
UNIVERSITÀ DI PISA
FACOLTÀ DI AGRARIA
CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN BIOTECNOLOGIE ALIMENTARI



UNIVERSITÀ DI PISA



E. COLI, SALMONELLA SPP. E BIOTOSSINE
ALGALI NELLE ACQUE DEL LITORALE APUANO
PER L'ALLEVAMENTO DEI MOLLUSCHI

RELATORE

Prof. Marco Nuti

CORRELATORI

Dott.ssa Francesca Susini

Prof. Paolo Berni

CANDIDATO

Dott. Alessio Maffei

Anno Accademico 2008-2009

A mia mamma Giulia

INDICE

INTRODUZIONE.....	5
<i>LA MOLLUSCHICOLTURA IN ITALIA</i>	<i>5</i>
<i>LA MOLLUSCHICOLTURA IN TOSCANA.....</i>	<i>7</i>
<i>PERCHE' I MOLLUSCHI BIVALVI SONO OTTIMI INDICATORI DI QUALITA' MICROBIOLOGICA.....</i>	<i>8</i>
<i>RISCHI IGIENICO-SANITARI CONNESSI AL CONSUMO DI MOLLUSCHI BIVALVI</i>	<i>10</i>
<i>E. coli.....</i>	<i>11</i>
<i>Salmonella spp.....</i>	<i>12</i>
<i>Vibrio spp.</i>	<i>13</i>
<i>Virus Enterici</i>	<i>16</i>
<i>Considerazioni su Vibrio spp. e Virus Enterici: patogeni emergenti.....</i>	<i>18</i>
<i>Biotossine algali.....</i>	<i>19</i>
<i>Metalli pesanti</i>	<i>28</i>
<i>NORMATIVA PER LA CLASSIFICAZIONE DELLE ACQUE PER LA PESCA E L'ALLEVAMENTO DEI MOLLUSCHI BIVALVI.....</i>	<i>30</i>
<i>CENTRI DI DEPURAZIONE MOLLUSCHI</i>	<i>33</i>
<i>L'IMPORTANZA ECONOMICA DELLA CLASSIFICAZIONE DELLE ACQUE.....</i>	<i>34</i>
<i>SCOPO DELLA TESI</i>	<i>35</i>
MATERIALI E METODI	36
<i>CAMPIONAMENTO</i>	<i>36</i>
<i>ANALISI MICROBIOLOGICHE</i>	<i>37</i>
<i>Conta di E. coli β-glucuronidasi positivi.....</i>	<i>38</i>
<i>Ricerca di Salmonella spp.....</i>	<i>41</i>
<i>Conferma di Salmonella spp.</i>	<i>45</i>
<i>ANALISI BIOTOSSICOLOGICHE</i>	<i>47</i>

<i>Determinazione di biotossine algali idrosolubili PSP</i>	47
<i>Determinazione di biotossine algali liposolubili DSP</i>	48
<i>Metodo per l'identificazione e la determinazione di tossine ASP</i>	52
RISULTATI E DISCUSSIONE	53
<i>RISULTATI ANALISI MICROBIOLOGICHE</i>	53
<i>RISULTATI ANALISI BIOTOSSICOLOGICHE</i>	56
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	58
BIBLIOGRAFIA	59
<i>LINK UTILI</i>	69

1. INTRODUZIONE

1.1 LA MOLLUSCHICOLTURA IN ITALIA

La molluschicoltura rappresenta la principale voce produttiva per l'acquacoltura italiana, con la produzione basata quasi esclusivamente su Mitili (*Mytilus galloprovincialis*, Fig. 1) e Vongole filippine (*Tapes philippinarum*, Fig. 2), ai quali si aggiungono limitate quantità di Vongole veraci (*Tapes decussatus*) ed Ostriche (*Crassostrea gigas*, Fig. 3). Secondo Prioli nell'anno 2005 le imprese dedite alla mitilicoltura sono risultate 263, a cui si aggiunge un'impresa dedicata esclusivamente all'ostricoltura, situata in Toscana, mentre due imprese si occupano dell'allevamento di entrambe le specie (2008). Tra le principali zone di produzione di più antica tradizione, abbiamo il golfo di Taranto, La Spezia, la laguna Veneta, il litorale Flegreo, ai quali, in tempi più recenti, si è aggiunto il litorale Triestino, il golfo di Olbia, l'Emilia-Romagna, le Marche, l'Abruzzo e la parte adriatica della Puglia.



Fig. 1 *Mytilus galloprovincialis*



Fig. 2 *Tapes philippinarum*



Fig. 3 *Crassostrea gigas*

Non sempre le imprese titolari dell'impianto di allevamento provvedono anche alla gestione dello stesso; in alcuni casi vige, infatti, l'affidamento di parte delle strutture di allevamento ad imprese o singoli imprenditori che esercitano a pieno titolo l'attività di mitilicoltura. Esiste una notevole separazione tra la produzione e la successiva commercializzazione. Il ruolo dell'allevatore si ferma allo sbarco del prodotto, dove i mitili sono presi in carico da grossisti che provvedono all'eventuale depurazione, al

confezionamento ed alla distribuzione al dettaglio. Le strutture in grado di rappresentare entrambe le componenti sono limitate e rappresentano una piccola percentuale delle imprese di produzione.

L'Italia sostanzialmente presenta due grosse carenze, alle quali gli operatori cercano di supplire nel miglior modo possibile:

- assenza di strutture tecniche dedicate allo studio dei molluschi e del settore più in generale, quale un centro nazionale con diramazioni nelle principali zone di produzione;
- mancanza di una forte organizzazione nazionale di produttori, così come avviene nei restanti paesi europei dove queste produzioni hanno forte rilevanza.

A queste carenze si aggiunge una serie di punti critici relativi ai diversi ambiti coinvolti in questa attività: ambientale, biologico, tecnologico, amministrativo, igienico-sanitario, economico-commerciale. Il settore, nonostante tutto, presenta una notevole dinamicità, che consente di affrontare le difficoltà che spesso si trova di fronte (Viaroli et al., 2001).

Il sistema della mitilicoltura è caratterizzato da una struttura complessa in cui convivono ancora retaggi frutto di antiche tradizioni e tecniche di allevamento moderne e di carattere intensivo (Turolla, 2008). Il processo di trasformazione verso pratiche di allevamento che consentono di superare l'ambito territoriale locale ed il carattere artigianale di questa attività è avvenuto con l'introduzione, nella seconda metà degli anni ottanta, di nuove tecniche. L'avvento di nuove tecnologie nell'allevamento dei Mitili ha consentito di conquistare nuovi spazi e alle tradizionali aree di produzione, si sono aggiunte numerose realtà produttive in mare aperto, non più vincolate da problematiche di carattere ambientale ed igienico-sanitario. Ciò fa sì che la molluschicoltura rappresenti oggi la principale voce produttiva per quanto riguarda l'acquacoltura italiana, sebbene, come già detto, la produzione si basi quasi esclusivamente su Mitili e Vongole filippine, cui si aggiungono limitate quantità di Vongole veraci ed Ostriche.

1.2 LA MOLLUSCHICOLTURA IN TOSCANA

Nonostante il territorio toscano per caratteristiche ambientali e geografiche si presti alla produzione e alla pesca di molluschi, la molluschicoltura è scarsamente praticata e non esistono impianti veri e propri. Come dimostrano i dati riportati nella Tabella 1, l'unico insediamento produttivo si trova nella Laguna di Orbetello e produce circa 300 quintali di ostriche l'anno.

Tab. 1 Numero di imprese e di addetti alla molluschicoltura in Italia (Prioli, 2008)

Regione	Imprese	Specie	Tonnellate	Personale
Abruzzo	5	Mitilo	1110	18
Campania	31	Mitilo	4170	148
Emilia-Romagna	23	Mitilo	16639	250
Friuli-Venezia Giulia	19	Mitilo	624	60
Lazio	10	Mitilo	1162	15
Liguria	69	Mitilo	2028	97
Marche	12	Mitilo	4665	60
Molise	2	Mitilo	657	14
Puglia	58	Mitilo	19709	273
Sardegna	16/1	Mitilo/Ostrica	9753/4	264/-
Sicilia	1	Mitilo	625	12
Toscana	1	Ostrica	30	-
Veneto	18/1	Mitilo/Ostrica	10572/1	150/-

Lungo le coste e negli arenili si effettua la pesca di molluschi bivalvi o attraverso specifiche pesche promosse da pochi pescatori professionisti o attraverso catture accidentali con reti da posta utilizzate nella pesca artigianale. Le aree già classificate, dove attualmente è possibile pescare, ed immettere successivamente il prodotto sul mercato, sono distribuite a nord della regione tra Livorno e la Versilia mentre tutto il resto della costa è sprovvisto di zone controllate e potenzialmente sfruttabili. Per

ottimizzare la gestione della pesca dei bivalvi, che in relazione a nuovi modelli gestionali, diventa a tutti gli effetti un'attività di acquacoltura estensiva, è indispensabile una preliminare corretta valutazione dello stato della risorsa. Attraverso questo percorso gli stock naturali possono essere gestiti nell'ottica della eco-compatibilità e nel rispetto dei criteri e dei dettami imposti dal Codice di Condotta FAO, per la pesca responsabile (Parisi, 2005). In quest'ottica la Regione Toscana, attraverso la legge regionale n°66/2005 "Disciplina delle attività di pesca marittima e degli interventi a sostegno della pesca professionale e dell'acquacoltura", ha promosso la classificazione di nuove aree, tra cui quella del litorale apuano, lungo le coste di Marina di Carrara e di Montignoso, per la pesca e l'allevamento dei molluschi bivalvi che andranno ad aggiungersi a quelle già esistenti e attualmente sfruttate, ampliando le possibilità di sviluppo di questo settore.

1.3 PERCHE' I MOLLUSCHI BIVALVI SONO OTTIMI INDICATORI DI QUALITA' MICROBIOLOGICA

I molluschi bivalvi in genere sono molto contaminati perché, ad eccezione di quelli dei vivai, vivono in prossimità delle coste, dove l'acqua ha una concentrazione salina inferiore a quella del mare ed è molto più ricca di sostanze organiche. Le acque costiere e le lagune interne, per questo motivo, costituiscono l'ambiente più idoneo alla crescita di tali molluschi, per la gran quantità di fitoplancton e di microrganismi associati ai detriti organici che ne assicurano il nutrimento. I molluschi bivalvi sono organismi che si nutrono filtrando enormi quantità d'acqua, variabili a seconda della taglia, attraverso un sifone cigliato che trattiene le particelle organiche (zooplancton e fitoplancton), e i microrganismi (Fig. 4). Nel caso di acque contaminate da scarichi cloacali i microrganismi presenti sono generalmente di origine enterica e, una volta penetrati all'interno del mollusco, sopravvivono per un certo periodo di tempo, mantenendo il loro potere infettante, prima di essere attaccati e digeriti con la fagocitosi.

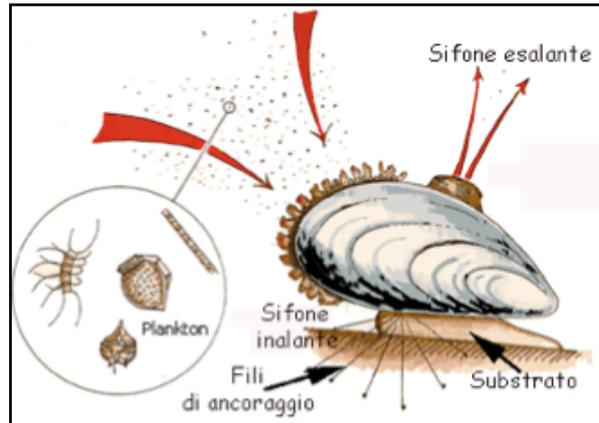


Fig. 4 Meccanismo di filtrazione dei molluschi bivalvi (Turolla, 2008)

Questo comportamento fisiologico causa la concentrazione dei microrganismi nel mollusco che, proprio per questa caratteristica, diventa un ottimo indicatore della qualità microbiologica del distretto costiero di interesse (Rodgers et al., 1992). Precedenti studi effettuati nei mari di Taranto (Latorre et al., 1995) hanno tuttavia evidenziato come in realtà le condizioni di allevamento dei molluschi possano dipendere molto anche dalle diverse condizioni meteo-marine. E' noto, infatti, che le acque fognarie, essendo caratterizzate da una minore densità, "galleggiano" sulle acque salate; in tal modo esse vengono più facilmente sospinte dai venti e dalle relative correnti superficiali per un tragitto più o meno lungo. A seguito dei fenomeni di diluizione e di sedimentazione, esse si disperdono nella massa dell'acqua salata. E' evidente, pertanto, che l'intensità e la direzione dei venti, nonché la durata degli stessi e l'ampiezza della zona interessata concorrono a determinare il grado di contaminazione dei molluschi allevati.

1.4 RISCHI IGIENICO-SANITARI CONNESSI AL CONSUMO DI MOLLUSCHI BIVALVI

Dal punto di vista nutrizionale, i molluschi bivalvi costituiscono per l'uomo un importante apporto nutritivo in quanto fonte di proteine di elevata qualità. Tuttavia, durante la loro intensa attività di filtrazione, essi trattengono nel loro organismo non solo il plancton necessario al loro metabolismo, ma anche batteri, virus o parassiti (es. protozoi) eventualmente presenti nell'ambiente, e biotossine algali. Per tale motivo i molluschi bivalvi sono considerati alimenti ad alto rischio e da diversi anni la loro commercializzazione è stata regolamentata da diverse normative europee (Regolamenti CE n. 853/04, 854/04, 2073/05, 2074/05, 1881/06 e successive modifiche e integrazioni) che stabiliscono i requisiti igienico-microbiologici e di sicurezza. Il giudizio di idoneità al consumo si basa sulla conta di *E. coli* come indice di contaminazione fecale, sulla ricerca di *Salmonella spp.* (Sulaj et al., 2004) e di biotossine algali di tipo PSP (Paralytic Shellfish Poison), DSP (Diarrhetic Shellfish Poison) e ASP (Amnesic Shellfish Poison). Nonostante le misure legislative, che hanno senz'altro comportato una riduzione delle patologie classiche quali colera, febbri tifoidee e salmonellosi, i molluschi non hanno smesso di costituire un rischio per la salute umana. I dati epidemiologici a disposizione (Toti, 2004), dimostrano che negli ultimi 25 anni è stato possibile riscontrare che i patogeni batterici associabili a contaminazione fecale delle acque sono stati responsabili solo del 4% delle epidemie associate al consumo di molluschi bivalvi, mentre i batteri naturalmente presenti nell'ambiente marino, per lo più appartenenti alla famiglia delle Vibrionaceae, sono risultati responsabili per il 20% delle malattie e per il 99% delle morti. Tali dati sono comunque sottostimati, poiché in molti casi, il consumo di molluschi provoca solo sintomi gastrointestinali di lieve entità che quindi non richiedono l'intervento medico. Inoltre, attualmente, i problemi legati alla presenza di biotossine stanno assumendo dimensioni preoccupanti per l'aumento di alghe tossiche, dovuto da un lato all'eutrofizzazione (eccessivo accrescimento di organismi vegetali acquatici) delle aree

marine costiere a causa di un'elevata presenza di sostanze nutritive come azoto, zolfo fosforo, e dall'altro, alla progressiva diffusione di fitoplancton in nuove aree geografiche attraverso, ad esempio, l'acqua di zavorra trasportata dalle navi da carico. Il fenomeno è in continua evoluzione. Di seguito verranno trattati singolarmente gli agenti biologici e chimici, quali batteri, virus, biotossine e metalli pesanti, responsabili dei rischi igienico-sanitari connessi al consumo di molluschi bivalvi.

1.4.1 *E. coli*

E. coli (Fig. 5) rappresenta l'unica specie conosciuta del genere *Escherichia*. Si tratta di un bastoncello, Gram negativo, asporigeno, anaerobio facoltativo, generalmente innocuo essendo un commensale della flora intestinale di tutte le specie a sangue caldo, in cui gioca un ruolo chiave nel processo digestivo. Appartiene al gruppo degli Enterobatteri, ma all'interno di esso si differenzia

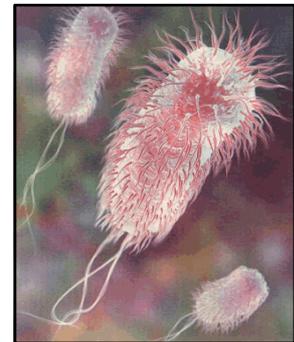


Fig. 5 *E. coli*

ulteriormente per la capacità di fermentare il lattosio, con produzione di acidi e gas, nel corso di 48 ore ad un intervallo di temperatura compreso tra 32° e 35° C. Tutti i diversi tipi di batteri fecali della specie e tutti i suoi simili che presentano questa capacità, vengono raggruppati sotto il nome di *coliformi*. Nelle recenti normative *E. coli* è stato scelto come il più specifico e accurato indicatore di inquinamento fecale. Attualmente si conoscono 171 sierotipi della specie *E. coli*, caratterizzate da differenti combinazioni di antigeni O (antigene somatico termostabile), K (antigene somatico termolabile) e H (antigene flagellare termolabile) a cui è correlata la patogenicità; essi sono stati classificati in quattro gruppi, EPEC (Enteropatogeni), EIEC (Enteroinvasivi), ETEC (Enterotossigeni) e EHEC (Enterohemorragici). La differenza tra questi gruppi è data dalla produzione di tossine, la cui sensibilità ai trattamenti termici è variabile, dai meccanismi e dai sintomi di tossinfezione. Tali ceppi sono causa di malattie intestinali e infezioni extraintestinali. La dissenteria è uno dei più

comuni sintomi nelle tossinfezioni alimentari da *E. coli*: i gruppi EPEC, EIEC ed ETEC sono i maggiori responsabili di gastroenteriti in neonati e bambini, specialmente in paesi in via di sviluppo. Il gruppo EHEC è quello in causa nella maggior parte delle tossinfezioni alimentari, con il ceppo 0157:H7 particolarmente virulento, è causa della sindrome emolitico-uremico nell'uomo. La contaminazione può verificarsi in seguito a consumo di carne contaminata non propriamente cotta, di prodotti lattiero-caseari non pastorizzati e altri alimenti, inclusi molluschi bivalvi contaminati da feci. Sono necessarie molte cellule di *E. coli* per produrre tossine in quantità sufficiente a determinare gastroenteriti, soprattutto in individui di categorie a rischio. Infatti, nella maggior parte dei casi, in persone adulte con normale risposta immunitaria un ceppo patogeno può provocare sintomi limitati a manifestazioni diarroiche, mentre in categorie a rischio quali bambini, malati, anziani e soggetti immunocompromessi, le conseguenze possono essere ben più gravi e talora fatali.

1.4.2 *Salmonella* spp.

Le specie appartenenti al genere *Salmonella* spp. comprendono bacilli (Fig. 6), Gram negativi, asporigeni, anaerobi facoltativi, capaci di fermentare il glucosio ma non il lattosio, con produzione di gas H₂S e

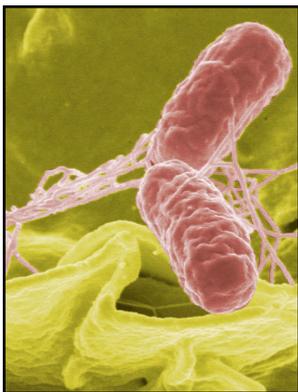


Fig. 6 *Salmonella*

capaci di ridurre i nitrati; le condizioni ottimali di crescita si collocano in un range di temperatura da 6° a 45°C, un valore minimo di attività dell'acqua (a_w) pari a 0,93 e valori di pH da 4,1 a 9. Si tratta di microrganismi generalmente mobili (solo alcune specie sono immobili) dotati di flagelli peritrichi, i cui sierotipi vengono diversificati in base gli antigeni O (antigene somatico), H (antigene flagellare) e Vi (antigene di superficie). Essendo presenti nell'ambiente marino, possono contaminare anche i molluschi bivalvi. L'infezione da Salmonelle è trasmessa per via oro-fecale attraverso l'ingestione di cibi o bevande contaminate; il periodo di

incubazione è molto breve, i sintomi possono manifestarsi anche solo dopo 12 ore dall'ingestione e consistono in dolori addominali, nausea, vomito, febbre e diarrea. Il decorso è breve e termina solitamente con la guarigione ma l'infezione non è da sottovalutare in soggetti più a rischio come bambini, anziani e immunodepressi. E' necessaria però l'ingestione di un numero elevato di cellule a seconda del potere infettante e della sensibilità individuale dell'ospite. Le salmonellosi non devono essere confuse con le tipiche malattie sostenute dalle salmonelle patogene per l'uomo (*S. typhi* e *S. paratyphi*) ossia tifo e para-tifo di tipo A e B. *Salmonella spp.* non resiste alle temperature di pastorizzazione e per inattivarla è sufficiente un termotrattamento a 60°C per 15-20'. A carattere preventivo, risulta efficace effettuare sanificazioni utilizzando alcol, ammonio quaternario e/o ipoclorito di sodio.

1.4.3 *Vibrio spp.*

Il genere *Vibrio* comprende bacilli Gram negativi, asporigeni, flagellati monotrichi o peritrichi. Sono capaci di metabolismo sia fermentativo che aerobio, e la loro crescita è stimolata dalla presenza di cloruro di sodio. Molte specie fanno parte della flora batterica autoctona e gran parte di queste sono associate ad infezioni nell'uomo o in animali acquatici. I *Vibrio* sono germi capaci di adattarsi rapidamente a variazioni di temperatura, pH, salinità, pressione osmotica e nutrienti. Tuttavia temperatura e salinità incidono fortemente sulla loro presenza nelle acque; ad esempio, non resistono a temperature al di sotto di 10°C. In condizioni sfavorevoli i vibrioni possono entrare in fase di quiescenza e come conseguenza risultare vitali ma non coltivabili in vitro; durante tale fase riducono il loro metabolismo orientandosi verso vie metaboliche in grado di evitare danni strutturali da carenze di nutrienti. La prima specie isolata è stata *V. cholerae* (Fig. 7), seguita da *V. parahemolyticus* (Fig. 8) e di *V. vulnificus* (Fig. 9); attualmente, grazie a studi molecolari di tassonomia, se ne stanno aggiungendo molte altre. Tutti i vibrioni indistintamente hanno dimostrato di avere un veicolo di primaria importanza nei prodotti della

pesca e specialmente nei molluschi bivalvi. A tale riguardo, l'attuale normativa comunitaria per la commercializzazione dei molluschi bivalvi,

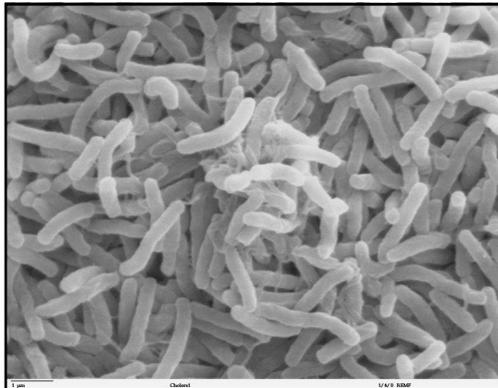


Fig. 7 *Vibrio cholerae*

risulta inadeguata basandosi solo sulla valutazione di *E.coli* e *Salmonella*. La loro assenza infatti non garantisce anche l'assenza del genere *Vibrio*. Inoltre, studi recenti hanno evidenziato come *V. cholerae* sia in grado di aggregare altri batteri mediante produzione di una matrice extracellulare e difendersi da

avverse condizioni ambientali; anche l'associazione con zoo e fitoplancton viene utilizzata, permettendo una vita più lunga rispetto a cellule singole. Le infezioni umane da vibrioni possono essere trasmesse per contatto diretto con l'ambiente acquatico o mediante ingestione di molluschi bivalvi o acqua contaminata; tali infezioni sono presenti maggiormente laddove è insufficiente il controllo igienico-sanitario dei prodotti della pesca e in assenza di impianti di trattamento delle acque reflue. A tal proposito nel 1994 furono segnalati a Bari 12 casi di colera; le caratteristiche di resistenza agli antibiotici permisero di collegare tale epidemia ai casi di colera riscontrati in Albania a causa della contaminazione delle acque (Serratore, 2008). La specie *V. cholerae* è suddivisa in sierogruppi in base all'antigene somatico O (polisaccaride termostabile dello strato lipopolisaccaridico); il sierotipo O1 include i due biotipi principalmente responsabili delle epidemie di colera. Sostanzialmente si tratta di una diarrea secretoria causata in genere da ingestione di acqua o di molluschi bivalvi contaminati. In persone sane la dose infettante è alta a causa della sensibilità del germe all'acidità gastrica; i sintomi compaiono dopo 12-72 ore dall'ingestione del mollusco contaminato e consistono in diarrea profusa, nausea, vomito, dolori addominali. L'ingestione di molluschi bivalvi contaminati da *V. parahaemolyticus* può provocare gastroenterite; i ceppi dotati di patogenicità, giunti nell'intestino tenue, si attaccano alla

parete e producono tossine che sono causa della sintomatologia. Solitamente il quadro clinico generale non è grave e si risolve in 2-3 giorni; la diagnosi si effettua tramite isolamento del microrganismo dalle feci. *V.*

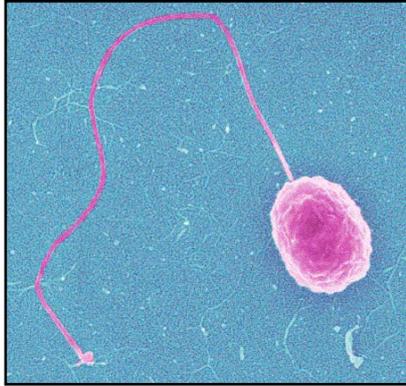


Fig. 8 *Vibrio parahaemolyticus*

vulnificus è invece considerato un agente patogeno a bassa morbilità; l'ingestione di molluschi bivalvi contaminati provoca, anche se raramente, gastroenterite caratterizzata da vomito, diarrea e crampi addominali. Per quantificare in termini reali, la pericolosità emergente di questi batteri, basta considerare che nel biennio 97-98 negli USA su un totale di 937 casi di

malattie prodotte da vibrioni e confermati mediante analisi colturale sono stati evidenziati 141 casi di infezione da *V. vulnificus* con 41 decessi; tale numero rappresenta la totalità delle morti causate da vibrioni negli USA (Suffredini et al., 2005). I batteri appartenenti alle specie *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, sono stati isolati ovunque siano stati cercati, anche se i ceppi ambientali non sempre possiedono caratteristiche di patogenicità. Ad esempio, sulla diffusione delle singole specie nei mari italiani, mancano rilievi sistematici. Le ricerche compiute da Serratore et al. (2008), in Adriatico nella zona compresa fra Goro e Cesenatico, concordano con

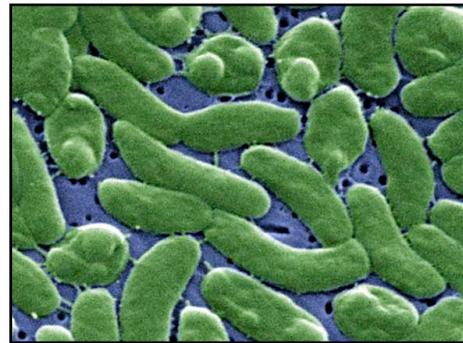


Fig. 9 *Vibrio vulnificus*

quanto riportato da altri autori e dimostrano la presenza di tali specie, anche se con dati di prevalenza diversi: i *V. cholerae* risultano rari e senza caratteri di patogenicità, i *V. parahaemolyticus* sono più frequenti ma con rarissimi caratteri di patogenicità mentre tutti i *V. vulnificus*, isolati sebbene rarissimi, presentano caratteri di patogenicità.

1.4.4 Virus Enterici

Oltre ai batteri descritti precedentemente, i molluschi bivalvi sono in grado di veicolare anche molte particelle virali, escrete con le feci dall'uomo e dagli animali. Fortunatamente la maggior parte dei virus presenta specificità d'ospite e quindi dal punto di vista della tutela della salute pubblica interessano solo i virus enterici di origine umana. Questi sono normalmente trasmessi attraverso il contagio interumano, ma recentemente ricerche epidemiologiche e di laboratorio hanno riconosciuto che anche i molluschi bivalvi possono veicolare all'uomo una larga varietà di agenti patogeni virali (Suffredini et al., 2005). Diversamente dai batteri essi non si moltiplicano nell'alimento nè producono tossine; si tratta di parassiti intracellulari obbligati e quindi inerti ed incapaci di replicare al di fuori della cellula ospite. Attraverso i molluschi quindi, i virus possono essere semplicemente veicolati, ma mai duplicarsi. I virus enterici eliminati dagli individui infetti attraverso le feci, arrivano nelle acque fognarie e potendo spesso resistere ai normali trattamenti di depurazione e disinfezione, provocano la contaminazione delle acque marine attraverso i fiumi e gli scarichi afferenti. In questo ambiente il numero di particelle si riduce sensibilmente per effetto della diluizione; la quantità di particelle virali nelle acque marine infatti risulta molto bassa. La riduzione della contaminazione da virus dell'ambiente marino è imputabile, oltre che all'effetto della diluizione, anche all'azione di "fattori inattivanti". Tra di essi esplicano attività antivirale la salinità, la temperatura, la luce solare, le sostanze tossiche, come i metalli pesanti, e l'antagonismo microbico. L'inattivazione virale esplicita da questi fattori ha un denominatore comune: il danneggiamento del capsido e/o degli acidi nucleici con conseguente inibizione del virus nella sua capacità di infettare le cellule e di attuare la trascrizione tramite la quale si riproduce. Tuttavia la presenza di questi agenti in qualsiasi tipo di acque di produzione di molluschi bivalvi, costituisce un importante problema di sanità pubblica. In teoria una sola particella è in grado di determinare l'infezione, anche se poi lo sviluppo di uno stato di malattia clinica dipende da numerosi altri fattori come lo stato

immunitario, l'età dell'ospite, la virulenza del microrganismo e il tipo di virus. Due fenomeni sembrano essere alla base della persistenza e della diffusione di questi microrganismi nell'ambiente: l'aggregazione e l'adsorbimento. Il primo corrisponde alla formazione di aggregati, sia nelle cellule ospiti che dopo lisi cellulare, formati da 2-10 unità virali chiamate "Clumps"; ciò garantisce una maggiore resistenza delle singole particelle alle condizioni ambientali avverse. Inoltre il grande potenziale di adsorbimento nei confronti di qualunque tipo di materiale particolato (organico ed inorganico), come particelle argillose, silicati, batteri, cellule algali e particolati organici aumenta i tempi di sopravvivenza dei virus nelle acque d'estuario e nei sedimenti spesso grazie alla creazione di una vera e propria barriera fisica. Così protetti essi riescono a sopravvivere per lunghi periodi nell'ambiente marino e a percorrere anche lunghe distanze, spesso parecchi chilometri, rispetto ai punti di scarico ed in relazione anche alle correnti marine. In letteratura (Gandolfi, 1996) vengono riportati tempi di sopravvivenza virale nei Mitili con una media di 190 giorni. I virus enterici possono quindi sopravvivere al di fuori delle cellule ospiti per giorni o addirittura per mesi. Si conoscono più di 100 diversi tipi di virus che possono essere eliminati con le feci dell'uomo infetto: teoricamente tale numero coincide con quello dei virus presenti nei liquami fognari, nell'acqua di mare e quindi nei molluschi allevati in tali acque. Dal punto di vista morfologico i virus enterici sono delle particelle sferiche con diametri che vanno da 25-35 nm per il virus dell'Epatite A (HAV, Fig. 10), a 75 nm per i Rotavirus (Fig. 11). Se ne conoscono 120 specie, tra le quali Norovirus, Enterovirus e il virus HAV responsabile dell'Epatite A.



Fig. 10 Virus dell'Epatite A

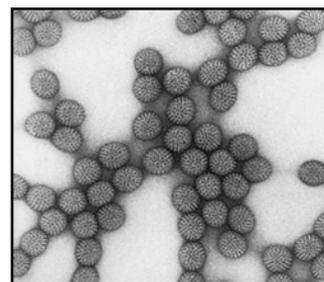


Fig. 11 Rotavirus

I virus trasmessi attraverso i molluschi bivalvi contengono al loro interno come materiale genetico una sola catena di RNA, protetta dal rivestimento esterno. Invece per i virus enterici contenenti DNA non è stata dimostrata la trasmissione attraverso alimenti e acqua. La dose infettante di tali virus è molto bassa, e in alcuni casi basta una sola unità virale infettante per causare malattia.

1.4.5 Considerazioni su *Vibrio* spp. e Virus Enterici: patogeni emergenti

“The First European Communicable Disease Epidemiological Report (2007)” redatto dall’European Center for Disease Prevention and Control, afferma che il colera resta una malattia rilevante nell’ambito della Comunità Europea ed è collegabile al consumo di molluschi bivalvi di importazione. Nel report non si fa alcun accenno, invece, all’epidemiologia delle vibriosi sostenute da *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. In tale rapporto si attesta, inoltre, che i casi di HAV sembrano mostrare un trend decrescente, pur rimanendo significativi in ambito comunitario, con un’incidenza di 1,7 casi su 100000 abitanti. Le infezioni da Norovirus non sono soggette a segnalazione, ma rappresentano certamente un’importante causa di gastroenterite in ambito comunitario (EFSA, 2008), con incremento di casi segnalati in particolare tra i passeggeri di crociere in nave e pazienti ospedalizzati. Nel 2001 la Commissione Europea aveva elaborato una revisione della normativa sui molluschi, dal titolo “Draft Regulation on microbiological criteria for foodstuffs and food production” prevedendo un controllo mirato su virus enterici, quali HAV e Norwalk virus e batteri quali *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*; ma nel pacchetto igiene del 2004 tali criteri non compaiono. Tuttavia, pur non essendo previsto in Europa un controllo sistematico nei confronti della componente virale e di quella relativa ai vibrieni marini, controlli a campione vengono comunque effettuati dalle Autorità competenti sui prodotti ittici, in particolare quelli di importazione da Paesi Terzi. Inoltre molti soggetti della grande distribuzione hanno inserito nei loro disciplinari criteri di

accettabilità dei prodotti anche in relazione a tali contaminanti. Nel corso del 2008, a seguito del riscontro di positività per HAV (Serratore, 2008) in molluschi bivalvi provenienti dal Perù, su proposta della DG SANCO, sono state bloccate le importazioni da questo Paese, con esclusione dei molluschi bivalvi sottoposti a trattamenti con il calore (Decisione della Commissione del 18 Febbraio 2008).

Nel giudicare l'idoneità al consumo dei molluschi bivalvi, non si può prescindere dalla identificazione delle specie in causa e dal possesso dei tratti di patogenicità. A tal proposito è doveroso segnalare la Circolare del Ministero della Salute DVGA-III.IX/32799/P-I/11 del 15/09/2005 relativa a *V.parahaemolyticus* in materia di rilievo dei marcatori di specie e di patogenicità. Quindi, anche se non esplicitamente previsti come criteri di sicurezza nel Regolamento 2073/05 e successive modifiche e integrazioni, i virus a trasmissione fecale ed i vibriani patogeni associabili ai molluschi bivalvi, dovrebbero essere ricercati.

1.4.6 Biotossine algali

Tra gli agenti patogeni di origine biologica non ci sono solo batteri e virus. Negli ultimi anni le biotossine marine sono state responsabili di più del 60% delle intossicazioni causate dai prodotti ittici negli USA (Toti, 2004). Tra queste, le biotossine algali (Ficotossine) sono quelle numericamente più importanti; tali tossine consistono in un gruppo eterogeneo di composti strutturalmente diversi e vengono prodotte da fitoplancton, tipicamente associato con aree geografiche ben definite, ove si verificano i *bloom algali* (imponenti fioriture che possono causare cambiamenti di colore dell'acqua). I dati epidemiologici degli ultimi anni mostrano comunque una notevole estensione di tali aree dovuta agli scambi internazionali e ai cambiamenti climatici. Tutte le biotossine algali sono resistenti al calore e quindi non vengono distrutte con la cottura degli alimenti; inoltre non causano variazioni organolettiche e non vengono messe in evidenza dalle comuni analisi microbiologiche: il loro effetto si

manifesta attraverso le trasformazioni metaboliche che subiscono durante i passaggi della catena alimentare.

Nonostante negli ultimi anni si sia assistito ad un progressivo affinamento dei metodi per la ricerca diretta sulle tossine algali, la maggior parte della sorveglianza si basa sull'identificazione del fitoplancton tossico mediante osservazione microscopica delle caratteristiche morfologiche. Le specie algali conosciute ammontano a circa 5000 ma di queste solo 75 sono in grado di produrre tossine; esse si possono classificare per il tipo di fioritura anche se, molte volte, i bloom non sono in grado colorare l'acqua poichè non raggiungono un numero di cellule superiore a 100000. Le biotossine, invece, vengono classificate in relazione alla solubilità e per tale motivo risultano suddivise in due gruppi: idrosolubili e liposolubili. Per quanto riguarda il consumo di molluschi bivalvi, le intossicazioni più frequenti nel Mar Mediterraneo, sono rappresentate dalle sindromi da PSP (Paralytic Shellfish Poison), ASP (Amnesic Shellfish Poison) e da DSP (Diarrhetic Shellfish Poison).

• PSP

Rappresenta la sindrome neurotossica più studiata e conosciuta per le gravi conseguenze che produce nei consumatori di molluschi bivalvi. Le microalghe responsabili della produzione di tali biotossine sono Dinoflagellate, tra cui le specie *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium minutum* e *Gymnodinium catenatum* sono presenti anche nel Mare Adriatico. I sintomi di avvelenamento sono di natura neurologica e nei casi più gravi possono portare alla paralisi respiratoria e alla morte (Viviani, 1997, Taylor, 1998); tali sintomi solitamente insorgono nei 30 minuti che seguono l'ingestione di molluschi bivalvi contaminati. Se vengono superate le prime 12 ore, solitamente la ripresa avviene senza effetti secondari. La principale tossina che causa la sindrome da PSP è la Saxitossina (STX) il cui nome deriva da *Saxidomius giganteus*, il primo mollusco da cui è stata estratta (Schantz, 1984), ma anche la Neosaxitossina e la Gonyautossina presentano proprietà neurotossiche.

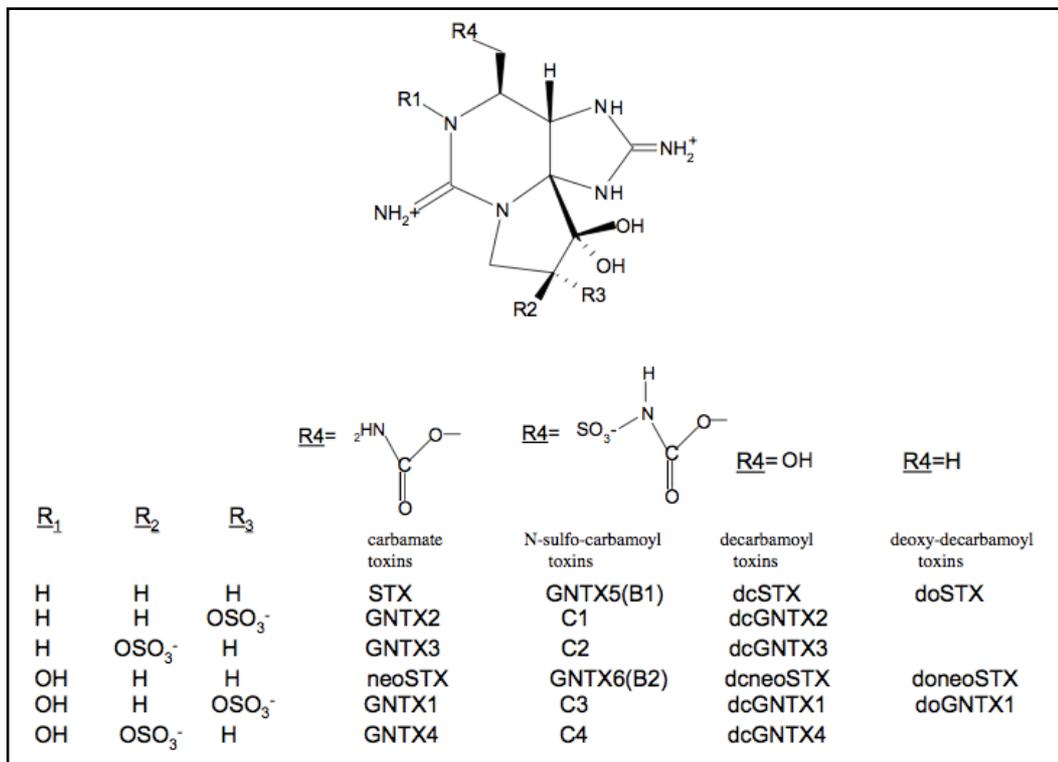


Fig. 12 Struttura chimica delle tossine PSP (Marine Biotoxins, FAO 2004)

Esistono 20 costituenti delle PSP, sono idrosolubili e sono suddivisi in carbammati, composti n-sulfocarbamilici, decarbamilici e deossi-decarbamilici (Fig. 12) con proprietà simili alla STX ma con tossicità molto differente. La struttura base di una molecola di STX (Fig. 13) si presenta con una tetraidropurina con due gruppi funzionali guanidinici carichi positivamente, responsabili dell'azione citotossica; attraverso questi gruppi essa si lega saldamente e blocca il canale del sodio delle membrane cellulari, interagendo con un gruppo carbossilico ionizzato (COO-) disposto all'ingresso del canale, sul versante extracellulare. Bloccando i canali Na⁺, impedisce il passaggio di ioni attraverso le membrane di cellule dell'apparato nervoso e muscolare, provocando una paralisi.

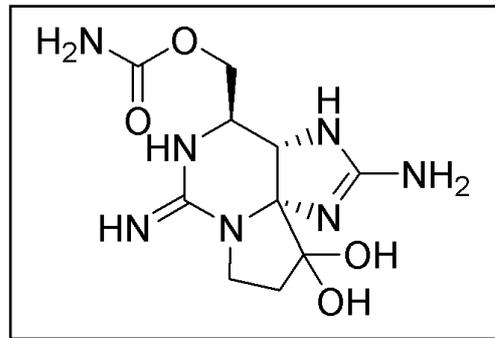


Fig. 13 Struttura chimica della Saxitossina (Marine Biotoxins, FAO 2004)

In media durante, la fioritura di alghe tossiche, un mitile può accumulare fino a 9000 µg di STX, con un picco di assorbimento per i mesi di aprile, maggio e giugno. Per quanto riguarda l'Italia il primo caso di avvelenamento da PSP è stato registrato nella costa dell'Emilia Romagna nel 1994 (Poletti, 2007) e tutt'ora rimane un'area ad alto rischio potenziale assieme alle coste della Sicilia e della Sardegna. Al momento non si conoscono antidoti e i trattamenti applicati ai pazienti intossicati sono la lavanda gastrica e la respirazione artificiale. Il Regolamento (CE) 853/04 impone che la quantità totale di PSP contenuta nei molluschi bivalvi, misurata nel corpo intero o nelle parti consumabili separatamente, non deve essere superiore al valore limite di 800 µg di STX o equivalente/Kg di parte edibile.

• ASP

Il primo caso di avvelenamento da ASP è stato registrato nel 1987 in Canada a seguito di ingestione di mitili durante fioritura di Diatomee; gli intossicati risultarono 250 di cui 4 morti. Nei casi più gravi i sintomi riscontrati includevano confusione e disorientamento, mutismo e persino il coma; per questo motivo la tossina fu chiamata ASP, ovvero Amnesic Shellfish Poison (Wright et al., 1989). Si tratta principalmente di acido domoico (AD) e di suoi isomeri, un amminoacido tricarbossilico raro (Fig. 14), neuroeccitatore che agisce sui siti della memoria; è solubile in acqua, in acidi e alcali diluiti mentre è scarsamente solubile in metanolo ed etanolo e totalmente insolubile in etere di petrolio e benzene.

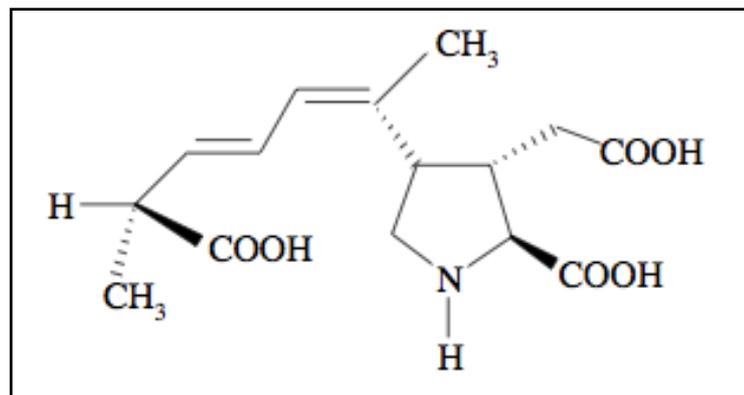


Fig. 14 Struttura chimica dell'acido domoico (Marine Biotoxins, FAO 2004)

Le microalghe responsabili della produzione di tali tossine, sono le specie appartenenti alle Diatomee, come *Nitzschia pungens* e *Pseudonitzschia seriata*. La dose di AD assorbita dall'uomo è circa il 5-10% di quella ingerita e la massima penetrazione avviene nel sangue; la sua escrezione avviene prevalentemente attraverso le urine. Simile al glutammato (che assieme all' L-aspartato agisce da agonista endogeno) e al kainato, AD interviene su alcuni recettori delle sinapsi, aumentando la concentrazione di Ca^{+} nella cellula, e portandola alla morte (Takemoto, 1987). La sua azione può colpire varie parti del corpo umano: nel cervello AD danneggia principalmente l'ippocampo e i nuclei amigdaloidali, ma

anche i neuroni attivando i recettori di AMP e kainato, causando un influsso di Calcio; l'incontrollato aumento di tale flusso causa la degenerazione delle cellule (Coyle, 1983). A carico dell'apparato gastrointestinale i sintomi appaiono 24 ore dopo l'ingestione e si tratta principalmente di vomito, diarrea, nausea, crampi addominali e gastriti emorragiche. A carico dell'apparato nervoso invece, i sintomi possono comparire da 3 ore a 3 giorni dall'ingestione (Wright et al., 1989). Anche nel caso dell'AD non si conoscono antidoti. Attualmente sono stati registrati casi di avvelenamento da ASP in molluschi provenienti dalle coste Europee dell'Atlantico e dei Paesi Balcanici, mentre in Italia, nonostante siano comunemente presenti nell'habitat marino specie di *Pseudonitzschia*, nei molluschi bivalvi non è mai trovata tossicità di tipo ASP. Il Regolamento (CE) 853/04 impone che la quantità totale di ASP contenuta nei molluschi bivalvi, misurata nel corpo intero o nelle parti consumabili separatamente, non deve essere superiore al valore limite di 20 mg di AD/Kg di parte edibile.

• DSP

I sintomi da avvelenamento da DSP compaiono circa dopo un'ora e mezza dall'ingestione e possono durare per un giorno intero; sono di natura gastrointestinale, principalmente diarroica (Yasumoto et al., 1987) ma comprendono anche nausea, vomito e dolori addominali. Non sono stati registrati decessi a causa di DSP e i sintomi provocati generalmente non mettono in pericolo di vita. Principalmente si tratta di acido okadaico e derivati, isolati per la prima volta in *Halichondria okadai* e *Pandaros acanthifolium*, ma, in generale, la maggior fonte di tali tossine è rappresentata dalle specie appartenenti alle Dinoflagellate come *Dinophysis fortii*, *D. sacculus*, *D. acuta*, *D. caudata* e *D. rotundata*. Consistono in composti liposolubili, costituiti da polieteri ciclici e suddivisi in quattro classi strutturali caratterizzate da effetti tossicologici differenti, sia in termini di meccanismi d'azione che di alterazioni biochimiche: acido

okadaico e derivati (AOs e DTXs), Pectenotossine (PTXs), Yessotossine e derivati (YTXs) e Azaspiracidi e derivati (AZAs).

L'acido okadaico e i suoi derivati (Fig. 15) vengono chiamate anche acido-tossine e hanno la capacità di attraversare facilmente le membrane cellulari; dal punto di vista biochimico i maggiori responsabili degli effetti tossicologici sono AO, DTX1 e DTX2. Si tratta di polieterei solubili in cloroformio, etanolo, metanolo, acetone, etilacetato ma insolubili in acqua.

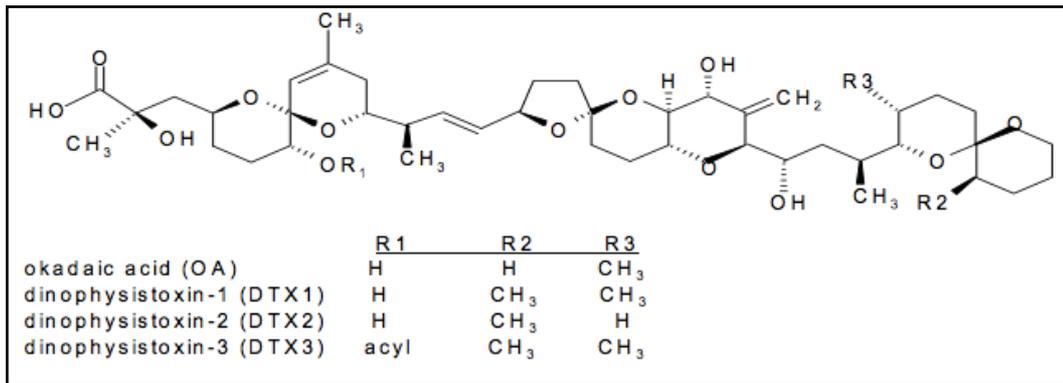


Fig. 15 Struttura chimica dell'acido okadico e dei suo derivati (Dinofisittossine)
(Marine Biotoxins, FAO 2004)

L'AO è un potente inibitore di due delle quattro classi di fosfoproteine, serina e treonina fosfatasi denominate PP1 e PP2A; la sua azione risulta citotossica in quanto impedisce la polimerizzazione dell'actina che supporta le strutture cellulari. Il periodo di incubazione varia da 30 minuti a 7 ore con una media di 4 ore nel 70% dei casi. Raramente supera le 12 ore (Lee *et al.* 1989).

Le Pectenotossine (Fig. 16) sono state associate solo recentemente ai casi di avvelenamento diarroico; consistono in polieterei ciclici divisi in due gruppi A e B, a seconda se terminano con un estere ciclico o con un gruppo alcolico e carbossilico (Yasumoto, 1985). I sintomi provocati sono analoghi a quelli provocati dall'AO ma attualmente non ci sono dati sufficienti per definire un preciso meccanismo di azione, adsorbimento e distribuzione.

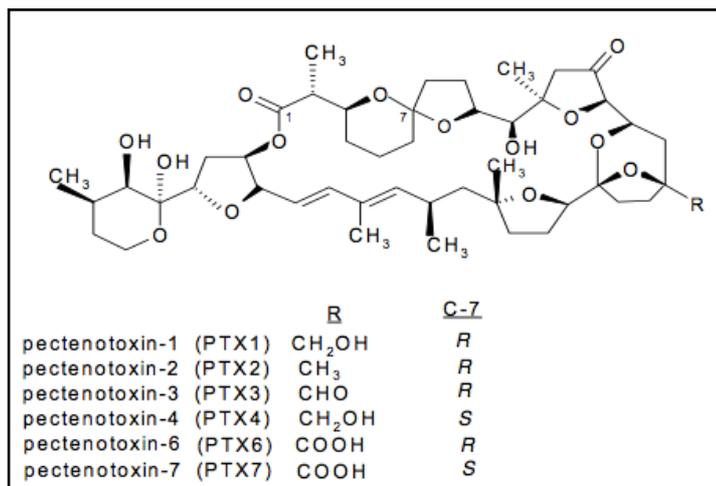


Fig. 16 Struttura chimica delle Pectenotossine (Marine Biotoxins, FAO 2004)

Per quanto riguarda le tossine AOs, le DTXs e le PTXs il Regolamento (CE) 853/04 impone che la loro quantità totale contenuta nei molluschi bivalvi, misurata nel corpo intero o nelle parti consumabili separatamente, non deve essere superiore al valore limite di 160 µg di AO o equivalente/Kg di parte edibile.

Le Yessotossine e i suoi analoghi sono state isolate per la prima volta in Giappone (Murata et al., 1987) da ghiandole digestive di un pettinide, *Pactinopecten yessoensis*, mentre la altre controparti di YTX sono state isolate in molluschi bivalvi sparsi in varie parti del mondo; recentemente è stato individuato un nuovo analogo, chiamato Adrianotossina (ATX) isolato in *Mytilus galloprovincialis* della costa dell'Emilia-Romagna (Ciminiello et al., 1998). La struttura chimica di YTX (Fig. 17) è stata determinata tramite l'utilizzo di spettroscopia (Satake et al., 1996) e consiste in un polietere ciclico costituito da 11 anelli ciclici trans e da una catena insatura a 9 atomi di carbonio e 2 gruppi opposti di alcol solfatato; la presenza di gruppi solfati nella molecola riduce l'assorbimento del composto nell'apparato digestivo.

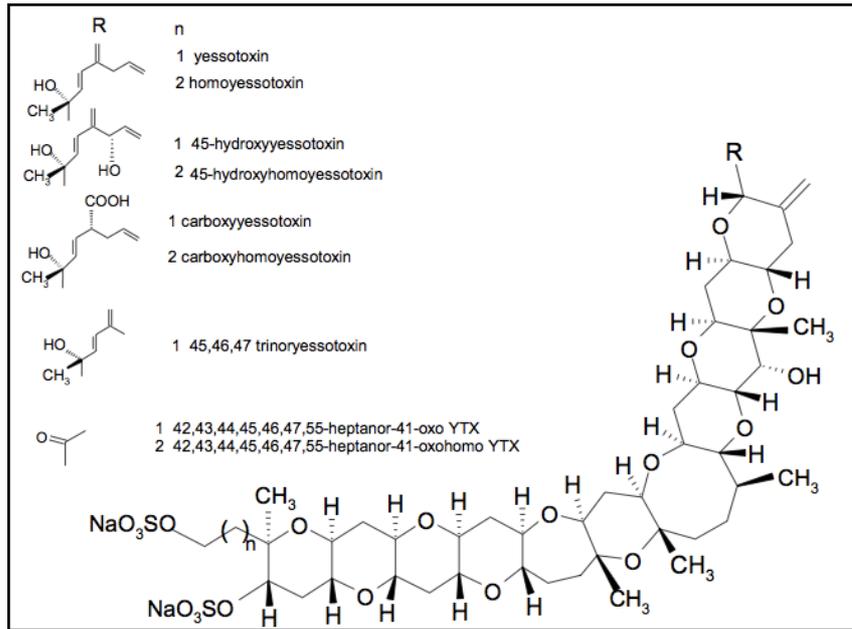


Fig. 17 Struttura chimica delle Yessotossine (Marine Biotoxins, FAO 2004)

Il Regolamento (CE) 853/04 impone che la quantità totale di YTXs contenuta nei molluschi bivalvi, misurata nel corpo intero o nelle parti consumabili separatamente, non deve essere superiore al valore limite di 1 mg di YTX o equivalente/Kg di parte edibile.

Infine, gli Azaspiracidi sono stati collegati a sintomi gastrointestinali a seguito dell'ingestione di molluschi provenienti dall'Irlanda (McMathon and Silke, 1995). Dal 1996, sono stati registrati altri casi di avvelenamento da AZA in Irlanda e da molluschi importati (Poletti, 1998). La loro struttura (Fig. 18) è stata individuata in Giappone ed è stata chiamata Azaspiracido in riferimento alla molecola che presenta un singolo anello azaspiro e un'acido carbossilico (Ofujii et al., 1999). Anche per gli Azaspiracidi il Regolamento (CE) 853/04 impone che la quantità

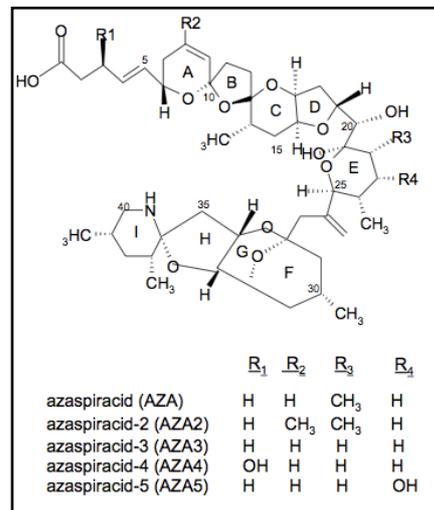


Fig. 18 Struttura chimica degli Azaspiracidi (Marine Biotoxins, FAO 2004)

totale contenuta nei molluschi bivalvi, misurata nel corpo intero o nelle parti consumabili separatamente, non deve essere superiore al valore limite di 160 µg di AZA o equivalente/Kg di parte edibile.

Il problema di avvelenamento diarroico dovuto al consumo di molluschi bivalvi non è mai stato riconosciuto ufficialmente in molti paesi come non letale, e per questo motivo, le biotossine DSP rappresentano attualmente il maggior problema sanitario, connesso a tale consumo.

1.4.7 Metalli pesanti

Per ultimo, ma non per importanza, si segnala la presenza nell'acqua dei metalli pesanti, i quali, pur non giocando direttamente un ruolo biologico, sono in grado di formare composti solubili particolarmente tossici (Souchu, 2001). Si è soliti definire pericolosi tutti i metalli pesanti, ma tra questi sono compresi anche elementi essenziali come il Ferro. Inoltre esistono metalli leggeri, come ad esempio il Berillio, la cui tossicità è altrettanto elevata. La pericolosità dei metalli pesanti è rappresentata dalla possibilità di imitare l'azione di elementi essenziali, e quindi sostituirsi ad essi, nel corpo umano, interferendo con i processi metabolici e causando possibili malattie (Lane, 2000); si tratta molto spesso di Cadmio, Piombo, Mercurio, Arsenico, Polonio e metalli radioattivi; questi ultimi mostrano sia tossicità radioattiva che chimica. Tali metalli nel momento in cui assumono uno stato di ossidazione diverso da quello standard, possono diventare tossici: ad esempio il Cromo (III) è un elemento essenziale ma il Cromo (IV) risulta cancerogeno. La tossicità inoltre è in funzione della solubilità, per cui spesso, composti metallici insolubili mostrano una tossicità trascurabile, mentre in altri casi forme organometalliche, come il dimetil-mercurio e il tetraetil-mercurio, possono diventare estremamente tossiche. La decontaminazione dei metalli pesanti è diversa da quella attuata per le biotossine: trattandosi di elementi essi non possono essere distrutti. Tuttavia si può agire su di essi rendendoli insolubili tramite l'azione di agenti chelanti mirati. Purtroppo i metalli tossici possono accumularsi nel corpo umano e nella catena

alimentare, eccetto per il Bario e per l'Alluminio; per questo la loro caratteristica principale consiste nella natura cronica della tossicità. Il Regolamento CE 1881/06 stabilisce i tenori massimi di alcuni contaminanti e fissa i limiti per le quantità di Piombo (Pb), di Cadmio (Cd) e di Mercurio (Hg) contenute nei molluschi bivalvi:

- Pb: 1,5 mg/Kg peso fresco
- Cd: 1 mg/Kg p.f.
- Hg: 0,5 mg/Kg p.f.

1.5 NORMATIVA PER LA CLASSIFICAZIONE DELLE ACQUE PER LA PESCA E L'ALLEVAMENTO DEI MOLLUSCHI BIVALVI

La produzione e la commercializzazione dei molluschi bivalvi e per analogia di echinodermi, tunicati e gasteropodi marini, destinati al consumo umano o alla trasformazione prima del consumo, è disciplinata dai Regolamenti CE n. 853/04, 854/04, 2073/05, 2074/05, 1881/06 e successive modifiche e integrazioni, i quali stabiliscono le norme igieniche-sanitarie di seguito riportate:

- limiti di tollerabilità per i contaminanti chimici, biologici e microbiologici;
- distinzione delle zone di provenienza;
- destino diversificato per i molluschi in base alla zona di provenienza.

In precedenza la Direttiva 91/492/EEC richiedeva agli Stati Membri di classificare le proprie aree di allevamento in tre categorie basandosi sulla valutazione del grado di contaminazione batterica fecale in campioni di molluschi (Rodgers et al., 1992). Attualmente, secondo la normativa vigente, le acque destinate alla mitilicoltura vengono classificate dall'Autorità competente in 3 categorie, in base al parametro *E. coli*. Le aree classificate devono essere sottoposte a riclassificazione con cadenza almeno triennale per confermare o rivedere la classe di appartenenza.

• Zona di classe A

zona in cui i molluschi possono essere raccolti e utilizzati per l'immissione diretta sul mercato. Oltre a dover presentare caratteristiche organolettiche tipiche del prodotto fresco e vitale, in particolare gusci privi di sudiciume, reazione adeguata a percussioni e livelli normali di liquidi intervalvare, tali molluschi devono soddisfare i seguenti requisiti microbiologici:

- contenere meno di 230 *E. coli* per 100 g di polpa e di liquido intervalvare.

Il metodo di riferimento per questa analisi è il test del numero più

- probabile (MPN¹) in cinque provette e tre diluizioni come specificato nella norma ISO 16649-3;
- non contenere *Salmonella* spp. in 25 g di polpa;
 - non contenere sostanze tossiche o nocive di origine naturale o immesse nell'ambiente in quantità tale che l'assunzione tramite alimenti superi la DGA (dose giornaliera ammissibile) per l'uomo;
 - avere un tenore massimo di veleno paralizzante PSP (Paralytic Shellfish Poison) nelle parti commestibili non superiore a 800 µg di STX per Kg (misurato mediante metodo biologico);
 - non dare, con i metodi di analisi biologica, reazione positiva per la presenza di veleno diarrogeno DSP (Diarrhetic Shellfish Poison);
 - avere un tenore massimo di ASP (Amnesic Shellfish Poison) non superiore ai 20 mg di AD per Kg di parte edibile (metodo di analisi HPLC).

Tab. 2 Requisiti UE per l'immissione dei molluschi bivalvi sul mercato

Criteri	Requisiti
<i>E. coli</i>	< 230 UFC/100 g polpa e liquido intervalvare
<i>Salmonella</i> spp.	assente/ 25 g polpa
AO, DTXs, PTXs	< 160 µg AO equivalenti/ Kg parte edibile
AZAs	< 160 µg AZA eq./ Kg p.e.
YTXs	< 1 mg YTX eq./ Kg p.e.
PSP	< 800 µg/ Kg p.e.
ASP	< 20 mg AD/ Kg p.e.
sostanze tossiche	< DGA per l'uomo

¹ Most Probable Number - metodica analitica che consente di apprezzare solo le cellule vitali coltivabili.

- **Zona di classe B**

zona in cui i molluschi possono essere destinati all'immissione sul mercato e solo dopo aver subito un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione in modo da soddisfare i requisiti indicati per la zona di classe A. I molluschi raccolti da tali zone non devono superare i livelli di 4600 *E. coli* per 100 g di polpa e liquido intervalvare. Anche in questo caso il metodo di riferimento per l'analisi è il test del numero più probabile (MPN) specificato nella norma ISO 16649-3. Mediante depurazione o stabulazione, i molluschi provenienti da tali zone di produzione dovranno arrivare a soddisfare i requisiti fissati per i molluschi delle zone A.

- **Zona di classe C**

zona in cui i molluschi possono essere destinati all'immissione sul mercato e al consumo umano esclusivamente previa stabulazione di lunga durata per un periodo non inferiore a due mesi; la stabulazione può essere associata o meno ad un processo di depurazione intensivo. I molluschi raccolti da tali zone non devono superare i livelli di 46000 *E. coli* per 100 g di polpa e liquido intervalvare. Il metodo di riferimento è sempre il test del numero più probabile (MPN) specificato nella norma ISO 16649-3.

In alternativa i molluschi provenienti dalle zone di classe B o C, non sottoposti a depurazione o stabulazione, possono essere inviati ad uno stabilimento di trasformazione per essere sottoposti a trattamento per l'eliminazione di microrganismi patogeni, in conformità con quanto stabilito dal Regolamento CE n 853/04. Non è ammessa in alcun modo la produzione di molluschi bivalvi in zone con tenore di *E. coli* > 46000.

Se si decide in linea di principio di classificare una zona di produzione o di stabulazione, l'autorità competente deve:

- effettuare un inventario delle fonti di inquinamento di origine umana o animale che possono costituire una fonte di contaminazione della zona di produzione;

- esaminare i quantitativi di inquinanti organici emessi nei diversi periodi dell'anno in funzione delle variazioni stagionali della popolazione umana e animale nel bacino idrografico, delle precipitazioni, del trattamento delle acque di scarico, ecc.;
- determinare le caratteristiche della circolazione degli inquinanti sulla base dell'andamento della corrente, della batimetria e del ciclo delle maree nella zona di produzione;
- istituire un programma di campionamento dei molluschi bivalvi nella zona di produzione, basato sull'esame di dati prestabiliti e su un certo numero di campioni; la distribuzione geografica dei punti di campionamento e la frequenza del campionamento devono garantire risultati delle analisi il più possibile rappresentativi della zona considerata.

1.5.1 CENTRI DI DEPURAZIONE MOLLUSCHI

In base ai criteri di classificazione, solo i mitili provenienti da aree di tipo A possono essere destinati direttamente al consumo umano, mentre il prodotto di tipo B può essere destinato al consumo previo trattamento in idonee strutture di depurazione od in zone marine di stabulazione preventivamente approvate come tali. I centri di depurazione (Allegato II, Regolamento (CE) n. 854/04) intervengono nel momento in cui il prodotto allevato non rispetta i requisiti igienico-sanitari imposti dai suddetti regolamenti. Un processo di depurazione standard dura in media 12 ore e garantisce un'adeguata eluizione di *E. coli* solo qualora la contaminazione iniziale sia modesta; tuttavia non garantisce un significativo abbattimento né della contaminazione di *Vibrio* spp., né della contaminazione da virus, per i quali sono necessari dai 3 ai 5 giorni di trattamento in più per ottenere risultati apprezzabili. Dal punto di vista economico, il processo di depurazione comporta un aggravio dei costi di produzione legato alla disponibilità di strutture adeguate, i cui costi di costruzione e gestione, non possono essere sostenuti da singoli allevatori, se non titolari di imprese con un'elevata capacità produttiva. In Italia i centri di depurazione

molluschi (CDM) autorizzati sono complessivamente 125 (Prioli, 2001) di cui la maggior parte sono situati in Veneto, Puglia ed Emilia-Romagna. Soprattutto nelle zone di maggior produzione solo una parte di questi centri sono collegati, più o meno direttamente, con le imprese titolari di allevamenti.

1.6 L'IMPORTANZA ECONOMICA DELLA CLASSIFICAZIONE DELLE ACQUE

La qualità dell'acqua risulta il più importante fattore di interesse per le imprese di molluschicoltura. Si può citare come esempio quello che viene attuato in alcuni paesi dove la molluschicoltura ha un'importanza economica rilevante come in Inghilterra e in Galles (Fitzgerald, 2008) dove dal Maggio 2006 è stato avviato un progetto a lungo termine di classificazione delle acque per l'allevamento e la pesca dei molluschi bivalvi. Attualmente alla maggior parte delle aree è stata assegnata la classe B. Sotto queste indicazioni "Local Action Groups" provvedono ad attivare un immediato meccanismo di risposta con lo scopo di investigare su campioni di molluschi che presentano *E. coli* superiori ai limiti imposti dal Regolamento. Sebbene ciò abbia portato un maggior investimento da parte delle imprese del settore per migliorare il sistema di trattamento delle acque reflue, le aree di classe A risultano ancora sotto l'1,5%. Esistono provvedimenti governativi mirati al miglioramento della qualità dell'acqua in tali aree, e vanno sotto il nome di "Shellfish Waters Directive". Oltre a fissare i criteri microbiologici, questa Direttiva fissa anche un programma di riduzione dell'inquinamento che consentirà di raggiungere gli standard microbiologici nelle 124 aree designate. Durante un piano di monitoraggio annuale delle aree di allevamento classificate, possono capitare imprevisti che portino ad un inaspettato valore elevato di *E. coli*. Questo può portare al declassamento delle zone di allevamento dei molluschi, con conseguente chiusura dei fondali su base stagionale, o nei casi più gravi, fino a lungo termine. Ciò può avere un significativo impatto economico sulle imprese del settore con perdite di guadagni e/o di

posti di lavoro, perdite di mercato e della sicurezza futura di produzione, con conseguente mancanza di fiducia e di ulteriori investimenti finanziari.

In conclusione, per il settore della molluschicoltura, la classificazione e il successivo piano di monitoraggio, risultano essere importanti strumenti a cui ricorrere, in un giusto equilibrio, per ottemperare alla normativa in materia di sicurezza alimentare e parallelamente per soddisfare le esigenze economiche.

1.7 SCOPO DELLA TESI

Considerati gli aspetti economici e le implicazioni sanitarie, questa tesi si colloca in un quadro dinamico attualmente in evoluzione.

L'argomento della presente tesi è rappresentato dalle attività di classificazione delle acque marine lungo il litorale apuano, più precisamente lungo la costa di Marina di Carrara e di Montignoso, per le future attività di pesca ed allevamento dei molluschi, in accordo con i vigenti Regolamenti Europei in materia di sicurezza alimentare.

In particolare, la presente tesi, svolta nell'ambito del tirocinio effettuato presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Pisa, ha previsto analisi microbiologiche, per la determinazione di *E. coli* e *Salmonella* spp., ed analisi biotossicologiche per la determinazione di biotossine algali di tipo PSP e DSP su campioni di molluschi bivalvi prelevati nelle acque marine lungo il litorale apuano.

2. MATERIALI E METODI

2.1 CAMPIONAMENTO

All'interno delle aree sottoposte a classificazione sono stati identificati rispettivamente 2 punti di prelievo per l'area di Marina di Carrara (Fig. 19) denominati CARR-1 e CARR-2, e 5 punti per l'area di Montignoso (Fig. 20) denominati MONT-1, MONT-2, MONT-3, MONT-4 e MONT-5. I prelievi sono stati effettuati con cadenza quindicinale da Luglio 2009 a Dicembre 2009.

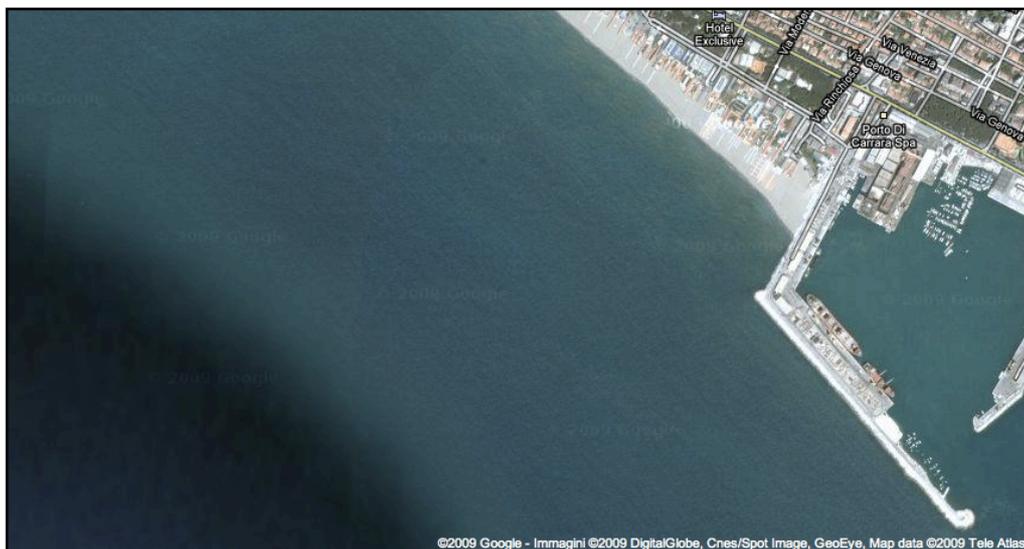


Fig. 19 Marina di Carrara

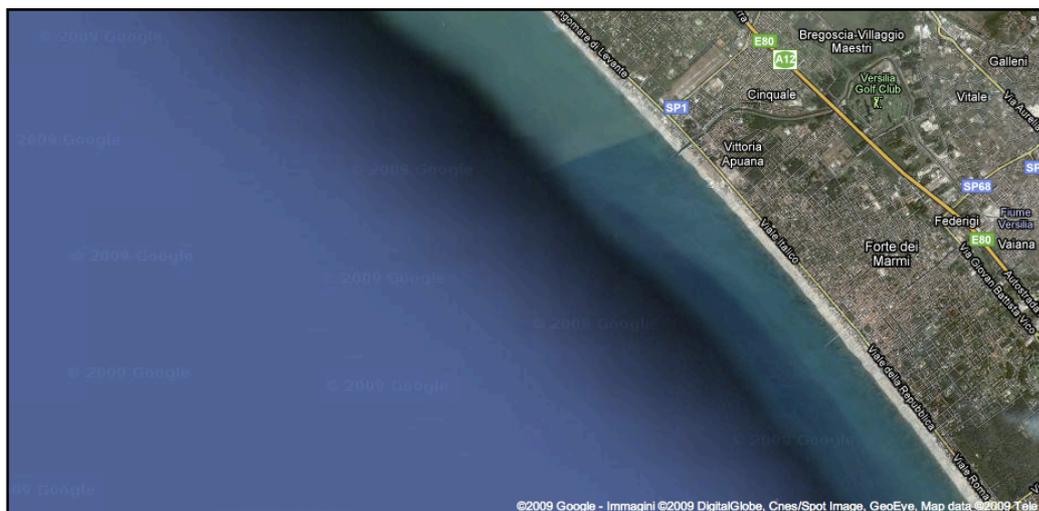


Fig. 20 Montignoso

Per le indagini sono state prelevate, in ognuno dei 7 punti, le specie di molluschi bivalvi più presenti; si è trattato principalmente di Telline (*Donax trunculus*), Vongole lupino (*Chamelea gallina*) e Mitili (*Mytilus galloprovincialis*). Nel caso di banchi naturali di molluschi che vivono sul fondo, i campioni sono stati prelevati, nei punti di prelievo stabiliti, con strisciate del retino ad intervalli regolari perpendicolari alla costa in un tratto di circa 500 metri. I molluschi, dopo essere stati sciacquati con acqua di mare, sono stati posti in un contenitore pulito, per assicurare un'adeguata protezione dalle contaminazioni esterne e dai danni durante il trasporto, sigillato e munito di etichetta di identificazione riportante una sigla che identificava il numero di campionamento (es. 1-CARR-1 nel caso di Marina di Carrara e 1-MONT-1 per Montignoso). Il trasporto al laboratorio di Acquacoltura ed Ittiopatologia dell'Istituto Zooprofilattico di Pisa è stato effettuato in contenitori isotermici a temperatura di refrigerazione.

All'arrivo in laboratorio, i 7 campioni di molluschi bivalvi in esame sono stati conservati alla temperatura di $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ fino al momento delle analisi.

2.2 ANALISI MICROBIOLOGICHE

Tutte le preparazioni e le manipolazioni dei campioni sono state condotte usando buone tecniche di asepsi e utilizzando attrezzature sterili atte a prevenire contaminazioni microbiche del campione da fonti esterne. Il giorno seguente, dopo aver scartato i molluschi che presentavano gusci aperti o danneggiati, sono stati aperti un numero di molluschi tali da rendere la quantità di polpa e di liquido intervalvare sufficiente per la prova specificata (un campione rappresentativo deve contenere da 6 a 10 individui e deve pesare circa dai 75 ai 100 grammi). Ogni conchiglia è stata lavata e spazzolata sotto acqua potabile corrente, particolarmente intorno all'apertura, quindi con acqua distillata sterile, e il tutto è stato scolato. Quando ogni conchiglia è stata aperta, la polpa e il liquido intervalvare sono stati raccolti in un contenitore sterile adatto per

l'omogeneizzazione, contrassegnato da un numero di identificazione del campione e dell'analisi da effettuare. Quindi sono state eseguite le prove previste: conta di *E. coli* β -glucuronidasi positivi e ricerca di *Salmonella* spp. secondo procedure specifiche standardizzate, rispettivamente ISO/TS 16649-3:2005 e ISO6579:2002.

2.2.1 Conta di *E. coli* β -glucuronidasi positivi

In un sacchetto monouso sterile, sono stati aggiunti 10 grammi di liquido intervalvare a 90 ml di diluente (soluzione fisiologica sterile) in modo tale da ottenere una diluizione 1:10 del campione. Quindi sono stati seminati 10 ml del campione in cinque provette di terreno di arricchimento selettivo a doppia concentrazione MMGD (minerals modified glutamate double strenght, Tab. 3) e 1 ml in cinque provette di terreno di arricchimento selettivo a concentrazione semplice MMGS (minerals modified glutamate single strenght, Tab. 3). Poi allo stesso modo, sono state seminate nel terreno di arricchimento selettivo a concentrazione semplice, diluizioni decimali della sospensione iniziale. Le provette così preparate sono state incubate alla temperatura di $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ore \pm 2 ore. Il giorno seguente, sono state osservate le provette per produzione di acido indicante la fermentazione del lattosio (Fig. 21), e ogni provetta considerata positiva (Fig. 22) è stata seminata in TBX (triptone bile glucuronide, Tab. 4), terreno in piastra selettivo e differenziale per *E. coli*. Le piastre di TBX sono state incubate alla temperatura di $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 20-24 ore. Trascorso il tempo di incubazione le piastre sono state osservate per verificare la presenza di colonie blu o blu-verdi (Fig. 23), indicanti la presenza *E. coli* β -glucuronidasi positivi. Il numero più probabile di *E. coli* β -glucuronidasi positivi è stato ottenuto dal numero delle provette di terreno di arricchimento selettivo (MMGD, MMGS) le cui subcolture su TBX hanno prodotto colonie blu o blu-verdi, consultando le tabelle MPN riportate nella ISO 7218:2007.

Tab. 3 Composizione del mezzo MMGS e MMGD

Ingredienti		g/l	
		MMGS	MMGD
Cloruro di ammonio		2,5	5,0
Acqua distillata		1000	1000
MMMB (Minerals Modified Medium Base)	<i>Lattosio</i>	20,0 g/l	11,4
	<i>Formiato di sodio</i>	0,5	
	<i>L-cistina</i>	0,04	
	<i>L (-) acido aspartico</i>	0,048	
	<i>L (+) arginina</i>	0,04	
	<i>Tiamina</i>	0,002	
	<i>Acido nicotinico</i>	0,002	
	<i>Acido pantotenico</i>	0,002	
	<i>Solfato di magnesio 7H₂O</i>	0,200	
	<i>Citrato ferrico di ammonio</i>	0,020	
	<i>Cloruro di calcio 2H₂O</i>	0,020	
	<i>Fosfato dipotassico di idrogeno</i>	1,80	
	<i>Porpora di bromocresolo</i>	0,020	
<i>pH 6,7 ± 0,1 @ 25°C</i>			
LP0124 Glutammato di sodio		6,4	12,8

Tab. 4 Composizione del Tryptone Bile X-Glucuronide Agar

Ingredienti		g/l
<i>Tryptone</i>	20,0 g/l	36,6
<i>Sali biliari No. 3</i>	1,5	
<i>Agar</i>	15,0	
<i>X-glucuronide</i>	0,075	
<i>pH 6,7 ± 0,2</i>		
Acqua distillata		1000



Fig. 21 Diluizioni in cui non è stato possibile osservare produzione di acido



Fig. 22 Diluizioni considerate positive per il viraggio di colore del terreno

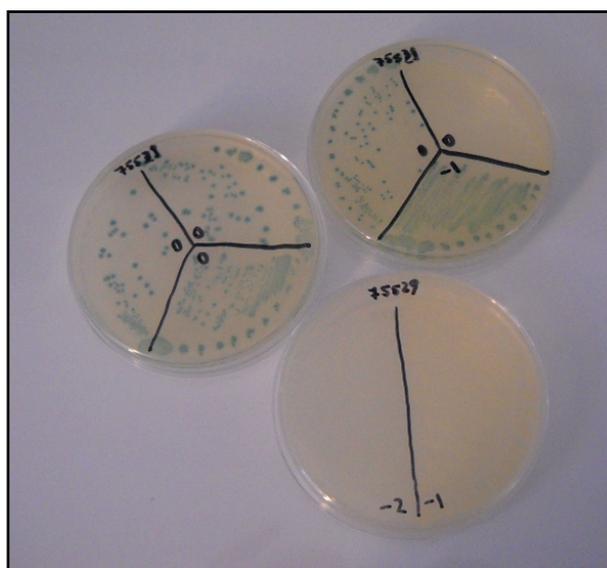


Fig. 23 Piastre di TBX in cui è osservabile la crescita di *E. coli* β -glucuronidasi positivi

2.2.2 Ricerca di *Salmonella* spp.

Salmonella spp. potrebbe essere presente in piccoli numeri e spesso è accompagnata da grandi quantità di altre *Enterobacteriaceae* od altre famiglie di germi; inoltre potrebbero esservi piccole quantità di *Salmonella* oppure cellule di *Salmonella* danneggiate, per cui è stato necessario procedere con il pre-aricchimento in terreno liquido non selettivo. Una quantità di campione (polpa e liquido intervalvare) pari a 25 grammi è stata diluita in BPW (Buffered Peptone Water, Tab. 5) con un rapporto 1:10 ed incubato a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18 ore \pm 2 ore. Il campione è stato successivamente arricchito in terreni liquidi selettivi: RVS (Rappaport-Vassiliadis medium with Soya, Tab. 6) e MKTTn (Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin broth, Tab. 7); le colture sono state incubate rispettivamente alla temperatura di $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ore \pm 3 ore per le provette di RVS, e alla temperatura di $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ore \pm 3 ore per le provette di MKTTn.

Tab. 5 Composizione del Buffered Peptone Water

Ingredienti		g/l
<i>Peptone</i>	20,0 g/l	20,0
<i>Cloruro di sodio</i>	1,5	
<i>Fosfato disodico</i>	15,0	
<i>Potassio fosfato monobasico</i>	0,075	
<i>pH 7,2 \pm 0,2 @ 25°C</i>		
Acqua distillata		1000

Tab. 6 Composizione del Rappaport-Vassiliadis medium with Soya

Ingredienti		g/l
<i>Soya peptone</i>	5,0 g/l	30,0
<i>Cloruro di sodio</i>	8,0	
<i>Cloruro di magnesio 6H₂O</i>	40,0	
<i>Potassio fosfato monobasico</i>	1,6	
<i>Malachite verde</i>	0,04	
pH 5,2 ± 0,2 @ 25°C		
Acqua distillata		1000

Tab. 7 Composizione del Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin broth

Ingredienti		g/l
<i>Estratto di carne</i>	4,3 g/l	89,5
<i>Digestione enzimatica caseina</i>	8,6	
<i>Cloruro di sodio</i>	2,6	
<i>Carbonato di calcio</i>	38,7	
<i>Tiosolfato di sodio (anidro)</i>	30,5	
<i>Ox bile</i>	4,78	
<i>Verde brillante</i>	0,0096	
pH 8,0 ± 0,2 @ 25°C		
Acqua distillata		1000

Dalle colture ottenute nella fase di arricchimento sono stati inoculati: XLD (Xylose Lysine Deoxycholate, Tab. 8) e un altro terreno solido selettivo, complementare all'XLD, appropriato per l'isolamento di ceppi di *Salmonella* lattosio-positivi, di *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi*; in questo caso è stato utilizzato il terreno SS (*Salmonella-Shigella*, Tab. 9).

Tab. 8 Composizione dello Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar

Ingredienti		g/l
<i>Estratto di lievito</i>	3,0 g/l	53,0
<i>L-lisina HCl</i>	5,0	
<i>Xilosio</i>	3,75	
<i>Lattosio</i>	7,5	
<i>Saccarosio</i>	7,5	
<i>Sodio deoxycholate</i>	1,0	
<i>Cloruro di sodio</i>	5,0	
<i>Tiosolfato di sodio</i>	6,8	
<i>Citrato ferrico di ammonio</i>	0,8	
<i>Fenolo rosso</i>	0,08	
<i>Agar</i>	12,5	
<i>pH 7,4 ± 0,2 @ 25°C</i>		
Acqua distillata		1000

Tab. 9 Composizione di Salmonella Shigella Agar

Ingredienti		g/l
<i>polvere Lab-Lemco</i>	5,0 g/l	63,0
<i>Peptone</i>	5,0	
<i>Lattosio</i>	10,0	
<i>Sali biliari</i>	8,5	
<i>Citrato di sodio</i>	10,0	
<i>Tiosolfato di sodio</i>	8,5	
<i>Citrato ferrico</i>	1,0	
<i>Verde brillante</i>	0,00033	
<i>Rosso neutro</i>	0,025	
<i>Agar</i>	15,0	
<i>pH 7,4 ± 0,2 @ 25°C</i>		
Acqua distillata		1000

Sia le piastre di XLD che quelle di SS sono state incubate a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ed esaminate dopo 24 ore ± 3 ore (Fig. 24).



Fig. 24 Piastre di XLD e di SS dopo l'incubazione a 37°C per 24 ore

Le colonie tipiche di *Salmonella* su XLD si presentano con un centro nero ed una zona semitrasparente rossiccia circostante dovuta al cambiamento di colore nell'indicatore; le varianti di *Salmonella* H_2S negative (es. *Salmonella paratyphi A*) che crescono su tale terreno appaiono rosa con un centro rosa scuro. Inoltre, i ceppi di *Salmonella* lattosio positivi che crescono sull'XLD sono gialli con o senza annerimento. Invece, le colonie tipiche che crescono su SS appaiono piccole, opache, trasparenti o traslucide, prive di colore; ma anche in questo caso alcune specie presentano colonie con centro nero. Tale caratteristica tipica è dovuta alla precipitazione del ferro solfuro, indotta dalla produzione di idrogeno solforato a partire dal sodio tiosolfato presente nel terreno. L'utilizzo di combinazioni di terreni selettivi e differenziali è stato effettuato con lo scopo di aumentare le possibilità di mettere in evidenza questi microrganismi, soprattutto se presenti in numero ridotto. Secondo quanto richiesto dalla normativa vigente, il risultato finale è stato espresso come *Salmonella* spp. assente in 25 grammi, qualora non sia stata isolata, e viceversa *Salmonella* spp. presente in 25 grammi nel caso sia stato possibile l'isolamento e la successiva conferma.

2.2.3 Conferma di *Salmonella* spp.

Le colonie riferibili a *Salmonella* sono state coltivate e quindi seminate in un terreno solido nutritivo (Nutrient Agar-NA, Tab. 10) poi incubate a 37°C per 24 ore ± 3 ore. Trascorso il tempo di incubazione a partire dalle colonie isolate sono state effettuate le prove biochimiche di conferma e le prove sierologiche specifiche per *Salmonella*.

Tab. 10 Composizione del Nutrient Agar

Ingredienti		g/l
<i>polvere Lab-Lemco</i>	1,0 g/l	28,0
<i>Estratto di lievito</i>	2,0	
<i>Peptone</i>	5,0	
<i>Cloruro di sodio</i>	5,0	
<i>Agar</i>	15,0	
<i>pH 7,4 ± 0,2 @ 25°C</i>		
Acqua distillata		1000

Per l'esame biochimico è stato impiegato un kit di identificazione commerciale; si è trattato di una galleria API 20E con reazioni biochimiche compatibili per *Salmonella*. Se la coltura è risultata pura, è stata considerata probabile la presenza di *Salmonella*. Una volta identificata *Salmonella* spp. dal kit commerciale è stata effettuata la conferma sierologica. Per tale identificazione è stato necessario verificare preventivamente la presenza di ceppi auto-agglutinanti, i quali non possono essere sottoposti ai test sierologici, poichè risulta impossibile la determinazione degli antigeni: la coltura pura è stata stemperata, con un'ansa, in una goccia di soluzione fisiologica sopra un vetrino portaoggetto, in modo tale da ottenere una sospensione torbida ed omogenea. In caso di aggregazione batterica in gruppi più o meno distinti, il ceppo è stato considerato auto-agglutinante. In caso negativo, tale ceppo non auto-agglutinante, è stato stemperato, con un'ansa, in una

goccia di siero onnivalente somatico sopra un vetrino portaoggetto. In presenza di agglutinazione, la reazione è stata considerata positiva.

I ceppi identificati mediante test biochimici e test sierologici come *Salmonella* o come possibile *Salmonella*, sono stati trasferiti presso il Centro di Referenza per gli Enterobatteri Patogeni di Roma, per la sierotipizzazione completa.

2.3 ANALISI BIOTOSSICOLOGICHE

Per le analisi delle biotossine algali sono stati rispettati i criteri e le metodiche stabilite dall'attuale normativa, contenuti nel Regolamento CE n. 2074/05 e nell'Allegato del Decreto del Ministero della Salute del 16 Maggio 2002. Nel caso delle tossine PSP e DSP il metodo di determinazione ufficiale riconosciuto è, attualmente, la prova biologica (Mouse Test) mentre, per le tossine ASP, il metodo di determinazione ufficiale consiste nell'utilizzo di cromatografia liquida ad alto rendimento (HPLC). Il metodo biologico si basa sull'effetto della tossicità acuta provocata in topi adulti dopo una inoculazione intraperitoneale di un estratto di corpo intero edibile di molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini. Per le prove sono stati utilizzati topi albini di razza swiss di peso compreso tra 18 e 20 grammi, sottoposti ad un periodo di quarantena di almeno 5 giorni all'interno dello stabulario, prima del saggio biologico. Per ragioni di sicurezza sono stati adoperati guanti per manipolare sia il materiale che può contenere le tossine che gli animali.

2.3.1 Determinazione di biotossine algali idrosolubili PSP

Questo metodo di prova rileva contaminazioni di tossina $\geq 800 \mu\text{g}/\text{Kg}$ di parte edibile, equivalenti al tenore massimo di tossina STX fissato dal Regolamento CE n. 853/04. Per ogni campione sono stati prelevati circa 150 grammi di polpa ottenuta dall'apertura dei molluschi bivalvi, di cui 50 grammi sono stati conservati come scorta da inviare al Laboratorio Nazionale di Riferimento per le biotossine marine, in caso di morte dei topi inoculati, per la quantificazione della tossina. I restanti 100 grammi sono stati omogeneizzati. Successivamente sono stati aggiunti 100 ml di HCl 0,25 N ed è stato verificato che il pH fosse compreso fra 2 e 2,5. La miscela è stata portata all'ebollizione e lasciata bollire lentamente per 5 minuti. Dopo averla fatta raffreddare a temperatura ambiente, è stato verificato che il pH fosse invariato; nel caso di variazione, è sufficiente aggiungere HCl 5 N o NaOH 0,1 N, rispettivamente per abbassarlo o per alzarlo, avendo cura, nel caso dell'idrossido di sodio, di lasciarlo cadere a

gocce e operando agitazione costante per prevenire un'alcalinizzazione locale e di conseguenza la distruzione della tossina. La miscela ottenuta è stata trasferita in un cilindro graduato da 200 ml, e portata a volume con l'aggiunta di acqua distillata. Dopo averla centrifugata a 3000 r.p.m. per 5 minuti, il surnatante ottenuto è stato trasferito in una beuta. Dopo aver controllato nuovamente il pH, per ogni campione sono stati selezionati 2 o 3 topi da sottoporre alla prova e in ciascuno di essi è stato inoculato nel peritoneo, 1 ml dell'estratto acido ottenuto, mediante l'utilizzo di siringhe monouso con ago da insulina. Dopo aver annotato l'ora di inizio, per ogni inoculo, i topi sono stati messi sotto osservazione per 60 minuti, al fine di stabilire il tempo dell'eventuale morte, indicata dall'ultimo respiro.

Il risultato finale è stato espresso con la dicitura *Tossine idrosolubili PSP: Non Determinabili (n/d)* nel caso in cui tutti i topi inoculati siano sopravvissuti oltre i 60 minuti. In caso di morte di almeno due topi su tre, il risultato finale è stato espresso con la dicitura *Tossine idrosolubili PSP: Determinabili (d)* e l'aliquota di estratto residuo è stata inviata al Centro di Referenza Nazionale (Centro Ricerche Marine di Cesenatico) per la conferma e la quantificazione.

2.3.2 Determinazione di biotossine algali liposolubili DSP

Il metodo ufficiale prevede 2 differenti protocolli rispettivamente per rilevare in un solo step tutte le componenti incluse nel gruppo (AOs, DTXs, PTXs, YTXs e AZAs) o tramite 2 step per rilevare le YTXs separatamente dalle altre componenti.

• Protocollo 1

L'analisi ha lo scopo di determinare le tossine liposolubili AOs, DTXs, PTXs, YTXs e AZAs nei molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini. Il metodo è semiquantitativo e rileva tutte le componenti storicamente incluse nel gruppo delle DSP: acido okadaico ed analoghi, Dinophysitossine, Pectenotossine, Yessotossine e Azaspiracidi. Per ogni campione sono stati prelevati circa 150 grammi di polpa ottenuta

dall'apertura dei molluschi bivalvi, di cui 50 grammi sono stati conservati come scorta da inviare al Laboratorio Nazionale di Riferimento per le biotossine marine, in caso di morte dei topi inoculati, per un'eventuale analisi di conferma. Ai restanti 100 grammi omogeneizzati sono stati aggiunti 300 ml di acetone e successivamente, è stata effettuata l'estrazione con omogenizzatore ad immersione per 2 minuti. Il materiale è stato poi filtrato sotto pressione ridotta ed il filtrato è stato raccolto in un pallone da 1000 ml mentre, il residuo, è stato sottoposto ad una seconda estrazione, questa volta con 300 ml di metanolo. Dopo aver riunito in un pallone da 1 l gli estratti acetone e metanolo, la miscela è stata sottoposta ad evaporazione a pressione ridotta. Dopo aver sciacquato il pallone utilizzato per l'evaporazione con un piccolo volume di acqua (minore di 5 ml) e di dietiletere (100 ml), tale miscela è stata aggiunta nell'imbuto separatore. Terminata la separazione delle due fasi, la fase acquosa è stata allontanata, mentre la fase di dietiletere è stata nuovamente sottoposta a risciacquo, per altre due volte, con circa 50 ml di acqua. Dopo aver ridotto per evaporazione in un pallone il volume di dietiletere, tale procedura è stata completata in una provetta graduata. Il residuo lipidico ottenuto è stato portato ad un volume finale di 4 ml con aggiunta di Tween 60 all'1%. A questo punto, per ogni campione sono stati selezionati 3 topi da sottoporre alla prova e in ciascuno di essi è stato inoculato nel peritoneo, 1 ml dell'emulsione ottenuta (corrispondente a 25 grammi di tessuto di parte edibile). Dopo aver annotato l'ora di inizio, per ogni inoculo, i topi sono stati messi sotto osservazione per 24 ore, al fine di stabilire il tempo dell'eventuale morte, indicata dall'ultimo respiro.

La morte di due su tre topi entro le 24 ore è stata indice di presenza di una o più tossine appartenenti ai gruppi AOs, DTXs, PTXs, YTXs e AZAs, a livelli superiori a quelli stabiliti dalla normativa di riferimento, e il test è stato considerato positivo; la sopravvivenza di almeno due topi su tre entro le 24 ore è stata indice di assenza di tali tossine o di presenza a livelli inferiori a quelli stabiliti dalla normativa di riferimento, ed il test è stato considerato negativo.

• Protocollo 2

Il procedimento prevede 2 step che consentono di evidenziare la presenza di diverse biotossine. Lo step 1 consente l'estrazione di una o più tossine appartenenti ai gruppi AOs, DTXs, PTXs e AZAs mentre lo step 2 consente l'estrazione di YTXs. Per ogni campione sono stati prelevati circa 150 grammi di polpa ottenuta dall'apertura dei molluschi bivalvi, di cui 50 grammi sono stati conservati come scorta da inviare al Laboratorio Nazionale di Riferimento per le biotossine marine, in caso di morte dei topi inoculati, per un'eventuale analisi di conferma. Ai restanti 100 grammi omogeneizzati sono stati aggiunti 300 ml di acetone e successivamente, è stata effettuata l'estrazione con omogenizzatore ad immersione per 2 minuti. Il materiale è stato poi filtrato sotto pressione ridotta ed il filtrato è stato raccolto in un pallone da 1000 ml mentre, il residuo è stato sottoposto ad una seconda estrazione, questa volta con 300 ml di metanolo. Dopo aver riunito in un pallone da 1 l gli estratti acetone e metanolico, la miscela è stata sottoposta ad evaporazione a pressione ridotta. La soluzione condensata ottenuta è stata trasferita in un imbuto separatore con 30 ml di diclorometano e 60 ml di metanolo al 60%. Terminata la separazione delle due fasi, la fase di diclorometano è stata sottoposta ad estrazione per due volte con 60 ml di metanolo al 60% presaturato. Dopodichè tutti gli estratti di metanolo sono stati riuniti.

- Step 1

Per evidenziare la presenza di AOs, DTXs, PTXs e AZAs è stata considerata la fase di diclorometano; il suo volume è stato ridotto inizialmente, per evaporazione in un pallone, e successivamente completata in una provetta graduata. Il residuo lipidico ottenuto è stato portato ad un volume finale di 4 ml con aggiunta di Tween 60 all'1%. A questo punto, per ogni campione sono stati selezionati 3 topi da sottoporre alla prova e in ciascuno di essi è stato inoculato nel peritoneo, 1 ml dell'emulsione ottenuta (corrispondente a 25 grammi di tessuto di parte edibile). Dopo aver annotato l'ora di inizio, per ogni inoculo, i topi sono

stati messi sotto osservazione per 24 ore, al fine di stabilire il tempo dell'eventuale morte, indicata dall'ultimo respiro.

La morte di due su tre topi entro le 24 ore è stata indice di presenza di una o più tossine appartenenti ai gruppi AOs, DTXs, PTXs e AZAs, a livelli superiori a quelli stabiliti dalla normativa di riferimento, e il test è stato considerato positivo. Viceversa, la sopravvivenza di almeno due topi su tre entro le 24 ore è stato indice di assenza di tali tossine o di presenza a livelli inferiori a quelli stabiliti dalla normativa di riferimento.

- *Step 2*

Per evidenziare la presenza di YTXs sono stati considerati gli estratti metanolici al 60% portati ad un volume finale di 200 ml con aggiunta di metanolo. Dopo aver prelevato 16 ml di tale soluzione, il suo volume è stato ridotto inizialmente, per evaporazione in un pallone, e successivamente completata in una provetta graduata. Il residuo lipidico ottenuto è stato portato ad un volume finale di 4 ml con aggiunta di Tween 60 all'1%. A questo punto, per ogni campione sono stati selezionati 3 topi da sottoporre alla prova e in ciascuno di essi è stato inoculato nel peritoneo, 1 ml dell'emulsione ottenuta (corrispondente a 2 grammi di tessuto di parte edibile). Dopo aver annotato l'ora di inizio, per ogni inoculo, i topi sono stati messi sotto osservazione per 6 ore, al fine di stabilire il tempo dell'eventuale morte, indicata dall'ultimo respiro.

la morte di due topi su tre entro le 5 ore è stata indice di presenza di tossine YTXs a livelli superiori a quelli stabiliti dalla normativa di riferimento, e il test è stato considerato positivo. Viceversa, la sopravvivenza di almeno due topi su tre entro le 5 ore è stata indice di assenza di tali tossine o di presenza a livelli inferiori a quelli stabiliti dalla normativa di riferimento. Il test è stato ripetuto nel caso si sia verificata la morte di due topi entro le 5 ore e il terzo topo abbia avuto un tempo di sopravvivenza inferiore alle tre ore; dopodichè il test è stato considerato positivo dopo aver verificato che la mediana dei tempi di sopravvivenza registrata, fosse complessivamente inferiore alle 5 ore.

2.3.3 Metodo per l'identificazione e la determinazione di tossine ASP

Tale determinazione è stata affidata ai laboratori del Centro di Referenza Nazionale per le Biotossine Marine di Cesenatico, per la conferma e la quantificazione in microgrammi di acido domoico/Kg di parte edibile. Il metodo che è stato applicato è quello ufficiale e prevede l'utilizzo di cromatografia liquida ad alto rendimento (HPLC).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Da Luglio 2009 a Dicembre 2009 sono stati effettuati 12 prelievi per un numero complessivo di 80 campioni analizzati. Tutti i campioni sono stati sottoposti alle analisi microbiologiche per la conta di *E. coli* β -glucuronidasi positivi e per la ricerca di *Salmonella* spp., mentre le analisi biotossicologiche sono state effettuate limitatamente ai primi prelievi dei mesi di Luglio, Settembre, Novembre 2009.

3.1 RISULTATI ANALISI MICROBIOLOGICHE

Nel periodo considerato sono stati analizzati 80 campioni che hanno dato i seguenti risultati rispetto ai parametri presi in esame. Per quanto riguarda il parametro *E. coli* (Tab. 11) il 65% dei campioni è risultato inferiore o uguale al limite stabilito per le aree di classe A (230 *E. coli*/100 g); il 20% è risultato inferiore o uguale al limite stabilito per le aree di classe B (4600 *E. coli*/100 g) mentre il 15% dei campioni è risultato inferiore o uguale al limite stabilito per le aree di classe C (46000 *E. coli*/100 g).

Tab. 11 Risultati in percentuale dei campioni sottoposti alla conta di *E.coli*

Parametro <i>E. coli</i>	% campioni
≤ 230 <i>E. coli</i> /100 g	65
230 - 4600 <i>E. coli</i> /100 g	20
4600 - 46000 <i>E. coli</i> /100 g	15

La ricerca di *Salmonella* spp. ha invece evidenziato una presenza sporadica del patogeno interessando un numero di campioni pari al 2,5% di quelli analizzati.

Per il dettaglio relativo alle 2 aree in esame si rimanda ai Grafici 1 e 2, dove viene messo in relazione l'andamento dei valori di *E. coli* riscontrati nel tempo nei punti di prelievo a Marina di Carrara (Grafico 1) e a Montignoso (Grafico 2).

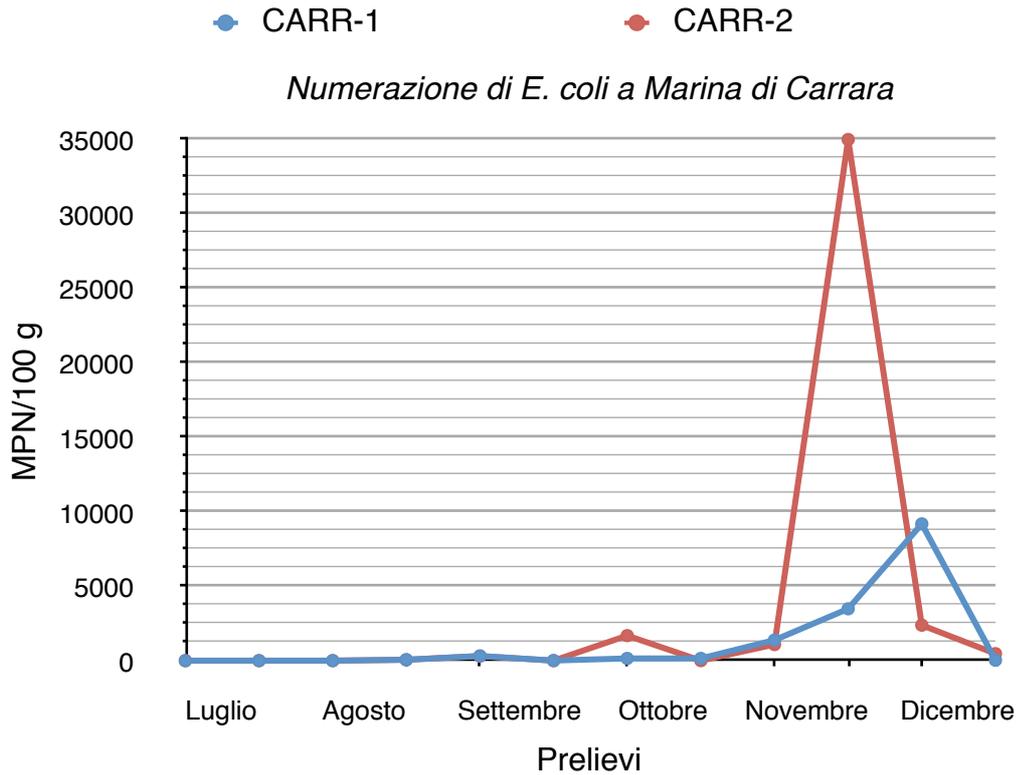


Grafico 1 Andamento dei valori di *E. coli* nei punti di prelievo di Marina di Carrara

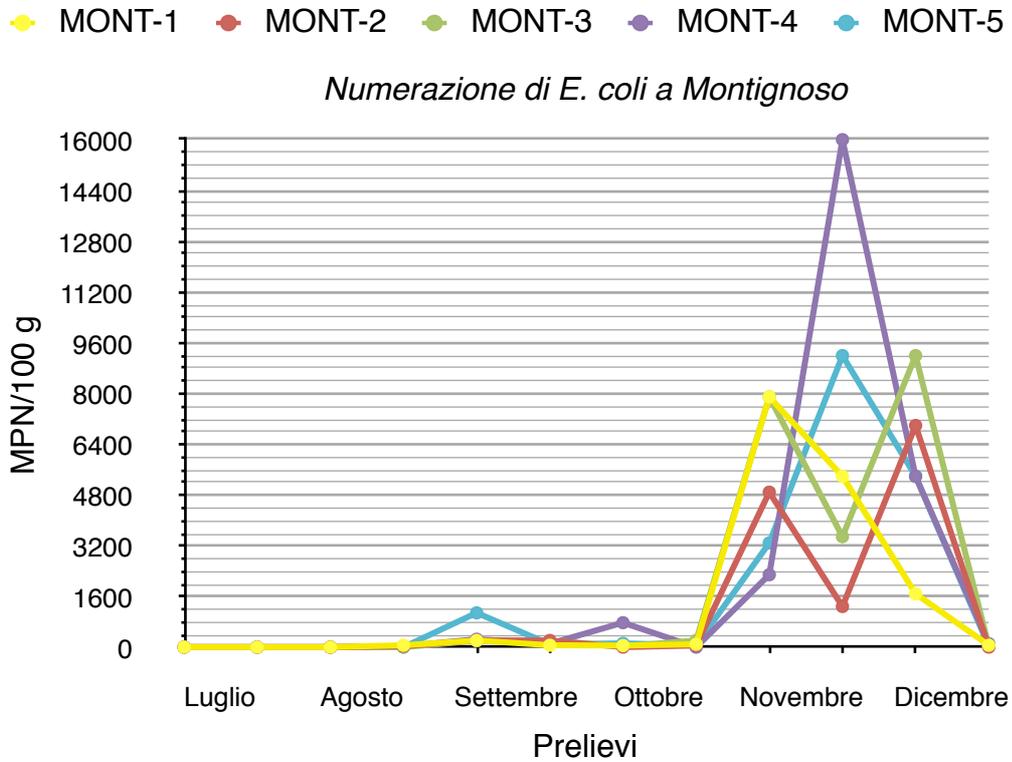


Grafico 2 Andamento dei valori di *E. coli* nei punti di prelievo di Montignoso

Come si può evincere dai Grafici 1 e 2 i valori più elevati per quanto riguarda la carica di *E. coli* si sono evidenziati nel periodo Novembre-Dicembre, mentre le non conformità per *Salmonella* spp. sono state rilevate nel mese di Dicembre. Le Telline, solitamente localizzate nelle vicinanze della costa sotto la sabbia di battigia² dove c'è maggior ricchezza di sedimenti e residui organici, risultano indicatori più efficaci a differenza delle Vongole, solitamente localizzate più al largo della costa, o dei Mitili, i quali popolano le aree intertidali³. Sostanzialmente le aree in esame hanno presentato un andamento dei valori di *E. coli* pressoché equiparabile. E' possibile notare come nei mesi estivi (Luglio, Agosto e Settembre) i valori di *E. coli* risultino trascurabili; pur trattandosi di zone turistiche e nonostante l'accumulo di sostanze organiche, inorganiche e sedimenti vari, tipico di quel periodo, si deve considerare che solitamente nei mesi estivi le acque marine risultano piatte o poco mosse e ciò provoca un minor apporto di sostanze che favoriscono la crescita di Enterobatteri ed il conseguente accumulo nei molluschi bivalvi. Al contrario, le intense precipitazioni e le frequenti mareggiate tipiche del periodo autunnale, possono provocare un maggior scarico d'acqua da parte dei fiumi (Latorre et al., 1995), causando la risospensione dei sedimenti accumulati, il che giustifica i valori più elevati riscontrati nel periodo compreso tra Novembre e Dicembre.

² parte di spiaggia contro cui battono le onde; si tratta di una fascia più o meno ampia, in funzione non solo dell'inclinazione del suolo e della forza del moto ondoso ma anche dell'ampiezza delle maree.

³ zona del litorale che dipende dalle maree, in quanto è emersa in condizioni di bassa marea e sommersa con l'alta marea.

3.2 RISULTATI ANALISI BIOTOSSICOLOGICHE

Nel periodo considerato sono stati analizzati 23 campioni mediante prova biologica per la determinazione di tossine PSP e DSP. In 2 campioni è stata rilevata positività per le tossine DSP, quindi con una percentuale di positività pari al 9%. In nessuno dei campioni è stata rilevata la presenza di tossine PSP. Per quanto riguarda le aliquote sottoposte ad analisi chimica per la determinazione di tossine ASP, anch'esse hanno dato esito negativo.

La positività dei campioni e quindi la conseguente presenza di biotossine di tipo DSP è da correlare alla fioritura di fitoplancton tossico; gli effetti dei bloom algali si manifestano soprattutto nei periodi estivi ed autunnali, quando sussistono condizioni ottimali per il loro sviluppo, dettate dall'apporto di nutrienti e dall'intensità luminosa. Tali condizioni si sviluppano prevalentemente in queste stagioni, quando si ha un buon apporto di luce e la rottura del termoclino⁴, la quale favorisce la disponibilità di nutrienti per gli organismi autotrofi in grado di effettuare la fotosintesi. In inverno il termoclino e la scarsa intensità luminosa, e in estate lo scarso ricircolo delle acque, non favoriscono la crescita del fitoplancton, limitando la loro presenza in aree localizzate con fioriture occasionali. In autunno la rottura del termoclino e le prime precipitazioni, favoriscono l'apporto di nutrienti e quindi le conseguenti fioriture. La stabilità meteo-marina gioca un ruolo fondamentale affinché si verifichino condizioni di assenza di moto ondoso o correnti marine insufficienti a produrre rimescolamento della colonna d'acqua. Si favorisce quindi, la concentrazione di quelle sostanze, soprattutto di fosfati e nitrati che, giunte in mare in grandi quantità attraverso gli effluenti, sono utilizzate dalla alghe a scopo trofico, con conseguente incremento della velocità di crescita e aumento della biomassa algale. Al termine del ciclo vitale, le alghe subiscono un processo di decomposizione ad opera di batteri aerobi

⁴ si tratta di un sottile strato nel quale la temperatura diminuisce, in funzione della profondità, più velocemente rispetto ad altri strati. Al di sopra del termoclino lo strato si dice superficiale e la temperatura dell'acqua è maggiore.

e si depositano sui fondali, determinando un forte consumo di ossigeno. Tale processo continua fintanto che l'arrivo d'ossigeno dagli strati più superficiali dell'acqua è sufficiente a bilanciarne il consumo batterico. Tuttavia, quando l'ossigeno diviene carente, per l'abbondante quantità di sostanza organica presente sul fondo, si instaurano processi anaerobi, di tipo riducente, nei quali la decomposizione della biomassa determina la liberazione di cataboliti, quali ammoniaca, idrogeno solforato e idrocarburi (metano) che inficiano la qualità delle acque e possono provocare condizioni di ipossia o anossia degli organismi acquatici, contribuendo in tal modo a limitare lo sviluppo sostenibile delle aree costiere.

4. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Al momento non possono essere tratte conclusioni definitive dato che le attività di classificazione non sono ancora concluse; tuttavia i campioni non conformi ai limiti stabiliti per le aree di classe A, rilevati in maniera pressoché equiparabile nelle due aree in esame, potrebbero far pensare ad un inquinamento delle acque da parte di reflui urbani non adeguatamente bonificati, come dimostrano i dati riportati in Tabella 12 riguardanti l'efficienza dei depuratori siti nelle aree di interesse (Arpat, 2009). Pertanto, sarebbe opportuno effettuare un maggior controllo degli impianti di depurazione dei reflui di scarico.

Tab. 12 Rapporto tra la necessità di depurazione e la reale capacità depurativa degli impianti esistenti a Carrara e a Montignoso (Arpat, 2009)

	Bilancio depurativo		
	Carico organico da depurare	Potenzialità depuratori	Carico potenzialmente depurato
Comune	(AbEq)	(AbEq)	(AbEq)
Carrara	104256	67020	64%
Montignoso	15222	200	1%

(AbEq - con il termine abitante equivalente viene indicato, nel campo dell'ingegneria sanitaria, il carico organico biodegradabile convogliato in fognatura, in un giorno, dovuto alla normale attività di una particolare utenza civile.)

Inoltre, nell'analisi dei risultati è opportuno correlare le non conformità ottenute con le condizioni meteomarine stagionali ed occasionali, con particolare attenzione ai fenomeni legati all'idrodinamismo, in modo tale da associare eventuali contaminazioni dei campioni di molluschi ad un preciso quadro microbiologico delle acque marine.

Dallo studio effettuato risulta evidente l'importanza di una approfondita verifica delle fonti inquinanti sia di origine umana che animale, per meglio individuare la causa dell'innalzamento dei valori microbiologici riscontrati. Inoltre è opportuno predisporre di una puntuale e rigorosa applicazione di Piani regionali di sorveglianza e monitoraggio delle aree del litorale apuano, destinate alla raccolta dei molluschi bivalvi ai fini di un'attività di prevenzione a tutela del consumatore.

5. BIBLIOGRAFIA

- Altkruse S.F., Cohen L.M., Sewrdlow, 2005. *Epidemiology of food borne diseases*. Prespective Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta. 1-11.
- Austin B., Austin D.A., 1989. *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. Ellis Horwood Ltd. 273-293.
- Bonnefont J.L., Martin Y.P., Guiennet B., 1990. *Experimental study for the growth of fecal bacteria in marine environment. Quantification, implicated factors*. Wat. Res. Vol. 24: 267-273.
- Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Poletti R., Satake M., Viviani R., Yasumoto T., 1997. *Yessotoxin in Mussels of the Northern Adriatic Sea*. Toxicon. 35: 177-183.
- Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Poletti R., Viviani R., 1998. *Isolation of adrianotoxin, a new analogue of Yessotoxin from mussels of the Adriatic Sea*. Tetrahedron Lett. 39: 8897-8900.
- Clesceri S.L., Greenberg E.A., Edaton A.D., 1992. *Standard Method for examination of waste water*. 20th edition. 9-47; 9-66.
- Connell J.J. *Control of fish quality*. Third edition. 120: 200-209.
- Corrain C., Arcangeli G., Fasolato L., Manfrin A., Rossetti E., Biazzi E., Mioni R., Pavoni E., Losio M.N., Sanavio G., Suffredini E., Croci L., 2007. *Influenze climatico-ambientali sulla presenza di virus enterici in molluschi bivalvi*. Industrie alimentari. 46: 277-283.
- Costa, C., Bianchini M., Ceccarelli P., Orecchia P., Rambaldi E., Volterra L., 1987. *Indagine sui molluschi bivalvi di interesse commerciale (telline, cannolicchi e vongole) delle coste della Toscana, del Lazio e della Campania (1985-1987)*. Quaderni Ist. Idrobiol. Acquacol. Brunelli. 7: 3-58.
- Coyle J.T., 1983. *Neurotoxic action of kainic acid*. J Neurochem. 41: 1-11.
- Croci L., Losio M.N., Suffredini E., Pavoni E., Di Pasquale S., Fallacara F., Arcangeli G., 2007. *Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea*. International journal of food microbiology. 114: 252-257.
-

- Croci L., Suffredini E., Pavoni E., Fallacara F., Toti L., Losio MN., 2004. *Noroviruses circulation in molluscs harvested from the northern Adriatic Sea*. In: 2nd International Calicivirus Conference 2004. Abstracts. Dijon.
- Croci L., Suffredini E., 2003. *Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici*. Ann. Istituto Superiore della Sanità. 39: 35-45.
- Decreto del Ministero della Salute, 16 Maggio 2002. Tenori massimi e metodiche di analisi delle biotossine algali nei molluschi bivalvi vivi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini.
- Depurary E., Derrien A., 1995. *Influence of previous stay of Escherichia coli and Salmonella spp. on their survival in sea water*. Wat. Res. Vol. 29, No 4. 1005-1011.
- Di Pasquale S., Suffredini E., Alessi E., Croci L., Toti L., 2004. *Determination of Escherichia coli, HAV, noroviruses and vibriaceae in shellfish from Adriatic sea*. In: International Conference on Molluscan Shellfish Safety (ICMSS 2004). Abstracts. Galway.
- Donovan T.J., Gallacher S., Andrews N.J., Greenwood M.H., Graham J., Russel J.E., Roberts D., Lee E., 1998. *Modification of standard method used in the United Kingdom for counting Escherichia coli in live bivalve mollusks*. Communicable Disease and Public Health. 1: 188-96.
- EFSA, 2005. *Needs to revise the Community Reports on Zoonoses and to harmonized the related data collection*. Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection.
- EFSA, 2008. *Manual for Reporting on Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the framework of Dir. CE 99/03*. Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection.
- EFSA, 2009. *Marine biotoxins in shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain*. The EFSA Journal.

- EFSA, 2009. *Trends and Source of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007*. Community Summary Report.
- EU Seafood Industry Report, 2007.
- EU Working Group on the Microbiological Monitoring of Bivalve Molluscs Harvesting Areas, 2007. Guide to Good Practice: Technical Application. CEFAS.
- FAO, 2004. Marine Biotoxins. Food and nutrition paper.
- Feldstein T., Kashman Y., Abelson A., Fishelson L., Mokady O., Bresler V., Erel Y., 2003. *Marine molluscs in environmental monitoring*. Springer-Verlag and AWI. Vol. 57, No. 3-4. 206-211.
- Fitzgerald A., 2008. *Financial impacts of sporadic pollution events and exceeded discharge agreements on shellfish operations*.
- Fitzgerald A., 2008. *Impact of climate change on frequency of pollution events*.
- Foster J., Fowler J.L., Decay J., 1997. *A microbial survey of various fresh and frozen seafood products*. Journal of Food Production. 40: 300-303
- Galli A., 2005. Microbiologia degli Alimenti. Casa Editrice Ambrosiana. 307-312
- Gandolfi C., 1996. *Virus enterici trasmessi attraverso il consumo di molluschi bivalvi*. Università degli studi di Milano, Facoltà di Medicina Veterinaria.
- Heral M., Berthomé J.P., 1991. *Water quality criteria and monitoring for marine mollusc culture: the French experience*. Acq. and the Env. No. 16.
- ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- ISO 6887-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

ISO 6887-3:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.

ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs-General requirements and guidance for microbiological examination.

ISO/TS 16649-3:2005. Microbiology of food and animal feeding stuff-Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide.

Ito E., Satake M., Ofuji K, Kurita N., T. McMahon, James KJ, Yasumoto T., 2000. *Multiple organ damage caused by Azaspiracid new toxin, isolated from mussels produced in Ireland*. *Toxicon*. 38: 917-930.

Iverson F., Truelove J., 1994. *Toxicology and seafood toxins: domoic acid*. Natural Toxins.

Kay D., Crowther J., Fewtrell L., Francis C.A., Hopkins M., Kay C., McDonald A.T., Stapleton C.M., Watkins J., Wilkinson J., Wyer M.D., 2008. *Quantification and control of microbial pollution from agriculture: a new policy challenge?* *Environ. Sci. & Policy*. 11: 171-184.

Lane T.W., Morel F.M., 2000. *A biological function for cadmium in marine diatoms*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.

Latorre F., Cavallo R.A., De Filippis M., 1995. *Acqua per la molluschicoltura nel golfo di Taranto*. Istituto Sperimentale Talassografico "A. Cerruti" CNR, Taranto.

Latorre F., Cavallo R.A., Acquaviva M., Macripò C., 1995. *Preliminari sull'inquinamento del Mar Piccolo e Mar Grande di Taranto adibiti alla molluschicoltura: aspetti microbiologici*. Istituto Sperimentale Talassografico "A. Cerruti" CNR, Taranto.

Lawrence J.F., Charbonneau C.F., Ménard C., Quilliam M.A., Sim P.G., 1989. *Liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the paralytic shellfish poison extraction*

- procedure of the Association of Official Analytical Chemists. J Chromatogr.*
- Losio M.N., Suffredini E., Pavoni E., Fallacara F., Arcangeli G., Croci L. , 2006. *Monitoring for the presence of norovirus in Italian shellfish.* In: Annual General Meeting Med-Vet-Net. Abstract Book. Malta.
- MacMahon T., Silke J., 1996. *Winter toxicity of unknown aetiology in mussels.* Harmful Algae News. 14: 2.
- Martinez-Manzares. *Relationship between indicators of fecal pollution in shellfish growing water and occurrence of human pathogenic microorganism in shellfish.* Journal of Food Protection. Vol. 55, No 8. 609-614.
- Mioni R., Comin D., Fornasiero E., Carrara G., Boffo L., Fuselli P., Bordin P., Grimaldi M., 2005. *Prevalenza di Vibrio spp. nei molluschi bivalvi allevati nella Regione Veneto.* Ist. Zooprofilattico Sper. delle Venezie.
- Murata T., Kumagai M., Lee JS, Yasumoto T., 1987. *Isolation and structure of Yessotoxin, a novel polyether Compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning.* Tetrahedron Lett. 28: 5369-5872.
- Ofujii K., Satake M., T. McMahon, James KJ, Naoki H., Y. Oshima, Yasumoto T., 1999. *Two analogues of azaspiracid isolated from mussels, Mytilus edulis, involved in human intoxication in Ireland.* Nat. Toxins. 7: 99-102.
- Ofujii K., Satake M., T. McMahon, James KJ, Naoki H., Y. Oshima, Yasumoto T., 2001. *Structures poisoning in Europe.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 740-742.
- Pane M., 2007. *Qualità e sicurezza dei prodotti ittici semiconservati: microrganismi e metaboliti microbici.* Facoltà di Agraria, Università di Pisa.
- Parisi G., Conti D., Franchi E., Dunn P.H., Bartoli A., Giorgi G., Sciammetta S., 2005. *Individuazione e rappresentazione cartografica delle aree toscane vocate alla molluschicoltura e prove*

di captazione e primo allevamento di ostrica piatta. Arsia Toscana. 1-10.

Poletti R., 2007. *Il rischio associato alle alghe tossiche marine.* National reference laboratory on marine biotoxins. Cesenatico.

Poletti R., 2007. *Lo stato delle conoscenze di alcune biotossine marine prodotte da microalghe bentoniche lungo le coste italiane.* National reference laboratory on marine biotoxins. Cesenatico.

Poletti R., Milandri A., Pompei M., 2007. *Algal Biotoxins of Marine Origin: New identification from the European Union - Veterinary Research Communications.*

Prioli G., 2008. *La molluschicoltura in Italia.* En A. Lovatelli, A. Farias e I. Uriarte (eds). 161-176

Prioli G., 2001. *Censimento nazionale sulla molluschicoltura.* Unimar Osservatorio tecnico-biologico.

Regolamento CE n. 853/04. Norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.

Regolamento CE n. 854/04. Norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.

Regolamento CE n. 2073/05. Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.

Regolamento CE n. 2074/05. Modalità di attuazione relative a taluni prodotti e all'organizzazione di controlli ufficiali.

Regolamento CE n. 2076/05. Disposizioni transitorie per l'attuazione dei Regolamenti CE n. 853/04 e 854/04 e 882/04. Modifiche ai Regolamenti CE n. 853/04 e 854/04.

Regolamento CE n. 1881/06. Tenori massimi di taluni contaminanti presenti nei prodotti alimentari.

Regolamento CE n. 1441/07. Modifiche al Regolamento CE n. 2073/06.

Report on trends and source of zoonotic agents in Belgium. May 2001. 17-26

- Rodgers C., Lees D., Hudson S., 1992. *Classification and monitoring of shellfish harvesting areas in England and Wales*. British Crown.
- Satake M., L. McKenzie, Yasumoto T., 1996. *Relative configuration of yessotoxin and isolation of two analogues From scallop*. Tetrahedron Lett. 37: 5955-5958.
- Satake M., Tubaro A., Lee JS, Yasumoto T., 1997. *Two new analogues of yessotoxin, a homoyessotoxin 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of Adriatic Sea*. Nat. Toxins. 5: 107-110.
- Satake M., K. Ofuji, Naoki H., James KJ, Furvey A., T. McMahon, J. Silk, Yasumoto T., 1998. *Azaspiracid in New Marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels*. J. Am. Chem. Soc. 120: 9967-9968.
- Sato M., Nakano T., Takeuchi M., Kanno N., Nagahisa E., Sato Y., 1996. *Distribution of neuroexcitatory amino acids in marine algae*. Phytochemistry. 42: 1595-1597.
- Schantz E.J., 1984. *Historical perspective on paralytic shellfish poison*. In Seafood toxins, EP Ragelis 8ed. ACS Symposium Series 262, American Chemical Society, Washington DC. 262: 99-111.
- Serratore P., 2008. *Molluschi bivalvi: patologie emergenti da cause microbiologiche*. Casalecchio di Reno.
- Smith D.S., Kitts D.D., 1995. *Enzyme immunoassay for the determination of domoic acid in mussel extracts*. J Agric Food Chem. 43: 367-371.
- Souchu P., Vaquer A., Collos Y., Landrein S., Deslous-Paoli J.M., Bibent B., 2001. *Influence of shellfish farming activities on the biogeochemical composition of the water column in Thau lagoon*. Mar. Ecol. Progr. Ser. 164: 135-146.
- Stapleton C.M., Wyer M.D., Crowther J., McDonald A.T., Kay D., Greaves J., Wither A., Watkins J., Francis C., Humphrey N., Bradford M., 2008. *Quantitative catchment profiling to apportion faecal indicator organism budgets for the Ribble system, the UK's sentinel drainage basin for Water framework Directive research*. J. Environ. Manag. 87: 535-550.

- Suffredini E., Cozzi L., Scalise F., 2005. *Problematiche legate ai patogeni emergenti nei prodotti della pesca*. Focus su sicurezza d'uso e nutrizionale degli alimenti. Roma.
- Sulaj K., Beli E., Bijo B., 2002. *Bacteriological monitoring of Albanian coastline and live bivalve mollusks on Spring 2002*. Journal of Veterinary, Albania, No. 2. 3-13.
- Sulaj K., Beli E., Bijo B., Telo D., Shalari Y., 2004. *Bacterial monitoring of Albanian water coastline and live bivalve mollusks on 2003*. Albanian Journal of Agriculture Science. Agriculture University of Tirana. Vol. 1, No. 3. 87-92.
- Sulaj K., Telo D., Shalari Y., Aleksii P., 2005. *Monitoring of bacteriological indicators and Salmonella spp. in production zones of bivalve mollusks in Albania 2004*. Institute of Veterinary Research "Biliali Golemi", Tirana, Albania.
- Takemoto T., 1987. *Isolation and structural identification of naturally occurring excitatory amino acid*. In: Kainic acid As a tool in neurobiology Raven Press. New York. 1-15.
- Taylor F.J.R., 1989. *Red Tide, brown tides and other harmful algal blooms: the view into the 1990's*. Toxic Marine Phytoplankton Edit. Graneli E., Sundstrom B., L. Elder, M.D. Anderson Elsevier Science Publishing Co. Inc. 527.
- Terao K., Ito E., T. Yanagi, T. Yasumoto, 1986. *Histopathological experimental studies on marine-toxin poisoning I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and Pectenotoxin-1*. Toxicon. 24: 1141-1151.
- Terao K., Ito E., Oarada M., Murata M., and T. Yasumoto, 1990. *Histopathological experimental studies on marine - Poisoning toxin-5. The effects in mice of yessotoxin isolated from Patinopecten yessoensis and desulfated derivated*. Toxicon. 28: 1095-1104
- The First European Communicable Disease Epidemiological Report, 2007.

- Topi B., Polletti R., Beli E., Mone S., Xinxo A., Dervishi I., Telo A., Sulaj K., 1998. *Monitoring of microbial and bio-toxicological pollution of aquatic eco-system of the Adratic and Ionian seas*. Journal of Veterinary, Albania. Vol. 1, No. 1. 3-15.
- Tortorello M.L., 2003. *Indicator organism for safety and quality uses and methods for detection: Minireview*. J AOAC Intern. 86: 1208-1217.
- Toti L., 2004. *Rischi igienico-sanitari connessi al consumo dei prodotti della pesca*. Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore della Sanità, Roma.
- Turolla E., 1999. *Riproduzione controllata di bivalvi*. Laguna. 5: 16-19.
- Turolla E., 2004. *Studio sulla valutazione dell'impatto di nuovi attrezzi per la pesca delle vongole veraci*. Amm. Prov. Ferrara – Relazione finale, 57 pp.
- Turolla E., 2008. *Biologia e tecniche di allevamento di molluschi bivalvi*. Istituto Delta Ecologia Applicata. Casalecchio di Reno.
- Viaroli P., Azzoni R., Bartoli M., Giordani G., Taje L., 2001. *Evolution of the trophic conditions and dystrophic outbreaks in the Sacca di Goro lagoon (Northern Adriatic Sea)*. In: Faranda, F.M., Guglielmo, L. e Spezie, G. (Eds.), *Mediterranean Ecosystems: Structure and Processes*. Springer-Verlag, Berlin. 443-451.
- Viviani R., Proja M., F. D'Alessandro, L. Mancini, Poletti R., Montanari G., 1997. *First cases in Italy of "Paralytic Shellfish Poisoning from mussels cultivated in rias of Spain"*. Acts Soc. En. Sci. Vet. 31: 331.
- Wilson I.G., Moore J.E., 1996. *Presence of Salmonella spp. and Campylobacter in shellfish*. Cambridge University. Epidemiol. Infect. 116: 147-153.
- Wright J.L.C., Bates S.S., Bird C.J., de Freitas A.S.W., Foxal, R., Gilgan M., Hanic L.A., Johnson G.R., McCulloch A.W., Odense P., Pocklington R., Quillam M.A., Sim P.G., Smith J.C., Subba Rao D.V., Todd E.C.D., Walker J.A., 1989. *Pennate diatomea Nitzschia pungens as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish*

- from eastern Prince Edward Island, Canada. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46: 1203-1215.*
- Wright J.L.C., Boyd R.K., DeFreitas A.S.W., Falk M., Foxall R.A., Jamieson W.D., Laycock M.V., McCulloch A.W., McInnes A.G., Odense P., Pathak V.P., Quilliam M.A., Ragan M.A., Sim P.G., Thibault P., Walter J.A., Gilgan M., Richard D.J.A., Dwar D., 1989. *Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. Can J Chem. 67: 481-490*
- Yasumoto T., Oshima Y., M. Yamaguchi, 1987. *Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Thoku District. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 44: 1249-1255.*
- Yasumoto T., Oshima Y., Sugarawa W., Fukuyo Y., Oguri H., Igarashi T. and Fujita N., 1980. *Identification of Dinophysis fortii as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 46: 1405-1411.*
- Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Sano M., Matsumoto GK, Clardy J., 1985. *Diarrhetic shellfish toxins. Tetrahedron. 41: 1019-1095.*
- Zhou AH, Komiyana M., K. Terao, Shimada Y., 1994. *Effect of pectenotoxin on-1 cells in vitro. Nat. Toxins. 2: 345-378.*

5.1 LINK UTILI

<http://www.arpat.toscana.it>

<http://www.cefas.co.uk>

<http://www.centroricerchemarine.it/home.php?Lang=it>

<http://www.efsa.europa.eu>

<http://eur-lex.europa.eu/it/index.htm>

<http://www.fao.org>

<http://www.fda.gov>

<http://www.iss.it>

http://www.izslt.it/izs/modules/sections/sito/IZS/centri_referenza/crep/crep_home.htm

<http://www.politicheagricole.it>

<http://seagrant.uaf.edu/>

<http://www.who.int/en/>

<http://195.45.99.79/csra/>

<http://195.45.99.81/izs>

RINGRAZIAMENTI

Per la stesura della presente Tesi voglio ringraziare in primo luogo il Prof. Marco Nuti e la Dott.ssa Monica Agnolucci; allo stesso modo ringrazio per la collaborazione il Prof. Paolo Berni, la Dott.ssa Francesca Susini, la Dott.ssa Laura Gasperetti e tutto il personale del Laboratorio di Acquacoltura ed Ittiopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Pisa, con particolare menzione alla Dott.ssa Chiara Geppini. A tal proposito un ringraziamento particolare e dovuto va al Dott. Riccardo Forletta per avermi accolto durante il periodo di tirocinio svolto all'IZS.

Arrivato a questo punto, alla fine del mio percorso universitario voglio ringraziare indistintamente tutte le persone che mi hanno accompagnato e sostenuto fino a questo traguardo importante; quindi, grazie soprattutto alla mia famiglia, babbo Maurizio, mamma Giulia e Raffaele per tutto l'amore che mi avete saputo dare. Ma con altrettanto calore, ringrazio la persona che amo e che più di tutte mi è rimasta vicina in questi anni, con la sua pazienza e il suo amore: grazie, Giusy. Proseguo nel ringraziare Stefano e Marc per la profonda amicizia con cui ci siamo legati e grazie alla quale ho potuto superare spesso momenti difficili. Ma l'Università mi ha lasciato anche nuove e preziose amicizie che hanno accompagnato il mio percorso, aiutandomi ad affrontarlo con dedizione e spesso con il sorriso; quindi grazie soprattutto a Marco, ma anche ad Erica, Sara, Giuseppe, Saverio, Sara, Liuba e tutti gli amici di Azione Universitaria ossia Antonio, Beppe, Giuseppe, Luca, Sara, Silvia, Valentina, Vera e Vincenzo. Un grazie sincero e dovuto va a tutti gli amici di sempre, a quelli di vecchia data e a quelli con cui ho potuto legarmi solo di recente; grazie, Andrea, Angelo, Carlo, Chiara, Elena, Filippo, Fulvio, Giacomo, Giusi, Laila, Loris, Luca, Massimo, Mattia, Sonia, Thomas e Valentina. A queste persone speciali, aggiungo un ringraziamento altrettanto speciale rivolto ad Antonio, Filomena e Vincenzo per tutto l'affetto che mi stanno dimostrando. Un ringraziamento particolare va ad Alessandra e Francesco per il rapporto che si è instaurato e per la possibilità che mi è stata data di inserirmi nel mondo del lavoro ancora prima di portare a compimento i miei studi. Grazie anche a Nonno Cirano, per la stima sincera che ripone nei miei confronti e nelle mie possibilità.

Rinnovo il ringraziamento a tutte le persone menzionate, con l'augurio e la speranza che l'affetto, l'amicizia e la stima che ci legano, possano accompagnarci per sempre.

Alessio