallo¹, M. Esposito¹, V. Soprano¹, Y. Proroga¹, M. Della Rotonda², L. Baldi¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno

² UOD Prevenzione e Sanità Pubblica Veterinaria, Regione Campania

Keywords: Molluschi bivalvi, Sorveglianza Sanitaria

Introduzione

La principale attività produttiva per l'acquacoltura campana è la molluschicoltura, con una produzione basata quasi esclusivamente su *Mytilus galloprovincialis*; la filiera inizia con la raccolta dei mitili nelle zone di produzione, rappresentate da specchi d'acqua di laguna o di estuario dove si trovano banchi di crescita naturale di frutti di mare oppure da aree appositamente attrezzate per l'allevamento. Tutti gli specchi d'acqua sfruttati per la produzione o la raccolta di frutti di mare sono classificati e sottoposti a controlli periodici dall'Autorità Competente.

Il monitoraggio periodico delle zone di produzione e di stabulazione dei molluschi, prevista dall'allegato II del Regolamento CE 854 del 29 aprile 2004, è affidata ai Servizi Veterinari delle AA.SS.LL. competenti per territorio. Il laboratorio di riferimento per l'analisi dei molluschi è identificato con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno. In Regione Campania la salubrità dei molluschi bivalvi viene garantita ai sensi della D.G.R.C. n. 2234 del 21/12/07 concernente "Linee guida sui molluschi bivalvi vivi e la nuova regolamentazione comunitaria". Il piano raccoglie le norme relative alla produzione primaria (produzione, raccolta, depurazione e spedizione dei molluschi bivalvi), le procedure di registrazione e riconoscimento, le procedure di etichettatura nonché le modalità per la classificazione ed il monitoraggio di tutte le aree di produzione e stabulazione di molluschi bivalvi. In particolare si prevede il campionamento direttamente a mare dei molluschi bivalvi raccolti, allevati o stabulati nelle zone acquee classificate "A", "B" e "C" prospicienti il territorio regionale. Gli esami cui sono sottoposti i bivalvi periodicamente sono microbiologici, (*E.Coli* e *Salmonella*) chimici e biotossicologici [1].

Summary

Bivalves, as food component, are characteristically tender, easily digested, additive-free and minimally processed. These characteristics make them a product that almost completely fulfils the demands of consumers. Contamination of bivalve shellfish occurs mainly because they are suspension feeders that selectively filter small particles of phytoplankton, zooplankton, viruses, bacteria and inorganic matter from the surrounding water. These circumstances make them an important vector of foodborne disease.

In order to protect consumers' health and meet EU legislative requirements, Italy Government and Regional Health Authority have a Shellfish Harvesting Monitoring Program in place, to ensure shellfish containing poison are not harvested and placed on the market.

In this work, results of the analysis of more than 3000 samples of shellfish tissue collected in the period 2016-2018 are presented and discussed.

Materiali e metodi

Ad oggi lungo il litorale campano si contano 22 specchi d'acqua, 3 dei quali classificati A e 19 classificati B; i banchi naturali classificati sono 6.

All'atto della classificazione in ciascuno specchio d'acqua sono identificati i punti di prelievo, ossia quei punti che durante il primo monitoraggio sono stati identificati come rappresentativi dello stato sanitario dei molluschi dell'intera area.

Utilizzando come strumento operativo il combinato disposto della Delibera D.G.R.C. n. 2234 del 21/12/07 ed il Regolamento CE 854/04, si sono fissate le procedure operative per attuare il piano di sorveglianza sanitaria delle zone di produzione.

Come da procedura, su ciascun punto di prelievo identificato sono stati effettuati campionamenti secondo le seguenti cadenze:

- ogni 30 gg per la determinazione dei parametri *Salmonella* ed *E.coli*;
- ogni 180 giorni per la determinazione dei tenori di Pb-Hg-Cd,IPA, Diossina/Furani, PCB diossina like e non diossina like;
- ogni 30 giorni da ottobre ad aprile ed ogni 15 giorni nei restanti mesi dell'anno per le biotossine algali;
- a seguito di specifiche segnalazioni si esegue la determinazione del parametro Epatite A v. e Norovirus.

A seguito di Non Conformità si sono intensificati i controlli con prelievi a cadenza ravvicinata fino al ripristino delle condizioni di Conformità.

Risultati e discussione

Durante il periodo compreso tra gennaio 2016 e settembre 2018, nell'ambito delle attività di monitoraggio igienico sanitario delle zone di produzione di molluschi bivalvi nei tratti marino costieri di competenza della Regione Campania, sono stati raccolti 3413 analisi dai Servizi Veterinari delle Aziende Sanitarie Locali.

Osservando la distribuzione mensile dei campioni prelevati si può notare che, nel triennio in esame, nei mesi primaverili si registra un progressivo aumento di campioni prelevati fino ad arrivare ai mesi estivi nei quali si osserva la maggiore frequenza di prelievi. Nel periodo invernale, in particolare nel mese di dicembre, l'attività di campionamento subisce un forte arresto dovuto alle avverse condizioni meteorologiche che impediscono le uscite in mare da parte delle Autorità Competenti.

La specie maggiormente testata è il mitilo comune (75%), a seguire lupino (10%), cannolicchio (7%), tellina (5%).

Sui campioni prelevati sono state effettuate analisi per la ricerca di parametri microbiologici (*Salmonella*, *E.coli*, *Epatite A v.* e *Norovirus*), chimici (IPA, metalli pesanti, diossine e PCB) e biotossine.

Nel triennio in esame le Non Conformità hanno riguardato la presenza di *E.coli*, *Salmonella* ed *Epatite A v.* per la microbiologica, gli Idrocarburi policiclici aromatici (IPA) per la chimica.

Una valutazione di dettaglio sull'andamento delle Non Conformità mostra un'incidenza maggiore di presenza di *E.coli* superiore al limite previsto rispetto alla classificazione nella zona dei banchi naturali di Mondragone, Cellole e Castelvolturmo. Anche nella zona di Torre Annunziata si osserva un incremento delle positività solo per *E.coli*.

L'analisi temporale condotta, rapportando il numero di campioni raccolti mensilmente alle analisi positive per la numerazione dell'*E.coli*, non sembra evidenziare un andamento stagionale delle non Conformità: si osserva infatti un picco di positività (53%) nel mese di gennaio solo nell'anno 2017 mentre per lo stesso mese degli altri anni non si sono registrate non Conformità, situazione analoga si verifica nel mese di febbraio con picco registrato solo nell'anno 2018 mentre gli altri anni le positività si attestano a valori inferiori al 10%.

Diversamente, il resto dell'anno mostra un trend di non conformità pressoché simile in tutti gli anni considerati con una leggera discrepanza solo per il 2018.

Il maggior numero di non conformità per la presenza di *Salmonella* si è registrata nelle aree di Torre del Greco, Torre Annunziata e Napoli Centro.

Si è rilevato che, mentre picchi di positività (>10%) si sono verificati nella zona vesuviana sia nel 2016 che nel 2017, nell'area cittadina le non conformità non superano il 5% sul totale dei campioni prelevati, presentandosi costantemente ogni anno.

Tali aree sono fortemente antropizzate ed interessate dallo scarico di acque superficiali e dal flusso di numerosi corsi d'acqua.

L'andamento mostra "stagionalità" ossia frequenza maggiore nei mesi estivi, coincidenti con una importante pressione turistica.

Per quanto riguarda la presenza del virus dell'Epatite A, le non conformità si sono verificate solo per l'anno 2017 ma in aree diverse del litorale nel primo trimestre dell'anno.

In generale la rilevazione di analisi irregolari per la ricerca di agenti microbiologici può essere messa in relazione ad imponenti fenomeni di pioggia [2]; dal momento che gli impianti di mitilicoltura si trovano in mare aperto, questa osservazione è da associare con buona probabilità allo sversarsi in mare aperto di portate d'acqua significative.

Per quanto attiene ai parametri chimici, le uniche irregolarità sono dovute alla presenza di Idrocarburi Policiclici Aromatici nella sola area del golfo di Pozzuoli durante gli anni 2016-2017. Tale situazione ha stimolato un approfondimento per identificare l'origine della contaminazione che, come riportato da diversi autori, può essere attribuito a un sostanziale rilascio di IPA da combustione di carbone e sistemi di riscaldamento domestici o da impianti di riscaldamento nella stagione invernale. A questo si aggiunge la possibilità che la contaminazione derivi dalle correnti d'acqua che smuovono IPA dai sedimenti marini inquinati. L'Autorità Competente ha pertanto proceduto, attraverso l'utilizzo di un software di gestione delle correnti lungo il litorale costiero campano, a rivedere il perimetro delle concessioni insistenti nel Golfo di Pozzuoli: gli allevamenti dell'area sono stati spostati al di fuori dello spazio di circolazione delle correnti che potenzialmente avrebbero potuto trasportare i contaminanti. Il monitoraggio chimico eseguito nel triennio non ha evidenziato, inoltre, in nessun campione superamento dei limiti massimi di metalli pesanti (Pb, Cd, Hg) e di diossine/furani e PCB che, anzi, sono risultati abbondantemente al di sotto di tali valori. Per quanto attiene infine, alle biotossine algali, il litorale campano è stata interessata in maniera poco significativa dal rischio biotossicologico nel periodo considerato, con un'unica positività nel 2016, subito rientrata.

La valutazione del rischio, mediante la caratterizzazione del pericolo, in questo ambito produttivo, ha confermato quanto registrato negli anni precedenti: questo settore produttivo è primariamente contraddistinto

da un pericolo di natura microbiologica legato per lo più allo sversamento in mare aperto di portate d'acqua significative in seguito di eventi meteorologici avversi [3].

Il rispetto delle frequenze e delle modalità di campionamento dei molluschi consente di rilevare nel breve periodo il superamento dei parametri microbiologici, nei molluschi bivalvi vivi allevati e/o raccolti; in tal modo l'Autorità Competente può adottare tempestivamente gli atti di divieto temporaneo alla raccolta o di obbligo alla depurazione per i molluschi bivalvi vivi allevati e/o raccolti nelle zone risultate Non Conformi, riducendo al minimo il rischio di insorgenza di tossinfezioni alimentari nel consumatore.

Infine, è in fase di sviluppo un sistema conoscitivo, basato su modelli predittivi e riscontri analitici, volto a migliorare la conoscenza dell'andamento dei fenomeni contaminativi in mare, con particolare riferimento agli specchi d'acqua classificati per la mitilicoltura lungo le coste campane. La catena modellistica, in cui è inserito il sistema denominato WaComM, si basa su modelli numerici accoppiati atmosfera-oceano-dispersione degli inquinanti, intendendo per inquinante una particella generica che diffonde nell'acqua e si sposta in base alle correnti superficiali [4-5-6-7].

L'utilizzo del Sistema WaComM ha mostrato essere un potenziale mezzo di previsione della concentrazione di particelle in molluschi bivalvi allevati in mare: attualmente, in presenza di un fenomeno di contaminazione noto (eventi meteorologici avversi o sversamenti da scarichi), è possibile conoscere con un certo grado di attendibilità come le particelle si distribuiscono e si concentrano nelle zone dove insistono gli allevamenti di mitilicoltura.

Tuttavia, non essendo il modello calibrato sulle caratteristiche dei microorganismi ma su parametri standard, non è stato ancora stabilito un protocollo di campionamento efficace per stabilire la relazione fra variazioni di concentrazioni rilevate dal modello e Non Conformità nei molluschi; pertanto, al momento il modello non può ancora essere utilizzato come unica fonte di informazione sui tempi di contaminazione/decontaminazione dei molluschi bivalvi ed ancora non consente di gestire in sicurezza i tempi di sospensione di impianti risultati irregolari al monitoraggio sanitario ordinario.

Bibliografia

[1] Regulation (EC) No 854/2004 of the European parliament and of the council of 29th April 2004 laying down specific rules for the organization of official controls on products of animal origin intended for human consumption. Official Journal of the European Union, Series, L 226, 83e127, 25.06.04

[2] Ackerman D., B.Weisberg S.,(2003) Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica Bay beaches, Journal of Water and Health -01.2-2003

[3] Kay D., Kershaw S., Lee R., Wyer M.D., Watkins J., Francis C.,(2008), Results of field investigations into the impact of intermittent sewage discharges on the microbiological quality of wild mussels (*Mytilus edulis*) in a tidal estuary, WAT ER RE S E ARCH 42 (2008) 3033 – 3046

[4] Raffaele Montella, et al., "Face-it: A science gateway for food security research". Concurrency and Computation: Practice and Experience, 27(16):4423–4436, 2015

[5] R. Montella, L. Baldi, A. Brizius, S. Cavallo, G. Colarusso, M. Della Rotonda, D. Di Luccio, C. Ferraro, A. Riccio, P. Sarnelli, P. Troiano, "WaComM: a hierarchically parallel lagrangian Water quality Community Model integrated in a workflow data science portal", 8th International Workshop on Modeling the Ocean (IWMO), Bologna (Italy) 7-10/06/2016

[6] R. Montella, D. Di Luccio, P. Troiano, A. Riccio, G. Giunta "Performance testing of WaComM using different hardware architectures", IBM work experience (Naples), April 2016

[7] R. Montella, C. Ferraro, D. Di Luccio, F. Izzo, P. Troiano, G. Giunta, "FairWind: a marine data crowdsourcing platform based on Internet of Things and mobile/cloud computing technologies", 8th International Workshop on Modeling the Ocean (IWMO) – Bologna (Italy), 7-10/06/2016

Molluschi bivalvi di origine extra UE in vendita nel nord Italia con alcuni elementi ispettivi di campo

I. Corti¹, C. Galimberti², I. Resmini³, R. Malandra⁴, G. Arcangeli⁵

¹) ATS dell'Insubria - Varese

²) Veterinario – Monza

³) ATS di Brescia - Brescia

⁴) ATS della Città Metropolitana di Milano - Milano

⁵) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

Keywords: shellfish, European importation, inspection

Introduzione

I molluschi bivalvi rappresentano una risorsa molto apprezzata a livello globale, costituendo quasi la metà della produzione acquicola europea.

In questo contesto l'immissione sul mercato di molluschi bivalvi importati da Paesi non appartenenti all'Unione Europea rappresenta il 4% a valore e a volume del totale dei prodotti ittici (2016), mantenendo una presenza stabile a volume dal 2011 al 2016 (+1%), aumentando il valore dell'8% nello stesso periodo [1-2].

L'acquacoltura italiana con le sue produzioni rifornisce il mercato con prodotti di buona qualità che tuttavia non soddisfano completamente la richiesta del mercato interno. I molluschi bivalvi provenienti da Paesi Terzi vengono spesso utilizzati come ingredienti di prodotti della pesca trasformati come: "preparati, condimenti per primi piatti, zuppe di pesce surgelate", ma non solo. La loro commercializzazione è capillare e presente sul mercato al dettaglio. Questa tipologia di prodotti sposa la praticità del loro utilizzo e della loro conservazione sempre più in linea con lo stile di vita di una grossa fetta della popolazione italiana.

Anche nell'ambito della commercializzazione di molluschi bivalvi di origine extra-UE l'attività ispettiva può rappresentare un'attività di verifica che contribuisce all'innalzamento e mantenimento della qualità dei prodotti destinati al consumo umano garantendo sicurezza e trasparenza nei confronti dei consumatori.

Scopo del presente lavoro è quello di analizzare le specie di molluschi bivalvi di origine extra-UE vendute nel nord Italia, considerando la tipologia di confezionamento, la presentazione e indicando alcuni elementi di ispezione di campo.

Summary

Bivalve molluscs represent a great portion of fish products commercialized all over the world. In Italy a high percentage of them comes from Third Countries and they are present on the market in different types of presentations.

Aim of this study was analyze the species of extra-UE bivalve molluscs present on North Italian market, classifying them considering species and typology of product.

We collected 11 species of bivalves: *Mytilus chilensis* (41,1%), *Meretrix lyrata* (17,1%), *Paphia textile* (13,2%), *Meretrix meretrix* (12,4%), *Chamelea gallina* (8,5%), *Tawera elliptica* (3,9%), *Amusium pleuronectes* (0,8%), *Argopecten purpuratus* (0,8%), *Mimachlamys varia* (0,8%), *Perna Canaliculus* (0,8%), *Ruditapes decussatus* (0,8%). The most present were *Mytilus chilensis*, *Meretrix lyrata*, *Meretrix meretrix* and *Paphia textile*.

Shellfishes were commercialized in different kinds of products: as bivalve molluscs (MB, 42,6%), as minor ingredient (MBS, 43,4%) and as main ingredient (MBP, 14%).

The great part of these products (89%) is represented by vacuum frozen shellfish.

We believe that shellfish inspection could represent a fundamental aspect to guarantee food safety and transparency for the consumer.

This study moreover confirmed that extra-EU products are common all over North-Italian market.

Materiali e metodi

Lo studio si è svolto attraverso l'effettuazione di sopralluoghi presso quindici catene della GDO e tre grossisti di prodotti ittici operanti nel nord Italia. Sono stati osservati tutti i prodotti posti in vendita e, attraverso l'utilizzo di una scheda di registrazione, sono state messe in evidenza le specie di molluschi bivalvi con origine extra-UE. Sono state raccolte anche altre informazioni: area FAO di pesca/Paese di coltivazione, tipologia di prodotto, tipologia di presentazione, tipologia di confezionamento, brand e luogo di individuazione.

Per quanto riguarda la tipologia di prodotto sono state individuate tre diverse categorie: molluschi Bivalvi in quanto tali (MB), molluschi utilizzati in prodotti trasformati come ingredienti principali (MBP, ad esempio prodotto a base esclusivamente di una specie di bivalvi) e molluschi utilizzati in prodotti trasformati come ingredienti secondari (MBS, ad esempio sughi contenenti varie specie di bivalvi).

Per quanto concerne le specie sono state prese in riferimento le denominazioni scientifiche e commerciali presenti nel Decreto Ministeriale del 22 settembre 2017[3-4].

Per l'elaborazione dei dati è stato utilizzato un foglio elettronico di calcolo Microsoft Excel 365.

Risultati e discussione

Il nostro studio ha esaminato i prodotti posti in vendita presso diciotto Operatori del Settore Alimentare; le specie di molluschi bivalvi riscontrate sono undici, delle quali sono state riscontrate frequenze di impiego diverse: *Mytilus chilensis* (41,1%), *Meretrix lyrata* (17,1%), *Paphia textile* (13,2%), *Meretrix meretrix* (12,4%), *Chamelea gallina* (8,5%), *Tawera elliptica* (3,9%), *Amusium pleuronectes* (0,8%), *Argopecten purpuratus* (0,8%), *Mimachlamys varia* (0,8%), *Perna Canaliculus* (0,8%), *Ruditapes decussatus* (0,8%).

Gli articoli posti in vendita individuati sono stati 96. Le due specie più utilizzate sono la Cozza cilena (*Mytilus chilensis*) e la Vongola del Pacifico (*Meretrix lyrata*, *Meretrix meretrix*, *Paphia textile*).

Le provenienze dei molluschi bivalvi sono diverse: le zone FAO di pesca coinvolte sono 61, 71, 37.2.2 e 37.4; Perù, Cile e Nuova Zelanda sono i Paesi di allevamento (Tab. 1).

Se si analizza l'utilizzo dei molluschi bivalvi considerati si apprende che solo il 42,6% viene venduto in quanto tale (MB), il 43,4% viene utilizzato come categoria MBS e il 14,0% come MBP.

La maggior parte dei prodotti venduti, pari al 44,2% del totale, è realizzata con prodotti con conchiglia intera, il 28,6% con prodotti sgusciati, il 3,1% con prodotti a "mezzo guscio".

L'89% dei molluschi bivalvi viene venduto congelato sottovuoto, l'8,5% in sacchetti plastici non sottovuoto e il 4,7 % in vaschetta non sottovuoto.

Tutti i prodotti sono congelati o surgelati ad eccezione di *Ruditapes decussatus* venduta viva e vitale proveniente dalla Tunisia e rinvenuta presso il mercato ittico di Milano e di *Chamelea gallina* venduta in conserva in salamoia e proveniente dal Mar Nero.

Dal punto di vista ispettivo, una verifica di base può essere condotta con diverse modalità a seconda della tipologia di presentazione dei molluschi bivalvi.

Per quanto riguarda i prodotti congelati e surgelati confezionati, la verifica dell'integrità della confezione è un utile elemento di controllo; nel caso dei molluschi dotati di conchiglia, questa può essere utile per una facile identificazione di specie. L'ispezione non può prescindere dall'apertura delle valve per la valutazione dei caratteri organolettici e qualitativi come odore, colore, consistenza del mollusco; per quanto concerne i prodotti sgusciati, la valutazione ispettiva è tendenzialmente più immediata.

La valutazione del prodotto vivo e vitale può essere effettuata classicamente tramite la valutazione di parametri quali: suono alla percussione dei bivalvi, quantità ed aspetto del liquido intervalvare, odore e reattività specie-specifica agli stimoli.

Per quanto concerne la valutazione ispettiva della conserva, ruolo di fondamentale importanza è rivestito dal controllo dell'integrità del contenitore, specialmente della capsula di chiusura, per escludere la cosiddetta "perdita di vuoto" (presenza di "clic-clac") individuabile con l'osservazione della capsula.

Questo studio dimostra una presenza capillare di molluschi bivalvi provenienti Paesi Terzi sul mercato del nord Italia; la conoscenza delle specie può essere un utile elemento da approfondire per capire le potenzialità connesse alla commercializzazione oltre che per l'attività di controllo Ufficiale, ad esempio per la prevenzione delle frodi [5].

Bibliografia

[1] European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products (EUMOFA) 2018. The EU fish market 2017 Edition

[2] Paquotte, P., & Lem, A. (2008). Seafood markets and trade: A global perspective and an overview of EU Mediterranean countries. *Options Méditerranéennes*, 62 (2008), 43-55.

[3] D.M. 22 settembre 2017 n°19105 Denominazioni in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale

[4] WoRMS Editorial Board (2018). World Register of Marine Species. Available from <http://www.marinespecies.org>

[5] Abbadi, M., Marciano, S., Tosi, F., De Battisti, C., Panzarin, V., Arcangeli, G., & Cattoli, G. (2017). Species identification of bivalve molluscs by pyrosequencing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (2017) 97(2), 512-519.

Tabella 1: dati relativi a specie, origini e presenza sul mercato dei molluschi bivalvi oggetto dello studio

Specie	Origine area FAO - Paese	Presenza sul mercato
<i>Amusium pleuronectes</i>	71	0,8%
<i>Argopecten purpuratus</i>	Allevata Perù	0,8%
<i>Chamelea gallina</i>	37.4	8,5%
<i>Meretrix lyrata</i>	61, 71	17,1%
<i>Meretrix meretrix</i>	71	12,4%
<i>Mimachlamys varia</i>	Allevata Cile	0,8%
<i>Mytilus chilensis</i>	Allevata Cile	41,1%
<i>Paphia textile</i>	71	13,2%
<i>Perna Canaliculus</i>	Allevata Nuova Zelanda (81)	0,8%
<i>Ruditapes decussatus</i>	37.2.2	0,8%
<i>Tawera elliptica</i>	-	3,9%

Stato dell'arte e prospettive della molluschicoltura in Sicilia

A. Costa¹, G. Barbera², F. Antoci², G. Palma³, G. Arcangeli⁴, D. Lo Monaco²

¹) Porrizzato s.r.l. –Acate (RG);

²) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – Palermo (PA);

³) Assoittica Italia Roma;

⁴) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

Keywords: molluschi, produzione, Sicilia

Introduzione

L'acquacoltura costituisce una realtà produttiva importante per il territorio della Sicilia, e i molluschi bivalvi sono tra i prodotti ittici maggiormente richiesti dai consumatori, sia di origine locale che extraregionale. L'Italia è il terzo produttore europeo di molluschi bivalvi, dopo Spagna e Francia. La molluschicoltura è la principale voce produttiva dell'acquacoltura nazionale. In Italia la molluschicoltura viene esercitata in 11 regioni. Un'elevata concentrazione di impianti è presente lungo la costa dell'Adriatico, in particolare Friuli, Veneto, Emilia Romagna e Puglia. Lo stato dell'arte della molluschicoltura in Sicilia evidenzia criticità produttive che di fatto hanno sempre ostacolato investimenti ed iniziative su larga scala in un settore che potenzialmente potrebbe ben integrare la piscicoltura e la pesca in Sicilia. Le realtà produttive in Sicilia sono rappresentate da alcune attività di allevamento in provincia di Messina (n.2 aziende) e Siracusa (n.3 aziende) di mitili (*Mytilus galloprovincialis*), vongola verace (*Ruditapes philippinarum* e *Ruditapes decussatus*) ed ostrica concava (*Crassostrea gigas*). Da alcuni anni sono in corso di svolgimento programmi di ricerca finalizzati alla diversificazione della molluschicoltura. Le nuove specie di molluschi bivalvi candidate per l'allevamento risultano: la cozza pelosa (*Modiolus barbatus*), il tartufo (*Venus verrucosa*), la tellina (*Donax trunculus*), la capasanta (*Pecten jacobaeus*), l'abalone (*Haliotis tuberculata*). Le particolari condizioni della costa e l'ottima qualità dell'acqua sono i presupposti per poter incrementare la molluschicoltura e produrre molluschi salubri, da poter consumare crudi o poco cotti anche senza il trattamento di depurazione. Viceversa, l'oligotrofia dell'acqua per lo scarso apporto di acque dolci, potrebbe risultare un fattore limitante. Da un punto di vista tecnologico è possibile distinguere due categorie di impianti: fissi e galleggianti. I primi sono costituiti da pali in legno o cemento infissi nel fondale (profondità 8-10 m) tra cui vengono tirate delle corde di sostegno (ventie) cui si fissano le calze dei mitili, lunghe da 2 ai 3 m. Questi impianti sono realizzabili in aree riparate (golfi chiusi e lagune). In aree molto produttive (eutrofiche) si raggiungono produzioni unitarie annue di 40/80Kg/m² di mitili. Gli impianti galleggianti, possono essere realizzati sia in aree riparate che in mare aperto. La tecnologia usata in aree riparate prevede l'impiego di galleggianti uniti tra loro da corde alle quali vengono fissate le calze con i mitili. Negli impianti di allevamento in mare aperto, i filari dei mitili sono posti in profondità (3-5 m) in modo da ridurre le sollecitazioni che devono sopportare in caso di mare mosso.

Summary

Italy is one of the more important producer of marine molluscs. The aim of the present study is to value the state of aquaculture in the production of molluscs in Sicily. In the paper we underline what are the farmed species and what are the target species for the future. We focus on the weakness points and strengths to confirm this sector.

Materiali e metodi

Tabella 1| Produzione nazionale di molluschi da acquacoltura scomposta per regione e per specie

(Anno 2016 valori in T fonte MIPAFF- AMA)

Regione	Mitilo	Ostrica concava	Vongole veraci	Totale	%
Emilia Romagna	21.601	7,5	13.4000	35.008,50	36
Veneto	14.087		15.599	29.686,00	32
Puglia	10.000	137,1		10.137,10	11
Friuli Venezia Giulia	5.021		1054	6.075,00	7
Sardegna	4.100	82,9	15	4.198,16	5
Liguria	2.682	18		2.700,00	3
Campania	2.000			2.000,00	2
Marche	1.860			1860,00	2
Abruzzo	547			547,00	1
Molise	460			460,00	0,5
Sicilia	288	8,7	94	390,33	0,4
Lazio	190			190,00	0,1
Totale complessivo	62.836	254	30.162	93.252	100
%	67,4	0,3	32,3	100	

Tabella 2| Andamento della produzione nazionale di molluschi da acquacoltura suddivisa per regione
(valori in T fonte MIPAAF- Unimar)

Regione	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Emilia-Romagna	34.463	35.556	36.670	36.857	40.654	41.897	35.940	35.009
Veneto	26.955	28.623	27.152	26.043	26.661	25.880	29.192	29.686
Puglia	9.654	12.800	13.100	9.082	11.643	10.605	8.438	10.137
Friuli Venezia Giulia	6.921	3.333	4.573	3.220	3.065	3.843	7.447	6.075
Sardegna	5.079	5.193	10.561	3.600	1.050	3.738	2.017	4.198
Liguria	1.966	1.854	2.184	1.234	1.110	2.511	2.713	2.700
Campania	1.923	2.420	2.697	2.750	2.958	2.840	1.948	2.000
Marche	3.266	3.507	3.517	3.904	4.147	3.478	2.113	1.860
Abruzzo	1.246	1.182	1.048	1.366	1.543	1.343	650	547
Molise	2.510	2.750	8.000	674	1.212	1.100	370	460
Sicilia	1.010	1.305	1.405	2.554	2.867	2.079	1.197	390
Lazio	747	698	1.104	247	287	1.062	207	190
Calabria	92	80	50	40				
Toscana								
Totale	95.833	99.300	112.062	91.571	97.197	100.374	92.232	93.253

Tabella 3| Produzione di novellame

fonte Unimar

Regione	Mitili			Ostriche	
	Impianti	q	%	Impianti	Numero
Emilia Romagna	7	23.312	91,4	1	1.000.000
Puglia	1	200	0,8		
Veneto	1	2.000	7,8		
Totale	9	25.512	100,00	1	1.000.000

Il quantitativo complessivo di semina del novellame viene distinto in base alla diversa provenienza ed indicato :

- Seme da avannotteria nazionale: seme proveniente da altri allevamenti;
- Seme selvatico da banco: seme proveniente da banco naturale, acquistato o raccolto in proprio;
- Seme selvatico da collettore: seme ottenuto ponendo in mare appositi collettori;
- Seme selvatico nazionale: seme di provenienza nazionale.

Tabella 4| Quantitativi di novellame di mitili seminati suddivisi per provenienza

fonte Unimar

Avannotteria nazionale		Selvatico banco		Selvatico collettore		Selvatico nazionale	
q	%	q	%	q	%	q	%
49.170	41	11.723	10	38.231	32	20.684	17

Tabella 5| Localizzazione degli impianti di mitilicoltura suddivisi in base alla tipologia di allevamento

fonte Unimar

Regione	Tipologia di tipo flottante		Tipologia di tipo fisso		Tipologia su barriera	
	In mare N.	Laguna/lago N.	In mare N.	Laguna/lago N.	In mare N.	Laguna/lago N.
Abruzzo	2					
Campania	20					
Emilia Romagna	12			1	3	
Friuli Venezia Giulia	27	1	1		1	
Lazio	3	1				
Liguria	3		67			
Marche	1				1	
Puglia	11		19	2		
Sardegna	8	5	2	1		
Sicilia	1	1		1		
Veneto	8	2		15		
Totale	96	10	89	20	5	0

Risultati e discussione

I risultati sulla molluschicoltura in Sicilia permettono di verificare ed approfondire:

La mitilicoltura è la prima voce della produzione nazionale e siciliana. I molluschi non richiedono risorse trofiche esterne perché utilizzano quelle naturali ed hanno un effetto depurante sulle acque perché possono riciclare i residui di allevamenti piscicoli, nei quali perciò è necessario un uso limitato di prodotti chimici che potrebbero inquinare gli apparati filtranti dei molluschi **Poco novellame, non ci sono avannotterie in Sicilia** La molluschicoltura in Sicilia è rappresentata esclusivamente da due impianti operanti nella Provincia

di Siracusa e due impianti nella Provincia di Messina, dediti alla stabulazione di mitili, quindi non propriamente all'allevamento. Nel complesso questi impianti introducono nel mercato 700 tonnellate di mitili, che rappresentano una quota irrilevante (circa 0,5%) rispetto alla produzione nazionale. La mancanza delle avannotterie è principalmente dovuta al debolissimo tasso di sopravvivenza, a causa delle correnti marine, della qualità dell'acqua e della sua temperatura. L'allevamento in avannotteria consiste nel raggiungere un livello di sofisticazione tecnica che consenta di ridurre l'impatto di questi parametri, in modo da raggiungere un tasso di sopravvivenza industrialmente accettabile. Ecco perché allo stato attuale si rende necessario supportare lo stock allevato di mitili con la semina di giovanili acquistati all'estero prodotti presso alcuni schiudatoi riconosciuti ed autorizzati. Un punto di forza del settore potrebbe essere quello di conferire l'identità territoriale al prodotto ad esempio Cozza siciliana evidenziando una filiera di qualità, controllata seguendo procedure certificate. D'altra parte il punto di debolezza è rappresentato dalla mancanza di massa critica da parte delle aziende a causa della produzione minima e della conseguente possibilità di entrare nel mercato. La realizzazione di consorzi con Enti pubblici scientifici potrebbe essere il volano di questa attività suddividendo la ricerca con l'applicazione direttamente nelle aziende; è chiaro che per arrivare a questo punto occorre sfruttare sia i fondi nazionali messi a disposizione dal MIPAF sia quelli regionali vedi FEAMP. Il ruolo dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia in quest'ottica potrebbe essere quello di favorire il trasferimento tecnologico alle imprese. Costituire una rete produttiva stabile e duratura, favorendo il grado di fiducia che si instaura tra le imprese produttive ed agevolando lo scambio di informazioni e conoscenze, mirando ad una strategia di cooperazione.

Bibliografia

- [1] Bille L., Ceolin C., Dalla Pozza M., Toson M., Trolese M., Arcangeli G. (2013). Risultati del piano di monitoraggio per il controllo delle patologie dei molluschi nel periodo 2007-2012. Atti del II° Convegno Nazionale SIRAM, 23-24
- [2] Bostock et al. (2009). European Aquaculture Competitiveness: Limitations and Possible Strategies. EU Parliament, Bruxelles, pp. 136
- [3] Ismea 2009. Il settore ittico in Italia Check-up 2009, Roma
- [4] Ismea 2013. Il settore ittico in Italia Check-up 2013, Roma
- [5] Meloni D., Mureddu A., Pisanu M., Sferlazzo G., Serra S., Tempesta A., Piras F., Virgilio S., Mazzette R. (2010) "Valutazione dell'efficacia dei sistemi di depurazione nei confronti di E. coli, Salmonella spp e Vibrio spp in mitili allevati nel golfo di Olbia" Il Pesce, 5/10, 165-172
- [6] Rossi R., Paesanti F., Turolla E., (1998) Messa a punto di nuove tecnologie di allevamento di *Mytilus galloprovincialis* e *Modiolus barbatus*. Biol. Mar. Medit 5(3): 1857-1866
- [7] Santulli A., (2011). Capitolo II: l'acquacoltura in Sicilia: analisi del settore. In: "Rapp. Ann. Pesca e Acquacoltura 2010" Distretto Produttivo della Pesca (ED), Palermo. Pp. 27-58
- [8] Serracca L., Ercolini C., Giorgi I., Prearo M., Gallo F., Ceschia G., (2008) Presenza di *Steinhausia mytilovum* in mitili (*Mytilus galloprovincialis*) nel Golfo di La Spezia (Mar Ligure orientale) Ittiopatologia 5: 81-86

Virus a trasmissione alimentare: prevalenza e quantizzazione in molluschi bivalvi al commercio

L. Cozzi¹, F. Capuano², Y.T.R. Proroga², L. Lanni³, G. La Rosa⁴, O. Di Marò², C. Salzano⁵, T. Vicenza¹, C. Santana¹,
G. Bonanno Ferraro⁴, P. Mancini⁴, M. Losardo¹, F. Garofalo², S. Di Pasquale¹, A. Pesce⁵, E. Suffredini¹

¹) Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Roma

²) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento Ispezione Alimenti, Portici (NA)

³) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Sezione di Roma, Roma

⁴) Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Salute, Roma

⁵) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Sezione di Caserta, Tuoro (CE)

Keywords: virus, molluschi, valutazione del rischio

Introduzione

La trasmissione dei virus mediante consumo di molluschi bivalvi è una problematica sanitaria ampiamente documentata e lo studio dei contaminanti virali in tale tipologia di prodotto è essenziale ai fini della definizione di eventuali criteri microbiologici. Scopo del presente lavoro è stata la valutazione della prevalenza, dei trend e dei livelli di contaminazione virale presenti in molluschi eduli lamellibranchi al commercio, includendo i virus di maggior rilievo, quali Epatite A e Norovirus di genogruppo I e II (HAV, NoVGI e NoVGII), alcuni patogeni emergenti quali Epatite E, Astrovirus e Aichivirus (HEV, AV e AiV) ed altri virus raramente ricercati nei bivalvi in Italia come Norovirus GIV, Adenovirus, Cosavirus e Saffold virus (NoVGIV, AdV, HCoV e SaFV).

Summary

Bivalve shellfish may be contaminated with enteric viruses. The aim of this study was the assessment of prevalence, quantitative levels and trends of viral contamination in live bivalve molluscs at market level. Two hundred forty-five samples were collected in Naples district between September 2015 and September 2017. Noroviruses (NoV) were most frequently detected (GI 11.4%, GII 26.9%), followed by Astrovirus (AV: 6.1%), Hepatitis E virus (HEV: 4.5%), Aichivirus (AiV: 2.9%), Hepatitis A virus (HAV) and NoV GIV (0.01% each); Adenovirus, Cosavirus and Saffold virus were never detected. Contamination loads ranged from below the detection limit to 9.800 genome copies/g (g.c./g) for NoV, 27.000 for AV, and 2.100, 1.500 and 990 g.c./g for AiV, HAV and HEV, respectively. Viruses prevalence was not statistically significant different in distinct bivalve species.

Materiali e metodi

Un totale di 245 campioni di molluschi bivalvi sono stati prelevati nell'area metropolitana di Napoli nel periodo compreso fra Settembre 2015 e Settembre 2017. I campioni comprendevano *Mytilus galloprovincialis* (n=168), *Ostrea edulis* (n=32), *Donax* spp. (n=24), *Tapes* spp. (n=18) ed altre specie di minor interesse commerciale (n=3) ed erano stati prelevati in esercizi di vendita al dettaglio (n=112), supermercati (n=39), presso grossisti e mercati ittici (n=66), o in centri di spedizione molluschi (n=17). Relativamente all'origine, 126 campioni (51.4%) erano di produzione locale (Regione Campania), 26 (10.6%) di produzione nazionale e 17 (6.9%) di importazione, mentre per 76 campioni tale informazione non era disponibile. L'estrazione degli acidi nucleici virali era effettuata secondo la ISO 15216-1 [1]. Le analisi per la quantizzazione di HAV, NoVGI e NoVGII, HEV, AV, AiV e per la ricerca di NoVGIV, AdV, HCoV e SaFV erano effettuate mediante real-time (q)PCR e RT-nested-PCR precedentemente descritte [2-8].

Risultati e discussione

La presenza di virus enterici è stata rilevata in 84 dei 245 campioni analizzati (34.3%). I virus più frequentemente rilevati erano i NoV (GI 11.4%, GII 26.9%), seguiti da AV (6.1%), HEV (4.5%), AiV (2.9%) e HAV e NoV GIV (0.01%). AdV, HCoV e SaFV non sono mai stati rilevati. Trentaquattro campioni (13.9%) mostravano copresenza di più di un target virale, di cui 12 (4.9%) contenevano 3 o più virus diversi. Nel periodo di osservazione la concentrazione media delle contaminazioni virali (Tab. 1), espressa come mediana dei campioni positivi, era 170 copie genomiche/g (c.g./g) per NoV, 280 c.g./g per AV, 390 c.g./g per AiV e 260 c.g./g per HEV, mentre la contaminazione media di HAV (620 c.g./g) era significativamente condizionata dal maggiore dei valori dei due soli campioni positivi rilevati. Nel medesimo periodo le concentrazioni virali raggiungevano 9.800 c.g./g per NoV, 27.000 c.g./g per AV, 2.100 c.g./g per AiV, 1.500 c.g./g per HAV, e 990 c.g./g per HEV. Complessivamente, i campioni di *Mytilus galloprovincialis* e *Tapes* spp. mostravano frequenze e livelli di contaminazione superiori rispetto alle specie *Ostrea edulis* e *Donax* spp. (Tab.2), ma le differenze rilevate non erano statisticamente significative (test Chi-quadro, $p > 0.05$).

Per quanto concerne il trend delle contaminazioni (Fig. 1), è possibile notare che, mentre HAV era rilevata sporadicamente, le contaminazioni da NoV, AV e AiV presentavano un andamento stagionale con concentrazioni del virus più elevate in corrispondenza del periodo invernale. Di contro, HEV non mostrava stagionalità, venendo rilevato senza differenze significative nei campionamenti dell'estate 2016 e dell'inverno 2016-2017.

I risultati di questo studio mostrano la presenza di numerose specie di virus nei molluschi oggetto di commercializzazione ed evidenziano la variabilità dei livelli quantitativi e la presenza di trend stagionali per diversi contaminanti virali. Tali informazioni potranno contribuire alla valutazione del rischio di trasmissione alimentare dei virus.

Ringraziamenti: Questa ricerca è stata finanziata dal Ministero della Salute, Ricerca Finalizzata “*Vibrio and viruses in shellfish: old and emerging pathogens. Evaluation of exposure levels for the implementation of prevention strategies*” RF-2011-02349693

Bibliografia

- [1] ISO. 2017. ISO 15216-1 Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 1: Method for quantification
- [2] Garson JA, Ferns RB, Grant PR, Ijaz S, Nastouli E, Szypulska R, Tedder RS. 2012. Minor groove binder modification of widely used TaqMan probe for hepatitis E virus reduces risk of false negative real-time PCR results. *J Virol Methods* 186:157-60.
- [3] Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol* 68:4523-33.
- [4] Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131:65-71.
- [5] Kitajima M, Hata A, Yamashita T, Haramoto E, Minagawa H, Katayama H. 2013. Development of a reverse transcription-quantitative PCR system for detection and genotyping of aichi viruses in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 79:3952-8.
- [6] Le Cann P, Ranarijaona S, Monpoeho S, Le Guyader F, Ferre V. 2004. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res Microbiol* 155:11-5.
- [7] Menage L, Yodmeeklin A, Khamrin P, Kumthip K, Maneekarn N. 2017. Prevalence of human cosavirus and saffold virus with an emergence of saffold virus genotype 6 in patients hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand, 2014-2016. *Infect Genet Evol* 53:1-6.
- [8] Muscillo M, Fratini M, Graffeo R, Sanguinetti M, Martella V, Green KY, Della Libera S, La Rosa G. 2013. GIV Noroviruses in Wastewaters and in Stool Specimens from Hospitalized Patients. *Food Environ Virol* 5(4): 194–202.

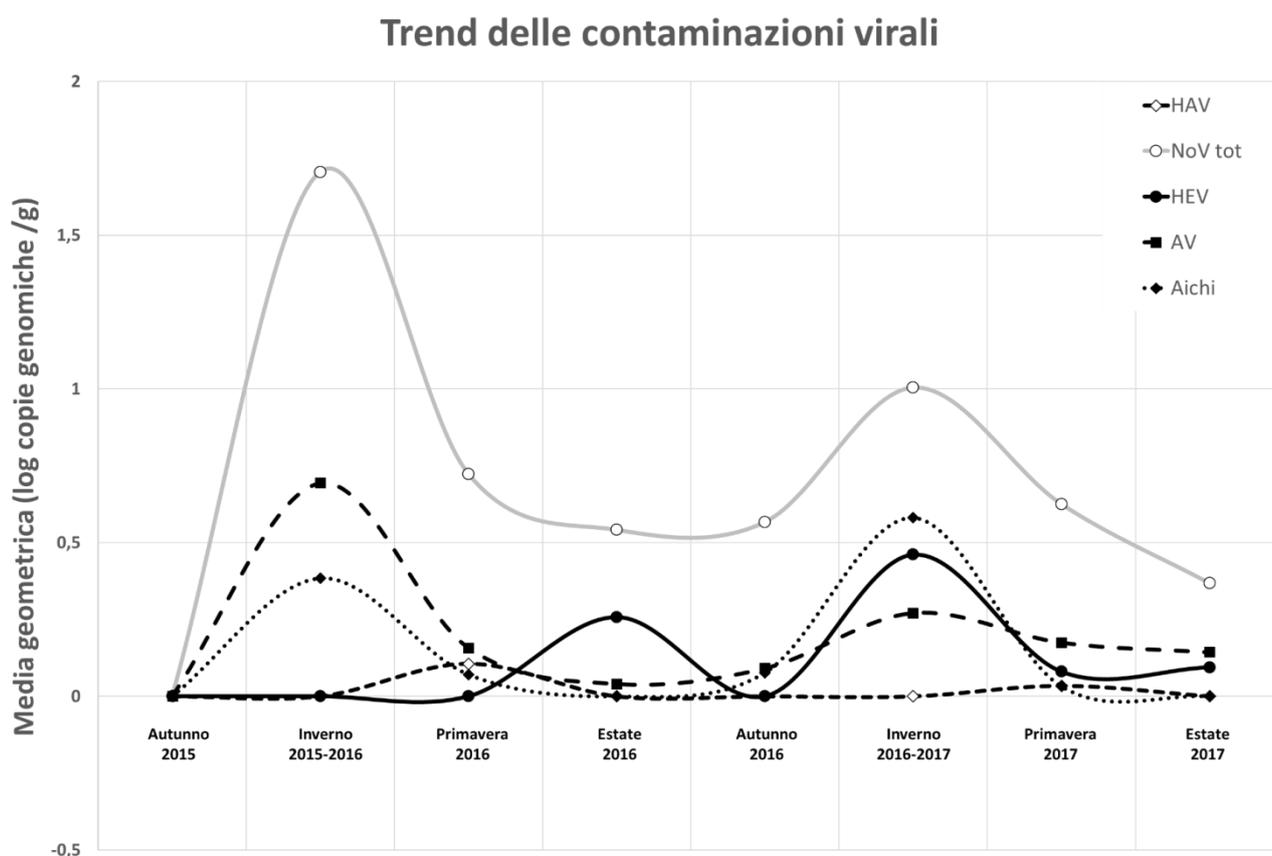
Tabella 1: Prevalenza e livelli quantitativi delle contaminazioni virali nei 245 campioni di molluschi al commercio analizzati nel periodo settembre 2015 – settembre 2017

Virus	N° positivi	Prevalenza [C.I. 95%]	Livello quantitativo delle contaminazioni	
			Mediana ^a	Range
HAV	2	0.01% [0.0%-3.1%]	620	<LOD – 1.500 c.g./g
NoV GI	28	11.4% [8.0%-16.1%]	70	<LOD – 3.600 c.g./g
NoV GII	66	26.9% [21.8%-32.8%]	180	<LOD – 7.400 c.g./g
NoV totale (GI+GII)	71	29.0% [23.7%-35.0%]	170	<LOD – 9.800 c.g./g
HEV	11	4.5% [2.4%-8.0%]	260	<LOD – 990 c.g./g
AV	15	6.1% [3.7%-9.9%]	280	<LOD – 27.000 c.g./g
AiV	7	2.9% [1.3%-5.9%]	390	<LOD – 2.100 c.g./g
NoV GIV	2	0.01% [0.0%-3.1%]	-	-
AdV	0	0.0% [0.0%-1.9%]	-	-
CoV	0	0.0% [0.0%-1.9%]	-	-
SaFV	0	0.0% [0.0%-1.9%]	-	-

^a Mediana dei campioni positivi

Tabella 2: Prevalenza e range delle contaminazioni virali nelle diverse specie di molluschi bivalvi analizzate

Specie	Prevalenza e Range delle contaminazioni						
	HAV	NoV GI	NoV GII	NoV tot	HEV	AV	AiV
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (N=168)	0,6% <LOD – 250	14,9% <LOD – 3.600	30,4% <LOD – 7.400	32,7% <LOD – 9.800	4,2% <LOD – 990	7,1% <LOD – 27.000	3,6% <LOD – 900
<i>Ostrea edulis</i> (N=32)	0,0% -	0,0% -	12,5% <LOD – 110	12,5% <LOD – 110	3,1% <LOD – 220	6,3% <LOD – 380	0,0% -
<i>Donax</i> spp. (N=24)	0,0% -	0,0% -	20,8% <LOD – 100	20,8% <LOD – 100	8,3% <LOD – 880	0,0% -	0,0% -
<i>Tapes</i> spp. (N=18)	5,6% <LOD – 1.500	16,7% <LOD – 1.700	33,3% <LOD – 3.400	38,9% <LOD – 5.100	5,6% <LOD – 50	5,6% <LOD – 60	5,6% <LOD – 2.100

Figura 1: Andamento temporale delle contaminazioni virali (Epatite A, Norovirus, Epatite E, Astrovirus, Aichivirus)

Determinazione del virus dell'Epatite A in molluschi bivalvi mediante Digital PCR

A. Cutarelli¹, E. Suffredini², Y. Proroga¹, L. Cozzi², F. Capuano¹, F. Corrado¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, (Na)

² Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299 – 00161 – Roma

Keyword: Epatite A, HAV, Droplet Digital PCR(ddPCR)

Introduzione

La real-time PCR quantitativa (qPCR) è la tecnica attualmente più utilizzata per analizzare la presenza di acidi nucleici in campioni diagnostici [1][2]. Tale metodo è il gold standard nelle analisi molecolari grazie alla sua accuratezza e precisione, anche se presenta dei limiti rispetto alla quantificazione di target analitici presenti in basse concentrazioni all'interno di campioni complessi. Un altro importante limite, che si traduce anch'esso in una riduzione della sensibilità, è legato alla possibile presenza di inibitori co-estratti insieme agli acidi nucleici target, che possono diminuire l'efficienza di amplificazione.

La digital PCR (dPCR) è un approccio molecolare di ultima generazione che garantisce massima precisione e accuratezza della quantificazione del target senza la necessità di una curva standard di calibrazione, riducendo pertanto i costi di analisi. La "droplet digital PCR" (ddPCR) si basa sulla ripartizione ("partitioning") della reazione in migliaia di goccioline in un'emulsione olio/acqua, la successiva esecuzione dell'amplificazione di polimerizzazione sull'emulsione, ed infine l'analisi delle "droplet" contenenti il target (positive) o non contenenti il target (negative) mediante la statistica di Poisson [3][4]. La droplet digital PCR è una tecnica sviluppata per fornire una quantificazione assoluta di DNA/RNA applicabile in vari ambiti della ricerca e nella diagnostica clinica, ed è in grado di analizzare fino a diecimila repliche dello stesso campione, risultando pertanto particolarmente indicata per la ricerca di eventi rari.

Scopo del presente lavoro è stata l'ottimizzazione e la validazione in-house di un protocollo di ddPCR per la determinazione del virus dell'Epatite A (HAV) in molluschi bivalvi.

Summary

Quantitative PCR (qPCR) is common in molecular analysis [1][2]. It is the gold standard for its accuracy and precision even if it shows limitations when the target is in low concentrations in complex samples. Another important limitation, which translates into a reduction in sensitivity, derives from it being susceptible to inhibitors extracted from the food matrix together with the target nucleic acid.

Digital PCR (dPCR) is a molecular approach for precise and accurate measurements, whose performance allows the maximum efficiency of quantification of the target DNA/RNA, without the need for a standard curve, reference materials, with an overall reduction for analytical costs. The "droplet digital PCR" (ddPCR) is based on the distribution of the sample in thousands of droplets in an oil / water emulsion, the subsequent amplification of the emulsion containing the target nucleic acid, and finally the analysis of the "droplets" containing the target nucleic acid (positive) or not (negative) using Poisson statistics [3][4]. The ddPCR is able to analyze up to ten thousand replicates of the same sample, so it is useful for finding rare events.

Aim of this study was the optimization and in-house validation of a ddPCR protocol for the detection of Hepatitis A virus (HAV) in bivalve molluscs.

Materiali e metodi

L'ottimizzazione del protocollo di ddPCR era effettuata utilizzando un RNA di sintesi (concentrazione iniziale compresa tra 10^6 e 10^8 copie/ μ L) contenente la sequenza target di HAV. Al termine dell'ottimizzazione, la determinazione in ddPCR era effettuata con le seguenti modalità: la miscela di reazione (Bio-Rad ddPCR Supermix 1X, Reverse Transcriptase 40 U, DTT 15 mM, primers 900 nM, probe 250 nM, e 10 μ L di acidi nucleici del campione in un volume totale di 20 μ L) era caricata nell'emulsificatore (Bio-Rad QX-100 Droplet Generator) e le droplets erano generate secondo le istruzioni del produttore. I primers e il probe utilizzati per la ddPCR erano i medesimi descritti per la determinazione di HAV nel metodo di riferimento ISO 15216. Successivamente alla generazione delle droplets, le reazioni erano trasferite in piastre a 96 pozzetti, sigillate termicamente e la reazione di RT-PCR era condotta su termociclatore convenzionale (Applied Biosystems SimplyAmp thermal cycler) con il seguente profilo termico: 60 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 cicli consistenti in 30 sec a 95°C e 1 min a 58°C. La reazione era infine terminata con uno step di 10 min a 98°C. Al termine della reazione le droplets erano analizzate immediatamente o erano conservate a 4°C fino all'analisi (Bio-Rad QX-100 Droplet Reader). Le droplets erano classificate come positive, negative o ambigue in base all'algoritmo del software (Bio-Rad QuantaSoft v 1.2). Gli eventi che, al termine dell'analisi dei dati, rimanevano ambigui erano esclusi dai risultati.

Per la definizione del LOQ della ddPCR l'RNA di sintesi era testato in diverse diluizioni decimali a partire dalla prima diluizione in cui il segnale evidenziava una chiara separazione delle droplet (assenza di saturazione). Per ciascuna diluizione erano state testate sei repliche.

Ai fini della validazione del sistema di ddPCR, era analizzato un panel di 62 campioni di molluschi bivalvi, comprensivo di campioni naturalmente o sperimentalmente contaminati con HAV e di campioni privi di contaminazione. I molluschi erano preparati secondo le modalità descritte nella ISO 15216 [1][2] e gli acidi nucleici erano estratti mediante sistema semiautomatizzato MiniMag (bioMerieux). Gli acidi nucleici erano infine testati in parallelo mediante la real-time RT-qPCR definita nella ISO 15216-1:2017 [1] e con il protocollo di ddPCR ottimizzato.

Risultati e discussione

Il LOQ determinato per la determinazione mediante ddPCR era di 9 copie genomiche (c.g.) per reazione. Nel dettaglio, risultati positivi in tutte le sei repliche analitiche erano ottenuti per le diluizioni corrispondenti alle concentrazioni 10^0 - 10^2 c.g./ μ l, 10^{-1} - 10^1 c.g./ μ l e 10^{-2} - 10^0 c.g./ μ l, con valori medi nelle determinazioni rispettivamente pari a 829, 96 e 9 c.g. per reazione, mentre tutti i replicati della concentrazione di 10^{-3} - 10^{-1} erano negativi.

La validazione del protocollo di ddPCR sul panel di campioni naturalmente e sperimentalmente contaminati evidenziava 29 campioni negativi e 33 positivi in ddPCR, a fronte dei 32 negativi e 30 positivi rilevati mediante real-time RT-qPCR (ISO 15216-1) ottenendo, per la ddPCR, una sensibilità pari a ~97% ed una specificità del ~96%. Si otteneva inoltre una sensibilità relativa (agreement positivo e negativo dei due metodi) del 91.9%. Relativamente ai risultati quantitativi, i due metodi (Fig. 1) mostravano, complessivamente, una elevata correlazione dei valori ottenuti (Pearson correlation coefficient = 0.953); i discostamenti più elevati fra le determinazioni quantitative della ddPCR e del real-time RT-qPCR erano ottenuti in presenza di basse concentrazioni di target analitico, ovvero in prossimità del LOQ dei due metodi. In conclusione, considerando le caratteristiche prestazionali della Droplet Digital PCR (ddPCR), è stato messo a punto un efficace protocollo di rilevazione del virus dell'Epatite A in molluschi bivalvi mediante tale tecnica, ai fini di una possibile applicazione come alternativa al metodo di real-time RT-qPCR descritto nella ISO 15216. Il metodo basato sull'utilizzo della ddPCR potrà essere utilizzato per la ricerca di HAV anche in alimenti di altro tipo, al fine di fornire una migliore performance analitica e garantire la rilevazione di questo patogeno anche in basse concentrazioni.

Bibliografia

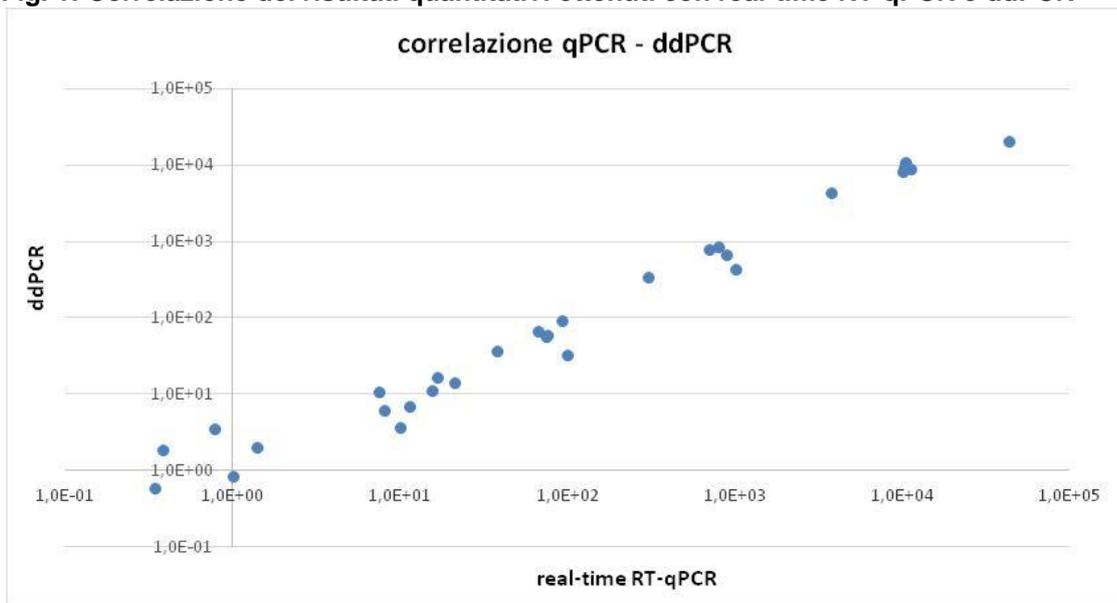
[1] ISO 15216-1:2017 Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification

[2] ISO/TS 15216-2:2013 Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 2: Method for qualitative detection

[3] Nejc Rački, Dany Morisset, Ion Gutierrez-Aguirre, Maja Ravnkar. One-step RT-droplet digital PCR: a breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses. *Anal Bioanal Chem* (2014) 406:661–667

[4] Coralie Coudray-Meuniera, Audrey Fraissea, Sandra Martin-Latila, Laurent Guillierb, Sabine Delannoyc, Patrick Fachc, Sylvie Perellea. A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples. *International Journal of Food Microbiology* 201 (2015) 17

Fig. 1: Correlazione dei risultati quantitativi ottenuti con real-time RT-qPCR e ddPCR



Cinetica di bioaccumulo e depurazione dei molluschi eduli lamellibranchi da virus patogeni: Rotavirus e Norovirus

D. Di Concilio^{1,4}, A. L. Langellotti², A. Martello², I. Di Bartolo³, G. Ianiro³, M. Monini³, G. Galiero¹, G. Fusco¹, M. G. Amoroso¹

¹) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno- Portici (NA)

²) Università degli studi di Napoli "Federico II"- CAISIAL - Portici (NA)

³) Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria (RM)

⁴) Università degli studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Medicina Veterinaria (NA)

Keywords: mussels, Rotavirus, Norovirus

Introduzione

Il consumo alimentare di molluschi bivalvi (MEL) è molto spesso associato all'insorgenza di tossinfezioni umane sia di origine virale che batterica. I molluschi infatti durante il processo di alimentazione filtrano le acque in cui crescono, concentrando al loro interno i microrganismi eventualmente presenti. Se le acque sono contaminate da reflui urbani quindi, i mitili intrappolano tutti i patogeni in esse contenuti, diventando vettori di numerose patologie a trasmissione oro-fecale.

Le norme sanitarie per l'immissione sul mercato dei MEL, in ottemperanza a quanto prescritto dai Reg. UE 854/2004, Reg. UE 2285/2015, Reg. 2073/2005, prevedono il controllo dell'assenza nel prodotto di indicatori di contaminazione fecale quali *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* Tale controllo è efficace nel garantire la salubrità batteriologica dei MEL, mentre è risultato essere non idoneo ad assicurare l'assenza di patogeni virali, come dimostrato da alcuni casi in cui molluschi bivalvi, conformi dal punto di vista legislativo, sono stati associati a focolai di infezione da Norovirus (NoV) ed Epatite A (HAV) (3).

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di studiare, attraverso contaminazione sperimentale, la cinetica con cui alcuni virus patogeni si accumulano nei molluschi insieme alla loro cinetica di depurazione, allo scopo di trovare delle variabili in grado di aumentare la velocità di rimozione del virus. In particolare, sono state studiate le cinetiche di Rotavirus (RV), causa principale di gastroenterite nei soggetti pediatrici Norovirus (NoV), riconosciuto come la prima causa di gastroenterite virale nell'uomo (2). Poiché il Norovirus umano non è coltivabile, negli esperimenti è stato usato un surrogato, il Norovirus murino.

Summary

Freshshellfish belonging to B and C harvesting areas must be depurated prior to commercialization. With respect to viruses, it is well known that depuration is less effective in virus removal, as demonstrated by periodic report of viral gastroenteritis outbreaks linked to the consumption of depurated shellfish. In this study, we evaluated the kinetics by which Norovirus and Rotavirus accumulate in the mussels as well as their removal trend, with the aim to improve the depuration systems in use. Virus quantification analysis was performed by Real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. Depuration trials showed a different behavior for the two viruses under study: Rotavirus being the virus removed from the mussels in a shorter time.

Materiali e metodi

Prove di bioaccumulo e depurazione

Le prove di bioaccumulo per ciascun virus sono state effettuate variando la temperatura dell'acqua (14-18-22°C) e monitorando l'andamento del bioaccumulo nel tempo (fino a 72 ore). La concentrazione impiegata è stata di 10^5 Plaque Forming Units/Litro (PFU/L) per il Rotavirus e 10^6 PFU/L per il Norovirus murino.

Le prove di depurazione sono state effettuate in un impianto di depurazione sperimentale (**Fig. 1**) in vasche da 25 L considerando le seguenti variabili: tempo di depurazione (fino a 9 giorni); presenza di alimentazione microalgale (*Nannochloropsis oculata* o *Phaeodactylum tricornutum*) a diverse concentrazioni (5×10^4 cellule/ml e 2×10^5 cellule/ml); presenza di impianto di ozonizzazione.

Estrazione acidi nucleici e Real Time quantitativa (qRT-PCR)

L'estrazione del virus dai mitili è stata effettuata secondo quanto indicato nella ISO/TS 15216-1:2013. Gli acidi nucleici sono stati estratti usando il sistema di estrazione automatico Qiasymphony (Qiagen) utilizzando il kit DSP Virus/Pathogen Midi kit (Qiagen).

La qRT-PCR è stata eseguita impiegando il kit PCR Real-Time Agpath-ID ONE STEP 2x (Ambion, Applied Biosystem) e primers e sonde riportati in letteratura (1,5).

Allo scopo di quantificare i virus sono state allestite curve standard effettuando diluizioni decimali scalari di uno standard del virus (plasmide) a titolo noto.

Prove di vitalità di Rotavirus e Norovirus murino

I mitili sono stati trattati con Glicina buffer (0.05M Glicina, 0.15M NaCl, pH 9.0) per eluire i virioni vitali dagli epatopancreas. Diluizioni seriali delle sospensioni virali ottenute sono state poi inoculate su monostrati di cellule di MA104 (Rotavirus) e RAW (Norovirus murino). La crescita virale è stata valutata tramite colorazione immunocitochimica con anticorpi specifici.

Risultati e discussione

I risultati del bioaccumulo hanno mostrato un andamento simile per i virus in studio: dopo 1 ora si ha già accumulo del virus nell'epatopancreas degli animali. Dopo un rapido ingresso del virus la sua concentrazione diminuisce leggermente per poi restare pressoché stabile per tutta la durata dell'esperimento (72 h). I risultati hanno mostrato che temperature più alte incrementano la velocità d'ingresso del virus nel mitilo influenzando però negativamente la vitalità dei molluschi. Le prove di depurazione hanno fornito risultati differenti per i 2 virus. Il Rotavirus mostra un'immediata diminuzione dell'RNA virale dopo 1 giorno di depurazione per arrivare ad eliminazione completa dopo 5 giorni di sperimentazione. Il Norovirus murino mostra un andamento altalenante di depurazione, con un decremento iniziale dopo 24 ore, una lieve risalita al 3° giorno, un nuovo abbassamento al giorno 6, un nuovo incremento della concentrazione al giorno 7 ed una definitiva eliminazione del virus al 9° giorno di sperimentazione. I dati sono stati confermati dalle prove di vitalità sulle cellule in cui si è osservata assenza di crescita su monostrati cellulari del Rotavirus al giorno 5 e del Norovirus murino al giorno 9. Le variabili introdotte (ozono e alimentazione microalgale), in successivi esperimenti eseguiti separatamente, non hanno portato significative variazioni all'andamento sopra descritto. Sono in corso ulteriori esperimenti per valutare nuove variabili in grado di migliorare il processo di depurazione e consentire un'eliminazione dei virus più rapida e compatibile con le pratiche commerciali.

Bibliografia

- [1] 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, *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 543-546
- [2] Baker K., Morris J., McCarthy N., Saldana L., Lowther J., Collinson A., Young M. (2011). An outbreak of norovirus infection linked to oyster consumption at a UK restaurant, February 2010, *Journal of Public Health*, 33: 205-211
- [3] Guillois-Bécel Y., Couturier E., Le Saux Jean-Claude, Roque-Afonso A. M., Le Guyader Soizick, Le Goas A., Pernes J., Le Behec S., Briand A., Robert C., Dussaix E., Pommepeuy Monique, Vaillant V. (2009). An oyster-associated hepatitis A outbreak in France in 2007, *Euro Surveill* 14: 19144
- [4] 4. ISO/TS 15216-1:2013: Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 1: Method for quantification
- [5] 5. Zeng S. Q., Halkosalo A., Salminen M., Szakal E. D., Puustinen L., Vesikari T. (2008). One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis, *Journal of virological methods* 153(2): 238-240.



Fig. 1 Sistema di depurazione sperimentale molluschi bivalvi

Rilevazione fenotipica della produzione di β -lattamasi a spettro esteso e AmpC in *Escherichia coli* isolati da alcune zone di produzione di *Chamelea gallina* marchigiane: dati preliminari

E.M. Epifanio¹, S. Orsini¹, C.F. Magistrali¹, L. Marchi¹, F. Agnetti¹, F. Barchiesi¹, C. Francescangeli², M. Latini¹

- 1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell' Umbria e delle Marche "Togo Rosati"
- 2) Veterinario libero professionista – Terni

Keywords: ESBL, AmpC, *Escherichia coli*, *Chamelea gallina*, resistenza

Introduzione

Negli ultimi anni è aumentata la diffusione ambientale di ceppi batterici produttori di beta-lattamasi di classe C (AmpC) non inibite dall' acido clavulanico e attive contro penicilline, cefalosporine a spettro ristretto, cefamicine e cefalosporine di terza generazione. Soprattutto, sono accresciuti i ceppi batterici produttori di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL), ovvero enzimi che conferiscono resistenza oltre che ai beta-lattamici anche a sulfamidici, chinoloni e aminoglicosidi. Queste classi di antibiotici sono di importanza critica nel trattamento delle infezioni umane e animali. Gli *Escherichia coli* rappresentano un serbatoio di determinanti genici responsabili di questo fenomeno di resistenza, e possono avere un ruolo nel trasferirla all'uomo attraverso gli alimenti. Difatti sono stati isolati sia nell' uomo che negli animali (ECDC/EMEA, 2009), e anche in alcuni alimenti (EMA/CVMP/AWP, 2013). Attualmente dati sulla frequenza di *Escherichia coli* produttori di ESBL e AmpC nei molluschi bivalvi in Italia sono carenti. Per questo nell'ambito delle attività di ricerca dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell' Umbria e delle Marche "Togo Rosati", nell' ottica "One health" dell'interazione tra salute umana, animale ed ambientale, si è ritenuto interessante acquisire dati sulla frequenza di questo fenomeno in *Chamelea gallina*, la specie più diffusa ed allevata nelle zone di produzione italiane, anche ai fini epidemiologici.

Summary

The aim of the study was to evaluation of the possible role of bivalve molluscs, in particular clams, as a "biosensor" of antimicrobial resistant microorganisms (AMR) found in the aquatic environment. *Chamelea gallina* is the most widespread species of bivalve molluscs raised in the Italian production areas. The colonization of antimicrobial-resistant bacteria (AMR), often derived from zootechnical wastewater, rivers may include beta-lactam resistant clusters, among which the micro-organisms producing ESBL genes (Extended-Spectrum Beta-Lactamase) and AmpC are of great importance. During the period 2017-2018, 58 *Escherichia coli* strains isolated from *Chamelea gallina* samples from areas with high anthropogenic and zootechnical impact were tested and the extended broad-spectrum beta-lactamases strains were detected. The prevalence of ESBL was of 0,05%. There was no phenotypic indication of the presence of AmpC. Due to the low prevalence, the role of *Escherichia coli* of extended-spectrum beta-lactamase producers isolated in clams is marginal.

Materiali e metodi

Nel periodo compreso da Gennaio 2017 a Ottobre 2018, sono stati testati 58 ceppi di *Escherichia coli* isolati da campioni di *Chamelea gallina* provenienti dai monitoraggi ufficiali delle zone di produzione dell'area di Falconara Marittima (AN) e di San Benedetto del Tronto (AP), considerate zone ad alto impatto antropico e zootecnico, infatti classificate come aree B secondo il reg. CE n. 854/2004. L'isolamento dei ceppi testati è avvenuto su piastre di Agar Triptone Bile Glucoronide (TBX) incubate in aerobiosi a 37°C. L'identificazione di base è stata effettuata mediante colorazione di Gram, test dell'ossidasi, test della catalasi e test biochimici in micrometodo (gallerie API rapid ID32E e API rapid20E). Le colonie sono state testate per l'antibiotico-sensibilità mediante il metodo di diffusione in agar e gli antimicrobici impiegati sono stati i seguenti: Ampicillina (AMP10), Amoxicillina-Acido Clavulanico (AMC 30/10), Cefotaxime (CTX30), Cefepime (FEP30), Cefoxitina (FOX 30), Cefazolina (KZ 30), Ceftazidime (CAZ 30), Cefalotina (KF 30), Ceftiofur (EFT), Cloramfenicolo (C 30), Streptomina (S10), Gentamicina (CN 10), Kanamicina (K 30), Apramicina (APR), Neomicina (N), Spectinomina (SH), Tetraciclina (TE 30), Sulfonamide (S3 300), Trimetoprim/Sulfametossazolo (SXT 25), Acido Nalidixico (NA 30), Ciprofloxacina (CIP 5), Enrofloxacina (ENR 5), Flumequine (UB 30), Aminosidina (AM 60). Sono stati successivamente rilevati fenotipicamente gli *Escherichia coli* produttori di ESBL e AmpC mediante il test della sinergia del doppio disco descritto da Jarlier et al. (1988), ovvero un classico test di diffusione in agar in cui dischetti antibiotati delle Cefalosporine Cefotaxime (CTX30), Cefepime (FEP30), Ceftazidime (CAZ 30), Cefoxitina (FOX 30), Cefotazidime (CAZ) sono stati posti ad una distanza di 20 mm vicino ad Amoxicillina Acido Clavulanico (AMC 30/10). La visualizzazione di un' espansione dell' alone di inibizione tra il β lattamico e l'Acido Clavulanico di aspetto frastagliato simile al tappo di uno spumante ha rilevato fenotipicamente la produzione di β -lattamasi a spettro esteso. Contemporaneamente si è deciso anche di determinare la più bassa

concentrazione (MIC) dell' antibiotico Colistina, diluito in brodo a concentrazione scalare, capace di inibire la crescita di *Escherichia coli*. La lettura della prova si è eseguita considerando la minima concentrazione inibente (MIC), ovvero il valore della concentrazione di antibiotico alla quale non si è osservata più crescita dell'isolato in esame. La classificazione degli isolati come resistenti si è basata su valori di MIC secondo i criteri dell'EUCAST (R: MIC > 2 mg / L).

Risultati e discussioni

Dei 58 ceppi di *Escherichia coli* testati soltanto tre hanno presentato il fenotipo ESBL (prevalenza 0,05%). Due dei tre ceppi provenivano dalla zona di Falconara Marittima. La prevalenza di ESBL a cui si riferiscono i dati è quella derivante da una procedura selettiva di coltura, che è volta ad individuare anche i campioni in cui sia presente una carica bassa di ESBL ed è la stessa utilizzata nel monitoraggio europeo per l'antibiotico-resistenza. E' interessante notare come nei ceppi di *Escherichia coli* isolati con profilo ESBL positivo si sono evidenziate resistenze multiple ad almeno tre classi di antibiotici (chinoloni, aminoglicosidi e sulfamidici), dato comunemente riscontrato nei batteri produttori di ESBL. Quindi l'impiego di molecole diverse dalle cefalosporine può determinare l'emergere e il diffondersi di ceppi ESBL attraverso un fenomeno di co-selezione. La resistenza alla Cefoxitina (FOX) associata alla sensibilità al Cefepime (FEP) (Cefalosporina di quarta generazione) può essere un' indicazione fenotipica della presenza di AmpC. Dai dati ottenuti dal presente studio si evince che, al momento, nei molluschi bivalvi non vi è tale rilevazione in quanto assenti tali associazioni (resistenza alla Cefoxitina (FOX) e sensibilità al Cefepime (FEP)). Nessun ceppo ha mostrato resistenza alla Colistina: i valori delle MIC sono risultati tutti <1. Il problema degli ESBL è legato anche alla possibilità di subire mutazioni come i derivati da TEM SHV (TEM-1, TEM-2, SHV-1) che ne ampliano lo spettro, oppure attraverso il trasferimento genico orizzontale nel gruppo CTX-M, PER, GES e VEB. Sarà un obiettivo futuro quello di valutare i determinanti genici di resistenza nei campioni di *Escherichia coli* isolati con fenotipo ESBL.

Conclusioni

Ad oggi, vista la bassa prevalenza, il ruolo di *Escherichia coli* produttori di beta-lattamasi a spettro esteso isolati nelle vongole è marginale. Appare nulla anche l'influenza di *Escherichia coli* produttori di beta-lattamasi di classe C (AmpC) in tali specie ittiche. Tali prodotti crudi o la loro manipolazione potrebbero trasmettere all' uomo *Escherichia coli* commensali provvisti di geni di resistenza facilmente trasmissibili a microrganismi patogeni presenti nel tratto intestinale umano. I dati ottenuti consentono inoltre di evidenziare lo scarso ruolo dei molluschi bivalvi quali sensori della contaminazione ambientale da batteri resistenti agli antimicrobici e, in senso lato, da geni portatori di resistenze antimicrobiche.

Bibliografia

- [1] ECDC/EMA (2009). The bacterial challenge: time to react – a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. Stoccolma; 13. 91
- [2] EFSA BIOHAZ Panel, 2011. 'Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals', EFSA Journal, Vol. 9(8):232
- [3] EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. EFSA Journal 2018;16 (2):5182, 270 pp.<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5182>
- [4] EMA/CVMP/AWP (2013). Reflection paper on the risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals; 8-13
- [5] P. Legrand G. Fournier A. Buré V. Jarlier M. H. Nicolas D. Decré J. Duval A. Philippon (1988). Detection of extended broad-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in four French hospitals. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Volume 8, Issue 6, pp 527–529
- [6] Regolamento (CE) del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 n. 854. "Norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano". G.U.U.E. L139 del 30/04/2004
- [7] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0, July 2017.<http://www.eucast.org>
- [8] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>

Determinazione della presenza di metalli pesanti in molluschi bivalvi raccolti in sistemi lagunari della Sardegna ad elevato valore naturalistico

G. Esposito¹, M. C. Abete², D. Meloni¹, G. Colombero², M. Mantia², A. G. Mudadu³, A. M. Bazzoni³, S. Ortu⁴, M. Prearo², S. Squadrone²

¹) Università degli Studi di Sassari, Dipartimento di Medicina Veterinaria, Sassari

²) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

³) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

⁴) Parco Naturale Regionale di Porto Conte, Alghero (SS)

Keywords: metalli pesanti, molluschi bivalvi, laguna

Introduzione

Gli ambienti umidi della Sardegna (lagune e stagni costieri) sono riconosciuti a livello nazionale e comunitario come ambienti umidi di elevato pregio naturalistico e che rappresentano ecosistemi ad elevata biodiversità [1]. La gran parte degli ambienti umidi sono localizzati nel golfo di Oristano e nel golfo di Cagliari [1]. Nel resto dell'isola sono distribuite zone umide di minore estensione [1]. Molti sistemi lagunari, a causa della difficoltà di conciliare diverse esigenze di natura economica, soffrono sulle loro sponde di una forte presenza di attività umane (cantieri/usi civici/attività turistiche) che possono determinare conflitti con la destinazione d'uso rivolta alla produzione primaria ed alla conservazione ambientale [1]. Tuttavia, diverse lagune rivestono ancora una notevole importanza per la pesca professionale e l'acquacoltura e sono sede di attività turistiche e ricreative sostenibili. Proprio grazie al loro secolare utilizzo, molti di questi ambienti sono stati preservati e conservati come ecosistemi naturali. La gestione produttiva, basata essenzialmente sullo sfruttamento delle risorse ittiche, ha consentito la loro conservazione, ponendo un freno alle politiche di bonifica fondiaria avviate su tutte le zone umide italiane, dall'inizio del secolo scorso [1]. Delle numerose zone umide presenti nell'isola, circa 30 sono rilevanti dal punto di vista della produzione ittica. La loro gestione è solitamente affidata a cooperative o consorzi di pescatori che esercitano le attività di pesca perlopiù con tecniche tradizionali. I prodotti ittici simbolo della pesca lagunare in Sardegna sono i muggini e le anguille [1]. Tra i molluschi bivalvi, le vongole veraci, le ostriche e i mitili sono le specie più pregiate e si rinvencono sia nei banchi naturali sia come prodotti di acquacoltura. Tra gli ecosistemi ad elevato valore naturalistico della Sardegna, la laguna del Calich (Alghero, SS) situata nella Sardegna nord-occidentale, è uno dei principali. Attualmente non è una zona classificata per la produzione dei molluschi bivalvi [2] e per quelli presenti in banchi naturali (vongole veraci, mitili, ostriche e cuori), vige il divieto di raccolta e commercializzazione. Lo scopo del presente studio è la preliminare verifica della qualità delle acque della laguna del Calich e nello specifico, la determinazione della presenza di metalli pesanti in mitili (*Mytilus galloprovincialis*) raccolti da banco naturale. Avvalendosi di organismi "sensibili" in grado di fungere da indicatori della qualità ambientale e di fornire utili informazioni sulle ripercussioni biologiche dei contaminanti biotici ed abiotici sulla salute dell'uomo, il biomonitoraggio mediante molluschi bivalvi è uno degli approcci più completi per valutare l'inquinamento degli ambienti lagunari ed i suoi potenziali effetti biologici.

Summary

The aim of the study was to evaluate the presence of trace elements in natural Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) populations collected from the Calich Lagoon in the western Mediterranean (Sardinia, Italy). The Calich Lagoon plays a central role in contributing to biodiversity and protecting natural habitats. The lagoon receives an extensive freshwater inflow from fluvial tributaries. The contribution of marine and fresh waters determines a high productivity. Despite its great potential and presence of natural bivalves, the waters of the lagoon have not been yet classified for shellfish farming. Samples of Mediterranean mussels were collected during early spring and summer 2017. The concentration of 16 trace elements (Al, Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sn, Tl and Zn) was quantified. The legal limits set by European Regulations for cadmium, mercury and lead were never exceeded. The highest values of metal pollutants have been reported for Aluminium and Iron (mean 35.5 ± 13.85 mg kg⁻¹ wet weight) and Zinc (mean 25 ± 10.25 mg kg⁻¹ wet weight).

Materiali e metodi

La laguna del Calich è un ecosistema lagunare tutelato con vincolo paesaggistico, classificato zona sensibile dalle normative comunitarie ed inserito nel Parco Regionale di Porto Conte. La laguna si estende per una superficie di 92 ettari e per una lunghezza di 2.650 m parallelamente alla linea di costa dalla quale dista in media 400 m. La laguna è collegata al mare attraverso un canale naturale dove si trova un porticciolo per imbarcazioni turistiche e da pesca. Nel complesso, il bacino idrografico della laguna del Calich (circa 42.500 ha) risulta caratterizzato da un'elevata attività agricola e zootecnica. Attraverso i suoi principali immissari viene inoltre riversata nella laguna tutta la pressione umana indotta da scarichi civili ed industriali derivanti

da frazioni e centri abitati circostanti. Ai fini di raccogliere dati preliminari in merito alla presenza di metalli pesanti in mitili (*Mytilus galloprovincialis*), sono state programmate due sessioni di campionamento durante la primavera e l'estate del 2017. Quattro campioni di mitili sono stati prelevati presso il principale banco naturale presente nella laguna e dopo il campionamento, sono stati immediatamente trasportati in laboratorio in contenitori refrigerati, dove la porzione commestibile di ciascun mollusco è stata separata dalle conchiglie per le successive analisi chimiche. La quantificazione del mercurio (Hg) è stata effettuata mediante Analizzatore Diretto di Mercurio (DMA80, Milestone, Shelton, CT, USA) [3]. Gli elementi traccia residui (Al, Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Sn, Tl e Zn) sono stati quantificati mediante Spettrometro di Massa a Plasma ad Accoppiamento Induttivo (ICP-MS Xseries II, Thermo Scientific, Brema, Germania) [4].

Risultati

Le concentrazioni dei metalli sono riportate in Tabella 1 e Tabella 2. I risultati sono espressi come valore medio \pm deviazione standard (ds). Per quanto riguarda gli elementi in traccia tossici per gli organismi viventi (Tabella 1) anche a basse concentrazioni (*alluminio, arsenico, cadmio, piombo, mercurio, argento e stagno*), il Reg. 1881/2006 definisce i limiti massimi per Cadmio, Piombo e Mercurio nei molluschi, mentre non ci sono ancora limiti stabiliti dall'UE per gli altri metalli negli alimenti. I livelli riscontrati per Cd ($0,057 \pm 0,031$ mg kg⁻¹), Hg ($0,017 \pm 0,000$ mg kg⁻¹), Pb ($0,057 \pm 0,031$ mg kg⁻¹) erano ben al di sotto dei limiti legali. I livelli più elevati sono stati riscontrati per Al ($35,5 \pm 13,85$). La quantificazione degli elementi in traccia essenziali (*cobalto, cromo, rame, ferro, manganese, nichel, selenio e zinco*) non ha evidenziato la presenza di valori potenzialmente dannosi per gli esseri umani (Tabella 2). I livelli più elevati sono stati riscontrati per Fe ($35,5 \pm 13,85$ mg kg⁻¹) e Zn ($25 \pm 10,25$ mg kg⁻¹). I risultati confermano l'efficacia dei molluschi bivalvi come bioindicatori della presenza di inquinanti metallici nei sistemi lagunari.

Discussione

L'ecologia attuale della laguna del Calich suggerisce che, un modello di sfruttamento produttivo compatibile con l'ecosistema lagunare, potrebbe essere la sua classificazione come zona di produzione e l'implementazione della molluschicoltura di tipo estensivo, migliorandone le capacità produttive mediante "semina" di specie pregiate (ostriche, mitili, vongole veraci). La conoscenza e la comprensione dei processi ecologici sono uno strumento indispensabile per favorire l'uso sostenibile dell'ambiente lagunare, valutare eventuali cambiamenti in atto, conservarne la biodiversità e mitigare gli effetti di alterazioni negative indotte dalle attività antropiche. Nonostante i recenti cambiamenti dovuti all'intervento dell'uomo e l'immissione di scarichi urbani, agricoli, zootecnici, nonché di detriti provenienti da tutto il bacino imbrifero, la laguna del Calich riveste ancora oggi una grande importanza naturalistica ed economica, che necessita di essere tutelata attraverso l'implementazione di modelli di gestione produttiva eco-compatibili.

Tabella 1

Concentrazione degli elementi in traccia *non essenziali* in mitili (*Mytilus galloprovincialis*) della laguna del Calich (mg kg⁻¹)

	Ag	Al	As	Cd	Hg	Pb	Sn
media\pmds	0,0205 \pm 0,006	35,5 \pm 13,85	1,45 \pm 0,235	0,057 \pm 0,031	0,017 \pm 0,000	0,057 \pm 0,031	0,019 \pm 0,003

Tabella 2

Concentrazione degli elementi in traccia *essenziali* in mitili (*Mytilus galloprovincialis*) della laguna del Calich (mg kg⁻¹)

	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Se	Tl	Zn
media\pmds	0,0545 \pm 0,011	0,105 \pm 0,024	2,5 \pm 1,76	35,5 \pm 13,85	2,55 \pm 0,89	0,14 \pm 0,0325	0,645 \pm 0,103	0,006 \pm 0,000	25 \pm 10,25

Bibliografia

[1] Agenzia Regionale Laore Sardegna/Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna (2014). Stagni e lagune produttive della Sardegna. Tradizioni, sapori e ambiente. Agenzia Regionale Laore Sardegna, 1-72.

[2] EU Council. (2004). Regulation (EC) No 854/2004 of the European parliament and of the council of 29th April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. Official Journal of the European Union, Series, L 226, 83e127, 25.06.04. (2004). Regulation (EC) No 853/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Official Journal of the European Communities, Series L, 139, 55e205. http://europa.eu.int/eurllex/pri/de/oj/dat/2004/l_139/l_13920040430de00550205.pdf, 30.4.04.

[3] Esposito, G., Meloni, D., Abete, M.C., Colombero, G., Mantia, M., Pastorino, P., Prearo, M., Pais, A., Antuofermo, E., Squadrone, S. (2018). The bivalve *Ruditapes decussatus*: A biomonitor of trace elements pollution in Sardinian coastal lagoons (Italy). *Environmental Pollution* 242, 1720-1728

[4] Squadrone, S., Brizio, P., Stella, C., Prearo, M., Pastorino, P., Serracca, L., Ercolini, C., Abete, M.C. (2016). Presence of trace metals in aquaculture marine ecosystems of the northwestern Mediterranean Sea (Italy). *Environmental Pollution* 215, 77-83

***Haplosporidium* sp. (Ascetosporea: Haplosporidiidae) come causa di mortalità di massa di *Pinna nobilis* (L.) a Taranto e in Toscana**

G. Fanelli¹, F. Rubino¹, B. Paoletti², L. Della Salda², F. Mosca², S. Morelli², G. Denti¹, G. Marino³, T. Pretto⁴, F. Susini⁵, G. Arcangeli⁴, P.G. Tiscar²

¹ CNR-IRSA, Talassografico “A. Cerruti” - Taranto

² Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria – Teramo

³ ARPAT, settore mare - Livorno

⁴ Centro Referenza Nazionale per le malattie dei pesci, molluschi e crostacei, IZSve – Legnaro (PD)

⁵ Istituto Zooprofilattico Lazio e Toscana - Pisa

Keywords: *Haplosporidium* sp., *Pinna nobilis*, Mortalità di massa

Summary

A severe mass mortality of *Pinna nobilis*, listed as protected species under the Directive 92/43/EEC, is occurring through the entire Mediterranean basin. The infection, recorded for the first time along the Spanish coasts, is caused by *Haplosporidium pinnae*. Samples consisting in suffering *Pinna nobilis* specimens and coming from Taranto (n= 3), Trieste (n= 1) and Tuscany (n= 1) were examined by cytological, histological and PCR amplification means.

Whereas the Trieste specimen resulted negative to the infection, the Taranto and Tuscany molluscs showed the presence of mononucleate and binucleate cells and multinucleate plasmodial forms mainly inside the digestive gland. Furthermore, the specific PCR amplification conducted on the 3 samples coming from Taranto supported that the parasite belongs to the haplosporidian group.

The obtained results suggest a strong aetiological relationship between the Spanish infection and the Ionian and Tyrrhenian mortality. Considering the high ecological role of *Pinna nobilis* and the protection problems as well, measures finalized to preserve the specie should be planned.

Riassunto

Nel Mediterraneo è in atto una mortalità di massa di *Pinna nobilis*. Questo mollusco, icona del Mediterraneo e specie di interesse comunitario che richiede una protezione rigorosa (“Direttiva Habitat”, 92/43/CEE), è oggetto di una patologia sostenuta da *Haplosporidium pinnae* (Ascetosporea: Haplosporidiidae) che ha iniziato a manifestarsi nel 2016 lungo le coste spagnole per poi estendersi, fino a questo momento, alle coste del Tirreno e dello Ionio.

Nei Mari di Taranto negli ultimi 10 anni si è assistito ad un notevole e diffuso ripopolamento di questa specie con densità che in alcuni siti raggiungevano 10 ind./mq.; a partire da aprile 2018, però, si è cominciata ad osservare una mortalità che progressivamente è andata aumentando, interessando nel mese di luglio la quasi totalità degli individui.

Durante il mese di agosto nei Mari di Taranto sono stati raccolti tre individui vivi ma in evidente stato di sofferenza, sui quali sono stati condotti esami citologici, istologici ed analisi molecolari.

Inoltre, su un esemplare proveniente dal golfo di Trieste e su un altro raccolto presso l'isola di Gorgona (Toscana) durante il mese di settembre, ambedue apparentemente moribondi, sono stati condotti esami citologici e istologici.

Mentre nel campione proveniente da Trieste non si sono evidenziati patogeni, nei tre individui originari di Taranto si sono potute evidenziare cellule mononucleate, binucleate e forme plasmodiali multinucleate, specialmente nelle ghiandole digestive, associate a fenomeni degenerativi; altrettanto si è riscontrato nel soggetto proveniente dalla Toscana.

Utilizzando, infine, una PCR specifica per amplificare un frammento di circa 300bp di *Haplosporidium* sp., tutti i campioni di Taranto hanno prodotto la banda attesa.

I risultati ottenuti portano a considerare una forte correlazione di causa tra le mortalità di massa registrate in Spagna e quelle presenti a Taranto e in Toscana.

Visto il notevole ruolo ecologico rivestito da *Pinna nobilis*, oltre che per le sue valenze nei termini di protezione, dovranno essere messe in atto importanti azioni al fine della salvaguardia di questa specie.

Correlazione tra contaminanti ambientali e virus enterici in cozze (*Mytilus galloprovincialis*)

F. Fiorito, M.G. Amoroso, S. Lambiase, F.P. Serpe, B. Cioffi, T. Bruno, R. La Nucara, D. Capozzo, P. Maglio, A. Scaramuzzo, G. Galiero, M. Esposito and G. Fusco

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA)

Keywords: cozze, PCB-NDL, IPA, Cd, NoV, AsV; RV

Introduzione

I molluschi bivalvi sono considerati un buon modello per valutare la qualità dell'acqua di mare, mostrando sia una vita sedentaria che la capacità di accumulare xenobiotici e o enormi quantità di microrganismi nei loro tessuti. Infatti, i mitili sono esposti a contaminanti organici, come i bifenili policlorurati non diossina-simili (PCB-NDL) e gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), provenienti da centrali termiche a carbone, fuoriuscite di petrolio, rifiuti civili ed industriali. Questi composti rappresentano un gruppo prioritario nella valutazione dei rischi di effetti avversi sulla salute a lungo termine, sia nei vertebrati che negli invertebrati, poiché potenzialmente genotossici e cancerogeni. Inquinanti inorganici, come il cadmio (Cd), spesso rilasciati ad alte concentrazioni da effluenti industriali e domestici, si accumulano nei mitili. Nell'uomo e negli animali, il Cd può danneggiare organi come reni, fegato, polmoni, ossa e sistema nervoso centrale. Inoltre, i PCB, così come gli IPA ed il Cd, possono provocare tossicità riproduttiva ed immunosoppressione [1,2].

I molluschi bivalvi per la loro capacità filtrante sono in grado di accumulare i virus eventualmente presenti nelle acque in cui sono allevati. Pertanto, se le acque sono contaminate da reflui urbani i mitili possono concentrare i patogeni enterici circolanti nell'ambiente marino e rappresentare un pericolo per la salute del consumatore, specialmente se consumati crudi o poco cotti, come vuole la tradizione. Virus quali *norovirus* (NoV), *rotavirus* (RV), *astro virus* (AsV), sono infatti stati associati ad insorgenza di gastroenterite legata al consumo di molluschi contaminati [3, 4].

Evidenze emergenti indicano che l'esposizione a basse dosi d'inquinanti ambientali potrebbe influenzare il sistema immunitario, umano e animale, inducendo un'aumentata suscettibilità agli agenti infettivi [5,6]. In questo studio, con l'obiettivo di garantire la sicurezza alimentare umana, per la prima volta a nostra conoscenza, abbiamo effettuato, simultaneamente, sia la valutazione chimica di diversi contaminanti che indagini microbiologiche, ed abbiamo cercato di stabilire una relazione tra contaminazione ambientale e virale in campioni di cozze *Mytilus galloprovincialis*.

Summary

Bivalve as mussels can be affected by environmental contaminants, as non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (NDL-PCBs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and cadmium (Cd). Moreover, mussels may concentrate human enteric viruses, if harvested in polluted marine waters. In this work, to establish a relationship between environmental and viral contamination, with the aim to ensure human food safety, herein for the first time, both chemical and virological analysis were carried out in mussels *Mytilus galloprovincialis*, farmed in Campania region. Chemical analysis revealed ranges below the European maximum limits, and were: $\sum 6$ NDL-PCBs (28, 52, 101, 138, 153, 180) 0.579-16.857 ng g⁻¹ wet weight (ww); BaP LOQ (<0.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$)-2.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ww, and $\sum 4$ PAHs (BaA, CHR, BbFA, BaP) 0.7-23.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ww; Cd LOQ (<0.005 mg kg⁻¹)-0.078 mg kg⁻¹ ww. Biomolecular analysis showed that all the four viruses investigated (Noroviruses GI and GII, AsV and RV) were found in the mussels, with prevalence varying from 18% (NoVGI), to 43%(NoVGI) and with the presence of more than one virus in about 35% of the samples. Overall, a simultaneous contamination, both chemical and viral, was found in 62% of samples. Interestingly, virus-positive mussels showed levels of chemicals higher than negative ones.

Materiali e metodi

Quaranta campioni di cozze (pool da 60 cozze/campione) sono stati raccolti da diversi impianti di acquacoltura (sia di classe A che B) in regione Campania, da Marzo a Settembre 2015. Le 12 zone interessate dal campionamento, indicate da un piano di monitoraggio regionale ufficiale, coprivano un'area costiera da Varcaturato a Castellammare di Stabia e sono state suddivise in tre siti: sito 1 litorale Domitio, sito 2 Golfo di Pozzuoli e sito 3 Golfo di Napoli (Fig. 1). I campioni sono stati valutati attraverso analisi chimiche e microbiologiche, utilizzando metodi validati. In particolare, sono state condotte analisi chimiche sulla porzione edule, ed indagini virologiche sull'epatopancreas. L'analisi dei PCB-NDL è stata eseguita mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione [7]. La determinazione degli IPA è stata effettuata tramite HPLC-FLD [1,2]. Il Cd è stato analizzato mediante assorbimento atomico (GF-AAS) [4]. Le indagini virologiche sono state effettuate mediante Real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) [8].

Risultati e discussione

In tutti campioni analizzati, i livelli di PCB-NDL, IPA e Cd erano conformi ai limiti stabiliti dalla normativa comunitaria [9]. In particolare, la $\Sigma 6$ PCB-NDL (28, 52, 101, 138, 153, 180) variava da 0,579 a 16,857 ng g⁻¹ di peso umido (ww), i tenori di BaP nel range LOQ (<0.2 µg kg⁻¹)-2.9 µg kg⁻¹ ww e la $\Sigma 4$ (BaA, CHR, BbFA, BaP) era compresa tra 0,7 e 23,7 µg kg⁻¹ ww, con valori simili a quelli riscontrati in cozze campionate nella stessa area nelle stagioni primavera-estate. Infatti, da studi recenti emerge la stagionalità dei livelli di IPA nelle stesse aree di campionamento, dove le concentrazioni più basse sono state rilevate in primavera-estate, mentre i livelli più alti nelle stagioni autunno-inverno. Tale fenomeno è dovuto sia al ciclo di riproduzione, sia al contributo di IPA pirolitici nell'atmosfera dagli impianti di riscaldamento [2]. I livelli di Cd variavano tra il LOQ (<0,005 mg kg⁻¹) e 0,078 mg kg⁻¹ ww.

Complessivamente, l'analisi qRT-PCR ha evidenziato la presenza dei seguenti virus enterici: NoVGII (43%), AsV (40%), RV (30%) e NoVGI (18%), con una prevalenza di NoVGII e AsV [3]. Inoltre, in circa il 35% dei campioni è stata rilevata la presenza simultanea di almeno due dei quattro virus analizzati. Per quanto riguarda l'analisi quantitativa, il RV ha mostrato le concentrazioni più elevate in 4 campioni (tutti appartenenti ad aree di classe B) 10³ copie di RNA/grammo (c g⁻¹) di epatopancreas. La concentrazione di AsV variava da 5.2x10¹ c g⁻¹ a 7.1x10² c g⁻¹ con 10 campioni che mostravano circa 10² c g⁻¹ di virus. NoVGII è stato identificato con una concentrazione variabile che raggiunge 3,5x10² c g⁻¹ (valori più alti solo in 3 campioni). NoVGI ha mostrato il numero di copie più basso/g raggiungendo 1x10² solo in un campione. La concentrazione di tutti i virus testati era piuttosto bassa nei campioni appartenenti alle aree di classe A, con un solo campione, dal sito 2, con 10² c g⁻¹ di NOGII e RV e 1 campione con 10² c g⁻¹ di AsV. Tuttavia, tra i campioni analizzati, tre (uno dal sito 1 e due dal sito 2, rispettivamente), erano particolarmente preoccupanti, poiché mostravano la presenza simultanea di tutti e quattro i virus esaminati a concentrazione compresa tra 1 (NoVGI) e 1,5x10³ (RV) c g⁻¹.

È interessante notare che le cozze positive ai virus hanno mostrato livelli di PCB, PAH e Cd superiori a quelli riscontrati in campioni negativi (38%). I valori di contaminazione chimica più elevati sono stati rilevati in campioni prelevati dal sito 2 [2]. È stato ipotizzato che il cambiamento dei livelli di contaminazione dei siti analizzati potrebbe essere dovuto al particolare inquinamento del sito 2. In effetti, in un recente studio sui livelli di contaminazione e la tossicità dei sedimenti e dell'acqua delle aree costiere del sito 2 [11], è stato riportato un inquinamento antropogenico significativo, dovuto sia a flussi inorganici che organici nei sedimenti, derivanti dall'area industriale dismessa di Bagnoli. Inoltre, anche la maggiore prevalenza di virus enterici analizzati è stata osservata in campioni raccolti dal sito 2.

I contaminanti sono frequentemente rilevati nell'ambiente marino e rappresentano un potenziale rischio per gli organismi marini, in particolare i bivalvi. Complessivamente, i dati disponibili supportano l'idea che l'esposizione ai contaminanti ambientali possa portare ad una maggiore suscettibilità agli agenti infettivi [5,6]. Inoltre, l'aumento di inquinanti nell'ambiente, può indurre nelle cozze alterazioni fisiologiche che potrebbero compromettere il loro sistema immunitario innato e portare a malattie opportunistiche, così come raggiungere gli umani attraverso la catena alimentare [5,6]. A questo proposito, è importante sottolineare che l'accumulo di virus nei bivalvi sembra essere dovuto non al filtraggio passivo bensì all'interazione attiva tra il virus e particolari ligandi (A-like antigens) presenti nelle cellule gastroenteriche dell'animale [11]. Questo potrebbe supportare l'idea che gli inquinanti ambientali, alterando il sistema immunitario dei bivalvi, potrebbero anche influenzare la quantità di virus presente nell'animale. Qui, per la prima volta, una correlazione tra contaminazione ambientale e virale è stata trovata nel 62% delle cozze campionate.

La valutazione dei contaminanti chimici negli organismi marini è un primo passo fondamentale per comprendere il possibile impatto dell'inquinamento sulle specie marine. Tuttavia, questo approccio dovrebbe essere combinato con approcci microbiologici volti a misurare la risposta degli organismi ad altri insulti ambientali. Infatti, la presenza simultanea di indicatori microbiologici e chimici può fornire informazioni sulla biodisponibilità dei contaminanti e l'integrazione degli effetti di esposizioni multiple nel tempo. Possono rappresentare un sistema di allarme molto efficace e sensibile per effetti negativi a lungo termine. I molluschi bivalvi marini sono utili sentinelle di contaminazione delle acque perché sono sedentari, filtrano grandi volumi di acqua di mare e accumulano alte concentrazioni d'inquinanti chimici e di virus. Quindi, gli studi di monitoraggio in mitili possono essere utili al fine di verificare sia la quantità di contaminanti che la presenza di virus enterici per prevenire il consumo di alimenti contaminati e rischi legati alla sicurezza alimentare.

Bibliografia

- [1] Serpe, F.P., Esposito M., Gallo, P., Salini, M., Maglio, P., Hauber, T., Serpe L., (2010). Determination of heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in *Mytilus galloprovincialis* from Campania coasts, Italy. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19, 2292- 2296.
- [2] Esposito, M., Perugini, M., Lambiase, S., Conte, A., Baldi, L., Amorena, M., (2017). Seasonal Trend of PAHs Concentrations in Farmed Mussels from the Coastal Areas of the Naples, Italy. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 99, 333-337.
- [3] Alfano-Sobsey, E., Sweat, D., Hall, A., Breedlove, F., Rodriguez, R., Greene, S., et al. (2012). Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiology and Infection*, 140(2), 276-282.
- [4] Iritani, N., Kaida, A., Abe, N., Kubo, H., Sekiguchi, J., Yamamoto, S. P., et al. (2014). Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka city, Japan. *Journal of Medical Virology*, 86(12), 2019-2025.
- [5] Renault, T., (2015). Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 88-93.
- [6] Fiorito, F., Santamaria, R., Irace, C., De Martino, L., Iovane, G., (2017). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and the viral infection. *Environ. Res.* 153, 27-34.
- [7] Esposito, M., Serpe, F.P., Diletti, G., Messina, G., Scortichini, G., La Rocca, C., Baldi, L., Amorena, M., Monda, M., (2014). Serum levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in a population living in the Naples area, southern Italy. *Chemosphere* 94, 62-69.
- [8] Fusco, G., Di Bartolo, I., Cioffi, B., Ianiro, G., Palermo, P., Monini, M., Amoroso, M.G., (2017). Prevalence of Foodborne Viruses in Mussels in Southern Italy. *Food Environ. Virol.* 9, 187-194.
- [9] Commission Regulation (EU) 1881/2006, 2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* L364, 5-24.
- [10] Mangoni, O., Aiello, G., Balbi, S., Barra, D., Bolinesi, F., Donadio, C., Ferrara, L., Guida, M., Parisi, R., Pennetta, M., Trifuoggi, M., Arienzo, M., (2016). A multidisciplinary approach for the characterization of the coastal marine ecosystems of Monte Di Procida (Campania, Italy). *Mar. Pollut. Bull.* 112, 443-451.
- [11] Tian, P., Bates, A. H., Jensen, H.M., Mandrell, R.E., 2006. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Lett Appl Microbiol.* 43 (6), 645-651.

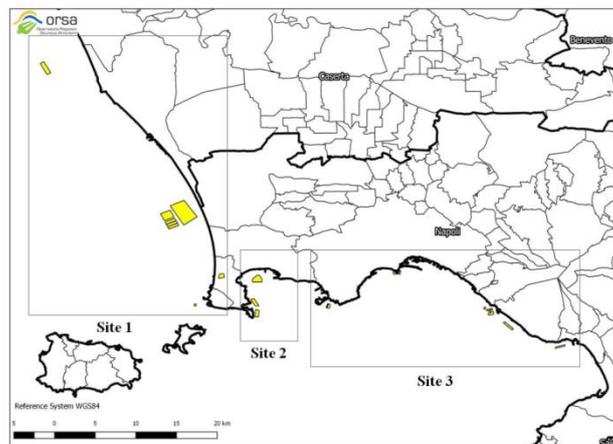


Fig. 1 – Mappa dei siti di campionamento delle cozze.

Determinazione di differenti contaminanti ambientali in ostriche (*Crassostrea gigas*) allevate in stazioni sperimentali della regione Campania

F. Fiorito¹, S. Lambiase¹, F.P. Serpe¹, T. Bruno¹, D. Capozzo¹, R. La Nucara¹, A. Scaramuzzo¹, P. Maglio¹, A.L. Langellotti², A. Martello², M.G. Amoroso¹, G. Galiero¹, G. Fusco¹, M. Esposito¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA)

²Centro di Ateneo per l'Innovazione e lo Sviluppo dell'Industria Alimentare, Università degli Studi di Napoli Federico II, Portici (NA)

Keywords: PCB-NDL, IPA, metalli pesanti, ostriche

Introduzione

Le attività antropogeniche nelle aree costiere, come il trasporto marittimo, gli impianti marini, gli scarichi industriali e domestici, possono rilasciare un'ampia gamma di sostanze inquinanti nel mare che, dando luogo a fenomeni di accumulo e biomagnificazione negli organismi acquatici, nell'acqua e nei sedimenti, entrano nella catena alimentare, costituendo un severo rischio per la salute umana. Infatti, i policlorobifenili non diossina-simili (PCB-NDL), gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) ed i metalli pesanti, come il mercurio (Hg), il piombo (Pb) e il cadmio (Cd) possono provocare una vasta gamma di effetti tossici, sia nei vertebrati che negli invertebrati. In particolare, tali contaminanti sono noti distruttori endocrini, possono indurre alterazioni nella riproduzione, soppressione del sistema immunitario, carcinogenesi e teratogenesi, ma anche neurotossicità, alterazioni del comportamento, oltre a dar luogo a fenomeni di accumulo in organi bersaglio come reni, fegato, polmoni e ossa [1-4]. Pertanto, per garantire la salute del consumatore, la concentrazione e la diffusione degli inquinanti ambientali nei prodotti della pesca sono costantemente monitorate mediante piani di monitoraggio specifici. In regione Campania sono presenti impianti di molluschicoltura dediti prevalentemente all'allevamento dei mitili. In un impianto di miticoltura sito nelle acque antistanti Monte di Procida (Golfo di Pozzuoli), recentemente, il Dipartimento di Sanità Animale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno di Portici (NA), nell'ambito della Ricerca Corrente IZSME 03/2016, ha allestito stazioni sperimentali (lanterne) per l'ostreocoltura. Le ostriche rappresentano un prodotto caratterizzato da elevato valore nutrizionale, inoltre il loro allevamento è di notevole interesse economico per la filiera ittica. Questi animali però, essendo filtratori, hanno la capacità di accumulare nei loro tessuti contaminanti ambientali, eventualmente presenti nelle acque di allevamento, rappresentando pertanto una potenziale fonte di rischio per la salute dei consumatori.

Inoltre, in cellule isolate da bivalvi marini, è stato evidenziato un effetto genotossico additivo dovuto all'esposizione combinata di metalli pesanti e PCB, suggerendo una possibile interazione tra questi xenobiotici [5]. Quindi, scopo di questo studio è stato monitorare i livelli di differenti inquinanti chimici ambientali, quali PCB-NDL, IPA e metalli pesanti normati (Hg, Pb e Cd) in campioni di ostriche *Crassostrea gigas*, allevate nelle stazioni sperimentali campane.

Summary

Anthropogenic activities in the coastal areas including shipping, making marine facilities, industrial and domestic effluents lead to release a variety of pollutants into the marine environments. Then, pollutants may be accumulated and biomagnified in aquatic organisms, water and sediment and thus threat food chain and finally human health. Indeed, non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (NDL-PCBs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals, like mercury (Hg), lead (Pb) and cadmium (Cd) are known to cause a wide range of toxic effects, in both vertebrates and invertebrates after dietary intake, including endocrine disruption, impaired reproduction, changes in the immune system, carcinogenesis, teratogenesis, behavioural alterations, accumulation in organs as kidneys, liver, lungs, bones, and neurotoxicity. Hence, the quantity and distribution pattern of marine environmental pollutants should be constantly monitored. Marine bivalves, as oyster, a product which has high nutritional and economic values, may concentrate environmental contaminants in their tissues and eating highly contaminated oysters could be dangerous for human health. Furthermore, using freshly isolated cells from marine bivalve revealed an additive genotoxic effect due to combined heavy metals and PCBs exposure, suggesting the interaction of those xenobiotics. Thus, the present study was aimed to monitor chemical pollution by assessing NDL-PCBs, PAHs and heavy metals, as Hg, Pb and Cd in oyster *Crassostrea gigas* farmed in Campania region. The samples of oysters were collected, from November 2016 to September 2018, from an experimental station. The concentration of chemicals was determined in tissues of oyster and revealed ranges below the European maximum limits, and were: $\sum 6$ NDL-PCBs (28, 52, 101, 138, 153, 180) 0.80-7.12 ng g⁻¹ wet weight (ww); BaP LOQ (<0.2 µg kg⁻¹)-1.2 µg kg⁻¹ ww, and $\sum 4$ PAHs (BaA, CHR, BbFA, BaP) 0.3-9.8 µg kg⁻¹ ww; Pb 0.035-0.487 mg kg⁻¹ ww, Cd 0.073-0.365 mg kg⁻¹ ww and Hg was always below LOQ (<0.089 mg kg⁻¹).

Interestingly, oysters represent suitable bioindicators for chemical environmental monitoring in marine environments and to decrease risks of environmental contamination to the human population which may originate from consumption of contaminated shellfish.

Materiali e metodi

16 campioni di ostriche (pool da 8 ostriche/campione) sono stati raccolti, da Novembre 2016 a Settembre 2018, da una stazione sperimentale campana. La concentrazione delle sostanze chimiche è stata determinata nei tessuti dei campioni di ostriche analizzati mediante procedure validate. L'analisi dei PCB-NDL è stata eseguita mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione [3]. La determinazione degli IPA è stata effettuata tramite HPLC-FLD [1,2]. Infine, i metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) sono stati analizzati mediante assorbimento atomico (GF-AAS) [4].

Risultati e discussione

Tutti i campioni analizzati presentavano valori al di sotto dei limiti massimi definiti dall'Unione Europea [6]. Precisamente, la somma dei 6 PCB-NDL (28, 52, 101, 138, 153, 180) era compresa tra 0,80 e 7,12 ng g⁻¹ di peso umido (ww); i livelli di BaP erano inclusi nel range LOQ (<0,2 µg kg⁻¹) -1,2 µg kg⁻¹ ww e la Σ4 IPA (BaA, CHR, BbFA, BaP) tra 0,3 e 9,8 µg kg⁻¹ ww. Mentre, i range dei livelli dei metalli pesanti esaminati erano i seguenti: Pb 0,035-0,487 mg kg⁻¹ ww, Cd 0,073-0,365 mg kg⁻¹ ww, ed i livelli di Hg erano sempre al di sotto del LOQ (<0,089 mg kg⁻¹).

Dall'analisi del profilo dei congeneri dei PCB analizzati, è interessante notare che i PCB-153, PCB-138 e PCB-101 rappresentavano i prodotti maggiormente presenti. Ciò è dovuto all'utilizzo, in passato, di prodotti contenenti tali PCB e alla loro persistenza nell'ambiente marino [7].

In conclusione, i risultati confermano che le ostriche rappresentano degli idonei bioindicatori per il monitoraggio di differenti inquinanti chimici in ambienti marini. Dunque, potrebbero costituire un utile strumento per ridurre i rischi dovuti al consumo umano di alimenti contaminati. Inoltre, i bassi livelli di contaminazione riscontrati ne garantiscono la sicurezza alimentare.

Bibliografia

- [1] Serpe, F.P., Esposito, M., Gallo, P., Serpe, L., (2010). Optimisation and validation of an HPLC method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussels. *Food Chem.* 122, 920-925.
- [2] Esposito, M., Perugini, M., Lambiase, S., Conte, A., Baldi, L., Amorena, M., (2017). Seasonal Trend of PAHs Concentrations in Farmed Mussels from the Coastal Areas of the Naples, Italy. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 99, 333-337.
- [3] Esposito, M., Serpe, F.P., Diletti, G., Messina, G., Scortichini, G., La Rocca, C., Baldi, L., Amorena, M., Monda, M., (2014). Serum levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in a population living in the Naples area, southern Italy. *Chemosphere* 94, 62-69.
- [4] Serpe, F.P., Esposito M., Gallo, P., Salini, M., Maglio, P., Hauber, T., Serpe L., (2010). Determination of heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in *Mytilus galloprovincialis* from Campania coasts, Italy. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19, 2292- 2296.
- [5] Zhang, Y.F., Chen SY, Qu MJ, Adeleye AO, Di, Y.N., (2017). Utilization of isolated marine mussel cells as an in vitro model to assess xenobiotics induced genotoxicity. *Toxicol. In Vitro.* 44, 219-229.
- [6] Commission Regulation (EU) 1881/2006, 2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* L364, 5-24.
- [7] Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Soriano, J.A., Concha-Graña, E., Muniategui, S., Beiras, R., (2016). Bioaccumulation of PCB-153 and effects on molecular biomarkers acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase in *Mytilus galloprovincialis* mussels. *Environ. Pollut.* 214, 885-891.

Nanoparticelle e bivalvi: prove sperimentali di accumulo e depurazione

F. Gallochio, G. Biancotto, A. Moressa, G. Arcangeli, A. Toffan, F. Pascoli, A. Ricci

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

Keywords: Nanoparticelle, Biossido di Titanio, Mitili

Introduzione

Le nanoparticelle di biossido di titanio (TiO₂NPs) vengono impiegate in diversi ambiti, (es. pigmenti in vernici, inchiostri, plastiche, carta, filtri solari nelle creme, additivi alimentari etc.) grazie alla loro capacità di conferire bianchezza brillante, resistenza alla corrosione e alla loro attività fotocatalitica.

Tuttavia, un impiego continuo e ripetuto di nanomateriali (NMs) può tradursi in un progressivo rilascio nell'ambiente. Alcuni studi hanno già evidenziato la presenza di TiO₂NPs in acque di deflusso urbano ad una concentrazione variabile nell'intervallo 10 -100 µg/L (1).

Le NPs potrebbero facilmente raggiungere le acque reflue e l'ambiente marino. Nonostante ciò, il comportamento ed il destino delle NPs nell'ecosistema marino (aggregazione, precipitazione, dissoluzione ecc.) e nei sistemi biologici ivi presenti (es. bioaccumulo, biodisponibilità, aggregazione, tossicità ecc.) è ancora poco conosciuto e studiato (2).

Sembra, inoltre, che le condizioni ambientali marine favoriscano l'aggregazione delle NPs stesse, rendendole più facilmente assimilabili ed accumulabili in molluschi bivalvi che, come tali, possono considerarsi dei potenziali bioindicatori di questi nuovi contaminanti (1,3-4), e, se edibili, rappresentano una possibile via di esposizione per i consumatori.

Lo studio del comportamento di TiO₂NPs in ambiente marino artificiale e la valutazione del loro potenziale accumulo in mitili mediterranei (*Mytilus galloprovincialis*) stabulati in ambiente artificialmente contaminato da NPs può offrire degli spunti e delle informazioni interessanti.

Tuttavia la caratterizzazione e rivelazione analitica delle NPs in ambiente marino e nelle specie marine rappresenta ad oggi la sfida maggiore. Ciò dipende dal fatto che non solo la composizione chimica ma anche la dimensione e la forma condizionano le proprietà chimico-fisiche nelle NPs (5) rendendo il loro comportamento in ambiente marino, del tutto imprevedibile.

Ciò richiede lo sviluppo di metodi analitici *ad hoc* che prevedono, oltre all'impiego di tecniche analitiche classiche (es. ICP/MS), anche l'impiego di tecniche strumentali nuove come il single particle – Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (spICP/MS) che è stato recentemente usato per l'analisi di NPs inorganiche in diverse matrici complesse (alimenti cosmetici etc.) (5).

Summary

Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) are widely used thanks to their high diffraction index and strong light scattering and incident-light reflection capability in different applications (e.d.as white pigment in cosmetics, paints, dyes and varnishes, textiles, paper and plastics, food and drugs, and even paving stones). Despite of the widespread production and use of engineered nanoparticles (NPs) and their foreseen increased release into the aquatic environment, relatively little is known about NPs interaction with, bioaccumulation in, or transfer to the aquatic food web (1-4).

Therefore, *in vivo* studies, carried out by exposing mussels (*Mytilus galloprovincialis*) to TiO₂NPs in a controlled artificial marine environment, can give important clues to understand NPs behavior in the aquatic environment as well as the bioaccumulation of NPs in edible marine animals.

The detection and characterization of NPs in marine environment and in marine species are quite complicated due to NPs unpredictable behavior, fate and low concentrations. This makes the determination of the bioavailability and bioaccumulation of NPs in marine species a challenge. However, a recently developed analytical technique, known as single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (spICP-MS), represents a powerful and reliable tool for the determination of NPs in complex matrices (5).

Materiali e metodi

Sperimentazione *in vivo*:

700 esemplari vivi di *Mytilus galloprovincialis* (pezzatura 3-4 cm); provenienza: Laguna Veneta.

Stabulazione in 7 distinte vasche (100 individui/vasca) riempite con 40l di acqua marina artificiale. Tempo di acclimatazione: 5 giorni.

Trattamento effettuato con sospensioni di TiO₂NPs e soluzioni di Titanio ionico (Ti⁺) a concentrazione nota (vedi tab.1). Trattamento ripetuto per 4 giorni consecutivi. Cambio acqua giornaliero prima della somministrazione delle TiO₂NPs e Ti⁺. Alimentazione giornaliera dopo circa 5 ore dalla somministrazione delle TiO₂NPs. Al termine del trattamento sono stati prelevati 50 individui da ogni vasca per l'analisi chimica. I mitili rimanenti e precedentemente sottoposti allo stesso trattamento sono stati raggruppati in un'unica vasca (gruppo 1-2; gruppo 3-4; gruppo 5-6) e lasciati in depurazione per 7 giorni (cambio acqua giornaliero).

Tabella 1 trattamento mitili

Trattamento	Gruppi						
	1 (controllo)	2 (controllo)	3	4	5	6	7
	40ml (NaPO ₃) ₆ 2%	40ml (NaPO ₃) ₆ 2%	40ml Ti ⁺ 60 mg/L*	40 ml TiO ₂ NPs 10mg/L	40 ml TiO ₂ NPs 10mg/L	40ml TiO ₂ NPs 100mg/L	40 ml TiO ₂ NPs 100 mg/L

Analisi Titanio ionico e TiO₂NPs

Ti ionico totale: Digestione acida (HNO₃) + ICP-MS.

TiO₂NPs: Digestione enzimatica (Proteinase K) + spICP-MS.

Risultati e discussione

L'analisi dei campioni mediante la classica tecnica ICP-MS ha evidenziato la presenza di Ti in tutti i gruppi trattati. La quantità di Ti riscontrato è risultato in linea con trattamento somministrato (vedi tabella 2).

Un' ulteriore analisi mediante spICP/MS ha consentito di evidenziare che il Ti presente è sotto forma di NPs.

Tabella 2 Risultati analisi ICP/MS e spICP/MS

Campione	Analisi ICP/MS	Analisi spICP-MS	
	Titanio totale (media ± SE) µg/kg Ti ⁴⁷ N=3	Concentrazione Ti (TiO ₂ NPs) µg/kg Ti ⁴⁸ N=3	Diametro medio TiO ₂ NPs (nm)
Gruppo 1 (controllo)	< LoQ = 50	< LoQ = 50	< LoD _{size} = 40
Group 2 (controllo)	< LoQ = 50	< LoQ = 50	< LoD _{size} = 40
Gruppo 3 (TiO ₂ NPs 10 µg/ml)	244,81 ± 43,25	279,01 ± 8,50	93 ± 1
Gruppo 4 (TiO ₂ NPs 10 µg/ml)	209,56 ± 4,16	231,88 ± 6,49	95 ± 4
Gruppo 5 (TiO ₂ NPs 100 µg/ml)	751,57 ± 51,35	1119,47 ± 59,80	105 ± 1
Gruppo 6 (TiO ₂ NPs 100 µg/ml)	1199,35 ± 101,52	1778,18 ± 98,28	111 ± 2
Gruppo 7 (Ti ⁺ 60 µg/ml)	1039,59 ± 62,81	1574,25 ± 110,28	55 ± 1
QC 1 (addizionato 100 µg/kg)	110,40 ± 5,15	96,05 ± 8,32	100 ± 3
QC 2 (addizionato 100 µg/kg)	105,31 ± 3,20	102,03 ± 9,56	105 ± 2

Le NPs riscontrate nei campioni trattati hanno un diametro medio molto simile a quello delle NPs somministrate e a quelle presenti nei campioni di controllo addizionati (QC). Tale risultato è molto interessante, in quanto indice di assenza di trasformazione delle NPs durante il processo di bioaccumulo nei mitili. Un altro dato molto interessante riguarda i campioni trattati con Ti⁺. In questo caso l'analisi mediante spICP/MS ha evidenziato che il Ti presente potrebbe trovarsi sotto forma di aggregati nanoparticellari con diametro medio diverso rispetto alla sospensione primaria somministrata. Ciò potrebbe indicare l'eventuale interazione del Ti⁺ con macromolecole (es. proteine) e una potenziale biotrasformazione che determina la formazione *in vivo* di NPs. Un'ulteriore analisi che richiederà l'impiego di una tecnica analitica diversa (es. microscopia elettronica con sonda EDX) consentirà di confermare i dati ottenuti mediati spICP/MS ed avere ulteriori delucidazioni in merito all'effettiva composizione chimica delle NPs evidenziate nei campioni trattati con Ti⁺.

Considerata la capacità filtrante dei mitili, si è voluto inoltre verificare se la sospensione del trattamento consentiva un'eliminazione e/o riduzione delle NPs bioaccumulate. La seconda fase sperimentale di "depurazione" ha evidenziato come già dopo 3 giorni dalla sospensione, i mitili sono in grado di autodepurarsi con conseguente diminuzione delle NPs presenti in tutti i gruppi sottoposti a trattamento (vedi figura 1).

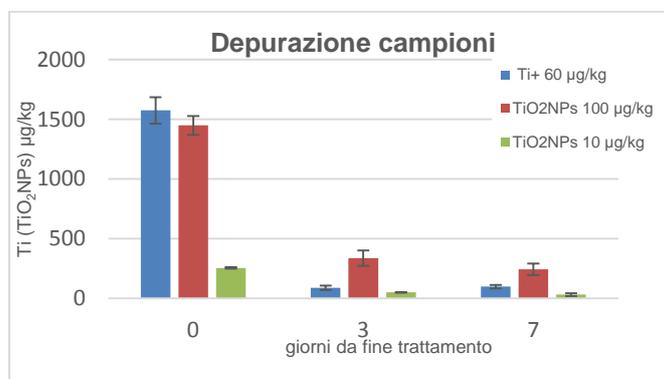


Figura 1: concentrazione Ti (TiO₂NPs) in campioni depurati

Bibliografia

- [1] R. Kaegi et al. 2008. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment *Environmental Pollution* 156, 233–239.
- [2] T. J. Baker et al. 2014. Review. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms *Environmental Pollution* 186 257-271.
- [3] F. Gottschalk et al. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials for different regions. *Environmental Science and Technology* 43, 9216–9222.
- [4] L. Canesi et al. 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research* 76 (2012) 16-21.
- [5] R. Peters et al. 2015. Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices. *J. Anal. At. Spectrom.* 2015, 30, 1274.

Monitoraggio zootecnico e sanitario di ostriche (*Crassostrea gigas*) allevate nel Medio Adriatico: risultati preliminari

L. Galosi¹, A. Roncarati¹, L. Gennari², F. Tosi³, S. Satto³, G. Arcangeli³, G.E. Magi¹

¹Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Università di Camerino (MC)

²Bivi S.r.l., Civitanova Marche (MC)

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, National Reference Center for Fish, Molluscs and Crustacean Diseases, Legnaro (PD)

Key words: Ostrica concava, *Crassostrea gigas*, allevamento, monitoraggio, mortalità

Introduzione

Negli ultimi anni, l'ostricoltura è diventata una realtà sempre più importante lungo le coste italiane. Dal 2013 al 2016, tutto il settore della molluschicoltura in Italia ha visto un aumento del 4,9%. Valutando separatamente la produzione di ostriche, si apprezza un incremento del + 379,7%, passando da 53 a 254 tonnellate di prodotto immesso sul mercato [1]. L'allevamento è rivolto principalmente alla specie *Crassostrea gigas*, utilizzando moduli di contenimento (lanterne, ceste), inseriti nei filari dedicati ai mitili o interamente dedicati ad esse. L'approvvigionamento delle piccole ostriche è assicurato acquistando il seme da schiuditoi o da nursery esteri. Nelle condizioni dell'Adriatico centrale, partendo da seme T6 (6 mm), la commercializzazione ha luogo dopo circa 15-20 mesi. Come nel resto d'Europa, si registrano delle mortalità importanti negli stadi giovanili. Tali mortalità sono spesso state attribuite all'*Ostreid Herpesvirus tipo 1* [OsHV-1] e a malattie batteriche (*Vibrio* spp.) [2, 3]. In questi ultimi anni, si è posta una sempre maggior attenzione alla fase di preingrasso e alle pratiche zootecniche al fine di contenere le perdite [4]. In tale scenario, è stato condotto un monitoraggio zootecnico e sanitario su due differenti lotti di *C. gigas* al fine di ottenere informazioni utili per migliorare la gestione dell'allevamento dell'ostrica concava in un impianto in long-line, situato nel Medio Adriatico a circa 3,5 miglia dalla costa.

Summary

As part of an Eureka project, 2 batches of cupped oyster (*Crassostrea gigas*) were monitored paying attention to zootechnical techniques, presence of pathogens (*OsHV-1*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio aestuarianus*) and health evaluation of oyster tissues. Rearing techniques were useful to grow the cupped oyster. In both the cycles, the histological examination allowed to observe pathological lesions in oysters sampled in late summer. These displayed atrophic and sometimes necrotic digestive gland with presence of clusters of small rod bacteria attached to the atrophic or necrotic epithelium or free in the lumen. In all the samples was observed within epithelium of gills, mantle and tubules of digestive intracytoplasmic eosinophilic microorganisms, under identification phase. Regarding biomolecular analysis, positive results were found only for the presence of *Vibrio splendidus*, with high amount in the summer period. Future studies will be necessary to associate the presence of the pathogen with tissue damage and consequent mortality in the cupped oysters raised in the Adriatic Sea. Although not free from production and health problems, it seems that the breeding of cupped oyster in the Middle Adriatic can guarantee good growth performances.

Materiali e Metodi

Nell'ambito di un progetto Eureka, che vede la collaborazione tra Università di Camerino, Bivi S.r.l. e Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, si è deciso di monitorare 2 lotti di ostrica concava, rappresentati da 100.000 soggetti cadauno (C1, C2), del peso medio iniziale di 0,194-0,198 g, che differivano tra loro per epoca di semina e densità di allevamento. Nel caso di C1, l'immissione in impianto è avvenuta il 14 dicembre 2017, utilizzando lanterne dove è stata adottata una densità pari a 1,5 soggetti / cm². Nel caso di C2, la semina ha avuto luogo il 28 febbraio 2018, impiegando lanterne e "cassette", costituite da contenitori sovrapposti, a base rettangolare; in entrambe le tipologie di supporto, i soggetti C2 sono stati introdotti alla concentrazione di 1,31 / cm². Nel caso del lotto C1, il primo diradamento è avvenuto dopo 151-159 giorni suddividendo il prodotto in n. 7 lanterne (2x3 mm) + n. 7 lanterne (3,5x5 mm). Dopo 242 giorni, si è proceduto alla pulizia di una parte di esse per poi eseguire la selezione dopo 285 giorni dalla semina; tale calibratura è stata completata nell'arco di 10 giorni. Nel caso del lotto C2, dopo 133-139 giorni dalla semina, si è proceduto a suddividere le ostriche in 7 lanterne (2x3 mm) + 7 lanterne (4,5x6 mm) + 3 gruppi di cassette. Dopo 237 giorni dall'inizio della prova, è stata eseguita la calibratura del prodotto. Periodicamente, sono stati condotti campionamenti allo scopo di monitorare la crescita del prodotto, la presenza di eventuali patogeni e lo stato di salute dei tessuti. Per valutare lo sviluppo delle ostriche, al momento della semina e poi ogni 2 mesi circa, si è proceduto a rilevare il peso (mediante bilancia elettronica Sartorius CP224S, Sartorius Mechatronic, Gottingen, Germany) e a misurare la lunghezza, la larghezza e lo spessore

(mediante calibro manuale) di 80 soggetti per ogni lotto preso in esame. Per le analisi biomolecolari, da questi soggetti, sono stati allestiti campioni che sono stati congelati a -80°C o conservati in etanolo, mentre per le analisi istologiche si è proceduto a fissare i campioni in liquido di Davidson. I patogeni ricercati tramite metodiche biomolecolari (rt-PCR) sono stati *Ostreid Herpesvirus 1* (OsHV-1), *Vibrio aestuarianus* e *Vibrio splendidus*. La resa a fine ottobre è stata stimata mediante conta dei soggetti vivi trasferiti dopo la selezione.

Risultati e Discussione

Il monitoraggio eseguito nel corso di questo studio ha permesso di valutare lo stato del prodotto, in relazione alle tecniche zootecniche adottate. Per quanto riguarda le performance di crescita, in C1 il peso medio è risultato pari a: g 25 nelle ostriche di pezzatura "grande" (9,8% dell'intero lotto); g 9,4 nelle ostriche di peso "medio" (27,3%); g 4,5 nella classe ponderale più piccola (62,9%). In C2, il peso medio raggiunto è stato di: g 17,7 evidenziato dalle ostriche "grandi" (11,6%); g 7,5 nei soggetti di peso "medio" (26,3%); g 2,1 nelle ostriche "piccole" (62,2%). Per quanto riguarda la resa a fine ottobre, nel lotto C1 è stata stimata intorno al 47,4%, conseguente ad un picco di mortalità riscontrato tra il 15 agosto e il 15 settembre, mentre nel caso del lotto C2, la resa si è aggirata sul 44% mentre le perdite più significative si sono osservate tra l'inizio del mese di agosto fino alla fine di settembre. L'esame istologico di 10 soggetti per campionamento ha permesso di osservare in entrambi i cicli quadri patologici di moderata entità a carico delle ostriche campionate in tarda estate. Queste manifestavano con alta prevalenza (80%) atrofia dei tubuli della ghiandola digestiva, solo raramente necrosi tubulare e frequentemente si osservavano clusters di batteri bastoncellari adesi all'epitelio atrofico o liberi nel lume mentre nell'interstizio intertubulare era presente un lieve infiltrato emocitario. Si osservava in tutti i campionamenti e con alta prevalenza (dal 40 al 100%) la presenza di microrganismi intracitoplasmatici eosinofili, in fase di identificazione e positivi alle colorazioni di Ziehl-Neelsen e di Macchiavello, localizzati a livello dell'epitelio intestinale, dei tubuli della ghiandola digestiva, del mantello e della branchia. Nelle ostriche campionate nel periodo estivo la presenza di tali microrganismi era intensa in circa il 40% dei soggetti, in particolare a livello dell'intestino e del mantello. Gli esami biomolecolari non hanno evidenziato la presenza dei patogeni ricercati ad eccezione del *Vibrio splendidus*, batterio rinvenuto in bassa carica nei campionamenti del primo trimestre ed in carica decisamente maggiore nei campionamenti della primavera ed estate 2018 del ciclo C1. Nel contesto delle mortalità osservate nel periodo estivo rimane da chiarire il ruolo svolto sia dal *V. splendidus*, in quanto questo è stato riscontrato in alte concentrazioni solo nel ciclo C1, che quello dei microrganismi intracellulari eosinofili. In conclusione, sebbene non scevro da problematiche produttive e sanitarie, sembra che l'allevamento dell'ostrica concava nel Medio Adriatico possa garantire performances di accrescimento compatibili con la sostenibilità economica dell'attività.

Bibliografia

- [1] MIPAAF. (2018) Valutazione a Medio Termine, Periodo di Riferimento 2015-2017, Piano Strategico Acquacoltura Italia 2014-2020
- [2] Domeneghetti S., Varotto L., Civettini M., Rosani U., Stauder M., Pretto T., Pezzati E., Arcangeli G., Turolla E., Pallavicini A., Venier P. (2014) Mortality occurrence and pathogen detection in *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis* close-growing in shallow waters (Goro lagoon, Italy). *Fish Shellfish Immunol* 41:37-44
- [3] Segarra A., Pépin J.F., Arzul I., Morga B., Faury N., Renault T. (2010) Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* 153:92-99
- [4] Dundon W.G., Arzul I., Omnes E., Robert M., Magnabosco C., Zambin M., Gennari L., Toffan A., Terregino C., Capua I., Arcangeli G. (2011) Detection of Type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1 μ var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. *Aquaculture* 314:49-52

Traslocazione di ostriche concave (*Crassostrea gigas*) in un allevamento di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) in Campania: aspetti zootecnici e parassitologici

D. Iaccarino^{2,3}, B. Degli Uberti¹, M. D'Amore¹, G. De Luca¹, F. Di Nocera¹, M. Santoro¹, D. Di Concilio^{2,3},
L. Langellotti⁴, A. Martello⁴, G. Galiero¹, M. G. Amoroso¹, G. Fusco¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno - Portici (NA)

² Università Degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali - Napoli

³ Centro di Riferimento Regionale per la Sicurezza Sanitaria del Pescato (CRiSSaP) - Napoli

⁴ Università Degli Studi di Napoli "Federico II", CAISIAL - Portici (NA)

Keywords: *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis*, histological analysis, condition index

Introduzione

L'allevamento dell'ostrica concava (*Crassostrea gigas*), endemica delle coste asiatiche dell'oceano Pacifico, ha preso avvio in Europa tra gli anni 60' e 70', in seguito alla grave riduzione della produzione di ostrica piatta (*Ostrea edulis*) dovuta alla Marteiliosi ed alla Bonamiosi, malattie protozoarie, notificabili, incluse nella lista dell'Organizzazione Mondiale della Sanità Animale (OIE). Tali malattie hanno esercitato un grave impatto socio-economico determinando la quasi completa sostituzione della specie *O. edulis* a favore della *C. gigas*, maggiormente resistente [1]. Tuttavia, *Marteilia* sp. è stata registrata in *C. gigas* lungo la costa atlantica della Spagna [2], mentre *Marteilia chungmuensis* è responsabile in *C. gigas* di malformazioni al tessuto gonadico ed al mantello, con conseguente riduzione del valore commerciale [3]. Considerata la marginalità dell'ostricoltura in Italia rispetto alla mitilicoltura e venericoltura, il presente studio ha inteso valutare la qualità zootecnica e sanitaria di *C. gigas* messe a dimora, dal 2016 al 2018, in un allevamento di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) della Campania, al fine di fornire dati utilizzabili per una futura diversificazione produttiva.

Summary

The species *Crassostrea gigas*, known as Pacific cupped oyster, is native from South-East Asia, it was farmed in Europe because of the severe reduction in *Ostrea edulis* production due to Marteiliosis and Bonamiosis, notifiable diseases according to European Regulation and included in the list of the Organisation for Animal Health (OIE). Considering the limited production of oysters in Italy, compared to mussels and clams, here we studied sanitary and zootechnical quality of *C. gigas* planted in a mussel farm (*Mytilus galloprovincialis*) of Campania from 2016 to 2018 in order to provide data that can be used for future production diversification. The prevalence and intensity of infection by *Marteilia* spp., *Bonamia* spp. and other parasites, using histopathological analyses, were evaluated in mussels and oysters. The presence of pathological phenomena, gonadal stage, condition index, meat yield and *Polydora* spp. infestation were also evaluated in the analyzed bivalves.

Materiali e metodi

Tra il mese di Settembre e quello di Novembre 2016, circa 800 ostriche concave, provenienti dall'allevamento olandese Pols-Bom (EG 6239) e previamente poste in quarantena ed analizzate, sono state traslocate su un filare long-line di un allevamento di mitili antistante il litorale di Monte di Procida (Napoli), in lanter-net da 10 piani ancorate un metro al di sotto della trave del filare. Da Dicembre 2016 ad Agosto 2018 sono stati eseguiti periodicamente campionamenti di ostriche concave e contestualmente anche di mitili posti in reste nelle immediate vicinanze delle lanterne di ostriche. Al campionamento, è stata misurata la temperatura dell'acqua ad un metro di profondità mediante sonda ed è stato prelevato un campione d'acqua da 1 L per la determinazione spettrofotometrica della clorofilla-a [4]. Per ciascun campione, sono stati valutati mediante esame istologico: presenza ed intensità d'infezione di *Marteilia* spp. [5] e nelle ostriche anche di *Bonamia* spp., presenza di fenomeni patologici, eventuale coinfezione di altri parassiti e lo stadio gonadico [5, 6]. Per le ostriche sono stati misurati l'indice di condizione [7], la resa in carne [8] e la classe qualitativa di infestazione di *Polydora* spp. nelle valve [9].

Risultati e discussione

L'esame istologico ha permesso di rilevare nelle ostriche la costante assenza di parassiti protozoi appartenenti ai generi *Marteilia* e *Bonamia* in accordo a quanto dimostrato precedentemente [10]. La presenza di *Marteilia* spp. è stata rilevata nei mitili con prevalenze d'infezione variabili dal 5% (Dicembre 2016-2017, Giugno 2017 e Gennaio 2018) al 35% (Marzo 2018). Contrariamente a quanto riportato [11], sono state evidenziate prevalenze d'infezione elevate a temperature dell'acqua inferiori a 17°C (massima prevalenza d'infezione, 35% con temperatura pari a 14,6°C). L'assenza d'infezione in mitili prelevati con temperature superiori a 26°C registrate a Luglio ed Agosto 2018 può essere spiegata con la riduzione del tasso di filtrazione, che per i mitili è descritta a temperature superiori a 25°C [11]. L'intensità di infezione di

Marteilia spp. è risultata moderata esclusivamente in 2 mitili mentre è stata classificata come severa in tutti gli altri mitili esaminati, con l'osservazione di tutti gli stadi di sviluppo, esclusivamente a livello del tessuto digerente. Per quanto attiene ai fenomeni patologici investigati, solo in n. 2 ostriche, (prelevate a Febbraio 2017 e Maggio 2018) sono state osservate neoplasie emocitarie a livello del tessuto gonadico attribuibili all'effetto di fattori stressanti ambientali [12]. Nei mitili sono stati osservati fenomeni patologici a carattere difensivo quali infiammazioni di tipo infiltrativo e nodulare a carico dei tessuti adipogranulare e connettivo vescicolare (9 mitili) e del tessuto digerente (7 mitili) non attribuibili a *Marteilia* spp. ma presumibilmente all'effetto di fattori stressanti ambientali. La ricerca di parassiti diversi da *Marteilia* spp. e *Bonamia* spp. non ha dato risultati positivi nelle ostriche. In 7 dei mitili analizzati sono stati invece riscontrate sporocisti contenenti cercarie (Trematoda) in differenti stadi di sviluppo a cui si è anche attribuita la concomitante presenza di gravi fenomeni di tipo infiltrativo e degenerativo a carico dei tessuti gonadico e digerente. Si è inoltre riscontrata in alcuni mitili (9) la presenza di cnidari commensali (*Eugymnanthea inquilina*) in prossimità del tessuto branchiale. L'andamento del ciclo gametogenico osservato nelle ostriche è in accordo a quanto indicato in altri studi eseguiti su *C. gigas* allevata nel Mar Mediterraneo [13]. In particolare, inattività gametogenica (stadio 0-5) nei mesi invernali (da Ottobre a Febbraio) e ripristino della gametogenesi (stadio 1) a Marzo. La completa maturazione gonadica (stadio 3H) è stata osservata tra Maggio e Giugno con temperature dell'acqua superiori a 18°C ed elevate concentrazioni di clorofilla-a (2,2-2,9 µg/l) in accordo a quanto riportato precedentemente [14]. L'emissione gametica (stadio 4) è stata osservata a Luglio ed Agosto. Nei mitili invece la completa maturazione gonadica è stata osservata in campioni prelevati nei mesi invernali come riportato in letteratura [15]. Le ostriche hanno mostrato indice di condizione e resa in carne in aumento nel corso della fase di maturazione (indice di condizione: 4-5,4; resa in carne: 0,19-0,22) ed in diminuzione durante l'emissione gametica (indice di condizione: 2,6-3,8; resa in carne: 0,11-0,14) ed il riposo gonadico (indice di condizione: 2,2-3,7; resa in carne: 0,13-0,17) mostrando una forte dipendenza dall'attività gametogenica [14]. Il lungo periodo di inattività gametogenica, osservato nelle ostriche analizzate, necessario per accumulare riserve di glicogeno utili a sostenere il successivo ciclo gametogenico, è tipicamente osservato in ambienti ricchi di fitoplancton [14], condizione dimostrata nello specchio d'acqua, sede della nostra sperimentazione, con valori di clorofilla-a variabili da 0,9 µg/l (Gennaio 2018) a 3,7 µg/l (Maggio 2018). Pertanto, le ostriche analizzate hanno mostrato buona funzionalità riproduttiva per tutto il periodo di osservazione. Non sono stati registrati eventi di mortalità nel corso del periodo oggetto di studio. La classe d'infestazione della *Polydora* spp. non ha mai superato il valore medio di 2 durante tutta la sperimentazione e non si è mai reso necessario un trattamento di disinfezione. Unico punto critico per l'allevamento long-lines nel sito in esame è risultato essere l'eccessiva quantità di organismi sessili incrostanti (principalmente Cirripedi e Serpulidi) che richiederebbe la possibilità di effettuare periodiche fasi in asciutta non semplici da svolgere per le ostriche con le stesse imbarcazioni ed attrezzature disponibili per la mitilicoltura. Infine, nonostante fossero allevate nello stesso specchio d'acqua dei mitili e ad una distanza non superiore ai 2 metri, nessuna delle ostriche analizzate ha mostrato presenza di parassiti (e di fenomeni patologici ad essi attribuibili) che invece sono stati ritrovati nei mitili. I risultati ottenuti sono molto incoraggianti e mettono in luce la possibilità di consolidare i risultati degli studi e progetti attraverso una fattiva diversificazione delle produzioni di molluschi bivalvi attraverso l'introduzione in Campania di allevamenti di *C. gigas*.

Progetto di Ricerca Corrente IZSME 03/2016 finanziato dal Ministero della Salute

Bibliografia

- [1] Villalba A., Montes J., Carballal M.J., Lopez M.C., Mourelle S.G. (1992) Epizootiology of Marteliosis in cultured mussels from estuaries of Galicia. Cuad Area Cienc Mar Semin Estud Galegos 201-202.
- [2] Montes J., Longa M.A., Lama A., Guerra A. (1998) Marteliosis of Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) reared in Galicia NW Spain. Bulletin European Association of Fish Pathologists 18, 124-126.
- [3] Imanaka S., Itoh N., Ogawa K., Wakabayashi H. (2001) Seasonal fluctuations in the occurrence of abnormal enlargement of the ovary of Pacific oyster *Crassostrea gigas* at Gokasyo Bay, Mie, Japan. Fish Pathology 36, 83-91.
- [4] APAT IRSA-CNR (2003) Metodi analitici per le acque. Manuali e Linee guida, 29, 3. Metodo 9020, 1137-1142.
- [5] Villalba A., Mourelle S.G., Carballal M.J., Lopez M.C. (1993a) Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). Diseases of Aquatic Organisms 17, 205-213.
- [6] Marteil, L., 1976. La Conchyliculture Française. 2^e Partie., Biologie de l'huître et de la moule. Rev. Trav. Inst. Pêches. Marit. 40 _2_, 149-346.
- [7] Walne P.R., Mann R. (1975) Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. Proc. 9th Eur. Mar. Biol. Symp. pp. 587-607.
- [8] Booth J.D. (1983) Studies on twelve common bivalve larvae and bivalve spawning seasons. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 17, 231-265.
- [9] Fleury P. G., Le Ber E., Claude S., Cornette F., d'Amico F., Guilpain P., Palvadeau H., Robert S., Le Gall P., Ropert M., Simonne C., Vercelli C. (2003) Comparison of Pacific oyster (*Cr. gigas*) rearing results (survival, growth, quality) in French farming areas: a 10-years

- (1993-2002) of network ifremer/REMORA. 95th Annual meeting of the National Shellfisheries Association, New-Orleans (U.S.A.), 13-17 Avril.
- [10] Renault T., Cochenec N. and Grizel H. (1995) *Bonamia ostreae*, parasite of the European flat Oyster, *Ostrea edulis*, does not experimentally infect the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Bulletin European Association of Fish Pathologists 15(3), 78.
- [11] Robledo J.A.F., Figueras A. (1995) The effects of culture-site, depth, season and stock source on the prevalence of *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* LMK) from Galicia, Spain. The Journal of Parasitology 81, 354-363.
- [12] Carballal M. J., Barber B., Iglesias D., Villalba A. (2015) Neoplastic diseases of marine bivalves. Journal of Invertebrate Pathology 131, 83-106.
- [13] Dridi S., Romdhane M. S., Elcafsi M. (2007) Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. Aquaculture 263, 238-248.
- [14] Dridi S., Romdhane M. S., Elcafsi M. (2014) Gametogenic cycle of *Crassostrea gigas* in contrasting Mediterranean habitats: marine (Gulf of Tunis) and continental (Bizert lagoon) culture sites. Journal of Biological Research-Thessaloniki, 21, 13.
- [15] Suárez M. P., Alvarez C., Molist P., San Juan F. (2005) Particular aspects of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the estuary of Vigo. Journal of Shellfish Research 24, 531-540.

Studio preliminare sulla circolazione stagionale di *Vibrionaceae* in allevamenti di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) campani.

D. Iaccarino^{1,2}, Y. Proroga³, D. Cristiano³, I. La Tela³, F. Di Nocera³, G. Smaldone^{1,2}, A. Anastasio^{1,2}, S. Iannella³, D. Criscuolo³, G. Borriello³, M. Santoro³, A. Cerrone³, G. Galiero³, G. Fusco³, F. Capuano³

¹) Università Degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali - Napoli

²) Centro di Riferimento Regionale per la Sicurezza Sanitaria del Pescato (CRiSSaP) - Napoli

³) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno - Portici (NA)

Keywords: *Vibrionaceae*, *Mytilus galloprovincialis*, Campania

Introduzione

I batteri appartenenti alla famiglia delle *Vibrionaceae*, ubiquitari negli ecosistemi marini, sono particolarmente abbondanti nelle acque costiere, in associazione al plancton ed ai sedimenti [1]. I batteri *Vibrio* spp. sono comunemente isolati dai tessuti dei molluschi eduli lamellibranchi (MEL) nei quali sono accumulati per filtrazione dell'acqua. Ad oggi sono note 99 specie appartenenti al genere *Vibrio* [2], al quale appartengono sia specie patogene per l'uomo, che per animali acquatici quali pesci, coralli e molluschi o che ne costituiscono il normale microbiota [3, 4]. Considerato il potenziale impatto sanitario e zootecnico sulla produzione di mitili, avente elevata importanza socio-economica in Campania, unitamente alla mancanza di monitoraggi sulla circolazione di *Vibrionaceae*, diverse dalle specie isolate ed identificate mediante metodiche ufficiali [5], negli allevamenti di mitili campani, il presente studio preliminare ha inteso stimare la circolazione stagionale di *Vibrionaceae* in 6 allevamenti di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) della Campania in un periodo che va da Febbraio a Luglio 2018 al fine di fornire dati utilizzabili dagli Enti competenti per pianificare eventuali campionamenti ed ispezioni future ed incrementare i dati disponibili.

Summary

Vibrionaceae are abundant in coastal environments, closely associated with plankton, sediment and macrofauna in turn associated with cultured bivalves. Thus they are commonly isolated from bivalve tissues due to their filter-feeding habit. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* cause serious food-borne gastroenteritis in humans. Several bacteria, belonging to *Vibrionaceae* family, are pathogenic for bivalves or they are part of their normal microbiota. Considering the importance of mussels (*M. galloprovincialis*) farms and the absence of previous data in Campania Region about opportunistic and pathogenic *Vibrionaceae* associated with cultured mussels and lower-risk zoonotic vibrios, here we show a preliminary overview on seasonal circulation of *Vibrionaceae* in 6 mussel farms along Neapolitan coast. The isolated species, by biochemical and molecular methods identified, confirm the importance of further monitoring programs.

Materiali e metodi

Da Febbraio a Luglio 2018, 19 campioni di mitili, sono stati prelevati da 6 allevamenti insistenti sul litorale napoletano. Al campionamento, è stata rilevata la temperatura superficiale dell'acqua. I campioni sono stati preparati secondo la metodica ISO/TS 21872-(1): 2017 (E) modificata. L'arricchimento primario è stato eseguito omogenando in doppio 25 g di polpa e liquido intervalvare in 225 ml di acqua peptonata alcalina salina (ASPW), con successiva incubazione rispettivamente a 37°C e 25°C per 18-24 ore. Le colture ottenute sono state seminate su piastre di Tiosolfato-Citrato-Bile-Saccarosio (TCBS) agar e di ChromAgar *Vibrio* ed incubate rispettivamente a 37°C e 25°C per 18-24 ore. L'identificazione di specie ha previsto l'esecuzione di test dell'ossidasi, della catalasi, della mobilità, colorazione di Gram, alotolleranza con l'impiego di acqua peptonata (SPW) a concentrazione crescente di NaCl (0%, 3%, 6%, 8%, 10%), test miniaturizzati API 20E e 20NE con temperatura di incubazione modificata a 25°C e lettura a 24-48 ore, per evidenziare attività metaboliche utili all'applicazione delle chiavi identificative [6] associati al sequenziamento del gene 16s rRNA (Kit MicroSEQ, Thermo Fisher Scientific) e confronto della sequenza ottenuta con quelle presenti nella banca dati di Green genes utilizzando il software Blast.

Risultati e discussione

Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi per la presenza di *Vibrionaceae* con isolamento di 56 specie batteriche. La specie prevalentemente isolata è stata *V. alginolyticus* (16 isolati, 28,6%), in accordo a precedenti studi intrapresi in allevamenti di *M. galloprovincialis* nel Mar Adriatico e nel Mar Ionio [7, 8]. Altre specie isolate sono state *Listonella pelagia* (8 isolati, 14,3%), *V. coralliilyticus* e *V. mediterranei* (5 isolati, 8,9%), *Photobacterium damsela* sub. *damsela* (4 isolati, 7,1%), *V. campbellii*, *V. crassostreae* e *V. diabolicus* (3 isolati, 5,4%), *V. harveyi*, *V. rotiferianus*, *V. splendidus* I, *V. splendidus* II, *P. leiognathi*, *P. phosphoreum* e *Photobacterium* sp. (1 isolato, 1,8%). La presenza di *V. alginolyticus* è stata rilevata costantemente in tutti i campioni di mitili prelevati tra Maggio e Luglio con temperature comprese tra 21,1°C e 28,2°C ed in tutti gli allevamenti monitorati, mentre è risultata assente nei campioni prelevati in inverno con

temperature comprese tra 13,4°C e 14,4°C. Allo stesso modo, le specie *L. pelagia*, *V. diabolicus*, *V. splendidus* I e *V. splendidus* II sono state isolate esclusivamente nei campioni di mitili prelevati nei mesi primaverili ed estivi (21,1°C-28,1°C). Tali dati riflettono l'influenza della stagionalità sulla distribuzione della *Vibrionaceae* isolate dai MEL, mostrando, contrariamente a quanto precedentemente rilevato [2], la presenza di *V. alginolyticus*, *V. diabolicus* e *V. splendidus* in campioni di mitili prelevati nei mesi primaverili ed estivi. Altre specie quali *V. coralliilyticus* e *V. mediterranei* sono state isolate sia nei mesi invernali che in quelli estivi (13,4°C-28,1°C), tuttavia, la presenza di *V. mediterranei* in campioni di mitili prelevati in inverno contrasta con quanto descritto in letteratura [2]. Sono state isolate specie appartenenti al clade Harveyi (21 isolati, 37,5%): *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. rotiferianus* e *V. alginolyticus* in mitili prelevati in primavera (21,1°C-23,7°C) ed estate (22,7°C-28,1°C) e coesistenti in un campione proveniente da un unico allevamento. Tali risultati sono in accordo con l'incremento dell'abbondanza dello zooplancton che nel Mar Mediterraneo si verifica in primavera-estate, successivamente alla fioritura fitoplanctonica [9] e con la stretta associazione di *V. harveyi* e *V. alginolyticus* a copepodi zooplanctonici, mediante sintesi di proteine di adesione all'esoscheletro [10]. La presenza di *V. crassostreae*, *V. splendidus* I e *V. splendidus* II, specie appartenenti al clade Splendidus (5 isolati, 8,9%), nonché l'isolamento di *V. coralliilyticus* in mitili prelevati in primavera-estate, può essere spiegata considerando la stretta associazione della macrofauna sessile e vagile ai mitili allevati che rappresenta, pertanto, un *reservoir* di tali specie batteriche [3, 4, 11]. Le specie appartenenti ai clade Harveyi e Splendidus sono patogene per numerosi bivalvi e ripetutamente associate ad eventi di mortalità [12]. Durante lo studio non sono stati registrati eventi di mortalità anomale negli allevamenti monitorati, in accordo alla resistenza di *M. galloprovincialis* alle infezioni batteriche per mezzo di potenti meccanismi di difesa immunitaria [13]. Tuttavia, sono stati documentati effetti negativi sullo sviluppo larvale di *M. galloprovincialis* indotti da *V. alginolyticus* [14] e sul reclutamento larvale provocati da *V. splendidus* II e *V. mediterranei* [15], nonché l'incapacità di innescare un'efficiente risposta immunitaria contro *V. coralliilyticus* sia in adulti che in stadi larvali di *M. galloprovincialis* [16]. In assenza di precedenti dati, il presente studio ha inteso offrire una panoramica preliminare circa la distribuzione stagionale di *Vibrionaceae*, commensali, opportuniste e potenzialmente patogene associate a mitili allevati in Campania. L'isolamento di *Vibrio* spp. potenzialmente patogeni per i mitili, nonché l'isolamento di specie a basso rischio per l'uomo, quali *V. alginolyticus*, *V. harveyi* e *P. damsela* sub. *damsela* [3, 17], confermano l'importanza nel valutare il potenziale rischio di tali comunità batteriche attraverso l'implementazione di ulteriori programmi di monitoraggio.

Bibliografia

- [1] Wai S. N., Mizunoe Y., Yoshida S. (1999) How *Vibrio cholerae* survive during starvation. FEMS Microbiology Letters, 180, 123-131
- [2] Rahman M. S., Martino M. E., Cardazzo B., Facco P., Bordin P., Mioni R., Novelli E., Fasolato L. (2014) *Vibrio* Trends in the Ecology of the Venice Lagoon. Applied and Environmental Microbiology 80, 2372-2380
- [3] Thompson F. L., Iida T., Swings J. (2004) Biodiversity of *Vibrios*. Microbiology And Molecular Biology Reviews, Sept. 2004, p. 403-431
- [4] Vezzulli L., Previati M., Pruzzo C., Marchese A., Bourne D. G., Cerrano C. (2010) *Vibrio* infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sea. Environmental Microbiology 12, 2007-19.
- [5] ISO/TS 21872-(1): 2017 (E) Microbiology of the food chain - Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. - Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*
- [6] Noguera I., Blanch R. (2008) Identification of *Vibrio* spp. With a set of Dichotomous Keys. Journal of Applied Microbiology 105, 175-185.
- [7] Ripabelli G., Sammarco M. L., Grasso G. M., Fanelli I., Caprioli A., Luzzi I. (1999) Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. International Journal of Food Microbiology 49, 43-48
- [8] Cavallo R. A., 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
- [9] Mazzocchi, M.G., Ribera d'Alcalà M. (1995) Recurrent patterns in zooplankton structure and succession in a variable coastal environment. ICES Journal of Marine Science, 52, 679-691
- [10] Carman K., Dobbs F. (1997) Epibiotic Microorganisms on Copepods and Other Marine Crustaceans. Microscopy Research And Technique 37, 116-135
- [11] Romero A., Costa M. D., Fom-Cuni G., Balseiro P., Chamorro R., Dios S., Figueras A., Novo B. (2014) Occurrence, seasonality and infectivity of *Vibrio* strains in natural populations of mussels *Mytilus galloprovincialis*. Diseases Of Aquatic Organisms. 108, 149-163.
- [12] Beaz-Hidalgo R., Balboa S., Romalde J. L., Figueras, M. J. (2010a) Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. Environmental Microbiology Reports. 2, 34-43
- [13] Ciacci C., Manti A., Canonico B., Campana R., Camisassi G., Baffone W., Canesi L. (2017) Responses of *Mytilus galloprovincialis* hemocytes to environmental strains of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*. Fish and Shellfish Immunology 65, 80-87
- [14] Anguiano-Beltrán C., Lizárraga-Partida M. L., Searcy-Bernal R. (2004) Effect of *Vibrio alginolyticus* on larval survival of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. Diseases of Aquatic Organisms 59, 119-123
- [15] Prato E., Acquaviva M. I., Biandolino F., Lo Noce R., Narracci M., Cavallo R. A. (2008) Effetto embriotossico di *Vibrio splendidus* II e *Vibrio mediterranei* in *Mytilus galloprovincialis* (lam., 1819) Biologia Marina Mediterranea 15 (1), 434-435
- [16] Balbi T., Auguste M., Cortese K., Montagna M., Borello A., Pruzzo C., Vezzulli L., Canesi L. (2018) Responses of *Mytilus galloprovincialis* to challenge with the emerging marine pathogen *Vibrio coralliilyticus*. Fish and Shellfish Immunology 84, 352-360
- [17] Austin B. (2010) *Vibrios* as causal agents of zoonoses. Veterinary Microbiology 140, 310-317

Sistemi informativi di comunicazione nel settore della molluschicoltura in Veneto e Friuli Venezia Giulia: stato dell'arte

G. Manca, L. Bille, E. Barbagli, E. Boaretto, L. Lunardi, M. Mazzucato, M. Dalla Pozza, L. Bortolotti, G. Arcangeli, S. Marangon

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

Keywords: information system, shellfish

Introduzione

La normativa Comunitaria riguardante l'igiene dei prodotti alimentari, in particolare i Reg. CE 853/2004 e 854/2004, pone massima attenzione ai controlli sui MBV, al fine di assicurare un prodotto idoneo al consumo umano. Anche in Italia, al fine di ottimizzare la gestione dei dati derivanti dall'attività di sorveglianza in tale settore, sono stati attivati specifici sistemi informativi per la raccolta di dati anagrafici, produttivi e di gestione delle attività di monitoraggio igienico sanitario degli allevamenti/aree di raccolta in molluschicoltura. Il sistema informativo di riferimento per le attività di campionamento è quello nazionale (Sistema Informativo Nazionale Veterinario per la Sicurezza Alimentare – SINVSA) ma, stante alcune esigenze manifestate localmente, sono stati avviati in Veneto e Friuli Venezia Giulia, specifici progetti per l'implementazione di sistemi informativi a supporto della gestione del campionamento e che contestualmente assolvessero ai debiti informativi verso il livello centrale. Al fine di ottimizzare sia la gestione di tali informazioni sia l'interazione fra gli operatori che eseguono i campionamenti e i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVe), all'interno del sistema informativo è stato sviluppato anche un protocollo per la preaccettazione dei campioni di MBV. Tale protocollo utilizza servizi web dedicati che consentono un flusso dati diretto tra gli applicativi web in uso presso il territorio e il gestionale dei laboratori IZSVe. Le procedure citate garantiscono inoltre un collegamento con il sistema SINVSA, per il mantenimento dei flussi informativi con il livello nazionale. Le procedure informatizzate sono operative dal 2016 e l'obiettivo del presente lavoro è quello di illustrare i risultati raggiunti dopo due anni di attività del citato progetto.

Summary

In accordance with the guidelines provided for at the Community level, Member States should establish national control plans, on the basis of shared procedures involving official authorities, producers and laboratories. Data gathering standardisation and document dematerialization play a key role to establish coherent and rapid protocols of communication, to set traceability systems and epidemiological networks, required by the legislation in force. For the management of shellfish official controls in North-eastern Italy, an Information System has been developed, involving the Local Public Health Units (LPHUs), IZSVe and the producers. From 2013 the new project has been launched and it is now fully functional for the integrated management of the official monitoring program established according to the EU Regulations on food safety. The aim of this paper is to highlight the results obtained using innovative solutions for sample acceptance and data flow management in shellfish monitoring plans activated in Northern-East of Italy.

Materiali e metodi

L'implementazione del sistema informativo ha comportato le seguenti fasi progettuali: 1 – studio bibliografico e analisi dei requisiti: tale fase ha consentito la corretta individuazione della base di dati e le relative interconnessioni da un lato con il sistema informativo nazionale (SINVSA) e dall'altro con il gestionale IZSVe per lo studio di protocolli di preaccettazione automatizzata. In tale fase sono stati raccolti anche i documenti di interesse (verbali di campionamento), per lo studio della loro dematerializzazione; 2 - creazione di una beta release e relativo uso in ambiente di test da parte degli operatori coinvolti: in tale fase sono state messe a punto le procedure operative di campo per l'uso dell'applicativo in fase di campionamento. Contestualmente sono stati rivisitati i protocolli di accettazione IZSVe al fine di consentire il nuovo flusso dati automatizzato. Al fine della raccolta dati sono state individuate due differenti modalità: una tradizionale, con compilazione del verbale cartaceo e rientro in ufficio prima dell'invio fisico dei campioni, al fine di perfezionare la compilazione on line e l'invio dati verso IZSVe ed una modalità mobile, con utilizzo di tablet/portatile in sito di prelievo e stampa di verbale/etichetta direttamente in sito di prelievo e comunque prima dell'invio del campione al Laboratorio; 3 – messa in produzione del sistema: il sistema, dopo le opportune modifiche ed integrazioni successive alla fase di test, è attivo in produzione dal mese di Ottobre 2016; 4 – analisi dell'archivio anagrafico censito in BDN e relativa validazione degli archivi: attraverso l'apposita funzione messa a disposizione dagli applicativi nazionali, è stato possibile procedere al riallineamento di quanto in essere sul territorio e quanto censito nel sistema SINVSA, attraverso una formale validazione del dato da parte Regionale.

Componente tecnologica: l'applicativo web è stato realizzato in Delphi 2010 (object-oriented language). Mentre il web server in uso è Apache 2.2 (Apache © Software Foundation). La localizzazione del punto di prelievo avviene per mezzo di uno specifico modulo webGIS. Questo è stato sviluppato in HTML, PHP 5.5 e Javascript (JS) Dojo 1.10 e libreria spaziale Javascript (JS) Openlayers 2.13, su web server Apache 2. I dati spaziali sono archiviati su geodatabase PostGreSQL 9.2 con estensione spaziale PostGIS 1.8 e sono esposti attraverso Web Services geografici (WMS e WFS) grazie al server geospaziale GeoServer, in deploy su application server Tomcat7. Al fine di permettere lo scambio dati tra l'app mobile, la web application ed il database, è stato implementato uno specifico Endpoint sviluppato in PHP 5.5 con framework Laravel 5.1, su web server Apache. L'applicativo webGIS, l'endpoint ed il server geospaziale sono stati installati su server presenti all'interno dell'IZSve su server con sistema operativo Ubuntu 14.04 LTS. La app, implementata in linguaggio Java, nativa per il sistema operativo Android (4.0 o successivi) è stata implementata come estensione del webGIS.

Risultati e discussione

La creazione di una base informativa regionale relativa agli impianti di produzione di MBV e la relativa manutenzione, correlata ai dati spaziali di ogni impianto produttivo, hanno consentito di porre le basi per lo sviluppo di sistemi più complessi sia per la gestione delle reti di sorveglianza epidemiologica che per garantire un'adeguata rintracciabilità dei campioni prelevati in sede di piani di monitoraggio. A due anni dall'avvio in produzione del sistema sono stati pre-accettati in modalità automatizzata circa 7.000 campioni. Il sistema ha coinvolto in tutto 9 A-Ulss nelle due Regioni coinvolte. Per IZSve sono interessati il laboratorio di Chimica e i laboratori Alimenti Ufficiali della sede centrale e della sede di Pordenone, nonché il Servizio di accettazione centralizzata per il ricevimento e la spedizione dei campioni. Anche la componente produttiva è stata coinvolta nel processo, essendo stato concordato un flusso dati di ritorno sui risultati degli accertamenti diagnostici fra IZSve e Associazioni dei produttori. Il progetto ha ottimizzato i tempi di registrazione dati e di accettazione dei campioni presso IZSve, eliminando la reintroduzione manuale del dato stesso in fase di accettazione presso il laboratorio e dunque consentendo l'abbattimento degli errori in fase di registrazione e trasmissione dei dati. Uno stretto controllo dei flussi informativi sin dall'avvio del progetto ha consentito la pronta individuazione delle criticità nell'approccio al sistema da parte degli utenti e la conseguente rapida attivazione di idonee azioni correttive. Per tale motivo è attivo un servizio di assistenza agli utenti, che si occupa sia dell'assistenza e formazione degli operatori sul territorio (front-office), che della qualità dei dati (back-office) attraverso anche il periodico monitoraggio dei log di errore legati all'invio dati al flusso nazionale.

Da novembre dello scorso anno è stato inoltre completato il flusso informativo con il sistema nazionale SINVSA. In definitiva il presente progetto ha consentito l'implementazione di un modello di automazione del flusso dati e il primo biennio di attività ne ha confermato la applicabilità al campionamento ufficiale su vasta scala.

Bibliografia

- [1] Direttiva 96/23/CE del Consiglio, del 29 aprile 1996, concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti e che abroga le direttive 85/358/CEE e 86/469/CEE e le decisioni 89/187/CEE e 91/664/CEE
- [2] Camussone, P.F. (2000): "Informatica, organizzazione e strategie". Ed. McGraw-Hill Libri Italia – Milano
- [3] Ponzoni A., Rizzo S., Benvegnù F., Bortolotti L., Marangon S. (2003): "I web services come strumento per la realizzazione della cooperazione applicativa nella pubblica amministrazione: l'esperienza dell'anagrafe bovina della Regione Veneto" – TMED 2003, 5° Mostra – Convegno di Telemedicina, Informatica e Telecomunicazioni in Sanità
- [4] REGULATION (EC) No 882/2004 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 29 April 2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rule
- [5] Grandmann, S. (2008) "interoperability: A key concept for large scale, Persistent Digital Libraries. Digital Preservation Europe <http://www.digitalpreservationeurope.eu/publications/briefs/interoperability.pdf>
- [6] Manca, G.; Bricchese, M.; Marangon, S. (2015) "New protocols of communication between Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve) and the public services using mobile solutions." Proceeding ISVEE 14 Annual meeting - Veterinary Epidemiology & Economics: Planning Our Future
- [7] Manca, G; Bille, L; Boaretto, E; Barbagli, E; Dalla Pozza, M; Mazzucato, M; Arcangeli, G; Marangon, S (2016) "Protocolli innovativi di comunicazione fra Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve) e Servizi territoriali nel settore della molluschicoltura". Convegno SIRAM 10-11 novembre, Roma
- [8] "The shellfish monitoring plan Information System for automatic communication between Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve) and the Public Services in the Northern-East of Italy" – presentazione in virtual session al convegno IMCIC 2018, Orlando - Florida

***Mytilus Galloprovincialis* nell'area di Corigliano Calabro: studio della contaminazione da agenti virali, batterici e protozoari**

G. Mancuso, G. Fusco, M.G. Amoroso, S.D. Cello, M.C. Malagrìno, P. Palermo, L. Barca

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno

Keywords: MTA, HAV, NoVs, RVA, ASV, SAV, Aichivirus, Salmonella, *E.coli*, *Vibrio cholerae* e *parahaemolyticus*, *Toxoplasma gondii*, Criptosporidi e Giardia

Introduzione

La Regione Calabria, nonostante la sua importante estensione costiera, ha da poco intrapreso il percorso della classificazione di alcuni specchi d'acqua per l'allevamento di molluschi marini.

Lo scopo del presente lavoro è di valutare i risultati di un piano di campionamento effettuato sia su molluschi bivalvi autoctoni cresciuti in aree ad elevato impatto ambientale (ad esempio in prossimità di un porto) sia su molluschi provenienti dalle aree appena classificate nella zona di Corigliano Calabro, provincia di Cosenza sul mar Jonio.

Oltre ai parametri microbiologici richiesti dalla vigente normativa per la classificazione delle acque e per il mantenimento della classe di appartenenza, sono stati considerati anche virus e protozoi che rappresentano un rischio zoonotico per l'uomo quale consumatore di prodotti della pesca.

Summary

Calabria region, despite the important coastal extension, has recently embarked on the path of classification of some stretches of water for the breeding of marine molluscs.

The aim of this work is to evaluate the results of a sampling plan carried out both on native bivalve molluscs grown in areas with high environmental impact (for example near a port) and on molluscs coming from the newly classified areas.

In addition to the microbiological parameters required by the current regulations for the classification of water and for the maintenance of the class to which they belong, viruses and protozoa were also considered, which represent a zoonotic risk for humans as consumers of fishery products.

Materiali e metodi

Nel biennio 2017-2018 sono stati prelevati e analizzati campioni provenienti da zone ad elevato impatto ambientale come il porto di Corigliano Calabro (CS), da una darsena portuale privata in località "laghi di Sibari" (CS) e da uno specchio d'acqua in mare aperto a 1 km dalla costa, tra il porto di Corigliano Calabro e il porto turistico Laghi di Sibari.

Sui mitili sono state eseguite indagini microbiologiche secondo norme accreditate: UNI EN ISO 16649-3 per la numerazione di *E.coli* in MPN; ISO 21872-1:2017 per la ricerca di *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus*; AFNOR BIO-12/32 - 10/11 per la ricerca di *salmonella* spp. mediante metodica ELFA.

Per le ricerche virologiche, il genoma di HAV e NGI e NGII è stato ricercato mediante la metodica di Real-Time PCR descritta nella norma UNI CEN ISO/TS 15216-2:2013; per la ricerca di HEV e Aichi virus sono stati impiegati protocolli di Real-time PCR riportati in letteratura mentre per la ricerca di Rotavirus, Astrovirus, Sapovirus sono stati utilizzati i kit Ceram Tool distribuiti dalla Ditta Ceram SAS (France).

Per i protozoi Giardia, *Toxoplasma gondii* e Criptosporidi sono stati impiegati protocolli di Real-time PCR riportati in letteratura.

Risultati e discussione

Nel periodo considerato sono stati sottoposti a indagine 16 campioni.

Dal punto di vista microbiologico, si è evidenziato come la carica di *E.coli* riscontrata non sia mai stata molto elevata, infatti il valore massimo riscontrato è stato di 130 MPN/100 g, ben al di sotto dei limiti previsti dal Regolamento CE 2073/2005 s.m.i., quale criterio di sicurezza alimentare (230 MPN/100g).

La salmonella è stata riscontrata in un unico campione mentre non è stata riscontrata la presenza di vibrionaceae.

Dal punto di vista virologico, si sono registrate le seguenti positività: 4 Rotavirus, 3 Aichi virus, 4 sia per Astro virus che per Sapovirus, 5 Norovirus G2 e 4 Norovirus G1.

Non sono stati rilevati protozoi.

Considerata la ristretta zona di provenienza dei campioni, appare evidente come in tale area il rischio virologico sia molto più marcato rispetto a quello batteriologico e protozoario.

In Italia non esiste una specifica normativa sulla ricerca di virus enterici a trasmissione alimentare ad esclusione dell'art. 11 comma 5, lett. B del Reg. CE 853/2004 e del Decreto Legislativo n. 191 del 2006. Il primo lascia la possibilità di stabilire i "requisiti igienico sanitari supplementari in collaborazione con il laboratorio di riferimento comunitario per i molluschi bivalvi vivi comprese le analisi virologiche e le relative

norme virologiche". Il secondo obbliga le Regioni e le Province Autonome ad applicare un piano di sorveglianza in funzione della situazione epidemiologica di ciascun territorio nei confronti di agenti responsabili di zoonosi previsti nell'allegato I parte B del regolamento, tra i quali sono annoverati Calicivirus e il virus dell'epatite A (HAV).

Ricordiamo, per contro, che il virus dell'Epatite A, in base al regolamento 2073/2005, viene considerato criterio microbiologico di sicurezza alimentare applicabile solo ai frutti di bosco.

Nel report EFSA 2017 per quanto riguarda i focolai epidemici di MTA, nel 2016 l'Italia ha segnalato il più elevato numero di focolai degli ultimi 5 anni (N=91), con un incremento del 146% rispetto al 2015. Ciò è riconducibile anche a un sostanziale miglioramento nella capacità di raccolta e trasmissione delle informazioni dal livello regionale a quello centrale e, infine, all'Efsa.

Un terzo dei focolai è riconducibile a Salmonella, mentre per una quota simile non sono disponibili informazioni sull'agente causale.

I rimanenti focolai sono attribuibili a Norovirus, *C. botulinum*, *Campylobacter spp.*, Epatite A, tossine batteriche, STEC, Trichinella e a intossicazione da istamina. Per tutti i focolai, i veicoli alimentari più frequentemente implicati comprendevano prodotti della pesca, preparazioni alimentari combinate, uova e derivati, carne suina e derivati.

Merita attenzione il *trend* in aumento del numero di focolai epidemici da Norovirus osservato in numerosi Paesi europei, dato confermato anche dalle risultanze finora raccolte dall'EFSA

Bibliografia

[1] Kristan U. et al. (2014). Assessment of pollution level using *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator species: The case of the Gulf of Trieste. Mar. Pollut. Bull. 15;89(1-2):455-63.

[2] Henigman U. et al. (2015). Molecular characterisation of noroviruses detected in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from harvesting areas in Slovenia. New Microbiol. 38(2):225-33.

[3] EU Council. (2004). Regulation (EC) No 853/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Official Journal of the European Communities, Series L, 139, 55e205. http://europa.eu.int/eurllex/pri/de/oj/dat/2004/l_139/l_13920040430de00550205.pdf, 30.4.04.

[4] The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5077>

Studio microbiologico di episodi di moria anomala in allevamenti di ostrica, *Crassostrea gigas*, in Sardegna

D. Mandas^{1,2}, E. Antuofermo², F. Salati¹

¹Laboratorio di Ittiopatologia e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Oristano;

²Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Sassari, Sassari.

Keywords: *Crassostrea gigas*; Mass mortality; OsHV; *Vibrio aestuarianus*.

Introduzione

L'ostricoltura rappresenta un'attività diffusa a livello mondiale e negli ultimi anni sta acquisendo sempre più importanza a livello nazionale, nonostante le produzioni italiane dell'ostrica del Pacifico *Crassostrea gigas* siano ancora molto esigue [1]; [2]; [3].

Negli anni gli allevamenti di ostriche sono stati colpiti da episodi di moria anomala, in grado di provocare ingenti danni economici con la perdita di gran parte del prodotto. Questo è ciò che si verificò a partire dagli anni '70 in diversi paesi in tutto il mondo, ed in Europa i casi peggiori furono registrati nelle coste atlantiche della Francia nel 1991, 2001 e 2008, e quest'ultimo con morie che andarono dal 60% al 100% delle ostriche. I fattori scatenanti questi avvenimenti sono diversi, e la loro concomitanza provoca uno stato di stress nei molluschi il cui risultato si manifesta nella malattia e successiva morte degli stessi. Si tratta di fattori ambientali (alterazioni di temperatura e salinità dell'acqua) e presenza di agenti patogeni sia virali (Ostreid herpesvirus, OsHV) che batterici (appartenenti alla famiglia delle vibriaceae). Lo scopo del presente lavoro è stato lo studio dei casi di moria anomala verificatisi in due allevamenti ostricoli della Sardegna (stagno di San Teodoro e stagno di Tortoli), negli anni 2016, 2017 e 2018.

Summary

The Pacific cupped oyster (*C. gigas*) is a bivalve mollusc native to Japan where it has been bred for centuries. Only in recent times the rearing of this mollusc has spread globally, becoming one of the most important species produced all over the world.

Some episodes of mass mortality affected several farms in many countries, and these episodes were due to the action of several factors, such as microbial environment and water conditions. Recently, it was found the involvement of two pathogens: Ostreid Herpesvirus and *Vibrio aestuarianus*.

This episode of mass mortalities causes loss of most oysters in farms, with serious economic damages, as happened in France in 2008 [4].

The aim of this work was therefore to search and identify the pathogen(s) of oysters, during this episode of mortality in farms, using basic techniques of classical and biomolecular microbiology, such as microbiological isolation, cultivation and molecular identification by PCR and real time PCR.

Materiali e metodi

In due diversi allevamenti di ostriche in Sardegna si sono verificati episodi di moria anomala: nello stagno di San Teodoro (Sardegna nord-orientale) si sono manifestati a partire da Dicembre 2016 fino a Marzo 2017, mentre nello stagno di Tortoli (Sardegna orientale) sono stati osservati nei mesi di Aprile e Settembre 2017 e Maggio 2018. In corrispondenza di questi episodi sono stati prelevati in totale 84 campioni dal primo sito e 94 campioni dal secondo sito.

Sui campioni sono stati effettuati l'esame anatomo-patologico per la valutazione di eventuali lesioni macroscopiche, quindi l'isolamento microbiologico dall'epatopancreas per la ricerca e l'identificazione di *V. aestuarianus*, il principale patogeno batterico delle ostriche [5]. Sono state utilizzate dapprima tecniche di microbiologia classica e successivamente la presenza di tale patogeno è stata confermata grazie all'analisi molecolare con real time PCR del DNA totale estratto dagli isolati ottenuti in precedenza.

Inoltre è stato prelevato, da tutti i campioni, un frammento di tessuto (branchie/mantello) per procedere anche in questo caso all'estrazione del DNA totale e successivamente alla ricerca molecolare tramite reazione di PCR dell'OsHV, anch'esso potenziale causa di episodi di mortalità [6].

Risultati e conclusioni

Nello stagno di San Teodoro, in seguito alla moria anomala, è stata riscontrata una perdita superiore all'80% del prodotto. In gran parte dei soggetti esaminati (>80%) è stata evidenziata la presenza di alterazioni a livello del muscolo adduttore con scarsa reattività muscolare, sintomo di uno stato di malessere dei molluschi ed all'esame macroscopico il muscolo dell'ostrica si presentava pallido e con perdita della normale consistenza. Le analisi microbiologiche hanno evidenziato la costante presenza di numerosi batteri ascrivibili alla flora microbica ambientale e in 26/84 campioni è stato isolato *V. aestuarianus* (31%); con le analisi

molecolari è stata invece accertata l'assenza di OsHV nei campioni in esame. Tale patogeno era stato invece rilevato costantemente in passato nel medesimo allevamento, sia in campionamenti effettuati nel 2014 che nel 2015.

Dei 94 campioni prelevati nello stagno di Tortoli più del 50% ha manifestato alterazioni sia nella funzione muscolare sia nella colorazione esterna del mantello. Le analisi microbiologiche e molecolari hanno evidenziato la presenza di *V. aestuarianus* in 11/94 campioni (12%) e di OsHV in 28/94 campioni (30%); nel totale dei campioni esaminati, 4 di essi (4%) hanno mostrato una coinfezione tra il vibrione e il virus, fattore che potrebbe aver aggravato le condizioni fisiologiche delle ostriche. La presenza contemporanea di entrambi i patogeni è un aspetto negativo per l'allevamento a causa della particolare difficoltà della loro eradicazione in campo.

Alla luce dei risultati ottenuti, è possibile suggerire che la manifestazione della malattia (sia batterica che virale) ed il picco di mortalità siano favoriti in periodi dell'anno in cui sono state registrate le temperature più rigide o in cui è avvenuta una variazione delle temperature ambientali, entrambi fattori che provocano forte stress fisiologico all'ostrica.

Bibliografia

^[1] FAO (2005-2018) Cultured Aquatic Species Information Programme - *Crassostrea gigas*.

^[2] Prioli Giuseppe (2001) Censimento nazionale sulla molluschicoltura. Technical Report. Consorzio Unimar.

^[3] ISMEA (2013) Check up 2013. Il settore ittico in Italia.

^[4] Barbosa Solomieu V, Renault T, Travers MA (2015) Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol* 131:2–10.

^[5] Travers MA, Boettcher Miller K, Roque A, Friedman CS (2015) Bacterial diseases in marine bivalves. *J Invertebr Pathol* 131:11–31.

^[6] Amélie Segarra, Jean Francois Pépin, Isabelle Arzul, Benjamin Morga, Nicole Faury, Tristan Renault (2010) Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research*.

(*) Parte della tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Sassari.

Bdellovibrio and like Organisms (BALOs): un nuovo approccio per il controllo dei patogeni microbici nei molluschi?

F. Mosca¹, G. Angelico², D. Ottaviani², S. Chierichetti³, C.E. Di Francesco¹, F. Leoni², P.G. Tiscari¹

¹) Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria – Teramo (TE)

²) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche – Ancona (AN)

³) Biologa libero professionista

Keywords: *Bdellovibrio* and like organisms, *V.parahaemolyticus*, *Salmonella napoli*, Molluschi bivalvi vivi

Introduzione

I BALOs (*Bdellovibrio* and like organisms) costituiscono un gruppo di batteri Gram negativi di piccole dimensioni, mobili, aerobi obbligati e filogeneticamente eterogenei. La peculiarità dei BALOs consiste nella capacità di penetrare in batteri Gram negativi e replicare nello spazio periplasmico con seguente lisi della cellula ospite. I BALOs sono presenti in maniera ubiquitaria nell'ambiente sia terrestre che marino e, in considerazione della loro attività predatoria e della mancanza di patogenicità verso organismi superiori, sono stati proposti come agenti di controllo biologico nei confronti di batteri patogeni non solo in matrici di tipo alimentare ed ambientale, ma anche nel trattamento di malattie infettive.

Il presente lavoro è stato quindi finalizzato all'isolamento di BALOs da ambienti marini e salmastri, verificandone *in vitro* l'attività predatoria nei confronti di *Vibrio* spp. e *Salmonella* spp., così come successive prove *in vivo* sono state condotte al fine di valutare l'efficacia di un particolare ceppo isolato (*Halobacteriovorax*) nella riduzione di *Vibrio parahaemolyticus* in molluschi bivalvi marini (MBM) sperimentalmente contaminati. La depurazione costituisce un processo cruciale nella decontaminazione batterica dei MBM, tuttavia le procedure convenzionali non risultano particolarmente efficaci nei confronti di *Vibrio* e *Salmonella* [1] [2] [3]. Approcci innovativi alla depurazione post-raccolta, come Individually Quick Frozen (IQF), Heat – Cool Pasteurization (HCP) ed High Hydrostatic Pressure (HHP), spesso sono fatali per i molluschi bivalvi e non soddisfano quei consumatori che desiderano consumare molluschi crudi [4]. Pertanto il presente studio focalizza l'interesse nei confronti dei BALOs e del loro potenziale ruolo nella decontaminazione dei MBM sottoposti a depurazione, al fine di garantirne la sicurezza microbiologica, preservandone parallelamente la qualità e la shelf life.

Summary

Bdellovibrio and like organisms (BALOs) are a phylogenetically heterogeneous group of small, rapidly swimming, Gram-negative bacteria. They play a characteristic role inside the prokaryotic world, being obligate predators of other gram negative bacteria through invasion of their periplasmic space, replication and lysis of the prey cell. For their predatory role and for the apparent lack of pathogenicity towards higher vertebrates, BALOs have been proposed as living antibacterial agents for reducing the levels of harmful bacteria in environment and food of animal origin, and also for treatment of infectious disease. The present study aimed to isolate BALOs strains from marine and estuarine water and to verify *in vitro* their predatory ability against *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp. Then, *in vivo* study was performed to investigate the efficacy of an isolated *Halobacteriovorax* strain to reduce the load of *Vibrio parahaemolyticus* in marine bivalves molluscs (MBM) that were experimentally contaminated. Depuration represents the crucial process for the removal of bacteria from MBM, however conventional procedures have limited effects to reduce *Vibrio* and *Salmonella* contamination [1] [2] [3]. Innovative approaches for depuration, such as Individually Quick Frozen (IQF), Heat – Cool Pasteurization (HCP) ed High Hydrostatic Pressure (HHP), appear as little suitable to guarantee the viability of MBM and their organoleptic properties. Therefore, the present study aims to investigate the potential role of BALOs in the decontamination of MBM during depuration, in order to ensure their microbiological safety and preserving their shelf life.

Materiali e metodi

L'isolamento di BALOs da matrici ambientali è stato condotto mediante tecnica in doppio strato di agar. I campioni di acqua sono stati centrifugati e filtrati prima di essere posti in agar insieme ai batteri preda (*V.vulnificus*, *V.alginolyticus*, Non O1/O139 *V.cholerae*, *Salmonella napoli*, *Salmonella derby*, *Salmonella typhimurium* e variante monofasica 4, [5], 12, *E.coli*, *A.hydrophila*, *P. aeruginosa*). Le piastre erano incubate a 25°C fino a 10 giorni e aloni di lisi riconducibili a BALOs sono stati selezionati in funzione della tempistica di apparizione ed evoluzione morfologica. I ceppi positivi a metodiche molecolari sono stati stoccati e sulla base della specificità, dell'intensità litica verificata nei saggi di placca e del sequenziamento molecolare, le indagini sono proseguite con due ceppi di *Halobacteriovorax*. Il primo ceppo è stato isolato da acque del litorale Adriatico della provincia di Ancona con preda primaria *V.parahaemolyticus* (Vp), ed è stato denominato HBXCO1, con sequenza molecolare registrata in Genbank (numero di accesso MG 770616). Un

secondo ceppo è stato isolato da acque della foce del fiume Tordino (TE) utilizzando come preda primaria *Salmonella napoli*, ed è stato denominato M7.

La capacità dei ceppi HBXCO1 e M7 di ridurre, rispettivamente, la carica di *V. parahaemolyticus* e salmonelle (*S. napoli*, *S. derby*, *S. typhimurium* e variante), è stata indagata primariamente in sistemi *in vitro*, mediante metodica microbiologica standard.

Sulla base delle indicazioni ottenute si è proceduto ad effettuare una prova di bioaccumulo ed eliminazione di *V. parahaemolyticus* in vasca per valutare la capacità depurativa dei mitili, provenienti da un allevamento al largo della costa anconetana, utilizzando il ceppo HBXCO1 come predatore.

Sono state utilizzate 3 vasche contenenti ciascuna 40 litri di acqua di mare artificiale al 3% di salinità ad una temperatura di 17°C. Una vasca per l'acclimatazione, una per il controllo e una per il test. Prima di posizionare i mitili in vasca, un'aliquota è stata analizzata per valutare il livello naturale di Vp. Dopo una acclimatazione di 24 ore i mitili sono stati contaminati con una concentrazione di *V. parahaemolyticus* pari ad un 10⁹ ufc in vasca. Al termine di questa fase un'aliquota di mitili è stata prelevata per verificare il livello di contaminazione raggiunto, mentre la restante parte è stata suddivisa equamente nella vasca di controllo ed in quella del test contenente una concentrazione di BALOs pari ad un 10⁵ in vasca.

Per i successivi tre giorni sono state prelevate delle cozze e dell'acqua da ogni vasca per valutare l'andamento di crescita del Balos e del *V. parahaemolyticus*.

Risultati e discussione

HBXCO1 e M7 mostrano una significativa attività predatoria nei confronti delle rispettive prede, riscontrata sia attraverso l'osservazione di aloni di lisi nella metodica in doppio strato di agar, sia nelle prove *in vitro* che hanno evidenziato la capacità dei due ceppi di ridurre significativamente la carica dei batteri preda, particolarmente nelle prime 24 ore di co-incubazione. Inoltre, il HBXCO1 ha mostrato anche una elevata specificità d'ospite.

I risultati ottenuti nella prova *in vivo* dimostrano come il livello di Vp nella vasca test nel corso dell'esperimento diminuisca progressivamente fino a 2 Log, mantenendosi sempre ad un livello inferiore rispetto ad *Halobacteriovorax*. Il livello di *Halobacteriovorax* si mantiene più alto rispetto al livello del Vp fino a circa 72 ore dall'inoculo, poi decresce contemporaneamente all'esaurirsi del ceppo preda.

Per quanto riguarda la vasca di controllo, invece, l'andamento del *V. parahaemolyticus* rimane costante per le prime 48 ore per poi subire una lieve diminuzione alle 72 ore.

Bibliografia

- [1] Andrews 2004. (2004). Strategies to control *Vibrios* in molluscan shellfish. Food Prot Trends 24: 70-76.
- [2] Barile et al 2009. (2009). Studio sull'efficacia di un sistema di depurazione a ciclo chiuso su molluschi bivalvi. Vet Ital. 45(4). 541-566
- [3] Croci et al 2002. (2002). Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. J Appl Microbiol 92: 460-465.
- [4] Mississippi Department of Marine Resources USA 2006. <http://www.dmr.state.ms.us/Fisheries/Seafood-Technology/pdfs/fact-sheet-postharvest-oysterprocessing.pdf2006>.

La sperimentazione in oggetto è da inserirsi nell'ambito del progetto del Ministero della Salute: RF-2013-02355019 "Biological approach to decontamination of bivalve molluscs from *V. parahaemolyticus* and *Salmonella* by *Bacteriovorax* species".

Monitoraggio *Ostreopsis ovata* litorale costiero Regione Campania anni 2008/2018

R. Rossi, O. Arace, M. G. Buonomo, V. Castellano, S. Imbimbo, V. Soprano

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, via salute,2 - 80055 Portici (NA)

Keywords: Ovatossine, Molluschi bivalvi, Spettrometria di massa ad alta risoluzione

Introduzione

Ostreopsis ovata^[1] è una microalga bentonica di origine tropicale che produce molecole tossiche, tra cui Palitossine (PITXs), Ovatossine (OvTXs) ed Ostreocine (OsTs). Queste tossine, una volta liberate nel mare, possono accumularsi negli organismi marini filtratori quali cozze e ricci di mare. Attualmente non esiste un limite di legge per queste sostanze, ma nel 2009 l'EFSA ha emanato un parere secondo cui si sconsiglia di superare il valore di 30 µg/kg per parte edibile come somma di palitossina ed ostreocina D^[2].

La palitossina (Massa=2678 Da) è la più potente tossina non proteica a tutt'oggi nota^[3] (Dose Letale₅₀ <100 nanogrammi/Kg), individuata ripetutamente in paesi tropicali come responsabile di sindromi di avvelenamento talvolta letali. L'ovatossina-a (Massa=2648 Da), molto simile strutturalmente alla palitossina, si differenzia da quest'ultima per due atomi di ossigeno in meno. Da studi condotti su cellule HaCaT e su test ELISA è stato identificato un potere tossico per l'ovatossina-a pari al 50% di quello della palitossina^[4].

Le tossicità dei prodotti ittici che vengono a contatto con la microalga sono ampiamente noti in paesi tropicali dove ogni anno la palitossina o i suoi analoghi si rendono responsabili di sindromi di avvelenamento talvolta letali, note col nome di clupeotossismo^[5]. Nel Mediterraneo, alcuni prodotti ittici quali cozze di scoglio e ricci di mare sono noti accumulare le tossine, rappresentando quindi l'anello della catena alimentare attraverso cui le tossine passano dalla microalga all'uomo.

Summary

Ostreopsis ovata^[1] is a benthic microalgae of tropical origin that produces toxic molecules, including Palitoxins (PITXs), Ovatoxins (OvTXs) and Ostreocins (OsTs). These toxins, once released into the sea, can accumulate in marine filtering organisms such as mussels and sea urchins. Currently there is no legal limit for these substances, but in 2009 the EFSA issued an opinion considering not safety to exceed the value of 30 µg/kg per part edible as a sum of palitoxin and ostreocin D^[2].

Palitoxin (Mass Weight = 2678 Da) is the most potent non-protein toxin known to date^[3] (Lethal Dose₅₀ <100 nanograms/Kg), repeatedly identified in tropical countries as responsible for some lethal poisoning syndromes. The ovatoxin-a (Mass Weight = 2648 Da), very similar structurally to the palitoxin, differs from the latter by two oxygen atoms less. From studies conducted on HaCaT cells and on the ELISA test a toxicity for ovatoxin-a equal to 50% of that of the palitoxin has been identified^[4].

The toxicities of the fish products that come in contact with the microalgae are widely known in tropical countries where every year the palitoxin or its analogs are responsible for some lethal poisoning syndromes, known as clupeotoxism^[5]. In the Mediterranean, some fish products such as mussels covering wave-washed rocks and sea urchins are known to accumulate toxins, thus representing the link in the food chain through which toxins pass from the micro-algae to humans.

Materiali e Metodi

Nel corso degli anni 2008-2018, nell'ambito del "Piano di Monitoraggio *Ostreopsis ovata* lungo le coste campane" sono stati raccolti 472 campioni tra cozze e ricci di mare sui quali è stata verificata l'eventuale presenza di Ovatossine e Palitossine.

L'estrazione sui campioni è stata così effettuata:

1. 10 grammi di campione sono omogenati in ultraturrax
2. Si aggiungono 30 mL di acetone e si agita su vortex per 1 min
3. 10 min di centrifuga a 3000 rpm
4. Il surnatante viene filtrato su carta WATMAN
5. Il rimanente residuo solido viene nuovamente estratto con 30 mL of MeOH.
6. I due estratti di acetone e metanolo vengono uniti e portati a secco in evaporatore rotante alla temperatura di 40 °C.
7. Il residuo secco viene ripreso e si effettua una separazione liquido-liquido
8. L'estratto finale ha una concentrazione pari ad 1 g di tessuto edibile per mL
9. 5µL dell'estratto vengono infine iniettati nello spettrometro di massa ad alta risoluzione
10. La quantificazione viene effettuata su standard interno di palitossina Wako Chemicals
11. Limite di Quantificazione (LOQ)= 0.5 µg/kg

Risultati e Discussione

L'elevato numero di campioni positivi evidenzia un possibile rischio sanitario da presenza di ovatossine nei tipici "frutti di mare" che, crescendo spontanei nei tratti di costa rocciosa della Campania, vengono tipicamente raccolti dai bagnanti nel periodo estivo. Il range di concentrazione delle tossine è molto ampio (da 5 µg/kg a 260 µg/kg). L'assenza di casi di tossicità conclamata a tutt'oggi in Campania non deve far pensare ad un'assenza totale del rischio, poiché molto spesso è possibile che i casi di tossicità da *Ostreopsis* siano associati ad altri agenti eziologici presenti nei molluschi.

Bibliografia

[1] Tognetto L.; Bellato S.; Moro I.; Andreoli C., DOI: <https://doi.org/10.1515/botm.1995.38.1-6.291>

[2] Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group, EFSA Journal: 15 dicembre 2009

[3] Moore R.E.; Bartolini G., J. Am Chem. Soc. 1981;103:2491-2494

[4] Pelin M, Forino M, Brovedani V, Tartaglione L, Dell'Aversano C, Pistocchi R, Poli M, Sosa S, Florio C, Ciminiello P, Tubaro A., Environ Sci Technol. 2016 2;50:1544-51

[5] Onuma Y, Satake M, Ukena T, Roux J, Chanteau S, Rasolofonirina N, Ratsimaloto M, Naoki H, Yasumoto T., Toxicon 1999; 37:55-65

I controlli ufficiali sui molluschi bivalvi dopo le modifiche introdotte dal Reg. (UE) 2015/2285

S. Rubini¹, C. Berardelli², A. Tosi², D. Gigliotti¹, L. Cozzi³, E. Suffredini³

¹) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) – Sezione di Ferrara *
silva.rubini@izsler.it;

²) Azienda USL Ferrara; U.O. Attività Veterinarie – Ferrara;

³) Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria – Roma

Keywords: Centro Depurazione Molluschi, *Escherichia coli*, vongola verace, mitilo, unità campionaria

Introduzione

Il Regolamento (UE) 2015/2285 della Commissione dell'8 dicembre 2015 (Reg. 2015/2285) introduce modifiche sostanziali all'allegato II del Reg. (CE) n. 854/2004 (organizzazione dei controlli ufficiali relativamente ai molluschi bivalvi vivi) e all'allegato I del Reg. (CE) n. 2073/2005 (criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari) uniformando, a decorrere dal 1° gennaio 2017, il criterio *Escherichia coli* per i prodotti immessi sul mercato a quanto definito nel Codex Alimentarius. Tale approccio consiste in un piano di campionamento a tre classi (n=5, c=1, m=230 e M=700 *E. coli* MPN/100 g), in luogo del precedente piano a due classi (n=1, c=0, M=230 *E. coli* MPN/100 g). Scopo del presente lavoro è stato la valutazione dell'impatto di tale modifica sulle attività di controllo dei molluschi prodotti nella Regione Emilia Romagna mediante la revisione critica dei risultati acquisiti nelle determinazioni di *E. coli* nel corso degli ultimi 4 anni.

Summary

The Regulation (EU) 2015/2285 has amended the Reg. 854/2004 with regard to the sampling criteria. According to that, the enumeration of *E. coli* must be performed on five sample units, in agreement with what set in Codex Alimentarius. Molluscs are suitable for human consumption if all the five values observed are \leq 230 MPN/100 g of flesh and intravalvular liquid or if one of the five values observed is between 230 and 700 MPN/100 g of flesh and intravalvular liquid. Our data show that, in Emilia Romagna, the prevalence of non-compliant bivalve molluscs samples did not varied significantly with the introduction of Reg. 2015/2285. However, the revision of legislation reduced the risk of marketing bivalves characterized by higher contamination levels, therefore guarantying a higher level of protection of consumer health.

Materiali e Metodi

Nel periodo compreso fra il 1° gennaio 2015 e il 30 settembre 2018, 755 campioni di molluschi (132 mitili e 623 vongole), prelevati in fase di commercializzazione, sono stati conferiti alla sezione di Ferrara dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna per attività di controllo ufficiale (Tabella 1). I campioni sono stati sottoposti alla determinazione di *E. coli* in accordo con le modalità definite dalla normativa (metodo ISO 16649-3:2015) e la conformità degli esiti analitici è stata valutata in relazione alla normativa vigente all'atto del campionamento (Reg. 2073/2005 s.m.i.). La frequenza di non conformità è stata rivalutata mediante analisi retrospettiva dei risultati acquisiti e la significatività statistica delle differenze riscontrate è stata valutata mediante Fisher's exact test.

Risultati e discussione

Sui 755 campioni esaminati, 28 (3,71%, C.I. 95%: 2,56%-5,33%) sono risultati non conformi ai criteri della normativa (Tabella 1), con un tasso di non conformità pressoché equivalente per mitili e vongole (3,03% per i primi, 3,85% per le seconde). La frequenza delle non conformità nel biennio 2015-2016 e nel biennio 2017-2018, ovvero prima e dopo l'entrata in vigore del Reg. 2015/2285, è stata rispettivamente del 4,32% e del 2,96%, con una differenza statisticamente non significativa (Fisher's exact test $p=0.34$). Tali risultati evidenziano come l'introduzione del piano campionario a tre classi, migliorando la probabilità di rilevazione di lotti non conformi, abbia determinato un incremento del livello di tutela del consumatore, senza tuttavia determinare un aggravio sanzionatorio nei confronti degli operatori della produzione.

La Tabella 2 mostra la ripartizione degli esiti analitici ottenuti a partire dall'introduzione del Reg. 2015/2285. Come è possibile notare, le non conformità ottenute nel biennio 2017-2018 includevano superamenti del tenore massimo di *E. coli* ammissibile (700 MPN/100 g) in 3 campioni, e superamenti del numero massimo di unità campionarie contenenti >230 *E. coli* MPN/100 g in 7 campioni, in circa metà dei quali lo sfioramento del limite riguardava la maggioranza delle unità campionarie. Significativamente, a fronte dei 10 campioni non conformi, 8 campioni (2,37%) mostravano valori di *E. coli* compresi fra 230 e 700 MPN/100 g in una unità campionaria. Tali campioni, conformi a norma del Reg. 2015/2285, avrebbero potuto - per mera probabilità statistica nel campionamento - essere considerati non conformi sulla base della precedente normativa.

In conclusione, la revisione introdotta dal Reg. 2015/2285 garantisce un elevato livello di tutela della salute del consumatore e una discriminazione più efficace dei lotti di molluschi bivalvi caratterizzati da un maggior rischio di contaminazione.

Bibliografia

[1] Regolamento (UE) 2015/2285 della commissione dell'8 dicembre 2015 che modifica l'allegato II del regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano per quanto riguarda taluni requisiti per i molluschi bivalvi vivi, gli echinodermi, i tunicati e i gasteropodi marini, nonché l'allegato I del regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. G.U. L 323 09.12.2015

[2] Regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. GU L 139 del 30.4.2004

[3] Reg. 2073 Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione, del 15 novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari (GU L 338 del 22.12.2005)

[4] Codex Alimentarius International Food Standards (www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/)

[5] ISO 16649-3:2015 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* -- Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide

Tabella 1: Numero di campioni esaminati per *E. coli* nei bienni 2015-2016 e 2017-2018

Anno	Campioni analizzati (N°)			Campioni non conformi (N°)			Campioni non conformi (%)		
	mitili	vongole	totale	mitili	vongole	totale	mitili	vongole	totale
2015	28	173	201	0	5	5	0,0%	2,9%	2,5%
2016	51	165	216	2	11	13	3,9%	6,7%	6,0%
	79	338	417	2	16	18	2,53%	4,73%	4,32%
Subtotale									
2017	33	157	190	1	1	2	3,0%	0,6%	1,1%
2018	20	128	148	1	7	8	5,0%	5,5%	5,4%
	53	285	338	2	8	10	3,77%	2,81%	2,96%
Subtotale									
Totale	132	623	755	4	24	28	3,03%	3,85%	3,71%
[C.I. 95%]							[0,93-7,79]	[2,58-5,69]	[2,56-5,33]

Tabella 2: Distribuzione degli esiti analitici per *E. coli* nel biennio 2017-2018

Classe di risultato	Campioni (N°)	Campioni (%)
Conforme	5 u.c. <230	320
	230 < 1 u.c. < 700	8
Non conforme	1 u.c. > 700	3
	2 u.c. > 230	4
	3 u.c. > 230	0
	4 u.c. > 230	1
	5 u.c. > 230	2

Rilevazione e caratterizzazione molecolare e sierologica di *Vibrio parahaemolyticus* in molluschi bivalvi del Nord Adriatico (2011-2016)

S. Rubini¹, L. Cozzi², M. Losardo², C. Berardelli³, MN Losio⁴, E. Pavoni⁴, B. Bertasi⁴, E. Suffredini²

¹) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Ferrara;

²) Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Roma;

³) Azienda USL Ferrara; U.O. Attività Veterinarie – Ferrara;

⁴) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, molluschi, TDH, TRH, T3SS, valutazione del rischio

Introduzione

Vibrio parahaemolyticus è un microrganismo autoctono dell'ambiente marino, occasionalmente responsabile di gastroenterite nell'uomo come conseguenza del consumo di prodotti ittici crudi o poco cotti o in relazione ad eventi di cross-contaminazione di prodotti cotti. Diversi fattori di patogenicità sono stati descritti in *V. parahaemolyticus* ed in particolare due emolisine (TDH e TRH, codificate rispettivamente dai geni *tdh* e *trh*) sono state associate all'instaurarsi di sintomatologia gastroenterica nell'uomo. Più recentemente, è stata sottolineata la rilevanza dei sistemi di secrezione di tipo III (T3SS) ai fini della patogenicità. Scopo del presente lavoro è stata la valutazione della prevalenza di *V. parahaemolyticus* e la caratterizzazione della sua potenziale patogenicità, in molluschi bivalvi raccolti dal Nord del Mare Adriatico nel periodo compreso fra il 2011 e il 2016.

Summary

Vibrio parahaemolyticus is a microorganism occasionally responsible for gastroenteritis associated to seafood products. Several pathogenicity characters (*tdh*, *trh*, T3SS) have been described in *V. parahaemolyticus*. Aim of this study was to assess the prevalence of *V. parahaemolyticus* in bivalves from the Northern Adriatic Sea and to characterize the distribution of pathogenicity markers in the collected isolates. A total of 1262 bivalve samples were collected over 6 years (2011-2016). *V. parahaemolyticus* was detected in 33.4% of the samples and 272 isolates were characterized. The gene *tdh* was never detected, while 4.0% of the isolates carried the *trh* gene (*trh2* variant) and 16 isolates (5.9%) carried Type III Secretion Systems. The 16 potentially pathogenic isolates showed diversity of serotypes and Sequence Types and were mostly isolated during spring and summer of the different years.

Materiali e metodi

Un totale di 1262 campioni di molluschi bivalvi (prevalentemente *Ruditapes decussatus*, e in proporzione minore *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* e *Chamelea gallina*) erano prelevati nel periodo compreso fra gennaio 2011 e dicembre 2016. Le analisi per la ricerca e l'isolamento di *V. parahaemolyticus* erano condotte secondo la ISO 21872 [1]. Gli isolati erano identificati mediante PCR per il gene *toxR* [2] ed erano caratterizzati per la presenza dei marker di patogenicità: i geni *tdh* e *trh* [3], tipizzati per le loro varianti molecolari [4], e i sistemi di secrezione T3SS1, T3SS2□ e T3SS2□ [5], ciascuno dei quali studiato mediante ricerca di quattro differenti geni. Una ulteriore caratterizzazione mediante sierologia e multi-locus sequence typing (MLST) [6] era effettuati sugli isolati contenenti marker di patogenicità.

Risultati e discussione

V. parahaemolyticus è stato rilevato in 421 campioni, con una prevalenza complessiva del 33.4% (C.I.95%: 30.8% - 36.0%). In totale, 272 isolati di *V. parahaemolyticus* erano sottoposti a caratterizzazione: il gene *tdh* non era mai rilevato (prevalenza 0%, C.I. 95%: 0.0% - 1.4%), mentre 11 isolati (4.0%, C.I. 95%: 2.3% - 7.1%) contenevano il gene *trh* (tutti variante *trh2*).

Relativamente ai sistemi di secrezione, i quattro geni del T3SS1 ricercati nello studio erano presenti in varie combinazioni, con nessuno dei quattro marker sistematicamente presente in tutti gli isolati. Il T3SS2□ era presente in 4 isolati (1.5%, C.I. 95%: 0.4% - 3.9%) *tdh-trh*-negativi, mentre il T3SS2□ era presente in 12 isolati (4.4%, C.I. 95%: 2.5% - 7.6%), corrispondenti agli 11 isolati *trh*-positivi e a un ulteriore isolato *trh*-negativo (Tabella 1).

La sierotipizzazione degli isolati contenenti marker di patogenicità (n=16; 5.9%, C.I. 95%: 3.6% - 9.4%) mostrava un'ampia varietà di sierotipi: O1:K32, O1:K33, O3:K48 (n=2), O3:KUT (n=2), O8:KUT, O10:K22, O10:KUT (n=7), O11:K51. Analogamente, il MLST evidenziava la presenza di diversi sequence type (ST): ST6 (n=3), ST73, ST107, ST137, ST448, ST1159 (n=2), ST1410 e di numerosi isolati non tipizzabili (n=6).

Undici dei 16 isolati con caratteri di patogenicità erano isolati in corrispondenza della tarda primavera e dell'inizio dell'estate (maggio e giugno) dei diversi anni, in presenza di temperature delle acque di produzione dei molluschi generalmente $\geq 16^{\circ}\text{C}$.

In conclusione, *V. parahaemolyticus* mostra un'elevata prevalenza (33.4%) nei campioni di molluschi bivalvi dell'alto Adriatico, con presenza dei marker tradizionalmente associati alla patogenicità (*tdh* and *trh*) nel 4.0% degli isolati e dei diversi marker, inclusi i T3SS, nel 5.9% degli isolati. Gli isolati potenzialmente patogeni mostrano inoltre una notevole variabilità delle caratteristiche sierologiche e del profilo genetico ed una associazione con il periodo primaverile-estivo.

Ringraziamenti: Questa ricerca è stata in parte finanziata dal Ministero della Salute, Ricerca Finalizzata "Vibrio and viruses in shellfish: old and emerging pathogens. Evaluation of exposure levels for the implementation of prevention strategies" RF-2011-02349693

Bibliografia

- [1] ISO 21872 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. -- Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*
- [2] Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J Clin Microbiol.* 1999;37(4):1173-7
- [3] Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MC, Jones DD, Kaysner CA. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J Microbiol Methods.* 1999;36(3):215-25
- [4] Suffredini E, Cozzi L, Ciccaglioni G, Croci L. Development of a colony hybridization method for the enumeration of total and potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish. *Int J Food Microbiol.* 2014;186:22-31
- [5] Jones JL, Lüdeke CH, Bowers JC, Garrett N, Fischer M, Parsons MB, Bopp CA, DePaola A. Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *J Clin Microbiol.* 2012;50(7):2343-52
- [6] González-Escalona N(1), Martínez-Urtaza J, Romero J, Espejo RT, Jaykus LA, DePaola A. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing. *J Bacteriol.* 2008;190(8):2831-40.

Tabella 1: Caratterizzazione molecolare e sierologica dei 16 isolati di *V. parahaemolyticus* con marker di patogenicità

ID isolato	data isolamento	temperatura acqua ($^{\circ}\text{C}$)	<i>tdh</i>		<i>trh</i>		TTSS1	TTSS2 α	TTSS2 β	sierologia	MLST
			<i>tdh1</i>	<i>tdh2</i>	<i>trh1</i>	<i>trh2</i>					
1122	30/05/2012	n.d.	-	-	-	+	+	-	+	O10:KUT	107
1129	19/06/2012	n.d.	-	-	-	+	+	-	+	O11:K51	1410
1158	24/10/2012	n.d.	-	-	-	+	+	-	+	O10:KUT	unk
1164	21/11/2012	n.d.	-	-	-	+	+	-	+	O1:K33	448
1207	10/01/2014	7,6	-	-	-	+	+	-	+	O1:K32	unk
1215	12/03/2014	11,9	-	-	-	+	+	-	+	O10:KUT	unk
1219	06/05/2014	16,5	-	-	-	-	+	+	-	O10:K22	unk
1220	09/05/2014	18,8	-	-	-	-	+	+	-	O10:KUT	unk
1221	09/05/2014	19,2	-	-	-	+	+	-	+	O3:KUT	137
1225	29/05/2014	21,2	-	-	-	+	+	-	+	O10:KUT	unk
1226	30/05/2014	20,0	-	-	-	+	+	-	+	O3:K48	6
1234	30/06/2014	23,7	-	-	-	+	+	-	+	O3:K48	6
1317	27/10/2015	11,8	-	-	-	+	+	-	+	O3:KUT	73
1340	16/05/2016	17,1	-	-	-	+	+	-	+	O10:KUT	6
1341	18/05/2016	19,1	-	-	-	-	+	+	-	O8:KUT	1159
1349	06/06/2016	22,4	-	-	-	-	+	+	-	O10:KUT	1159

Metodiche molecolari per la valutazione dello stato sanitario di *Ruditapes philippinarum*

S. Satto¹, M. Gastaldelli¹, M. Smits², G. Dalla Rovere², L. Bargelloni², G. Arcangeli¹

- ¹) Centro di Referenza Nazionale per le Malattie dei Pesci, molluschi e Crostacei, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, V.le Università, 10, 35020, Legnaro (PD);
²) Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Università degli Studi di Padova, V.le Università xx, 35020, Legnaro (PD)

Keywords *Ruditapes philippinarum*, *Vibrio tapetis*, *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, *Perkinsus olseni*, *Mikrocytos mackini*, real-time PCR

Introduzione

L'allevamento della vongola *Ruditapes philippinarum* rappresenta un'importante realtà produttiva italiana, coprendo quasi la metà della produzione di molluschi bivalvi a livello nazionale. Nell'anno 2016, la sua produzione ammontava a 30.053 tonnellate¹, tuttavia l'allevamento intensivo di tali specie è stata spesso oggetto di mortalità che hanno determinato significativi cali di produttività. Sebbene le principali cause di mortalità siano da ricondurre a condizioni climatiche/ambientali sfavorevoli quali variazioni di salinità e/o temperatura dell'acqua, in alcuni casi lo stato sanitario di questi animali può essere compromesso da infezioni causate da *Vibrio tapetis*, *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, *Perkinsus olseni*, o la specie esotica *Mikrocytos mackini*. I patogeni più rilevanti per *R. philippinarum* sono *V. tapetis*, agente eziologico della Brown Ring Disease (BRD) ed il parassita *P. olseni*. Inoltre, sebbene non sia ancora stata dimostrata la patogenicità di *V. splendidus*, alcuni studi hanno evidenziato l'associazione tra episodi di mortalità di vongole e la carica di *V. splendidus* negli animali analizzati². Nonostante il parassita *M. mackini* non sia stato mai rilevato nelle acque nazionali, questo organismo è endemico nelle vongole allevate negli USA. La frequente importazione di seme americano rappresenta quindi un rischio ecologico che necessita una costante attività di monitoraggio del prodotto importato. Allo scopo quindi di monitorare lo stato sanitario degli allevamenti di *R. philippinarum* nel litorale veneto, il centro di referenza nazionale per le malattie dei pesci, molluschi e crostacei dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (CSI) ha quindi implementato protocolli di real-time PCR per la rilevazione, ed eventualmente la quantificazione di *V. tapetis*, *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, *P. olseni*, e la specie esotica *M. mackini*. Tali metodiche sono state quindi utilizzate per valutare lo stato sanitario di animali allevati, da seme fino alla taglia commerciale, in un vivaio a Chioggia (Laguna di Venezia).

Summary

The farming of *Ruditapes philippinarum* clams represents almost an important part of the entire bivalve mussel production in Italy. Unfortunately, mortality events affecting these animals lead to significant and expensive losses. The health status of clams can be compromised by the infection of several pathogens, like *V. tapetis*, *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, *P. olseni*, or the exotic species *M. mackini*. The reference national center for fish, mussel and shellfish diseases implemented real-time PCR protocols with the aim to detect and eventually quantify these pathogens. The health status of clams farmed in a hatchery in Chioggia (Venice Lagoon) was evaluated by means of the newly implemented protocols. All the samples were negative for *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, *V. tapetis* and *Mikrocytos spp.* Among all, 29 samples were positive and quantifiable for *P. olseni*.

Materiali e metodi

Le branchie di vongole provenienti da Chioggia sono state campionate e conservate a -80°C fino a processamento. Per ciascun individuo, le branchie sono state omogenate interamente e, a partire dal peso iniziale delle branchie, sono stati prelevati 25 mg di omogenato da cui è stato estratto il DNA utilizzando il kit commerciale "Invisorb spin tissue mini kit" (Strattec Biomedical Systems, Germany), seguendo le istruzioni fornite dal produttore. I campioni di DNA sono stati poi quantificati e successivamente normalizzati a 5 ng/μl per le analisi di real-time PCR quantitativa (qPCR) per *V. splendidus* e *V. aestuarianus*, e a 10 ng/μl per le analisi di real-time quantitativa per *P. olseni*, per la real-time PCR di *V. tapetis* e per la nested PCR per la rilevazione di *Mikrocytos spp.*

La metodica di rivelazione di *V. tapetis* in *R. philippinarum*³ prevede l'amplificazione di un frammento del gene *virB4*, utilizzando un protocollo di real-time PCR con sonda Taqman *virB4-P1* (5'-FAM-CGAGTACCAACATGCCTTCCCGT-TAMRA-3') e primer *virB4-F3* (5'-TTAAAAGTGGCGGAGGAATG-3') e *virB4-r3* (5'-AAGCTCTGCATCGGTTAGGA-3'). La reazione è stata condotta in un volume di 15 μl contenente 0.5 μM di ciascun primer, 0.1 μM di sonda, 12.5 μl di Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies) e 5 μl di DNA. Il profilo termico utilizzato consisteva in 3 min di denaturazione a 95°C seguiti da 45 cicli di amplificazione (10 sec a 95°C, 20 sec a 54°C, 15 sec a 72°C), utilizzando lo strumento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Biorad).

La metodica di qPCR per rilevazione e quantificazione di *V. aestuarianus*⁴ prevede l'amplificazione di un frammento del gene *dnaJ* con primer *dnaJ-F* (5'-GTATGAAATTTTAACTGACCCACAA-3') e *dnaJ-R* (5'-TCAATTTCTTTTCGAACAACCAC-3') e sonda *dnaJ-probe* (5'-Texas Red-TGGTAGCGCAGACTTCGGCGAC-BHQ-2-3'). La reazione è stata condotta in un volume di 20 µl contenente 0.3 µM di ciascun primer, 0.2 µM *dnaJ-probe*, 10 µl di Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies) e 5 µl di DNA. Il profilo termico consisteva in una denaturazione iniziale di 3 min a 95°C, seguita da 40 cicli di amplificazione (10 sec a 95°C e 20 sec a 60°C).

Per la rilevazione e quantificazione di *V. splendidus*, è stato adottato un protocollo di qPCR specifico per il gene batterico *16S-rRNA*⁶, con primer 16S SpF2 (5'-ATCATGGCTCAGATTGAACG-3'), 16S SpR2 (5'-CAATGGTTATCCCCACATC-3') e sonda 16S probe (5'-FAM-CCCATTAACGCACCCGAAGGATTG-BHQ1-3'). La reazione è stata condotta in un volume di 20 µl contenente 1.6 µM di ciascun primer, 0.8 µM 16S -probe, 10 µl di Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies) e 5 µl di DNA. Il profilo termico prevede una denaturazione iniziale di 3 min a 95°C, seguita da 40 cicli di amplificazione (15 sec a 95°C e 90 sec a 60°C).

Le cariche di *V. splendidus* e *V. aestuarianus* presenti nei campioni analizzati sono state stimate mediante confronto con rette di regressione ottenute analizzando, parallelamente ai campioni, diluizioni seriali di specifici plasmidi ricombinanti.

La metodica di rilevazione di *Mikrocytos spp.* consisteva nell'amplificazione mediante nested PCR di un frammento del gene SSU rRNA. La prima reazione di amplificazione prevedeva l'utilizzo dei primer interni *mik451F* (5'-GCCGAGAYGGTTAAWGAGCCTCCT-3') e *mik1511R* (5'-CCTATTCAGCGCGCTCTGTTGAGA-3') ed è stata condotta in un volume di 20 µl, contenente 10X PCR Buffer (*Invitrogen*), 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs, 0.5 µM di entrambi i primers, 0.1 µl di Platinum Taq DNA Polymerase (*Invitrogen*) e 5 µl di DNA. Il profilo termico della prima reazione consisteva in una denaturazione iniziale di 2 min a 94°C, 35 cicli di 30 sec a 94°C, 1 min a 64°C, 1 min a 72°C, seguiti da una fase di estensione finale a 72°C per 10 min. L'amplificato ottenuto con la prima PCR è stato quindi sottoposto ad ulteriore amplificazione mediante PCR con primer *mik868F* (5'-GGACTACCAGWGGCGAAAGCGCCT-3'), *mik1340 R* (5'-TGCATCAGGGACCTACCTTWGACC-3'). Il profilo termico della seconda reazione differiva dal precedente nella fase di annealing (62°C per 1 min). I prodotti di amplificazione sono stati speratati mediante elettroforesi a 120 Volt per 60 minuti in gel d'agarosio (1%). Gli ampliconi sono stati quindi sequenziati con sequenziatore ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

La metodica di rilevazione e di quantificazione per *P. olseni* non è riportabile, essendo ancora in uno stadio di sviluppo e quindi non ancora pubblicata.

Risultati

Tutti I campioni analizzati sono risultati essere negativi per *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, *V. tapetis* e *Mikrocytos spp.* Per quanto riguarda *P. olseni*, su un totale di 192 campioni analizzati, 29 risultano essere positivi quantificabili.

Conclusioni

Questo lavoro ha permesso di implementare metodiche molecolari che permettono di monitorare lo stato sanitario degli allevamenti di *R. philippinarum*, permettendo di potenziare l'attività diagnostica a sostegno delle produzioni locali.

Bibliografia

[1] API-AMA, data referring to the year 2016

[2] Castro D, Pujalte MJ, Lopez-Cortes L, Garay E, Borrego JJ. Vibrios isolated from the cultured manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Numerical taxonomy and antibacterial activities. *J Appl Microbiol.* 2002;93(3):438-447. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01709.x

[3] Bidault A, Richard GG, Le Bris C, Paillard C. Development of a Taqman real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio tapetis* in extrapallial fluids of clams. *PeerJ.* 2015. doi:10.7717/peerj.1484

[4] Saulnier D, De Decker S, Haffner P. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *J Microbiol Methods.* 2009. doi:10.1016/j.mimet.2009.01.021

[5] <http://www.eurl-mollusc.eu/SOPs>

[6] Saulnier D, De Decker S, Tourbiez D, Travers MA. Development of a duplex Taqman real-time PCR assay for rapid identification of *Vibrio splendidus*-related and *V. aestuarianus* strains from bacterial cultures. *J Microbiol Methods.* 2017. doi:10.1016/j.mimet.2017.07.002

Valutazione dell'incidenza di *Vibrio splendidus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio aestuarianus* e Ostreid Herpes virus-1 in *Mytilus galloprovincialis* nel golfo della Spezia, nel biennio 2015-2017

L. Serracca, R. Battistini, I. Rossini, V. Listorti, C. Ercolini

Istituto Zooprofilattico sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione della Spezia - La Spezia (SP)

Keywords: *Vibrio* spp.; OsHV-1; *Mytilus galloprovincialis*

Introduzione

I molluschi bivalvi appartenenti al genere *Mytilus* sono organismi filtratori, in grado di concentrare al loro interno vari agenti microbici potenzialmente patogeni per l'animale. I Vibrioni, in particolare, sono ubiquitari negli ambienti marini e possono essere ritrovati in grandi quantità all'interno dei molluschi bivalvi. Generalmente questi microrganismi sono normali componenti della microflora dei mitili senza nessun significato patologico [1] e possono essere ritrovati in tessuti di molluschi sani durante tutto l'anno. Tuttavia, in condizioni particolari, possono interferire con il loro sistema immunitario influenzando sulla loro vitalità ed essere associati a mortalità, in particolare nelle forme giovanili e nelle larve. Microrganismi appartenenti ai generi *V. splendidus* clade, *V. harveyi* clade e *V. aestuarianus* possono essere patogeni per i molluschi [2]. Tra i *Vibrio* patogeni, specie appartenenti al *V. splendidus* clade sono state recentemente associate a forme di mortalità massiva in mitili [3] e sono state isolate anche in corso di un focolaio di mortalità anomala avvenuto in allevamenti nel Golfo della Spezia nel febbraio del 2015. Durante questo focolaio l'elevata mortalità è stata causata dalla presenza del patogeno e da condizioni ambientali sfavorevoli concomitanti che hanno causato alterazioni del metabolismo e delle difese immunitarie dei mitili. Le specie appartenenti al *V. splendidus* clade non sono tutte patogene. I determinanti di patogenicità dei *V. splendidus* sono principalmente la metalloproteasi *vsm* e la proteina esterna di membrana *ompU*. Ostreid herpesvirus (OsHV-1) è un agente virale che sta causando problematiche all'allevamento di ostriche, determinando in questi animali immunosoppressione e favorendo l'infezione da parte di agenti batterici [4]. OsHV-1 viene isolato anche dai mitili [5] ed è stato visto che mitili infettati sperimentalmente possono presentare le stesse alterazioni istologiche rinvenute nelle ostriche infette e che possono fungere da *reservoir* per questo microrganismo [6]. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare l'incidenza di microrganismi potenzialmente patogeni quali *V. splendidus*, *V. harveyi*, *V. aestuarianus* e OsHV-1, nei mitili allevati nel Golfo della Spezia dall'ottobre del 2015 all'ottobre del 2017.

Summary

Shellfish farms have been impacted by bacterial infectious diseases for many years, inducing repeated episodes of mortality and consequently important economic losses. The most common causative agent is represented by members of the genus *Vibrio*. Among bivalve species and until recently, mussels were not massively affected by bacterial pathogens. The Gulf of La Spezia is a commercially important area both as a shipping port and for mussel farming. In this area in February 2015 it has been reported an episode of abnormal mortality in mussels *Mytilus galloprovincialis*. During this episode, bacteria belonging to the *V. splendidus* clade were isolated. In this study are reported the results of a microbiological survey conducted from October 2015 until October 2017, to monitor the presence of pathogenic bacteria (*V. splendidus* clade, *V. harveyi*, *V. aestuarianus*) and OsHV-1 in four rearing sites in the Gulf of La Spezia. Strains belonging to *V. splendidus* clade were isolated in 60% of samples (55/92). *V. harveyi* was isolated in 5,4% of samples (5/92) in the last 3 months of the sampling. DNA of OsHV-1 was detected in 13% of samples (12/92), from July 2016 to May 2017. Despite the presence of these pathogens, outbreaks of abnormal mortality were not reported during the survey, confirming the importance of environmental factors in the emergence of the diseases.

Materiali e metodi

I campioni di mitili sono stati raccolti da 4 aree di produzione nel Golfo della Spezia, site all'interno ed all'esterno della diga foranea, denominate diga ponente interna, diga ponente esterna, diga levante interna e Portovenere. Il campionamento è stato effettuato mensilmente da ottobre 2015 a settembre 2016, ad eccezione del mese di agosto e da novembre 2016 ad ottobre 2017, per un totale di 23 campionamenti. I campioni sono stati mantenuti refrigerati e trasportati in laboratorio per l'isolamento e l'identificazione batterica e per le analisi virologiche. Per l'isolamento batterico di *V. splendidus* clade, *V. aestuarianus* e *V. harveyi* sono state prelevate porzioni di mantello e branchie ed eseguite diluizioni da 1/100 fino a 1/10000 con acqua peptonata alcalina (APWS). Cinquanta µl delle precedenti diluizioni sono state seminate su piastre contenenti Agar Tiosolfato-citrato-bile-saccarosio (TCBS). Le colonie morfologicamente corrispondenti a *Vibrio* sono state selezionate e prelevate con un'ansa monouso sterile e risospese in 200 µl

di acqua sterile. Il DNA è stato estratto mediante bollitura (10 minuti a 98°C) e, dopo raffreddamento, 5 µl sono stati utilizzati per le indagini biomolecolari. Per l'identificazione di *V. splendidus* clade e *V. aesturianus* è stato utilizzato un protocollo di multiplex Real Time PCR in accordo al protocollo messo a punto dall'IFREMER nel 2013. Dal momento che il gruppo polifiletico di *V. splendidus* può comprendere all'interno sia ceppi patogeni che non, per identificare la patogenicità degli isolati risultati positivi in PCR, sono state condotte altre due PCR classiche per la ricerca del DNA dei fattori di virulenza *vsm* e *ompU* [7]. La ricerca di *V. harveyi* è stata eseguita mediante un test di PCR classica per la ricerca del gene dell'emolisina *hly* utilizzando la coppia di primer HLY-F ed HLY-R precedentemente pubblicati [8]. Per l'individuazione di OsHV-1 il DNA è stato estratto da campioni di mantello e branchie (0,025g) utilizzando un kit commerciale ed è stato amplificato utilizzando un protocollo di Real Time PCR in accordo al regolamento UE 175/2000 utilizzando la coppia di primer HVDP-F ed HVDP-R.

Risultati e discussioni

Vibrio appartenenti al *V. splendidus* clade sono stati isolati dal 60% dei campioni (55/92). Dai dati ottenuti non sembra esserci una particolare stagionalità. Il 46% degli isolati (25/55) presenta fattori di virulenza, la maggior parte, 33%, il solo fattore *vsm* (18/55), nel 9% (5/55) i due fattori di virulenza sono stati trovati entrambi e nell'4% (2/55) è stato individuato il solo fattore di virulenza *ompU*. La presenza di *V. harveyi* è stata riscontrata nel 5,4% dei campioni (5/92) durante gli ultimi 3 mesi di campionamento. Tutti i campioni sono risultati negativi per *V. aesturianus*. L'OsHV-1 è stato riscontrato nel 13% dei campioni (12/92), soltanto nel periodo da luglio 2016 a maggio 2017. I microrganismi appartenenti al *V. splendidus* clade sono spesso riportati come normali commensali della flora degli animali marini, e non è riportata una correlazione tra i *pattern* di virulenza fenotipici e genotipici [7]. Nonostante la presenza di questi microrganismi, presentanti anche fattori di virulenza, non sono stati riportati casi di mortalità anomala durante il periodo del campionamento. Questa evidenza conferma la necessità di fattori ambientali sfavorevoli concomitanti affinché questi microrganismi possano manifestare il loro potenziale patogeno. Risulta interessante anche l'individuazione del *V. harveyi*, microrganismo patogeno per numerosi vertebrati ed invertebrati marini. La presenza di OsHV-1 nei mitili allevati nel golfo della Spezia può rappresentare un fattore di rischio per l'allevamento ostriche concave (*Crassostrea gigas*) e delle ostriche piatte (*Ostrea edulis*) che vengono allevate nelle stesse aree e per le quali è ben noto il potenziale patogeno dell'OsHV-1, ed anche per gli stessi mitili, anche se resta da investigare il potenziale patogeno di OsHV-1 in questi animali.

Bibliografia

- [1] Kwan T., Bolch C. (2015). Genetic diversity of culturable vibrio in an Australian blue mussels *Mytilus galloprovincialis* hatchery. Dis. Aquat. Org. 116, 37-46
- [2] Travers M.A., Miller K.B., Ana Roque A., Friedman C.S. (2015). Bacterial diseases in marine bivalves. Journal of Invertebrate Pathology 131, 11-31
- [3] Oden E., Burioli E.A.V., Trancart S., Pitel P.H., Houssin M. (2016). Multilocus sequence analysis of *Vibrio splendidus* related-strains isolated from blue mussel *Mytilus* sp. during mortality events. *Acquaculture*, 464:420-427
- [4] de Lorgeril J., Lucasson A., Petton B., Toulza E., Montagnani C., Clerissi C., Vidal-Dupiol J., Chaparro C., Galinier R., Escoubas J.M., Haffner P., Dégremont L., Charrière G.M., Maxime Lafont M., Delort A., Vergnes A., Chiarello M., Fauray N., Rubio T., Leroy M.A., Pérignon A., Régler D., Morga B., Alunno-Bruscia M., Boudry P., Le Roux F., Destoumieux-Garzón D., Gueguen Y., Guillaume Mita G. (2018). Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nature Communication* 9, DOI: 10.1038/s41467-018-06659-3
- [5] Domeneghetti S., Varotto L., Civettini M., Rosani U., Stauder M., Pretto T., Pezzati E., Arcangeli G., Turolla E., Pallavicini A., Venier P. (2014). Mortality occurrence and pathogen detection in *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis* close-growing in shallow waters (Goro lagoon, Italy). *Fish and Shellfish Immunology* 41: 37-41
- [6] O' Reilly A.J., Laide C., Maloy A., Hutton S., Bookelaar B., O'sullivan K., Lynch S.A., Culloty S.C. (2018). The role of the mussel *Mytilus* spp. in the transmission of ostreid herpesvirus-1 microVar. *Parassitology* 145: 1-10
- [7] Nasfi H., Travers M.A., de Lorgeril J., Habib C., Sannie T., Sorieul L., Gerard J., Avarre J.C., Haffner P., Tourbiez D., Renault T., Furones D., Roque A., Pruzzo C., Cheslett D., Gdoura R., Vallaeyts T. (2015). A European epidemiological survey of *Vibrio splendidus* clade shows unexplored diversity and massive exchange of virulence factors. *World J Microbiol Biotechnol* 31: 461-75
- [8] Haldar S., Neogi S.B., Kogure K., Chatterjee S., Chowdhury N., Hinenoya A., Asakura M., Yamasaki S. (2012). Development of a haemolysin gene-based multiplex PCR for simultaneous detection of *Vibrio campbellii*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Lett Appl Microbiol.* 50:146-52

Elementi per un'analisi del rischio da consumo di vongole veraci della Sacca di Goro: prevalenza e quantificazione dei ceppi enteropatogeni di *Vibrio parahaemolyticus*

P. Serratore, E. Zavatta, L. Lorito, G. Bignami

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie – Università di Bologna

Introduzione

Vibrio parahaemolyticus è un bacillo gram-negativo, alofilo, naturalmente presente nelle acque marine e di estuario ed è riconosciuto responsabile di zoonosi alimentari in tutto il mondo. I molluschi bivalvi, in quanto filtratori, possono concentrare questo batterio fino a 100 volte rispetto all'ambiente circostante, pertanto vongole ed ostriche, che vengono spesso consumate crude, rappresentano alimenti potenzialmente in grado di veicolare dosi infettanti [1]. Generalmente gli isolati ambientali della specie *V. parahaemolyticus* non posseggono i caratteri di patogenicità correntemente considerati, ovvero uno o entrambi i determinanti che codificano per l'emolisina TDH (thermostable direct hemolysin) e TRH (thermostable-related hemolysin) rispettivamente, ed in tali condizioni non causano alcuna infezione [2].

L'infezione conseguente al consumo di alimenti contaminati da ceppi patogeni si presenta generalmente come una gastroenterite di lieve o moderata entità ed autolimitante, con meno del 40% di casi richiedenti ospedalizzazione e/o terapia con antibiotici. Tuttavia, in individui particolarmente suscettibili, l'infezione può esitare in setticemia. I soggetti particolarmente a rischio sono quelli con diabete, gravi epatopatie o nefropatie, cancro, nonché quelli con compromissione del sistema immunitario conseguente ad infezione da HIV o terapie immunosoppressive. Inoltre, sono segnalati rari casi di infezioni di ferite [3-4]. Secondo uno studio della Food and Drug Administration, U.S. [5], una dose infettante pari a 10^8 microrganismi in totale può causare infezione nel 50% degli individui, mentre una dose pari a 10^3 - 10^4 ha una scarsissima probabilità di causare infezione ($p < 0,001$). Solo per alcuni sierotipi come O3:K6, la dose infettante può risultare anche inferiore a 10^4 [6]. Al fine di delineare elementi utili ad un'analisi del rischio connesso al consumo di vongole veraci crude o poco cotte di produzione nazionale, in questa sede vengono presentati i dati di prevalenza e quantitativi, relativi ai ceppi enteropatogeni di *V. parahaemolyticus* (*tdh+* e/o *trh+*), ottenuti nell'ambito di un monitoraggio pluriennale sulle vongole veraci della Sacca di Goro.

Summary

Vibrio parahaemolyticus is a halophilic gram-negative bacillus, naturally present in the marine and estuarine environment, and it is recognized as a food-borne pathogen worldwide. Filter feeding shellfish can concentrate pathogenic bacteria as much as 100-fold from the overlying water, consequently, clams and oysters, that are often consumed raw or undercooked, may represent a source of infectious doses of the entero-pathogenic strains, currently identified by the presence of one or both genes encoding for the hemolysins TDH (thermostable direct hemolysin) and TRH (thermostable-related hemolysin) respectively. *V. parahaemolyticus*-associated gastroenteritis is usually mild to moderate and self-limited, although the infection may be severe in persons with chronic medical disease. In this study, the prevalence of enteropathogenic strains (*tdh+* and/or *trh+*) resulted 24%, with a mean load of $2,71 \pm 0,67 \log_{10}$ CFU g^{-1} for the Manila clams harvested in the Sacca di Goro, Italy. An intake of 250 g of these clams (32,5 g of net weight) may result non-hazardous for healthy consumers, harboring 10^3 pathogenic *V. parahaemolyticus*, namely in the range of 10^3 - 10^4 , a total dose that have been considered significantly noninfectious ($p < 0,001$).

Materiali e metodi

Tra il 2010 ed il 2018 sono stati analizzati nell'arco delle diverse stagioni, 101 campioni di vongole veraci provenienti dalla Sacca di Goro. La ricerca di *V. parahaemolyticus* è stata effettuata mediante semina diretta su CHROMagar™ Vibrio, e gli isolati sospetti sono stati confermati a livello biochimico e genomico mediante PCR utilizzando il *toxR* come marcatore di specie, *tdh* e *trh* come marcatori di patogenicità, seguendo un protocollo riportato in precedenza [7]. L'incidenza di *V. parahaemolyticus* (*toxR+*) è stata espressa come numero di campioni positivi sul totale degli esaminati, mentre i valori di abbondanza, come Unità Formanti Colonia (UFC g^{-1}). La prevalenza dei ceppi *tdh+* e/o *trh+* è stata valutata anche da un punto di vista quantitativo nei singoli campioni. Tutti i valori sono stati trasformati in logaritmo prima di calcolare la media. La valutazione quantitativa dei ceppi enteropatogeni rappresenta un dato essenziale per stabilire se una porzione di vongole può effettivamente veicolare una dose infettante di ceppi enteropatogeni. Allo scopo è stata considerata una porzione di vongole di 250 g lordi, valutando la parte edibile pari al 13% come altrove riportato per le vongole veraci dell'Adriatico [8], corrispondente a 32,5 g.

Risultati e discussione

Complessivamente sono risultati positivi per *V. parahaemolyticus* totali (*toxR+*) il 43,5% dei campioni esaminati (44 su 101), di cui il 93% (41 su 44) riferiti a campionamenti effettuati nei mesi più caldi (aprile-

ottobre), mentre i valori di abbondanza sono risultati mediamente pari a $2,70 \pm 0,74 \log_{10} \text{UFC g}^{-1}$. Il 45,5% dei campioni positivi per *V. parahaemolyticus* totali (20 su 44) è risultato negativo per ceppi patogeni, mentre il 54,5% (24 su 44) è risultato positivo per i marcatori *tdh+* e/o *trh+*. Tali risultati sono sostanzialmente in linea con quanto riportato in uno studio precedente condotto nella stessa area [9]. In particolare, 9 campioni sono risultati positivi per ceppi con doppio marcatore, 10 per ceppi con il solo marcatore *trh*, 5 per ceppi con il solo marcatore *tdh* ed 1 solo campione con compresenza di ceppi *tdh+* o *trh+*. Considerato l'intero campionamento, la prevalenza dei ceppi patogeni è risultata del 24% (24 su 101), con valori di abbondanza mediamente pari a $2,71 \pm 0,67 \log_{10} \text{UFC g}^{-1}$.

Per un approccio all'analisi del rischio da consumo di vongole crude o poco cotte, la dose di intake considerata pari a 32,5 g di vongole (13% di una porzione lorda di 250 g) può contenere, secondo i nostri dati, una quantità totale di ceppi patogeni pari mediamente a 10^3 in totale, ovvero nel range $10^3 - 10^4$ cui viene attribuita una scarsissima probabilità di causare infezione ($p < 0,001$) [5].

Attualmente, la normativa Europea non contempla *V. parahaemolyticus* fra i criteri di sicurezza applicabili ai molluschi bivalvi, ma non è raro che l'Autorità Competente, così come gli acquirenti della Grande Distribuzione Organizzata, dispongano controlli in tal senso. Gli accertamenti ufficiali vengono eseguiti prevalentemente con il metodo presenza/assenza l'ISO 21872-1:2017 [10], mentre in fase di autocontrollo viene spesso a mancare anche la caratterizzazione genomica. In tali condizioni il lotto viene considerato comunque non conforme, con conseguente allerta, ritiro e richiamo. Considerato che *V. parahaemolyticus* è un contaminante acquisito nelle aree di produzione, e che il trattamento di depurazione risulta sostanzialmente inefficace come per tutti i membri del genere *Vibrio*, per una corretta gestione del rischio i Controlli Ufficiali andrebbero primariamente disposti nelle zone di produzione, ed andrebbero svolti con un approccio qualitativo e quantitativo quale quello da noi utilizzato. D'altra parte, il metodo quantitativo ISO/NP TS 21872-2 [11], risulta attualmente "under development". Nell'area da noi considerata, in un arco di ben 10 anni, le vongole veraci hanno presentato valori di contaminazione che indicano una dose di intake con scarsissima probabilità di causare infezione e questo fatto, surrogato da Controlli Ufficiali, potrebbe non solo essere davvero utile in senso epidemiologico e per una corretta analisi del rischio, ma addirittura rappresentare una forma di promozione della produzione nazionale. Ciò non toglie che sia opportuno indicare in etichetta "da consumarsi previo cottura", mentre sarebbe auspicabile una campagna informativa rivolta ai soggetti particolarmente a rischio per questo come per altri patogeni opportunisti.

Bibliografia

- [1] Froelich B.A., Phippen B., Fowler P., Noble R.T., Oliver J.D. (2017). Differences in abundances of total *Vibrio* spp., *V. vulnificus*, and *V. parahaemolyticus* in clams and oysters in North Carolina. *Applied and Environmental Microbiology*, 83: e02265-16 (1-11). doi: 10.1128/AEM.02265-16.
- [2] Odeyemi O.A. (2016). Incidence and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: a systematic review and meta-analysis. *SpringerPlus* (2016) 5:464 (1-17). doi: 10.1186/s40064-016-2115-7.
- [3] Daniels N.A., Shafae A. (2000). A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicians. *Infection in Medicine* (2000) 17:665-685.
- [4] FDA. (2012). *Vibrio parahaemolyticus*. In: Food and Drug Administration. U.S. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition (2012). URL: <https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>
- [5] FDA. (2005). Interpretive summary: quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. Food and Drug Administration U.S. Department of Health and Human Services (2005). URL: <https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM196914.pdf>
- [6] Daniels N.A., Ray B., Easton A., Marano N., Kahn E., McShan A.L. 2nd, Del Rosario L., Baldwin T., Kingsley M.A., Pühr N.D., Wells J.G., Angulo F.J. (2000). Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary. *Journal of American Medical Association* (2000) 284:1541-1545. doi:10.1001/jama.284.12.1541.
- [7] Passalacqua P.L., Zavatta E., Bignami G., Serraino A., Serratore P. (2016). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* in the clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) from Emilia Romagna and Sardinia, Italy. *Italian Journal of Food Safety* (2016) 5:5709. doi: 10.4081/ijfs.2016.5709
- [8] Giulini G. (2006). Valorizzazione della produzione locale di vongole veraci allevate in laguna mediante l'adozione di un disciplinare di produzione finalizzato all'acquisizione di un marchio di qualità. Regione del Veneto DOCUP 2000/2006 – SFOP 2004 Progetto n. 12/PM/2004. URL: <https://www.moceniga.it/attachments/article/22/Disciplinare%20Almecca.pdf>
- [9] Serratore P., Ostanello F., Passalacqua P.L., Zavatta E., Bignami G., Serraino A., Giacometti F. (2016). First multi-year retrospective study on *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus* prevalence in *Ruditapes philippinarum* harvested in Sacca di Goro, Italy. *Italian Journal of Food Safety*, 5: 6161
- [10] ISO 21872-1:2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. Technical Committee: ISO/TC 34/SC 9 Microbiology. Publication date: 2017-06
- [11] ISO/NP TS 21872-2. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. Part 2: Quantitative determination in seafood of total and potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus* using nucleic acid hybridisation. Technical Committee: ISO/TC 34/SC 9 Microbiology. Under development.

Analisi metagenetiche del microbiota e del patobiota in popolazioni di *Crassostrea gigas* colpite da episodi di mortalità anomala in Europa

L. Vezzulli¹, P. Venier², G. Arcangeli³, A. Pallavicini⁴

¹Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita, Università di Genova

²Dipartimento di Biologia, Università di Padova

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

⁴Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste

Keywords: Microbiota, Patobiota, Mortalità anomala, Genomica

Introduzione

Lo scopo principale di questo lavoro, inquadrato nell'ambito del progetto Europeo H2020 VIVALDI, è stato quello di investigare, principalmente a livello molecolare, la comunità microbica commensale in ostriche commerciali, focalizzando la nostra attenzione nell'identificare presunti agenti patogeni o meglio descrivere una comunità microbica patogena. Studi recenti, principalmente nell'acquacultura di pesci, hanno dimostrato che i batteri patogeni possono essere controllati da agenti probiotici e che la mortalità di larve e giovanili può essere significativamente ridotta grazie al microbioma positivo. Purtroppo la nostra capacità di gestire il microbiota nell'acquacultura dei molluschi bivalvi è gravemente limitata dalla mancanza della conoscenza delle principali interazioni microbiche ed in generale dell'ecologia di questi sistemi. Di seguito descriviamo la messa a punto a livello comunitario delle metodiche atte alla definizione del microbioma dei molluschi bivalvi e l'applicazione di tali tecnologie a bivalvi malati e sani provenienti da alcune regioni europee storicamente vocate all'acquacultura di ostrica.

Summary

The overall goal of this deliverable, in the frame of the H2020 European project VIVALDI, is to report the investigation, mainly at molecular level, of the microbial community living in bivalves, shedding light on the putative pathogens or better in a pathogen community. Recent studies, mainly in fish, have demonstrated that pathogenic bacteria in live feed can be controlled by probiotics (ie the positive microbiome) and that mortality of infected larvae can be reduced significantly by probiotic bacteria. However, the successful management of the aquaculture microbiota is currently hampered by our lack of knowledge of relevant microbial interactions and the overall ecology of these systems. The general objectives of this deliverable is to set-up the methodologies for the definition of bivalve microbiome and to apply this technologies to healthy and diseased bivalve from some European areas haunted for their oyster aquaculture.

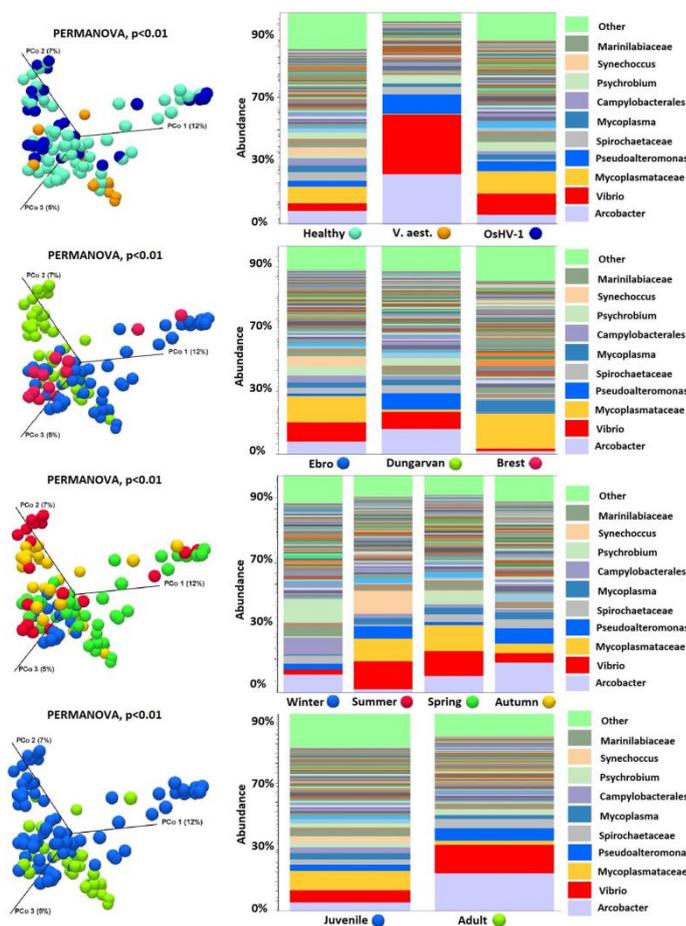
Materiali e metodi

Più di 500 campioni di *Crassostrea gigas* in condizioni contrastanti (malati e sani) sono stati raccolti in differenti stagioni prima, durante e dopo l'accadimento di episodi di mortalità anomala in differenti siti Europei (Delta dell'Ebro, Spagna; Baia di Durgarvan, Irlanda; Baia di Brest, Francia). Il DNA totale da singoli animali è stato estratto dall'omogenato dei tessuti utilizzando un protocollo concordato con i partner del progetto europeo VIVALDI. I campioni sono stati preventivamente analizzati per la presenza di Ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) e *Vibrio aestuarianus* tramite real time PCR. La regione V4 del gene 16S rRNA è stata amplificata con primers ibridi tra la regione specifica 16S e sequenze utili al sequenziamento tramite metodica Ion Torrent (Lifetechnologies). Le analisi dei dati di sequenziamento è stata operata tramite il modulo software Microbial Genomics (v13) del pacchetto informatico CLC Genomics workbench (v951). In breve le sequenze sono state inizialmente processate per la loro qualità, in seguito raggruppate per similarità al 97% in Unità Tassonomiche Operative (OTUs). L'analisi di chimere molecolari e classificazione tassonomica è stata eseguita utilizzando il database non ridondante SILVA SSU (versione 119; <http://www.arb-silva.de>). Il microbioma comune tra i singoli animali analizzati è stato definito tramite il software Corbata (CORE microbiome Analysis Tools, Li et al 2013). A modello biparametrico (ubiquitarità e abbondanza) è stato utilizzato per identificare quantitativamente le unità tassonomiche comuni in ogni gruppo di campioni appartenenti alle diverse condizioni di salute dei molluschi.

Risultati e Discussione

Un totale di 525 campioni di ostrica sono stati raccolti nei principali siti oggetto degli studi del progetto VIVALDI nel corso di 12 campagne di raccolta tra il Marzo 2016 e l'Ottobre 2017. Tali campioni sono stati vagliati per la presenza di OsHV-1 e *V. aestuarianus*. In particolare *V. aestuarianus* è stato associato alla mortalità nei campioni del Delta dell'Ebro del 13 aprile 2016 (50% mortalità) e 31 Maggio 2017 (85% mortalità) e nei campioni della Baia di Durgarvan del 3 ottobre 2016 (20% mortalità). OsHV-1 è stato associato a 12 eventi di mortalità in tutti e tre i siti analizzati dal 2016 al 2017 (dal 20 al 100% di mortalità).

Per le analisi del microbiota, 101 campioni contrastanti sono stati quindi selezionati. In particolare abbiamo focalizzato le nostre analisi sui periodi più contrastanti (n=5 per campioni contrastanti). In generale la composizione della comunità batterica associata a *C. gigas* è dominata da Gamma (28%) e Alfa (15%) protobatteri. Lo sforzo di sequenziamento è sempre state sufficiente per descrivere la maggior parte dei filotipi nei campioni analizzati. Pertanto dai nostri dati si ritiene di indicare un numero minimo di 50000 sequenze per campione per questo tipo di investigazioni. L'analisi comparativa del microbiota di *C. gigas* (analisi della beta diversità) in differenti condizioni (salute, località, stagione e stadio di sviluppo) è riportata nella seguente immagine. In generale per tutte le condizioni analizzate possiamo evidenziare delle differenze significative nella composizione della comunità microbica in ostrica (MANOVA $p < 0,01$).



La maggior differenza nella comunità microbica è rilevabile in ostriche adulte infette da *V. aestuarianus*. In particolare in questi animali si rileva una anomala abbondanza dei generi *Vibrio* e *Arcobacter*.

L'analisi del microbioma comune in tutti gli animali oggetto dell'analisi rileva che *Vibrio* è comunque un genere batterico sempre presente assieme ad un gruppo batterico identificabile come *Uncultured-053*.

Se si analizzano solo i campioni positivi a *V. aestuarianus* il "core microbiome" è composto da *Arcobacter* e *Vibrio* genera mentre quello degli animali non infetti è formato da *Uncultured-053*. Le differenze tra i microbiomi di animali sani e infetti da OsHV-1 non è invece significativa.

Dal punto di vista della gestione dei bivalvi in acquacultura può essere interessante evidenziare le differenze significative tra adulti e giovanili. Infatti negli adulti il microbioma comune ha tra i suoi componenti principali *Vibrio* e *Arcobacter* nei soggetti giovanili troviamo una maggiore diversità (*Vibrio*, *uncultured-053*, *Haliea* and *Marinicella*). Significative sono anche le differenze tra gli animali delle differenti località campionate e anche unendo tutti i campioni ed analizzandoli per le differenti stagioni di campionamento (vedi tabella sottostante).

Abbiamo qui presentato la ricerca dei partners del progetto Vivaldi volta alla definizione della comunità microbica in ostrica. Dato che la ricerca scientifica si basa sulle analisi comparative siamo stati in grado di evidenziare significative differenze tra animali malati e quelli sani. Possiamo certamente concludere che una singola specie batterica, virus o protozoo non possa essere indicata come responsabile di una patologia in molluschi bivalvi. Di conseguenza un profilo microbico comune non è assolutamente ovvio anche nel caso si confrontino eventi di mortalità nella stessa specie. Certamente l'abbondanza del genere *Vibrio*, e in certa misura *Arcobacter*, è una delle presenze comuni in tutte le situazioni prese in esame.

Core microbiome	Winter	Spring	Summer	Autumn
Genera	<i>Arcobacter</i> <i>Vibrio</i> uncultured-053 <i>Sulfobacter</i> <i>Colwellia</i> <i>Marinicella</i>	uncultured-053 <i>Arcobacter</i> <i>Vibrio</i>	uncultured-104 uncultured-053 <i>Vibrio</i>	<i>Arcobacter</i> <i>Vibrio</i> uncultured-053 <i>Winogradskyella</i> <i>Sulfobacter</i> OM60(NOR5) clade <i>Marinicella</i> <i>Lutimonas</i>

Bibliografia

- [1] Webb SC, Fidler A, Renault T (2007) Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand mollusks Aquaculture 272(1-4):126-139
- [2] IFREMER report (2013) *Vibrio splendidus* et *V. aestuarianus* detection by Real Time Polymerase Chain Reaction European Union Reference Laboratory for Molluscs Diseases Edition n 1, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Av de Mus de Loup, 17390 La Tremblade France
- [3] VIVALDI è un progetto di ricerca finanziato nell'ambito del programma EU H2020, contratto N. 678589. <http://www.vivaldi-project.eu/>

INDICE PRIMO AUTORE

Amoroso L.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Sanità Animale</i>	12
Arace O.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA)</i>	15
Boccia F.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA)</i>	17
Bordin P.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD),</i>	20, 22
Ciccarelli C.	<i>ASUR MARCHE A.V. 5 – San Benedetto del Tronto - Ascoli Piceno</i>	24
Cioffi B.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Sanità Animale, Via Salute 2, 80055 Portici (NA),</i>	28
Colarusso G.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno</i>	30
Corti I.	<i>ATS dell’Insubria - Varese</i>	33
Costa A.	<i>Porrazzito s.r.l. –Acate (RG)</i>	36
Cozzi L.	<i>Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Roma</i>	39
Cutarelli A.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, (Na)</i>	42
Di Concilio D.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno- Portici (NA)</i>	45
Epifanio E.M.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’ Umbria e delle Marche “Togo Rosati”</i>	47
Esposito G.	<i>Università degli Studi di Sassari, Dipartimento di Medicina Veterinaria, Sassari</i>	49
Fanelli G.	<i>CNR-IRSA, Talassografico “A. Cerruti” - Taranto</i>	51
Fiorito F.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA)</i>	52, 55
Gallocchio F.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)</i>	57
Galosi L.	<i>Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Università di Camerino (MC)</i>	60
Iaccarino D.	<i>Università Degli Studi di Napoli “Federico II”, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali - Napoli</i>	62, 65
Manca G.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)</i>	67
Mancuso G.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno</i>	69
Mandas D.	<i>Laboratorio di Ittiopatologia e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Oristano</i>	71

Mosca F.	<i>Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria – Teramo (TE)</i>	73
Rossi R.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA)</i>	75
Rubini S.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Ferrara</i>	77, 79
Satto S.	<i>Centro di Referenza Nazionale per le Malattie dei Pesci, molluschi e Crostacei, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD);</i>	81
Serracca L.	<i>Istituto Zooprofilattico sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione della Spezia - La Spezia</i>	83
Serratore P.	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie – Università di Bologna</i>	85
Verrulli L.	<i>Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita, Università di Genova</i>	87

SIRAM

www.siram-molluschi.it