

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Workshop di aggiornamento
su problematiche emergenti
nel settore dei prodotti ittici**

**Istituto Superiore di Sanità
Roma, 24-25 maggio 2004**

Atti a cura di
Beatrice Pasolini, Eva Alessi e Dario De Medici
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
05/24

Istituto Superiore di Sanità

Workshop di aggiornamento su problematiche emergenti nel settore dei prodotti ittici. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 24-25 maggio 2004.

Atti cura di Beatrice Pasolini, Eva Alessi e Dario De Medici
2005, iii, 104 p. Rapporti ISTISAN 05/24

I prodotti della pesca rappresentano una categoria di alimenti molto ampia il cui consumo è in continua crescita, specialmente per quelli provenienti da allevamenti. Tali prodotti possono costituire un serio problema per la salute pubblica in quanto possono veicolare microrganismi patogeni o contaminanti chimici presenti nell'ambiente in cui vivono. Tale rapporto intende fornire, in particolare agli operatori del Servizio Sanitario Nazionale, informazioni sulle normative nazionali e comunitarie del settore, nonché le più recenti conoscenze riguardo il significato della presenza di infezioni parassitarie, contaminanti microbiologici (batteri patogeni, virus enterici) e chimici (metalli pesanti e antibiotici) e le strategie per il controllo delle patologie da questi trasmesse. Viene, inoltre, proposta una panoramica di metodi d'analisi sia classici che innovativi sviluppati dal Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e i Rischi Alimentari dell'Istituto Superiore di Sanità, per la determinazione di patogeni emergenti dei prodotti della pesca con particolare riguardo ai virus enterici e ai vibrioni patogeni.

Parole chiave: Prodotti ittici, Contaminazioni microbiologiche, Contaminazioni parassitarie, Contaminazioni chimiche, Patologie trasmesse

Istituto Superiore di Sanità

Workshop on new hygienic aspects in seafood. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 24-25 May 2004.

Proceedings edited by Beatrice Pasolini, Eva Alessi and Dario De Medici
2005, iii, 104 p. Rapporti ISTISAN 05/24 (in Italian)

Seafood represents a food category whose consumption is in continuous increase, especially for those coming from fish farming activities. Aquaculture and farmed fish products represent a global concern to consumer safety for the contamination of products by chemical and biological agents present in the environment in which they live. Such workshop means to supply, in particular for the personnel operating in the Italian National Health Service, information on the national laws and European directives, on new aspects of microbiological agents (pathogenic bacteria, enteric viruses), parasitic infections and chemical contamination (antibiotic and heavy metals) and on the control strategies of transmitted pathologies. An overview of classical and innovative analysis methods developed by the National Centre for the Food Quality and Risk Assessment of the Istituto Superiore di Sanità (Italian National Institute of Health) is, moreover, proposed, for the determination of emerging pathogens of seafood particularly concerning enteric viruses and pathogenic *Vibrio*.

Key words: Seafood, Microbiological agents, Parasitic infections, Chemical contaminations, Transmitted pathologies

Per informazioni su questo documento scrivere a: dario.demedici@iss.it; pasolini@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2005

INDICE

Premessa	iii
Rischi igienico-sanitari connessi al consumo dei prodotti della pesca <i>Laura Toti</i>	1
Iniziative comunitarie per la prevenzione delle contaminazioni microbiologiche dei molluschi <i>Luciana Croci</i>	8
Consumi dei prodotti della pesca in Italia <i>Aida Turrini, Colomba Sermoneta</i>	17
Antibiotico-resistenza in prodotti di acquacoltura <i>Anna Maria Ferrini</i>	26
Qualità dell'ambiente marino e acquacoltura intensiva <i>Eva Alessi, Daniela Mattei, Luciana Migliore</i>	31
Zoonosi parassitarie trasmesse da prodotti ittici <i>Edoardo Pozio</i>	38
Ruolo dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale nel controllo dei virus enterici nei molluschi <i>Marina Nadia Losio, Enrico Pavoni</i>	47
Piombo, cadmio, arsenico e mercurio negli alimenti di origine ittica: livelli di presenza e stima delle assunzioni in Italia e nell'Unione Europea <i>Giuseppe Baldini, Fabrizio Novelli, Massimo Baldini</i>	53
Virus trasmessi dai prodotti ittici <i>Dario De Medici, Mara Paniconi</i>	65
Determinazione di Norovirus in molluschi eduli lamellibranchi <i>Elisabetta Suffredini, Bruna Auricchio</i>	73
Applicazione della <i>Real Time PCR</i> per il rilevamento del virus dell'epatite A <i>Simona Di Pasquale, Elisabetta Delibato</i>	82
Vibroni patogeni veicolati dai prodotti della pesca <i>Loredana Cozzi, Gianni Ciccaglioni</i>	90
Ruolo dei microrganismi indicatori e processi di depurazione <i>Eva Alessi, Luciana Croci</i>	97

PREMESSA

I prodotti della pesca rappresentano, dopo i prodotti carnei, una fonte proteica di rilievo nella dieta umana, e rappresentano una importante percentuale, in rapido incremento, del commercio internazionale di alimenti. Negli ultimi anni, infatti, si è avuto un notevole sviluppo della produzione di questi prodotti dovuto all'aumento delle richieste che hanno portato ad un incremento delle importazioni e ad un notevole sviluppo delle tecniche di acqua-coltura.

È importante tener presente che la gran parte dei prodotti della pesca proviene da Paesi in via di sviluppo con elevate incidenze di malattie gastroenteriche e da zone di pesca, ad eccezione per i molluschi, non ben definite.

Questi prodotti, che dopo la cattura devono necessariamente trascorrere un periodo di tempo su grandi e piccole imbarcazioni, sono spesso conservati in condizioni non ottimali che possono avere un effetto sicuramente negativo per un prodotto delicato e facilmente degradabile. La consapevolezza, che questa categoria di prodotti continua ad acquisire un peso crescente nel tempo con ovvi riflessi sulla qualità e sicurezza d'uso della dieta, ha spinto il Centro Nazionale per la qualità degli alimenti e i Rischi alimentari ad organizzare un corso in grado di affrontare le più importanti tematiche sanitarie in questo campo.

Accanto ad una ampia panoramica sulle normative comunitarie del settore, sono state analizzate le diverse problematiche emergenti in campo microbiologico, chimico e parassitologico. Inoltre, sono stati proposti metodi di analisi innovativi, sviluppati nei laboratori del Centro Nazionale per la Qualità e i Rischi Alimentari, per la determinazione di virus enterici e vibriani patogeni. In questo rapporto sono riportate le più significative relazioni presentate durante il workshop di aggiornamento.

RISCHI IGIENICO-SANITARI CONNESSI AL CONSUMO DEI PRODOTTI DELLA PESCA

Laura Toti

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il pesce e i molluschi rappresentano la seconda fonte di proteine per l'uomo dopo i prodotti carnei; in alcuni Paesi, come il Giappone, essi costituiscono la prima risorsa di proteine.

I prodotti della pesca rappresentano una categoria di alimenti molto ampia che include alimenti preparati sia con metodi tradizionali sia secondo moderne tecnologie. Negli ultimi venti anni sono stati fatti grandi progressi nelle modalità di produzione dei pesci e molluschi che hanno visto una grande espansione dell'acquacoltura; ciononostante la domanda di questo tipologia di prodotti, a livello mondiale è in continua crescita e si prevede che presto sarà maggiore di quanto il mercato possa offrire. Contemporaneamente, a causa dell'aumento del prelievo incontrollato, la disponibilità di molte specie sta via via diminuendo con conseguente aumento dei prezzi. Tale fenomeno, a sua volta, stimola il commercio a livello internazionale e incoraggia ulteriormente le innovazioni in acquacoltura.

È importante tener presente che la gran parte del pesce oggetto di commercio a livello internazionale proviene dai Paesi non industrializzati che, nella maggior parte dei casi, non hanno sistemi di controllo degli alimenti ben sviluppati e spesso hanno un'elevata incidenza di malattie gastroenteriche. A questo bisogna aggiungere che in tali Paesi ma spesso anche in quelli industrializzati, i prodotti della pesca destinati sia al mercato interno che a quello internazionale, vengono prelevati in zone marine non ben definite e trasportati in condizioni igieniche non idonee e a temperature non adeguate. Tutto ciò può influire in modo significativo sulla qualità igienica di un prodotto che di per sé è già molto delicato e facilmente deperibile.

Con il termine generico di prodotti ittici si intendono raggruppare pesci, molluschi e crostacei che invece, dal punto di vista zoologico, costituiscono categorie di organismi profondamente diversi quanto a caratteristiche fisiologiche, alimentazione e ambiente di vita.

Ai fini della valutazione degli aspetti microbiologici i prodotti della pesca possono anche essere suddivisi in base al loro ambiente di origine: acque dolci o acque salate, acque costiere rispetto al mare aperto, acque calde tropicali rispetto ad acque fredde che rappresentano realtà diverse per quanto riguarda le caratteristiche microbiologiche e quindi i possibili rischi per la salute. Ancora a parte va considerata l'acquacoltura, che, pur essendo una tecnologia che ha radici antiche, si è andata affermando solo recentemente come fonte significativa di pesci e molluschi anche per il commercio internazionale. Le peculiari caratteristiche associate a questo tipo di allevamento fanno sì che il prodotto che ne deriva debba essere considerato separatamente dallo stesso proveniente dall'ambiente naturale.

Dal punto di vista nutrizionale il tessuto muscolare degli animali acquatici, analogamente alle carni, ha un elevato contenuto in proteine e un basso contenuto in carboidrati. La composizione del pesce può subire delle variazioni anche notevoli a seconda della stagione e del ciclo riproduttivo. In genere il contenuto di acqua e lipidi varia in modo inverso: tali variazioni naturalmente influenzano oltre alla consistenza e il gusto, anche l'evoluzione microbiologica.

La cottura causa una significativa riduzione del contenuto in acqua con conseguente aumento relativo degli altri macronutrienti. I molluschi, rispetto agli altri prodotti ittici, hanno un contenuto significativo in carboidrati.

La carne dei pesci costituisce un ottimo substrato per la crescita della maggior parte dei batteri eterotrofi e il basso contenuto in carboidrati limita l'abbassamento del pH associato alla produzione di acido lattico che si produce durante il rigor mortis. Pesci come tonno e halibut raggiungono valori di pH intorno a 5,4 mentre il pH del merluzzo non scende al di sotto di 6-7.

I molluschi invece, che contengono il 2-5% di glicogeno, raggiungono valori di pH molto più bassi a causa della degradazione degli zuccheri da parte degli enzimi contenuti nei tessuti.

Dal punto di vista microbiologico riveste particolare importanza la presenza, nei tessuti muscolari, di composti contenenti azoto libero non proteico che sono subito disponibili per la proliferazione batterica *post mortem*. L'ossido di trimetilamina, presente nei pesci, viene ridotto a trimetilamina dalla flora microbica del deterioramento con produzione del caratteristico "odore di pesce"

Negli elasmobranchi, gli alti livelli di urea vengono metabolizzati ad ammoniaca. La composizione in aminoacidi liberi della carne di pesce può influenzare l'andamento del deterioramento e assumere importanza dal punto di vista sanitario per la formazione di amine biogene.

Microflora iniziale

Il tipo di popolazione microbica associata con i prodotti ittici vivi riflette la microflora dell'ambiente nel quale il pesce è stato catturato o allevato ma è subito modificata dalla abilità dei diversi microrganismi, per la maggior parte batteri, a moltiplicarsi nell'ambiente fornito dalla superficie esterna, pelle o conchiglia a seconda del tipo di organismo, dalle branchie e dal canale alimentare. Ad esempio, i molluschi che crescono vicino agli insediamenti umani tenderanno ad avere cariche batteriche più elevate e qualitativamente diverse rispetto a quelli che si trovano in aree isolate. Come si verifica in tutti gli animali, anche i tessuti muscolari e gli organi interni dei prodotti ittici sono normalmente sterili e i batteri sono localizzati sulla pelle, sui gusci di chitina sulle branchie e nel tratto intestinale. In particolare, è stato rilevato che alcuni tipi di crostacei possono veicolare attraverso il loro sistema circolatorio che è "aperto" significativi livelli di microrganismi, soprattutto appartenenti al genere *Vibrio*.

Come è stato accennato in precedenza, i livelli di carica microbica variano a seconda delle condizioni e della temperatura dell'acqua: pesci e crostacei provenienti da acque più fredde, la cui temperatura si aggira intorno ai 10-15 °C, generalmente forniscono conte di 10^2 - 10^4 CFU/g sulla superficie della pelle e delle branchie, mentre animali provenienti da acque calde hanno livelli di 10^3 - 10^6 CFU/g. Le conte del contenuto intestinale variano invece in rapporto alla alimentazione passando da 10^2 CFU/g nel pesce non alimentato a 10^8 CFU/g nelle specie che si alimentano attivamente. Le conte riscontrate nei molluschi risentono maggiormente della temperatura dell'acqua passando da meno di 10^3 CFU/g nelle acque fredde non contaminate a più di 10^6 nelle acque calde e contaminate.

Flora saprofitaria

Come è stato già accennato, il fattore più importante che condiziona i cambiamenti della microflora è sicuramente la temperatura: Tipicamente le popolazioni batteriche di pesci e molluschi provenienti da acque temperate sono prevalentemente psicrofile in funzione della temperatura dell'acqua che è di solito inferiore a 10 °C. I prodotti ittici provenienti dalle acque tropicali, al contrario, mostrano livelli più alti di batteri mesofili per cui è molto importante che,

dopo la cattura e la morte i pesci vengano conservati sotto ghiaccio o comunque a basse temperature in modo da allungare la “shelf-life” del prodotto.

Diversamente da quello che comunemente si pensa la microflora dei prodotti ittici non è prevalentemente alofila: nella maggior parte dei casi, infatti non si tratta di alofili obbligati ma di alotolleranti capaci di crescere in un ampio spettro di concentrazioni saline e con un optimum intorno al 2-3%. L'uso del ghiaccio nella conservazione del pesce comporta un abbassamento della concentrazione salina che favorisce la sopravvivenza e la crescita delle specie alotolleranti. In linea di massima si può dire che nelle specie di origine marina sono dominanti le specie appartenenti al genere *Vibrio*, alotolleranti mentre in quelle di acqua dolce prevalgono le *Aeromonas*.

I batteri che vivono sulla superficie degli organismi marini sfruttano come substrato di crescita gli aminoacidi, i peptidi e altre fonti diverse dai carboidrati; l'utilizzazione di queste sostanze porta alla produzione di condizioni leggermente alcaline del substrato.

La flora microbica che si trova sulla pelle e sulle branchie è tipicamente aerobia o aerobia facoltativa come nel caso del genere *Vibrio*. Batteri strettamente anaerobi si possono trovare solo nell'intestino. Da un punto di vista qualitativo prevale la flora gram positiva nelle acque fredde e quella gram negativa nelle acque più calde. I generi maggiormente rappresentati sono *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Micrococcus* e *Corynebacterium*. Il pesce proveniente da acqua dolce presenta una flora analoga tranne che il *Vibrio* è sostituito da *Aeromonas*.

La microflora dei molluschi è anch'essa simile alle precedenti con una netta prevalenza del genere *Vibrio*. Poiché, come è noto, i molluschi risentono grandemente dell'influenza dell'ambiente la loro microflora è influenzata da microrganismi di provenienza terrestre quali Enterobacteriaceae e Streptococcaceae.

Microrganismi patogeni e tossigeni

Batteri

Molti sono i microrganismi patogeni che possono essere associati al consumo di prodotti ittici: essi possono derivare dall'ambiente ed essere presenti già nell'animale vivo, o essere veicolati dalla contaminazione delle acque o ancora da una contaminazione *post mortem* dovuta alla manipolazione e trattamenti successivi.

I soli batteri che sono sicuramente patogeni per l'uomo e costituenti naturali della microflora dell'ambiente e degli animali marini sono il *Clostridium botulinum* e le vibrionacee. Tutte le altre specie patogene provengono dalla contaminazione umana delle acque che assume particolare rilievo nel caso dei molluschi lamelibranchi che si nutrono filtrando grandi volumi di acqua.

Il *Clostridium botulinum* deriva prevalentemente dai sedimenti e i sierotipi E e i ceppi non proteolitici di tipo B ed F possono essere isolati dall'intestino e, più raramente, dalla pelle dei pesci. Il botulino può costituire un patogeno per i pesci stessi quando questi si cibano dei resti di pesci morti. Specialmente le condizioni di acquacoltura possono aumentare notevolmente l'incidenza di *C. botulinum* del quale sono state descritte epidemie in allevamenti di trote e salmoni.

Microrganismi mesofili appartenenti al genere *Vibrio* sono stati isolati da vari tipi di pesce, sia di fondo che di superficie: tra le specie potenzialmente patogene il più diffuso sia tra i pesci che tra i molluschi è sicuramente il *Vibrio parahaemolyticus*. Il livello di vibrioni mesofili presenti negli organismi marini è influenzato principalmente dalla temperatura dell'acqua; essi

infatti si moltiplicano rapidamente a temperature tra i 20 e i 40 °C per cui viene ritrovato anche in numero elevato nei molluschi allevati in acque la cui temperatura si aggira attorno ai 30 °C mentre risulta per lo più assente in quelli allevati in acque fredde. Gli studi finora condotti hanno dimostrato che non esiste una reale correlazione tra la presenza di vibrioni e quella dei microrganismi indicatori di contaminazione fecale ma che la presenza di *Vibrio* è maggiormente influenzata da fattori ambientali quali, oltre la temperatura, la salinità, la profondità e anche l'ora del giorno. I dati epidemiologici evidenziano che nei Paesi occidentali le malattie causate da vibrioni patogeni sono, per la maggior parte ascrivibili al consumo di molluschi e crostacei mentre in Giappone e in altri Paesi asiatici il più comune veicolo di infezione è costituito dal pesce. Oltre al *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus* la cui patogenicità è ormai accertata e riconosciuta, anche altre specie, occasionalmente, sono state causa di gastroenteriti o di infezione delle ferite.

Altri batteri, come l'*Aeromonas* e *Plesiomonas*, sono stati responsabili di infezioni occasionali e possono rappresentare un rischio per le persone immunosopresse.

Clostridium perfringens, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *Shigella* e *Salmonella* sono stati isolati da pesci e molluschi provenienti da acque contaminate da scarichi umani.

Virus

I virus che hanno rilievo per la salute pubblica: epatite A, calicivirus e Norovirus vengono isolati, nell'ambito dei prodotti ittici, soprattutto dai molluschi che, filtrando, trattengono e concentrano le particelle virali. Le malattie virali trasmesse dai molluschi hanno sempre avuto e hanno un grosso impatto sulla salute pubblica: basti pensare all'epatite A, di cui i molluschi rappresentano i principali vettori dopo l'acqua e ai Norovirus che, a livello internazionale, rappresentano la causa più frequente di malattia trasmessa dai molluschi.

Parassiti

Pesci e crostacei albergano facilmente elminti parassiti ma fortunatamente pochi di essi sono in grado di infettare l'uomo. Perché avvenga l'infezione, infatti, il pesce deve essere consumato crudo o, comunque, insufficientemente cotto. Uno dei parassiti più frequenti è sicuramente l'*Anisakis* che è stato isolato, in Giappone, nel 10% dei campioni di sushi preparato con salmone o maccarello.

In un altro studio questo nematode è stato isolato nel 40% dei campioni di salmone ad un livello di 2-3 larve ogni 200 g di pesce. Le larve di *Anisakis* possono essere presenti in una grande varietà di pesci; le larve sono resistenti ai normali processi di marinatura cui viene sottoposto il pesce ma possono essere inattivate o attraverso il congelamento da -17 a -20 °C per 24 ore o con la cottura.

Biotossine marine

Negli ultimi anni le biotossine marine sono state responsabili di più del 60% delle malattie causate dai prodotti ittici negli USA, associate, nella maggior parte dei casi, al consumo di pesce.

Come è noto, le principali intossicazioni, associate al consumo di prodotti ittici, aventi un'origine microbiologica sono: *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP), *Diarrhetic Shellfish*

Poisoning (DSP), *Neurotoxic Shellfish Poisoning* (NSP), *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP), *ciguatera* e *sgombroic fish poisoning* (amine biogene). Le due intossicazioni più frequenti a livello internazionale, sono la ciguatera e le amine biogene. Le intossicazioni da PSP, DSP, NSP e ASP sono prodotte dal consumo di molluschi bivalvi che si sono nutriti di alghe tossigene e hanno accumulato la tossina nel loro organismo. Anche i pesci che si cibano di plancton possono ingerire una grande quantità di alghe, particolarmente quelle associate alla PSP e DSP; se tali pesci vengono consumati interi, senza la rimozione degli organi interni, possono diventare pericolosi e sono stati descritti numerosi casi di morte, soprattutto nelle Filippine.

Le tossine algali includono molecole che hanno struttura molto diversa tra di loro e vengono prodotte da alghe tipicamente associate con aree geografiche ben definite ove si verificano i bloom algali. I dati epidemiologici degli ultimi anni mostrano comunque una notevole estensione di tali aree dovuta agli scambi internazionali e ai cambiamenti climatici.

È importante tener presente che tutte le biotossine algali sono resistenti al calore e non vengono distrutte con la cottura degli alimenti, non causano variazioni delle caratteristiche organolettiche e non vengono messe in evidenza dalle comuni analisi microbiologiche. Nonostante negli ultimi anni si sia assistito ad un progressivo affinamento dei metodi per la ricerca diretta delle tossine algali, la maggior parte della sorveglianza si basa sulla identificazione del fitoplancton tossico mediante osservazione microscopica delle caratteristiche morfologiche. In caso di positività si procede alla ricerca delle tossine negli organismi indicatori, per lo più molluschi.

Nel panorama delle tossine prodotte da microrganismi, un cenno a parte merita la intossicazione da “pesce palla” che è causata dalla presenza di tetradotossina nelle specie ittiche appartenenti agli *Spherooides*: si tratta di un problema sanitario molto rilevante in Giappone dove questo tipo di pesce è considerato una prelibatezza. La tetradotossina, considerata finora una sostanza di origine endogena, può essere prodotta da comuni batteri marini, specialmente appartenenti al genere *Vibrio*. Nonostante questa ipotesi suggerita da alcuni autori, i dati ad ora disponibili sono insufficienti a confermare che la tetradotossina sia di origine microbiologica.

Cattura e processi primari

Il pesce può essere catturato mediante esche, reti, arpioni ecc. il più delle volte in acque che sono lontane dagli impianti di trattamento e trasformazione. Poiché la fase di cattura può durare diverse ore e le condizioni di lavoro sopra i pescherecci sono per lo più difficili, vi è scarso controllo degli animali al momento della morte. Ciò contrasta fortemente con quello che accade nelle industrie delle carni, sia rosse che avicole, dove gli animali vengono portati al macello in buone condizioni fisiologiche e vengono uccisi velocemente e con il minimo stress.

Dopo la pesca, il prodotto deve essere protetto dai processi di deterioramento durante il trasporto fino all'impianto di trasformazione. La durata di questo periodo è molto variabile e può andare dalle poche ore fino a 3 settimane. La conservazione viene di solito attuata mediante il ghiaccio in modo da mantenere la temperatura intorno ai -2 °C. Naturalmente negli ultimi anni ci sono stati molti progressi per quanto riguarda le attrezzature delle navi da pesca che sono in grado di mantenere temperature al di sotto dello zero che rallentano notevolmente i processi di deterioramento. Ci sono pareri molto controversi sulla pratica di eviscerare il pesce sulla barca o piuttosto dopo l'arrivo a terra. La prima pratica, che è molto utilizzata in Europa, almeno per quanto riguarda il pesce di grandi dimensioni, ha il vantaggio di rimuovere subito la stragrande maggioranza della flora microbica, ma le superfici di taglio espongono i tessuti all'attacco diretto dei batteri. Nel caso in cui i pesci non vengano subito eviscerati, come accade per lo più negli USA, i prodotti della proliferazione batterica a livello intestinale e il materiale

fecale possono provocare odori sgradevoli nonché processi digestivi a carico della parete intestinale. Probabilmente la scelta migliore da un punto di vista igienico è quella di eviscerare subito dopo la cattura e lavare accuratamente la carcassa.

I batteri che causano il deterioramento del pesce sono gli stessi che fanno parte della microflora saprofitaria: le specie più comunemente isolate sono *Shewanella* e *Pseudomonas* che predominano a basse temperature di stoccaggio mentre *Aeromonas*, *Vibrio* e coliformi predominano a temperature più elevate che vanno da 10 a 37 °C. La temperatura esercita quindi una pressione selettiva sulle popolazioni batteriche che si trovano sulla superficie del pesce: alle basse temperature i batteri mesofili smettono di crescere o muoiono lentamente mentre i ceppi psicrotrofi aumentano secondo la classica curva di crescita costituita da una lag fase, una fase logaritmica e una stazionaria. Il tempo necessario dipende ancora una volta dalla temperatura; in genere quando il pesce proviene da regioni temperate ed è mantenuto a 0 °C la lag fase dura da 1 a 5 giorni, quella esponenziale da 6 a 14.

Particolare importanza riveste il tempo che intercorre dal momento della cattura a quello della refrigerazione: esperienze appositamente condotte hanno dimostrato che una refrigerazione immediata porta allo stadio di deterioramento entro 15 giorni, mentre basta un ritardo della refrigerazione di circa 9 ore a 26 °C per anticipare il deterioramento a 5 giorni. Le esperienze raccolte hanno messo in evidenza che, nelle specie tropicali, la decomposizione procede molto rapidamente a temperature al di sopra dei 25 °C. È stato possibile notare anche che le specie dominanti sono *Alteromonas putrefaciens*, le aeromonadi, i vibrieni e ceppi di enterobatteri. Di particolare interesse è la identificazione di *Aeromonas hydrophila* tra gli organismi dominanti: tale germe infatti è un patogeno opportunista che si riproduce e causa deterioramento ed è anche produttore di istamina. Tale germe e le aeromonadi in genere sono in grado di moltiplicarsi anche a temperature più basse vicine a quelle della refrigerazione: esse probabilmente derivano dal ghiaccio o dall'acqua con cui il pesce viene lavato e diventano significativi quando il pesce è mantenuto al di sopra dei 5 °C.

Un ritardo nella refrigerazione del pesce ha un effetto notevole sui tempi di deterioramento. Tali ritardi si verificano soprattutto sui piccoli pescherecci nelle aree tropicali ove non sempre sono disponibili celle frigorifere e ghiaccio per la refrigerazione.

La microflora dominante all'inizio, costituita soprattutto da Pseudomonadacee, viene largamente sostituita da *Micrococcus* e Enterobatteriacee man mano si allunga l'attesa della refrigerazione. Il fenomeno sembra essere un po' più lento nel caso del pesce di acqua dolce.

Naturalmente, come per altri alimenti, il processo di deterioramento procede tanto più lentamente quanto più è basso il rapporto superficie volume per cui la velocità del deterioramento aumenta man mano si passa dal pesce intero a quello eviscerato ai filetti e bastoncini fino alla polpa macinata.

Istamina

L'intossicazione da pesci appartenenti alla famiglia degli sgombroidi a causa dell'accumulo di alti livelli di istamina è strettamente correlata a fenomeni di deterioramento. I pesci coinvolti appartengono a specie molto comuni quali tonno, maccarello, sardine, alici, ecc. Tali pesci sono molto ricchi di un aminoacido libero, l'istidina che viene trasformata in istamina dalla flora gram negativa. Quando la temperatura di conservazione è bassa, il livello di istamina formato rimane basso e comunque non tale da causare i sintomi dell'intossicazione, ma quando la temperatura supera i 15 °C i livelli di istamina prodotti superano i 100 mg per 100 g di prodotto e possono causare i sintomi. L'attuale legislazione (DL.vo 531 del 30 dicembre 1992) prevede che per un lotto di pesce debbano essere prelevati 9 campioni per i quali il tenore medio non

deve superare i 100 mg/100 g, due campioni possono avere valori tra 100 e 200 e nessuno deve comunque oltrepassare i 200 mg/100 g.

Tra i germi produttori di istamina alcuni, come le pseudomonadacee e i vibrioni, sono naturalmente presenti nel pesce mentre altri come *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* ed *Enterobacter aerogenes* sono invece aggiunti durante le operazioni di manipolazione

Raccomandazioni:

- Conoscenza delle aree di pesca e selezione di quelle meno contaminate, specialmente per quanto concerne le biotossine algali e i patogeni enterici.
- Raffreddamento immediato dopo la cattura in modo da portare rapidamente la temperatura al di sotto dei 5 °C.
- Mantenimento della catena del freddo a temperature < 2 °C.
- Adeguamento delle strutture al GMP (*Good Manufacturing Practise*).
- Prevenzione delle contaminazioni crociate durante le manipolazioni e le operazioni di eviscerazione e filettatura, specialmente se condotte nei mercati all'aperto.
- Utilizzazione di acqua e ghiaccio non contaminati.

Acquacoltura

Un cenno a parte merita l'acquacoltura i cui prodotti, come è già stato accennato, costituiscono una parte importante della produzione ittica (circa il 12% a livello mondiale). In questa produzione sono compresi sia pesci di largo consumo come il pesce gatto, il salmone e la trota sia gamberi e ostriche. Il pesce gatto viene allevato soprattutto nel sud-est degli Stati Uniti mentre il salmone nel nord Europa e sulle coste settentrionali de Pacifico. Gamberi dall'Asia e Sud America ma comunque questa tecnologia è destinata ad espandersi anche a causa della incipiente scarsità del prodotto naturale.

La microflora iniziale è abbastanza simile a quella del prodotto naturale, anche se può essere condizionata da alcuni fattori, tra questi la presenza di sostanze nutritive utilizzate per arricchire le acque e per nutrire gli animali, la densità dei pesi presenti, le modalità di processo e distribuzione del prodotto.

È stato osservato che le trote di allevamento presentano una maggiore incidenza di *Clostridium botulinum*, mentre patogeni enterici quali Salmonella e Shigella diventano comuni in allevamenti che ricevono acque di scarico. Il livello della contaminazione dipende da fattori chimico-fisici, dalla grandezza del pesce e anche dalla presenza di fonti di contaminazione quali anfibi e uccelli.

I ceppi di salmonella isolati dagli impianti di allevamento mostrano spesso resistenze multiple agli antibiotici.

Negli allevamenti di crostacei, come accennato in precedenza, prevalgono invece patogeni appartenenti al genere *Vibrio*.

Per quanto concerne i prodotti di acquacoltura, alle raccomandazioni prima elencate è necessario aggiungere quelle del controllo periodico dei mangimi utilizzati e dei campionamenti periodici delle acque e dei sedimenti.

INIZIATIVE COMUNITARIE PER LA PREVENZIONE DELLE CONTAMINAZIONI MICROBIOLOGICHE DEI MOLLUSCHI

Luciana Croci

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

I molluschi, tra cui si annoverano circa 20.000 specie, sono ampiamente distribuiti nel mondo e costituiscono per l'uomo un importante apporto nutrizionale, in quanto fonte di proteine di elevata qualità.

Sono per lo più costituiti da animali scavatori sessili o sedentari, che si nutrono di piccole particelle alimentari presenti nell'acqua o nei sedimenti, mediante un meccanismo di filtrazione pressoché ininterrotto. Durante questa intensa attività di filtrazione i molluschi trattengono nel loro organismo non solo il plancton necessario al loro metabolismo, ma anche batteri e virus eventualmente presenti nell'ambiente, che possono veicolare all'uomo, provocando una gran varietà di sindromi gastroenteriche di varia origine.

Per tale motivo sono considerati alimenti ad alto rischio e da diversi anni la loro commercializzazione è stata regolamentata da diverse normative, come l'attuale DL.vo 530/1992 (1) che ne stabilisce i requisiti igienico-microbiologici, basando il giudizio di idoneità al consumo solo sulla ricerca delle salmonella e dell'*E. coli*, come indice di contaminazione fecale. È comunque ormai ampiamente riconosciuto che tale microrganismo non è correlato né alla presenza di alcuni patogeni ambientali né a quella dei virus enterici.

È quindi comprensibile come nonostante tali misure legislative, che hanno senz'altro comportato una riduzione delle patologie classiche, quali colera, febbri tifoidee e salmonellosi, i molluschi non abbiano smesso di costituire un pericolo per la salute umana.

I dati epidemiologici a disposizione, che sono comunque sottostimati, poiché in molti casi il consumo di molluschi provoca solo sintomi gastrointestinali di lieve entità e quindi non richiedono l'intervento del medico, dimostrano che negli ultimi 25 anni è stato possibile riscontrare che i patogeni batterici associabili a contaminazione fecale delle acque (es. coliformi e salmonelle) sono stati responsabili solo del 4% delle epidemie associate ai molluschi, 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 (2). Nello stesso tempo anche i virus enterici hanno assunto un ruolo sempre crescente come responsabili di patologie trasmesse dai molluschi. Tra queste patologie le più frequenti sono le gastroenteriti e le epatiti, causate rispettivamente da Norovirus e virus dell'epatite A.

Iniziative comunitarie

Sulla base di tali considerazioni, nella Comunità Europea, per la salvaguardia della salute pubblica, si è sentita la necessità di una maggiore omogeneizzazione delle attività condotte nel settore dai singoli Stati Membri e di un più efficace sistema di monitoraggio, basato

sull'utilizzo di indicatori più efficaci dell'*E. coli* e di tecniche idonee per la ricerca dei virus enterici, al fine di stabilire standard batteriologici e virologici per i molluschi bivalvi.

Laboratori di Riferimento

Con la "Council Decision of 29 april 1999 on reference laboratories for monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluscs" (3) si invitavano tutti gli Stati Membri a designare un Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) responsabile del coordinamento per il controllo della contaminazione batteriologica e virale dei molluschi nel proprio Paese.

Nella stessa Decisione veniva individuato come Laboratorio Comunitario di Riferimento (LCR) il "Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science" (CEFAS) (Weymouth, United Kingdom).

Per l'Italia il Ministero della Salute con lettera 18 aprile 2002 prot. 600.9/60.31/605 ha nominato alla Commissione Europea DG Sanco il Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e i Rischi Alimentari (ex Laboratorio Alimenti) dell'Istituto Superiore di Sanità.

Compiti del Laboratorio Nazionale di Riferimento

Compiti dell'LNR sono:

- coordinare le attività dei Laboratori Periferici che effettuano i controlli virologici e batteriologici dei molluschi bivalvi;
- assistere le competenti autorità dello Stato Membro nell'organizzare un sistema di monitoraggio per le contaminazioni batteriche e virali dei molluschi bivalvi;
- organizzare saggi comparativi tra i vari Laboratori Periferici relativamente ai parametri microbiologici da controllare;
- disseminare le informazioni provenienti dall'LCR;
- collaborare con LCR.

Compiti del Laboratorio Comunitario di Riferimento

Compiti dell'LCR sono:

- fornire informazioni sui metodi e organizzare saggi comparativi con la partecipazione degli LNR;
- coordinare l'applicazione di tali metodi e la ricerca di nuovi sempre attraverso ring test con gli LNR;
- organizzare training e corsi avanzati per il personale degli LNR;
- collaborare con i Laboratori dei Paesi Terzi che lavorano in questo settore;
- fornire assistenza tecnica e scientifica alla CE (specialmente in caso di contestazione);
- aiutare gli LNR ad implementare in SAQ (Sistema di Assicurazione di Qualità).

Dal 2002 quindi è stato istituito un network, su base tecnico-scientifica, tra l'LCR e gli altri LNR, che si riunisce annualmente per discutere sulle diverse problematiche, esaminare i risultati delle attività svolte e promuovere iniziative su argomenti emergenti.

Dall'inizio a tutt'oggi sono state avviate diverse attività e programmati studi su argomenti di maggiore rilievo di seguito riportate.

Attività

Saggi comparativi

Vengono organizzati dall'LCR ogni anno:

- determinazione di *E. coli* e salmonelle nei molluschi, mediante metodica MPN (*Health Protection Agency - Food EQA scheme*);
- numerazione di batteriofagi (FRNA) in molluschi bivalvi (*Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, CEFAS*);
- determinazione del virus dell'epatite A (HAV), mediante *Reverse Transcriptase-nested-Polymerase Chain Reaction* (RT-nested-PCR), in molluschi bivalvi (CEFAS);
- determinazione di Norovirus, mediante *RT-booster-PCR*, in molluschi bivalvi (CEFAS);
- determinazione di vibrioni (*Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*) in molluschi bivalvi (*Health Protection Agency - Food EQA scheme*);
- classificazione e sorveglianza delle zone di allevamento dei molluschi.

È stato costituito un gruppo di esperti, che ha iniziato i lavori nel febbraio 2004, per l'elaborazione di linee guida per "Monitoring of bivalve mollusc harvesting areas" l'Italia partecipa con suo rappresentante.

Il documento sarà composto in linea di massima delle seguenti sezioni:

- Problematiche relative alla sorveglianza, inclusi gli effetti legati a fattori ambientali;
- Piani di campionamento, con considerazioni spaziali e temporali riferite alle diverse specie di molluschi;
- Metodi di campionamento e protocolli per il trasporto dei campioni;
- Metodi di analisi;
- Tolleranza di standard numerici e analitici;
- Interpretazione dei dati relativi ai programmi di monitoraggio.

Tutti gli Stati Membri sono invitati a fornire indicazioni sulle strategie messe in atto nei vari Paesi e i dati ottenuti in modo da supportare il lavoro del gruppo.

Argomenti in discussione a livello comunitario

Organismi indicatori: *E. coli* e batteriofagi

È emersa la necessità di una maggiore omogeneità tra gli Stati Membri relativamente ai metodi utilizzati per la ricerca dell'*E. coli*. A tale scopo la proposta dell'LCR di utilizzare come metodo MPN di Donovan (1998) (4) per la ricerca dell'*E. coli*, come metodo di riferimento è stata considerata idonea dagli LNR, previa però sottomissione e accettazione da parte della Commissione ISO/CEN. Tale metodo presenta il vantaggio di ridurre i tempi di analisi, in quanto nella prima fase di arricchimento si basa sull'utilizzo del Brodo al glutammato modificato (MMGB) e sul rilevamento, dopo 24 ore di incubazione, della sola produzione di acido (viraggio del terreno) e non di gas, caratteristica che generalmente si evidenzia più tardi. Per la conferma viene impiegato un terreno cromogenico (BGIG agar), che contiene un indicatore per l'evidenziazione della attività β -glucuronidasica (colonie blu-verdi).

Al momento attuale è allo studio la sua applicazione a diverse matrici alimentari con relativa validazione, come richiesto per tutti i metodi ISO.

Tutti i Laboratori partecipanti al gruppo si sono trovati d'accordo nel proporre l'*E. coli* come unico indicatore di contaminazione fecale, contrariamente a quanto prevede l'attuale legislazione che prende in considerazione l'*E. coli* e i coliformi fecali.

È stato anche affrontato il problema dell'inadeguatezza dell'utilizzo dell'*E. coli* come indice di contaminazione virale dei molluschi, al posto di questo è stata suggerita, da parte dei ricercatori inglesi, l'adozione dei batteriofagi (F-specifico RNA). Tale proposta era basata su studi condotti su ostriche prelevate da diverse (49) situate in Inghilterra e nel Galles, che mensilmente, per una durata di 18 mesi, erano sottoposte alla ricerca parallela di *E. coli*, batteriofagi e Norovirus (5). I risultati di tale indagine avevano evidenziato una ampia distribuzione di questi microrganismi nelle aree studiate e in quantità medie tre volte più elevate di quelle dell'*E. coli*, e nonostante una evidente stagionalità, essendo il scarsamente presenti nei mesi estivi, mostravano una significativa correlazione con gli episodi di gastroenteriti connesse al consumo di molluschi provocate da Norovirus, che nei mesi invernali si verificavano con una più alta incidenza. Inoltre il comportamento di questi microrganismi durante i processi di depurazione sembra essere più simile a quello dei virus enterici, essendo rilasciati più lentamente dell'*E. coli* dai molluschi bivalvi. Sulla base di queste evidenze era stato ipotizzato un più efficace ruolo dei batteriofagi nell'indicare un probabile rischio virologico, sia a livello di contaminazione primaria che come indicatori di processo.

Per verificare l'idoneità di tale ruolo nell'ambito di un progetto finalizzato dalla DG Sanco "Human pathogens associated with bivalve molluscan shellfish", conclusosi nel dicembre 2003, è stata prevista un'area di studio "Impact and effectiveness of microbiological criteria for FRNA bacteriophage on commercial depuration", in cui sono stati coinvolti oltre ai ricercatori del CEFAS, l'Università di Santiago di Compostela e l'Istituto Superiore di Sanità. Le indagini svolte da giugno a dicembre avevano come obiettivo un monitoraggio su molluschi prelevati da tre aree diverse di allevamento, scelte tra quelle classificate B in ciascuno Stato partecipante, e sottoposti a processi di depurazione nelle normali condizioni utilizzate per la commercializzazione in tre diversi Centri di depurazione, che possibilmente utilizzano diversi sistemi di disinfezione delle acque. I risultati hanno confermato la suscettibilità dei batteriofagi alle alte temperature (nel periodo estivo non sono stati rilevati in numero quantificabile) e un più lento rilascio da parte dei molluschi, che rende il loro comportamento più simile a quello dei virus enterici rispetto all'*E. coli*, sebbene in alcuni casi il rilevamento di un maggiore numero di tali microrganismi in campioni dopo depurazione fa presumere una loro non omogenea distribuzione che potrebbe compromettere una valutazione sull'efficacia dei processi di depurazione.

Virus enterici

La trasmissione di virus enterici mediante il consumo di molluschi bivalvi è un problema emergente (6) su cui da anni diversi gruppi di ricercatori stanno lavorando. Questi possono essere classificati in tre grandi gruppi:

- Virus che causano gastroenteriti;
- Virus dell'epatite entericamente trasmessa;
- Virus che si replicano nell'intestino umano, ma che causano malattia dopo essere migrati in altri organi, come il sistema nervoso centrale o il fegato.

Alcuni di questi virus sono poco (HAV) o non affatto coltivabili su colture cellulari (NV), quindi come è noto i metodi di determinazione attualmente disponibili si basano sulla determinazione del genoma mediante RT-PCR.

A seconda del tipo di virus e delle esigenze del Paese, le esperienze dei ricercatori variano e le metodologie utilizzate si discostano notevolmente, sia per quanto riguarda le modalità di estrazione e purificazione dell'RNA, le condizioni di amplificazione e i *primer* usati.

In risposta quindi alla necessità sia di una maggiore omogeneizzazione che di disporre di un metodo di riferimento, a livello CEN è stato istituito un gruppo di esperti (TAG 4-Detection

viruses of food) coordinato da David Lee, il cui compito sarà quello di proporre una procedura per la determinazione di virus enterici negli alimenti, dopo aver valutato i protocolli utilizzati da vari gruppi. Il lavoro dovrebbe concludersi in un tempo massimo di 21 mesi.

Vibrioni

I vibrioni patogeni o potenzialmente patogeni sono tra i problemi emergenti all'attenzione della Comunità Europea, che nel 2001 ha nominato una commissione di esperti "Scientific committee on veterinary measures relating to public health" con il compito di stilare un documento relativo alla valutazione del rischio di due microrganismi *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*, segnalati in più occasioni come responsabili di patologie per l'uomo.

Dal documento "Working document on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*" risultava che i dati a disposizione non erano sufficienti allo scopo richiesto, che le patologie causate dal consumo di prodotti della pesca in Europa imputabili ai due microrganismi erano apparentemente rare, ma che un aumento poteva essere previsto dato l'intensificarsi degli scambi internazionali, soprattutto a causa dei prodotti provenienti dall'oriente.

Oltre relativamente alla loro presenza veniva inoltre sottolineata non solo la mancanza di correlazione con i coliformi fecali o altri indicatori, ma che neanche la quantità di vibrioni non-patogeni poteva essere correlato alla presenza di vibrioni patogeni, per tale motivo la conta totale non poteva essere utilizzata come modalità di controllo.

In particolare per quanto riguarda il *Vibrio parahaemolyticus* veniva riportato che la maggior parte dei ceppi isolati dall'ambiente o dagli alimenti, non contenevano i geni codificanti la emolisina TDH (*Thermostable Direct Hemolysin*) o TRH (*TDH-Related Hemolysin*), responsabili della patogenicità.

Infine veniva evidenziato che i metodi utilizzati dai diversi ricercatori per la determinazione sia del *Vibrio parahaemolyticus* che del *Vibrio vulnificus* mostravano diversa sensibilità, tanto da rendere difficile una comparazione dei risultati.

Da quanto sopra emergevano le seguenti necessità:

- avere informazioni sull'incidenza di tali microrganismi;
- armonizzare e standardizzare le tecniche di determinazione, enumerazione e caratterizzazione della patogenicità, per facilitare la comparazione dei dati;
- ottimizzare le tecniche di caratterizzazione della virulenza;
- eliminare la pratica di rigettare partite solo sulla presenza o sul numero (in alcuni Paesi) di *Vibrio parahaemolyticus* senza considerare i fattori di virulenza (TDH e TRH).

Al fine di assolvere a tali necessità nell'ambito della predisposizione a livello comunitario di programmi coordinati di controllo dei prodotti alimentari, il cui fine è quello di acquisire informazioni ed esperienze sulle quali basare le attività future di controllo e la legislazione pertinente la Comunità europea ha emanato la Raccomandazione della Commissione della Comunità Europea del 10 gennaio 2003 relativa ad un programma coordinato di controlli ufficiali dei prodotti alimentari per il 2003 (7).

In ottemperanza ad essa gli Stati Membri dovevano procedere ad ispezioni, controlli e prelievo di campioni allo scopo di, nel caso specifico, valutare la qualità batteriologica di determinati prodotti della pesca (crostacei e molluschi precotti). L'obiettivo di tale programma era di raccogliere informazioni sulla prevalenza dei microrganismi patogeni e indicatori in tali prodotti e in particolare sulla presenza di *Vibrio parahaemolyticus*, da utilizzare per fissare parametri nel documento comunitario ancora in corso di definizione sui criteri microbiologici degli alimenti (Working document SANCO/4198/2001 Rev.9 (PLSPV/2002/3665/3665R5-EN.doc) Commission Regulation on microbiological criteria for foodstuffs. Commission of the European Communities, Draft 15.1.2004).

Per la ricerca di tale microrganismo viene proposta dalla Commissione l'utilizzo della tecnica MPN applicata al metodo ISO 8914.

Attività della Commissione ISO

Presso la Commissione ISO si sta valutando la proposta di metodi colturali per la determinazione dei vibriani patogeni. La proposta prevede una suddivisione in tre parti:

- Determinazione del *Vibrio parahaemolyticus* (8);
- Determinazione del *Vibrio cholerae* (9);
- Determinazione di altri vibriani patogeni (non ancora disponibile).

Negli allegati 1 e 2 sono riportati gli schemi dei due metodi.

Progetti europei

La necessità di acquisire nuove conoscenze scientifiche su tali argomenti ha portato alla formulazione e approvazione di un Progetto integrato "Health promoting, safe seafood of high eating quality in a consumer driven fork-to-farm concept" (SEAFOODplus), che vede la partecipazione di 80 partner; i lavori sono iniziati a febbraio 2004.

L'impatto strategico del progetto e quello di fornire conoscenze scientifiche per consentire un miglioramento della salubrità, del valore nutritivo e della qualità dei prodotti della pesca al fine di ridurre l'incidenza delle maggiori malattie, trasmesse da tali alimenti, e aumentare la salvaguardia del consumatore europeo.

Più specificamente il *Pillar 3 – Seafood quality* ha come principali obiettivi lo sviluppo di metodi avanzati e standardizzati per diversi patogeni (virus enterici e batteri) da poter essere utilizzati nel controllo. Il raggiungimento di tali obiettivi soddisferà le esigenze della Comunità Europea, che come vede come necessità primaria la disponibilità di metodi standardizzati per la ricerca dei virus nei molluschi, in particolare Epatite A e Norovirus; anche in considerazione del fatto che nella nuova bozza del documento *Commission regulations for microbiological criteria for foods* viene decretato un impegno ad introdurre nel regolamento misure sul problema dei virus nei molluschi bivalvi nel giro di tre anni.

Per quanto riguarda i batteri patogeni il progetto si propone di mettere a punto tecniche che consentano la numerazione di *Vibrio* spp., nonché la distinzione tra ceppi patogeni e non patogeni. Verranno presi in considerazione metodi classici e molecolari, posti a confronti e quando necessario sviluppati al fine di assicurarne la specificità.

Procedure di *Real Time PCR* verranno studiate per la numerazione dei vibriani patogeni. Le performance di tali tecniche verranno valutate e validate mediante utilizzo di campioni sperimentalmente e naturalmente contaminati.

I metodi messi a punto verranno quindi utilizzati per gli studi della cinetica di tali microrganismi durante i processi di depurazione e della loro sopravvivenza durante la conservazione.

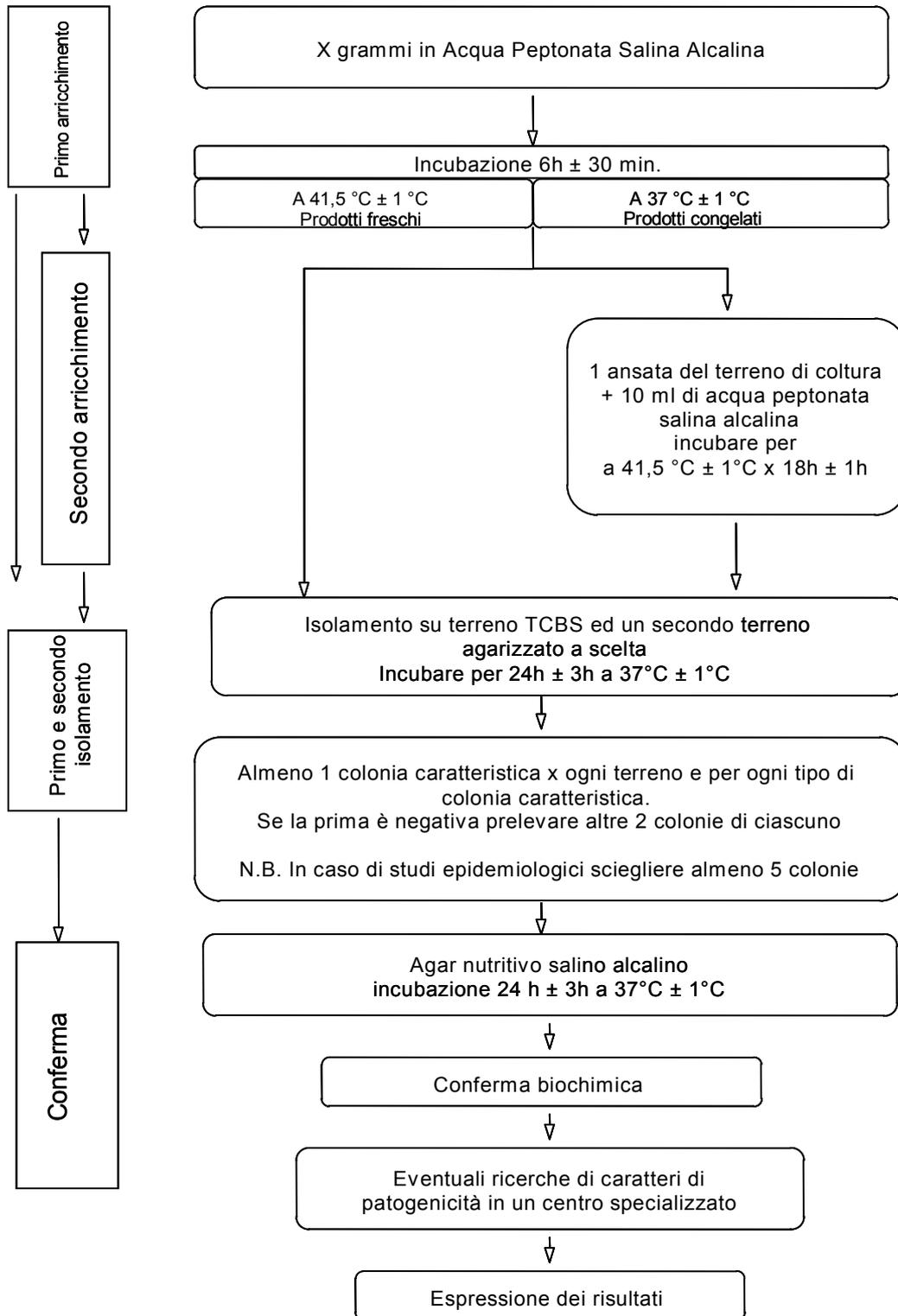
Metodi di tipizzazione molecolare e fingerprinting verranno sviluppati e applicati per caratterizzazione e la verifica del significato epidemiologico di vibriani isolati da prodotti della pesca nell'ambito delle attività di sorveglianza condotte nei diversi Stati Membri.

Bibliografia

1. Italia. Decreto Legislativo del 30 dicembre 1992, n. 530, recante “Attuazione della direttiva 91/492/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi”. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 104 del 6 maggio 1999.
2. Lipp EK, Rose JB. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Rev Sci Tech* 1997;16:620-40.
3. Comunità Europea. Council Decision of 29 april 1999 on reference laboratories for monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluscs. *Official Journal of the European Communities* L120/40 del 8 maggio 1999.
4. Donovan TJ, Gallacher S, Andrews NJ, Greenwood MH, Graham J, Russel JE, Roberts D, Lee R. Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *E. coli* in live bivalve molluscs. *Comm Dis Pub Health* 1998;1:188-96.
5. Doré WJ, Henshilwood K, Lees DN. Evaluation of F-Specific RNA Bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. *Appl Environ Microb* 2000;66:1280-91.
6. Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microb* 2004;90:23-41.
7. Comunità Europea. Raccomandazione della Commissione del 10 gennaio 2003 relativa ad un programma coordinato di controlli ufficiali dei prodotti alimentari per il 2003. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* L7/76 del 11 gennaio 2003.
8. ISO TC 34/SC 9. *Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche des Vibrio présumés pathogènes par voie digestive. Partie 1: Recherche de Vibrio parahaemolyticus*. Geneva: International Organization for Standarditation; 2002. (N 645 del 8.01.2002).
9. ISO TC 34/SC 9. *Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche des Vibrio présumés pathogènes par voie digestive. Partie 2: Recherche de Vibrio cholerae*. Geneva: International Organization for Standarditation; 2002. (N 646 del 8.01.2002).

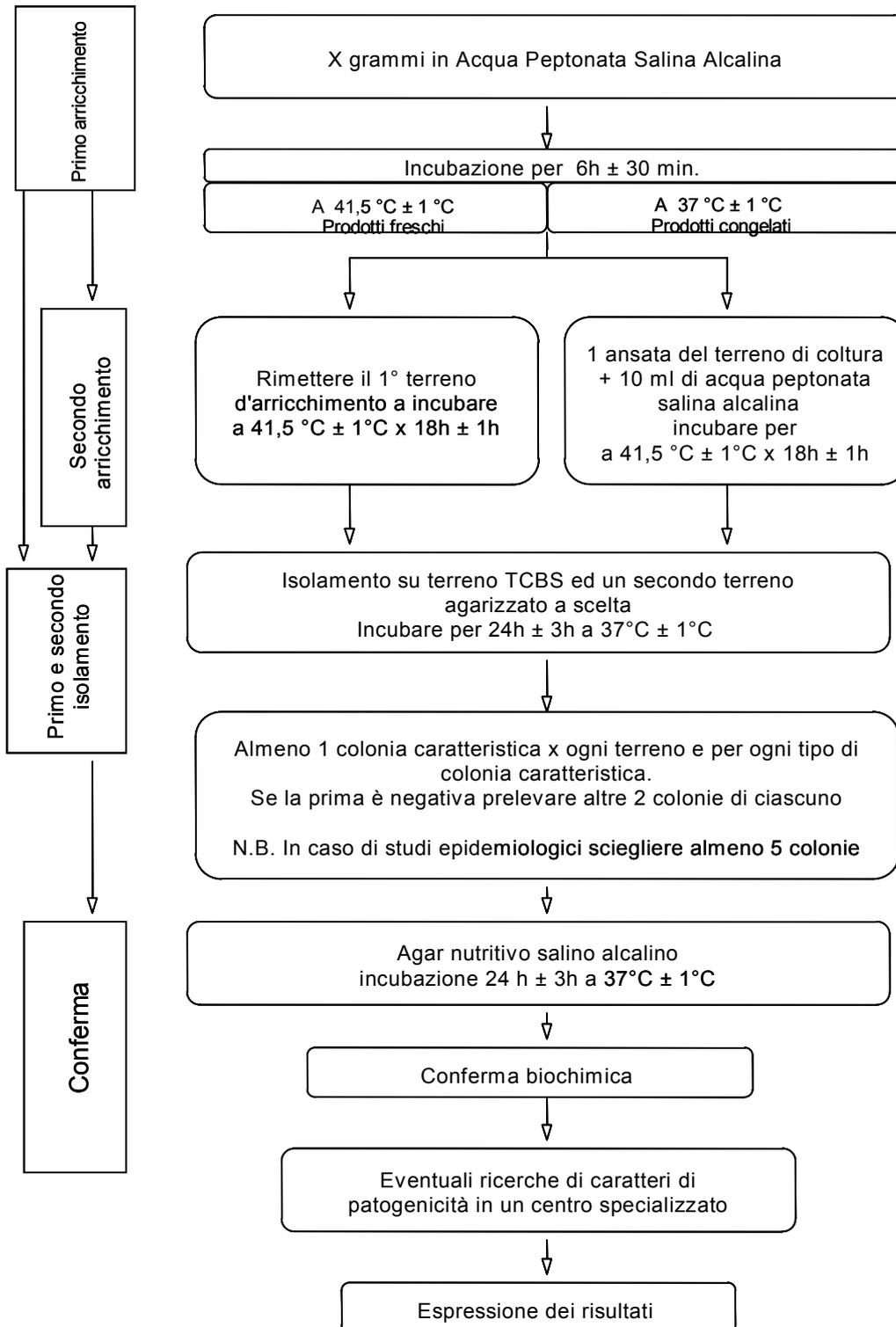
Allegato 1

Ricerca del *Vibrio parahaemolyticus* - doc ISO/TC34 SC9 N 645 Schema del metodo



Allegato 2

Ricerca del *Vibrio cholerae* - doc ISO/TC34 SC9 N 645 Schema del metodo



CONSUMI DEI PRODOTTI DELLA PESCA IN ITALIA

Aida Turrini, Colomba Sermoneta

Unità di Statistica ed Economia Alimentare, Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Roma

Premessa

Il dato di consumo che interessa direttamente il nutrizionista è la quantità di alimento assunta giornalmente – con tutto il suo corredo di nutrienti ed energia – al fine di poter valutare l'adeguatezza rispetto ai fabbisogni, o quantomeno le raccomandazioni (Livelli di Assunzione Raccomandati di Nutrienti, LARN). Il profilo quantitativo della dieta è, poi, usato per stimare l'esposizione all'assunzione di sostanze diverse dai nutrienti, più o meno potenzialmente dannose, la cui occorrenza nei cibi è estremamente variabile, in quanto non costituiscono componenti strutturali, ma migrano negli alimenti per diversi motivi: dalla tecnologia di produzione o di trasformazione, alle condizioni igieniche, alle caratteristiche pedo-climatiche dei terreni di coltivazione, fino ad eventi rari e, in generale, alle condizioni ambientali. Parliamo di sostanze tossiche, residui di lavorazioni, fitofarmaci, e così via fino alla radioattività. In questo contesto, i dati di consumo insieme ai dati di concentrazione costituiranno l'input di procedure di valutazione di tipo deterministico (1-4) – metodo del Budget Inverso, calcolo dell'esposizione per valori di consumo estremo, ricostruzione della dieta totale e analisi chimica (1, 4, 5) – o probabilistico, in cui sono le curve di distribuzione (consumo, consumatori, concentrazione) ad essere elaborate mediante software appositamente sviluppato (es. Montecarlo). La complessità del procedimento riguarda sia il livello della raccolta dei dati, poiché, la misura, in termini di peso, dell'ingestione media giornaliera richiede più giorni di osservazione, con strumenti quali inventari familiari e/o diari individuali (2, 6), oppure interviste per rilevare il consumo delle 24 ore precedenti. In ogni caso, i dati dovranno essere aggregati per ottenere profili di consumo intelligibili e, soprattutto, con variabili che raggiungono la significatività statistica. I criteri di classificazione in base ai quali aggregare non sono definibili in modo esatto a priori, sia perché il mondo degli alimenti è estremamente variegato e continuamente variabile, sia perché le aggregazioni variano secondo l'obiettivo di analisi (7). L'attenzione alla qualità dei dati e all'organizzazione degli stessi per una corretta elaborazione sono, infine, fattori importanti per la preparazione di matrici di dati idonee per effettuare le analisi statistiche e ottenere profili nutrizionali affidabili (8, 9).

Percorso dall'approvvigionamento all'ingestione

A fronte di dati (reperiti sia dal database FAOSTAT della FAO: <http://faostat.fao.org>, che da fonti ISTAT e INRAN) che danno in crescita sia la disponibilità (Figura 1) che gli acquisti domestici e l'assunzione media giornaliera (con il relativo aumento del contributo all'assunzione di energia e nutrienti) (Tabella 1, Figura 2), la primaria fonte di approvvigionamento di prodotti della pesca in Italia appare essere l'importazione (Figura 3), anche se nel tempo la produzione è cresciuta in media di più (+3,0% l'anno vs 2,7% l'anno). In compenso, nel quarantennio 1961-2001, la quota destinata all'esportazione è cresciuta vertiginosamente (+92,3%). Nella Figura 4 è illustrata la ripartizione della produzione italiana per mercato di destinazione.

Tabella 1. Acquisti e intake di prodotti della pesca in Italia media annua pro-capite (kg)

Prodotti della pesca	1994-1996	1980-1984	1994-1996/1980-1984 variazione %
Acquisti			
Freschi e surgelati	11,5	6,9	66%
Conservati	2,0	1,0	91%
Totale	13,5	7,9	69%
Intake			
Freschi e surgelati	9,8	6,6	48%
Conservati	2,6	2,1	26%
Totale	12,4	8,7	43%

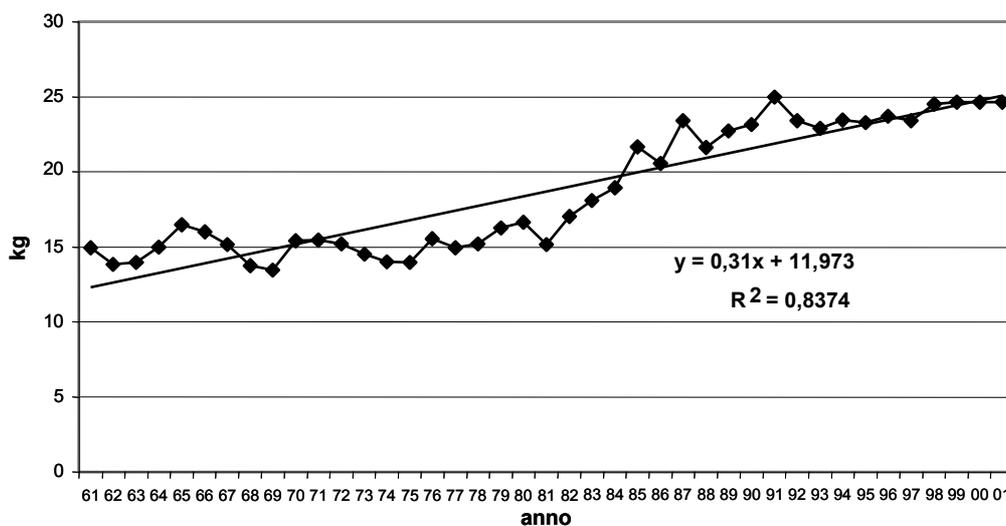


Figura 1. Evoluzione della disponibilità prodotti della pesca in Italia (kg/anno/pro-capite)

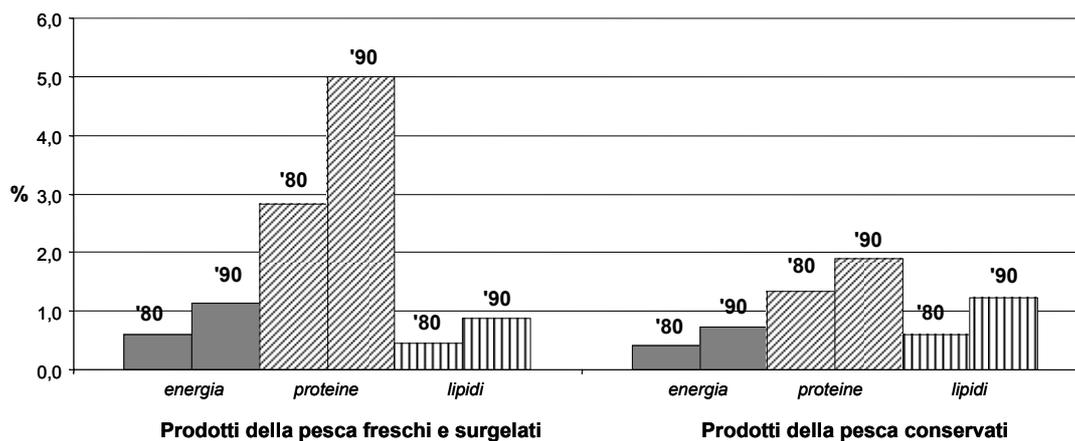


Figura 2. Contributo % all'assunzione media giornaliera pro-capite di energia, proteine e lipidi confronto fra i risultati degli studi INRAN negli anni 1980 e 1990

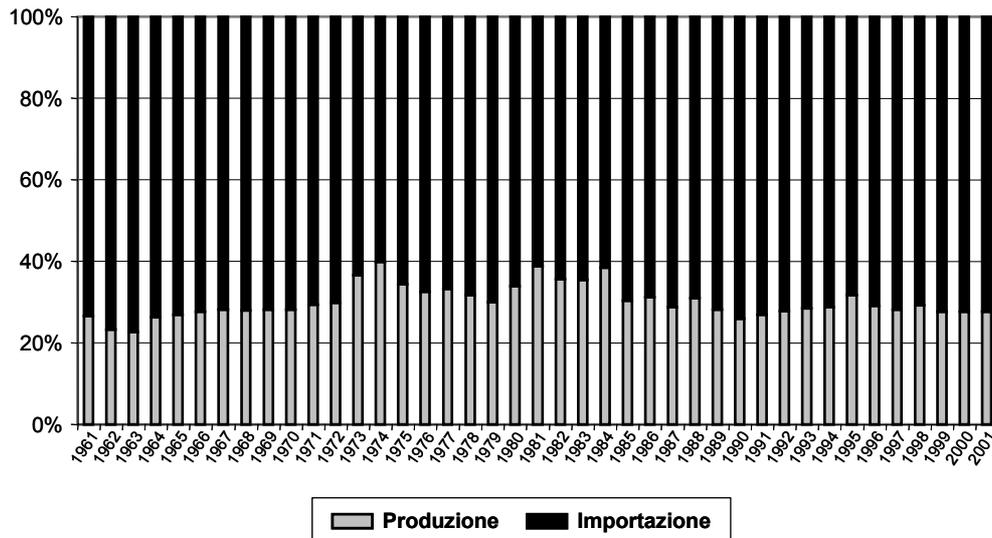


Figura 3. Evoluzione dell'approvvigionamento di prodotti della pesca in Italia per fonte: produzione e importazione (quota %)

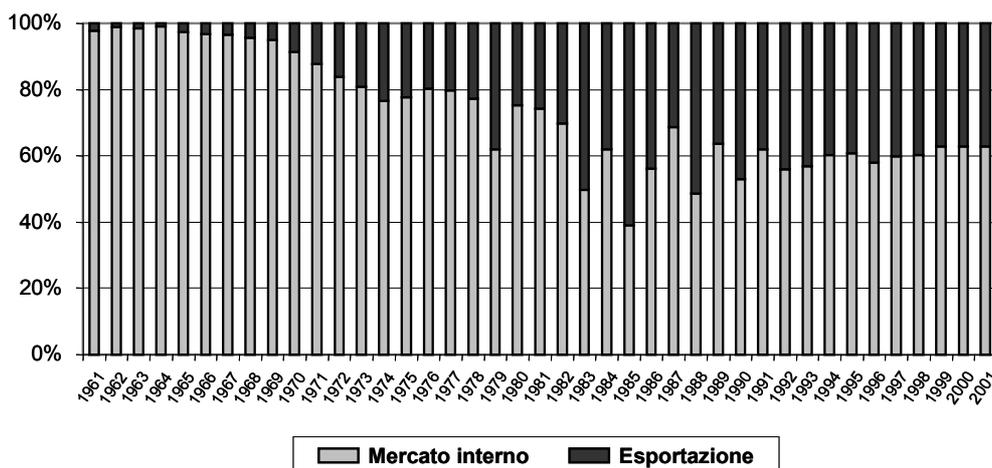


Figura 4. Evoluzione della produzione di prodotti della pesca in Italia per destinazione: mercato interno ed esportazione (quota %)

Questi dati sono importanti soprattutto se si desidera realizzare un'analisi della dieta totale che richiede una ricostruzione della dieta, acquistando un paniere di alimenti definito secondo criteri ragionati di rappresentatività (4). Non solo voci alimentari maggiormente consumate (come numero di consumatori e quantità), ma anche luoghi di acquisto abituali.

A fronte di una disponibilità crescente, anche gli acquisti domestici hanno mostrato un andamento crescente in termini quantitativi (10), sia pure con un livello assoluto più basso (Figura 5) (non sono inclusi i consumi fuori casa e le quantità stoccate), e le frequenze di

consumo (11). Il confronto è stato possibile solo per il periodo 1980-1996 anni per i quali sono disponibili entrambi i dati.

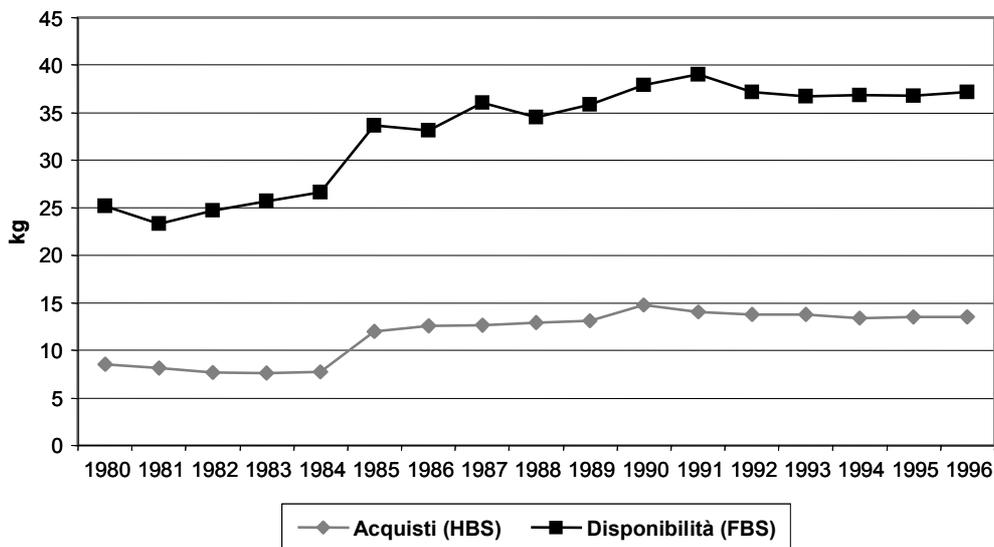


Figura 5. Evoluzione della disponibilità per i consumo e degli acquisti di prodotti della pesca in Italia (kg/anno/pro-capite) (1980-1996)

Dai dati di acquisto ai dati di assunzione si osserva una ulteriore differenza (Tabella 1), poiché, se anche i dati di assunzione comprendono una quota di consumo fuori casa (sono esclusi i piatti con più ingredienti di cui non era nota la ricetta), le quantità sono espresse al netto degli scarti di cucina e di piatto, operazione che non è possibile attraverso un diario di acquisti. Infine, dal 1996 l'ISTAT non rileva più le quantità per cui in futuro occorrerà lavorare su stime indirette a partire dalle spese. A margine annotiamo che mentre per il pesce fresco (e per la maggior parte degli alimenti) questo è vero, per i prodotti della pesca conservati i dati di assunzione forniscono un valore superiore a quello ottenuto con le quantità acquistate (Tabella 1). Ciò fa pensare, ad una differenza di classificazione.

Comunque, tutte le indicazioni di tendenza concordano. Infatti, anche il confronto tra i dati di assunzione media giornaliera *pro-capite* di prodotti della pesca nello studio condotto dall'INRAN negli anni 80 (12) e il successivo degli anni '90 (6), mostra un aumento, sia in termini di grammi che di contributo all'assunzione di energia e nutrienti.

Profili alimentari della popolazione

I dati, frutto di una rilevazione individuale, permettono di individuare le differenze nelle diete per gruppi di popolazione definiti da caratteri socio-demografici, antropometrici, e così via.

I prodotti della pesca rappresentano nel nostro Paese una fonte importante di proteine, acidi grassi polinsaturi e alcuni micronutrienti (Tabella 2), poiché per in questi casi si collocano tra i primi dieci alimenti per contributo percentuale. Considerando la ripartizione della quantità di prodotto (Figura 6), il pesce di mare presenta il peso maggiore (55,3%), seguito da prodotti della pesca conservati (18,5%), molluschi (15,5%), pesce d'acqua dolce (7,3%) e crostacei (3,5%) (4).

Tabella 2. Apporto di nutrienti dei prodotti ittici in Italia (prime 10 fonti)

Nutriente	Rango	%
Prodotti della pesca freschi e surgelati		
Vitamina D	1	26,50
Selenio	2	15,42
Rame	4	10,39
Fosforo	6	5,18
Colesterolo	6	8,03
Zinco	6	5,17
Acidi grassi polinsaturi	6	3,73
Proteine	7	5,77
Niacina	7	5,40
Vitamina B6	7	4,19
Ferro	9	3,18
Calcio	10	1,85
Potassio	10	3,20
Prodotti della pesca conservati (sott'olio, secco, ecc.)		
Selenio	1	16,30
Vitamina D	3	13,20
Vitamina E	8	2,77
Niacina	10	3,55

Fonte: Indagine nazionale nutrizionale sui consumi alimentari 1994-1996 (Studio INN-CA 1994-96)

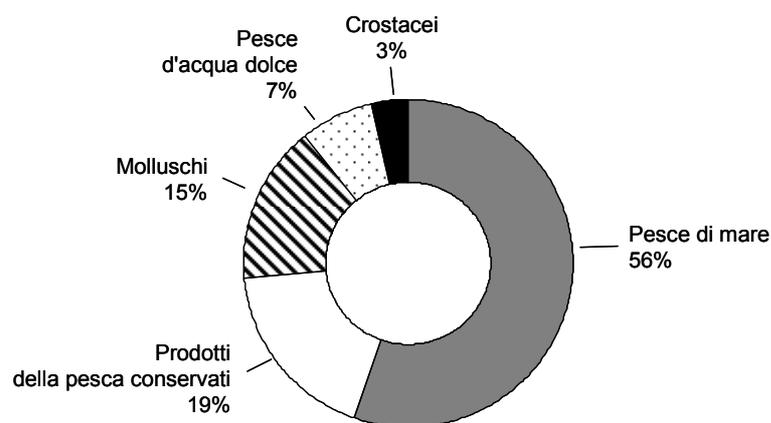


Figura 6. Percentuale di consumo delle diverse voci alimentari all'interno del gruppo prodotti della pesca (Studio INN-CA 1994-96, INRAN)

Una visuale italiana dell'assunzione di prodotti della pesca è stata estratta dai risultati dello studio condotto negli anni 90: i maschi assumono giornalmente quantità superiori a quelle assunte dalle femmine (come del resto di quasi tutti gli alimenti) (Figura 7); i bambini (1-9 anni) presentano un consumo medio inferiore a quello delle altre classi di età (24,1 g/die) (Figura 8); il Sud e Isole sono ancora i maggiori consumatori con 48,0 g/die *pro-capite* (42,0 g di prodotti freschi e surgelati e 6,0 g di prodotti conservati) (Figura 9) (6).

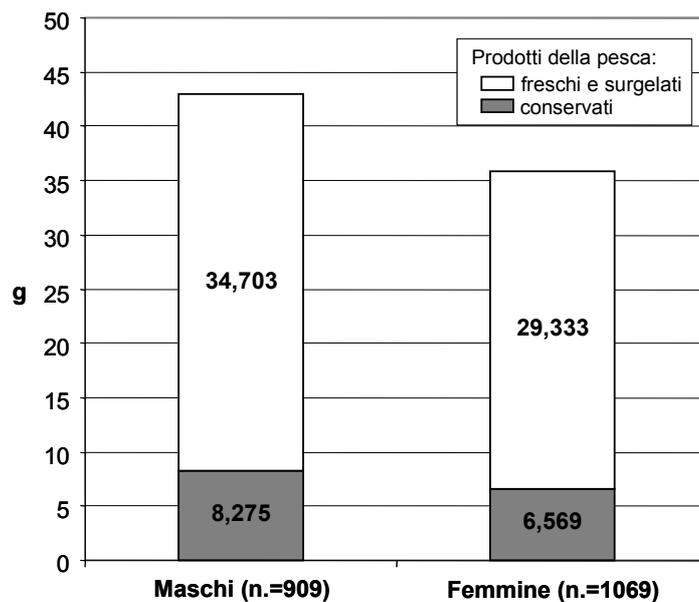


Figura 7. Consumo medio di prodotti della pesca in Italia negli anni 1994-96 (g/die/capite) per genere (Studio INN-CA 1994-96, INRAN)

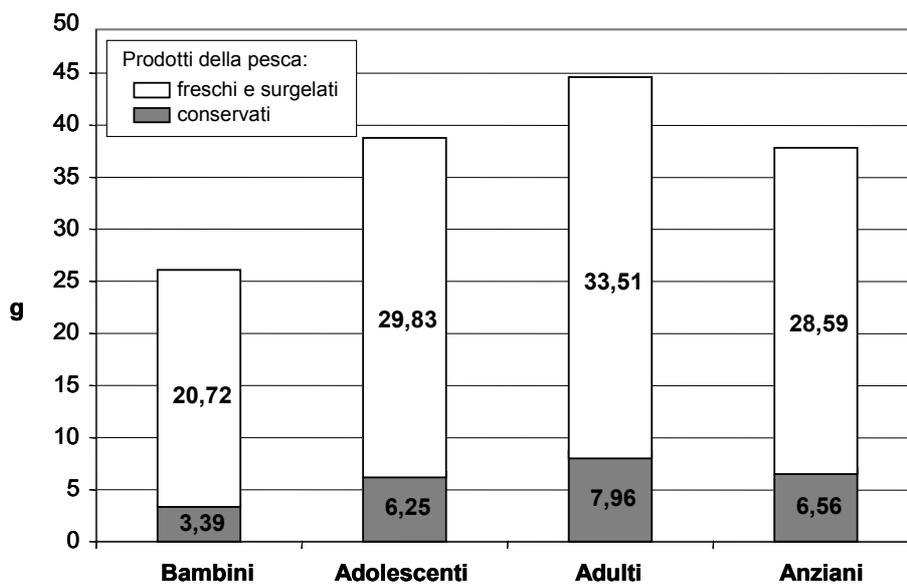


Figura 8. Consumo medio di prodotti della pesca in Italia negli anni 1994-96 (g/die/capite) per classe di età

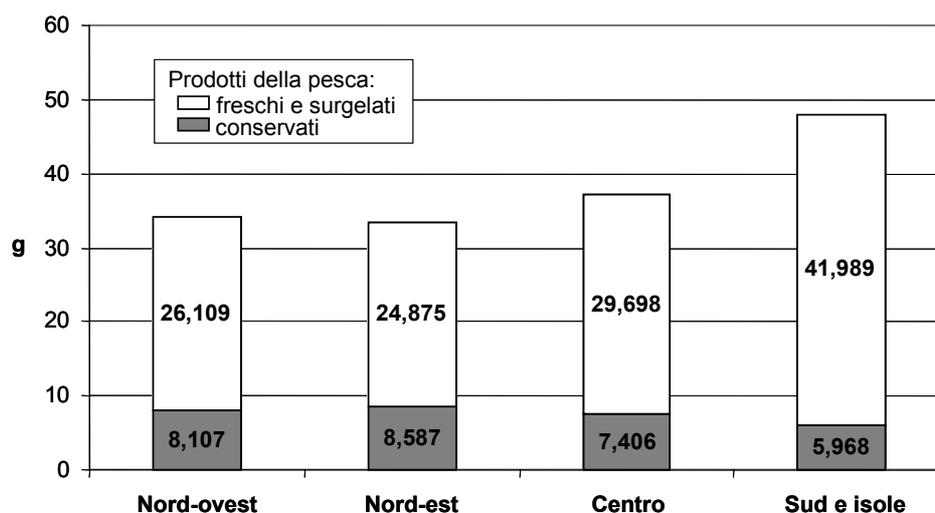


Figura 9. Consumo medio di prodotti della pesca in Italia negli anni 1994-96 (g/die/capita) per ripartizione geografica principale (Studio INN-CA 1994-96, INRAN)

Un dato che non emerge dalle inchieste alimentari finora condotte è relativo alla ripartizione dei consumi di prodotti della pesca tra pesca marittima e acquacoltura. Questo accade a causa della difficoltà di riportare l'informazione per i partecipanti agli studi. Per il momento, si può fare riferimento alle statistiche ufficiali per conoscere la suddivisione del mercato (si veda ad esempio la Tabella 3 tratta dal sito del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (13) su dati 1997-1998), in futuro occorrerà attrezzarsi per cercare di reperire l'informazione in fase di rilevazione.

Tabella 3. Produzione Lorda Vendibile (PLV in miliardi di lire), bilancio commerciale, consumi interni (1996-1998)

Produzione	1996		1998	
	Tonnellate	PLV	Tonnellate	PLV
Pesca marittima				
Osservatorio pesca	470.480	3.165	465.254	3.208
Mitili ^(c)	28.000	24	30.000	33
Pesca oceanica	56.219	281	52.367	297
Totale	554.699	3.470	547.621	3.537
Acquacoltura				
Pesci	64.200	359	68.500	529
Molluschi	142.300	267	148.000	302
Totale	206.500	626	216.500	831
Import				
Fresco, congelato o surgelato	484.545	2.828	520.966	3.394
Trasformato	136.100	1.062	156.614	1.366
Totale	620.645	3.890	677.580	4.760
Export				
Fresco, congelato o surgelato	100.263	443	99.737	493
Trasformato	12.274	109	16.330	140
Totale	112.537	552	116.066	633
Consumo interno	1.269.306	7.434	1.325.635	8.496
Consumo procapite	22,09 kg		23,01 kg	

Conclusioni

La scelta di lavorare su una particolare tipologia di dati dipende dall'obiettivo dello studio (nutrizionale/altro) e/o dai limiti imposti da budget o tempi. L'ideale per le valutazioni nutrizionali – adeguatezza ed esposizione – sarebbe la disponibilità di una base di dati di assunzione rappresentativa per l'intera popolazione e sempre aggiornata. Questo tuttavia richiederebbe uno sforzo organizzativo estremamente elevato e, tutto sommato, sproporzionato, dato che i “grandi” cambiamenti nei profili alimentari sono visibili dopo un certo numero di anni. Tutto ciò può non essere più vero quando si scende al livello di dettaglio di una singola voce alimentare. Tuttavia, un approccio di studio, che parta dall'integrazione di dati da più fonti informative, sembra più facilmente utilizzabile per avere stime sufficientemente aggiornate, senza ripetere in tempi ravvicinati rilevazioni a carattere nutrizionale su scala nazionale. È, però, necessario aggiornare periodicamente la base di dati, cosa che fino ad ora è stata possibile con una cadenza decennale (114).

In base alle informazioni attuali, i prodotti della pesca costituiscono una categoria di prodotti importante per l'alimentazione italiana, che presenta un peso crescente nel tempo, con ovvi riflessi sulla qualità e sicurezza d'uso della dieta.

Bibliografia

1. Turrini A, Saba A, Lintas. Study of the Italian reference diet for monitoring food constituents and contaminants. *Nutrition Research* 1991;11(8):861-74.
2. Saba A, Turrini A, Cialfa E. Estimate of intakes: methodology and results of some studies carried out in Italy. *Food additives and contaminants* 1992;9(5):527-34.
3. Leclercq C, Arcella D e Turrini A, Estimates of the Theoretical Maximum Daily Intake of erythorbic acid, gallates, Butylated Hydroxyanisole (BHA) and Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Italy. A stepwise approach. *Food and Chemical Toxicology* 2000;38:1075-84.
4. Turrini A, Lombardi-Boccia G. The formulation of the market basket of the Italian total diet 1994-96. *Nutrition Research* 2002;22(10):1151-62.
5. Sermoneta C, Roccaldo R e Turrini A. The exploitation of data to evaluate exposure to risk: a contribution, 3rd Congress EurSafe 2001, *Food Safety Food Quality Food Ethics, Preprints*, 3-5 ottobre Firenze, 2001:505-506.
6. Turrini A, Saba A, Perrone D, Cialfa E, D'Amicis A. Food Consumption Patterns in Italy: the INN-CA Study 1994-96. *European Journal of Clinical Nutrition* 2001;55(7):571-88.
7. Turrini A (1999): Food coding in nutritional surveys, in: Classification and Data Analysis. Theory and Application, M. Vichi, O. Opitz (Eds) Proceedings of the Biannual Meeting of the Classification Group of Società Italiana di Statistica (SIS) Pescara July 3-4 1997, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 361-366.
8. Turrini A. Food data quality in nutritional surveys: which issues are to be tackled? *Journal of Food Composition and Analysis* 2000a;13(4):597-609.
9. Turrini A. Conceptual framework of an integrated databases system for nutritional studies. *Journal of Food Composition and Analysis* 2000b;13(4):585-95.
10. ISTAT. *I consumi delle famiglie*. Roma: Istituto Nazionale di Statistica; 1980-1996.
11. ISTAT. *Indagine Multiscopo – Aspetti della vita quotidiana*. Roma: Istituto Nazionale di Statistica; 1993-2000.

12. Saba A, Turrini A, Mistura G, Cialfa E, Vichi M. Indagine nazionale sui consumi alimentari delle famiglie 1980-84: alcuni principali risultati. *Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione* 1990;19(4):53-65.
13. Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. *Quadro macroeconomico del settore (pesca)*. Roma: MiPAF; 2003. Disponibile all'indirizzo <http://www.politicheagricole.it/PESCA/SFOP/Piano/PianoVI/quadro.htm>; ultima consultazione 27/9/05.
14. Turrini A. Indagini alimentari su scala nazionale: metodologia e possibilità di utilizzazione. *Giornale Europeo di Nutrizione Clinica* 1993;3:61-9.

ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN PRODOTTI DI ACQUACOLTURA

Anna Maria Ferrini

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

“The increasing problems associated with infectious diseases in fish, the limited number of drugs available for treatment and prevention of these diseases, and the rapid increase in resistance to these antibiotics represent major challenges for this source of food production worldwide”
American Society of Microbiology Task Force on Antibiotic Resistance (1994)

Introduzione

L'inizio dell'era antibiotica data intorno agli anni 40, quando la penicillina (già scoperta da più di una decina di anni da Fleming) viene utilizzata durante la II guerra mondiale con risultati tanto eccezionali da generare l'illusione che, prima o poi, sarebbe stato possibile fronteggiare qualsiasi malattia infettiva.

Da allora sono state messe a punto moltissime molecole ad attività antibiotica ma, a distanza di 60 anni, ancora si ricercano altre molecole per raggiungere migliori profili farmacocinetici, nuovi target cellulari, differenti spettri di azione e altri obiettivi ancora, ma soprattutto per aggirare il problema della antibiotico-resistenza.

Di fatto oggi, abbiamo a disposizione più di 15 differenti classi di antibiotici. Questi differiscono tra loro per struttura chimica e meccanismo di azione, possono essere naturali o di sintesi ma hanno tutti in comune la capacità di uccidere i microrganismi o di inibirne la moltiplicazione e questa capacità li rende unici per il controllo delle malattie infettive, anche quelle altrimenti mortali.

Molti patogeni batterici sono diventati difficili da trattare con gli antibiotici tradizionali a causa del fenomeno dell'antibiotico-resistenza e il fatto che sia stato necessario modificare i protocolli terapeutici per il trattamento di diverse infezioni, fa sentire sempre più pressante la minaccia dell'antibiotico-resistenza. Tubercolosi, gonorrea, malaria, patologie da *Staphylococcus aureus* sono soltanto alcune delle malattie cliniche diventate difficili da trattare con gli antibiotici. Il mondo medico ha da tempo sollevato la preoccupazione che di questo passo potremmo trovarci presto di fronte a patogeni non più trattabili con gli attuali mezzi a disposizione.

Oggi sappiamo che quando un microrganismo sviluppa antibiotico-resistenza per un determinato antibiotico, non solo quel microrganismo non è più inibito da quella molecola, ma anche, e questo è il significato più allarmante, che quel microrganismo può potenzialmente trasferire quella antibiotico-resistenza ad altri microrganismi, anche tassonomicamente lontani, i quali a loro volta diventano resistenti a quello stesso antibiotico.

È ormai dimostrato che i due serbatoi principali per lo sviluppo di ceppi antibiotico-resistenti sono il comparto clinico e quello veterinario. Dato che ogni ceppo portatore di geni di antibiotico-resistenza trasmissibile può potenzialmente passare questa sua caratteristica ad altri microrganismi dell'ecosistema, l'antibiotico-resistenza per una o più molecole può essere intercambiata tra animale e uomo, e questo si realizza principalmente attraverso la catena alimentare o anche solo per contatto diretto con animali trattati.

Impiego degli antibiotici in veterinaria e zootecnia

Nonostante il problema dell'antibiotico-resistenza fosse già stato sollevato dallo stesso Fleming nel 1946 considerando gli effetti dell'abuso dei sulfamidici, non appena è stato possibile ottenere prodotti a costo accessibile, gli antibiotici sono stati utilizzati negli animali non solo per trattarne le patologie, ma soprattutto per facilitarne la crescita ponderale. Indagini condotte in diversi Paesi industrializzati hanno stimato che la quantità di antibiotici destinata all'uso nel settore veterinario e zootecnico è solo di poco inferiore a quella destinata all'uso umano, determinando una forte pressione di selezioni per l'antibiotico-resistenza. Tipico è l'esempio dei fluorochinoloni, introdotti in clinica dalla metà degli anni '80. Solo una decina di anni dopo, immediatamente dopo la loro autorizzazione di impiego per il pollame, dagli animali trattati sono stati isolati ceppi di *Salmonella* e *Campylobacter* ad essi resistenti, diventando successivamente simili isolamenti piuttosto frequenti anche nell'uomo.

L'antibiotico-resistenza indotta da un antibiotico può, in alcuni casi, estendersi anche ad altre molecole della stessa famiglia (resistenza crociata). Uno dei casi più allarmanti è stato quello dell'aumento di insorgenza di ceppi umani di *Enterococcus vancomicina*-resistenti, conseguente l'uso in veterinaria (come additivo alimentare per polli) di un altro glicopeptide: l'avoparcina. Sulla base di questa osservazione, nel 1995 la Danimarca ha bandito l'uso della avoparcina come promotore di crescita negli animali e successivamente nel 1997 lo stesso provvedimento è stato esteso a tutta l'Europa. Dopo il ritiro dell'autorizzazione, la prevalenza di ceppi vancomicina resistenti, in animali, alimenti e nell'uomo, si è ridotta drasticamente, confermando sia lo sviluppo di resistenze crociate tra diverse molecole della stessa famiglia che la diffusibilità dei ceppi tra uomo e animale.

Considerazioni sull'uso di antibiotici in acquacoltura

L'impiego di antibiotici in ambiente acquatico pone problemi sia a livello di potenziale impatto ambientale, sia di implicazioni per la salute umana.

L'impiego di antibiotici in acquacoltura è previsto solo per fini terapeutici. Il Regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio che definisce una procedura comunitaria per la determinazione dei Limiti Massimi di Residui (LMR) di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale stabilisce anche, per ognuna delle molecole riportate, la/e specie animali per la quale tale molecola può essere utilizzata.

Molte sono le molecole antibiotiche autorizzate per la formulazione di medicinali veterinari per i prodotti ittici, ma di fatto le specialità registrate nella Comunità Europea per l'acquacoltura sono poche. Questo non ne permette la necessaria rotazione per contenere l'antibiotico-resistenza né assicura il non uso di specialità registrate per altre specie animali che, in questo caso, potrebbero essere somministrate con dosaggio inappropriato contribuendo ulteriormente all'insorgenza di antibiotico-resistenza.

Nei Paesi asiatici, forti produttori nel settore dell'acquacoltura per produzione di pesce e gamberetti, la situazione è ancora molto poco definita: alcuni Paesi, a fronte di una regolamentazione esistente, mancano di un sistema efficace di controllo; altri invece mancano proprio della stessa regolamentazione. Dove non ci sono regole, i produttori possono utilizzare qualunque farmaco, anche cloramfenicolo e nitrofurani banditi dalla Comunità Europea, e quando l'approvvigionamento del farmaco viene da fonti non controllate, può essere di scarsa qualità e, comunque, in assenza di controllo veterinario, può essere usato male.

Queste considerazioni, che, comunque, valgono per tutti i settori di allevamento, sono particolarmente importanti per l'acquacoltura, considerando quanto la presenza e la concentrazione di antibiotico siano determinanti per selezionare e conservare la flora batterica antibiotico-resistente.

L'uso di antibiotici in acquacoltura deve in particolare tenere conto del fatto che:

- i trattamenti vengono effettuati disperdendo mangime medicato nell'acqua. Questo non viene consumato tutto e può sedimentare o rimanere in sospensione e in questo modo le molecole possono persistere, sia pure a concentrazioni basse, oltre la fine del trattamento, per tempo variabile in funzione della loro stabilità;
- le deiezioni degli animali si riversano nella stessa acqua di allevamento; come conseguenza:
 - concentrazioni basse e prolungate di antibiotico favoriscono le condizioni per l'insorgenza di microrganismi antibiotico-resistenti;
 - la diffusione di tali ceppi da un animale all'altro non incontra la minima barriera in acquacoltura, come in parte avviene per gli animali terrestri. Inoltre, i geni di antibiotico-resistenza possono essere passati ad altri microrganismi acquatici con ripercussioni sull'ecosistema e/o raggiungere l'uomo attraverso l'alimentazione, e quindi essere trasferiti ai microrganismi della flora intestinale.

È un dato di fatto generale che pesci che condividono le stesse acque, generalmente condividono anche le stesse patologie (1).

Le patologie dei pesci hanno in genere una diffusione estremamente rapida che in alcuni casi può raggiungere percentuali di mortalità fino al 90% dei capi, come nel caso della foruncolosi da *Aeromonas salmonicida* e della "malattia della bocca rossa" da *Yersinia* (2, 3, 4).

In allevamento perciò, per contenere le perdite economiche, i trattamenti vengono effettuati ai primi sintomi di malattia. Studi effettuati su patogeni isolati da prodotti trattati con antibiotici confermano la correlazione tra le molecole utilizzate e l'antibiotico-resistenza per le stesse molecole.

Nei confronti di *A. salmonicida*, patogeno per non solo per salmoni ma per almeno 58 specie ittiche (2, 3), da diverse parti del mondo vengono ormai segnalati ceppi resistenti a sarafloxacin, cloramfenicolo, trimetoprim, amoxicillina e tetraciclina, cioè alle stesse molecole che vengono utilizzate per i trattamenti (5-8).

È importante ricordare che l'*Aeromonas* è un microrganismo ambientale autoctono degli ambienti acquatici e che sporadicamente può essere trasmesso all'uomo nel quale può provocare gastroenterite o, in soggetti immunocompromessi, infezione sistemica.

Molti studi sono stati effettuati anche nel settore di produzione dei gamberetti. La produzione mondiale in questo settore ha conosciuto una autentica impennata negli ultimi 30 anni, ma anche in questo settore ci sono stati problemi molto seri associati a patologie microbiche (9). Le infezioni batteriche in questo tipo di produzione, possono comportare mortalità fino al 100% nella fase larvale e giovanile (10). Il genere *Vibrio* è ritenuto il principale responsabile delle infezioni batteriche in tutte le specie di gamberetti e le specie batteriche più importanti sono *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. parahaemolyticus* e *V. penaeicida* (11). Anche per le vibriosi, il modo più comune per affrontare il problema è la somministrazione di mangimi antibiotati e quindi diversi sono gli studi sull'antibiotico-resistenza in proposito. Uno studio su *Artemia nauplii* ha riportato il 60% di 336 isolati come discretamente resistente ad eritromicina, nitrofurazone e ossitetraciclina (12).

Diversi studi concordano che *V. harveyi* risulta ormai essere diffusamente resistente ad ampicillina nei prodotti asiatici (13, 14).

I fluorochinoloni sono una famiglia di antibiotici introdotta recentemente in acquacoltura e mostrano sia bassa frequenza di resistenza che forte attività. L'enrofloxacin è la molecola più

potente di questo gruppo con MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) di 0,006 mg/L per i *Vibrio* patogeni nel pesce e tra 1,0 e 0,05 mg/L per *Vibrio* patogeni isolati da gamberetti (15).

L'ossitetraciclina è un antibiotico comunemente utilizzato in acquacoltura. In Thailandia viene utilizzato a scopo profilattico piuttosto che terapeutico e come risultato si osserva una generale resistenza a questa molecola. Uno studio su diverse specie di *Vibrio* effettuato in questa regione riporta che la specie più sensibile è il *V. anguillarum* con una percentuale di sensibilità pari solamente al 29% dei ceppi esaminati (16). A questo proposito è significativo il confronto tra il range di MIC per tetraciclina pari a 1,0-30,0 mg/L per *Vibrio* isolati da gamberetti coltivati in America (15) rispetto ad un range di MIC di 0,39-100 mg/L, con valore medio di MIC di 37,5 mg/L per *Vibrio* isolati da produzioni thailandesi dove l'uso di questa molecola è molto più alto (17).

Conclusioni

Negli animali, come nell'uomo, l'uso degli antibiotici può provocare non solo aumento di resistenza nei batteri patogeni, ma anche nella flora endogena di questi animali. Batteri resistenti emersi da animali, possono infettare o raggiungere la popolazione umana, non solo per contatto diretto, ma anche attraverso i prodotti alimentari e quindi colonizzare o trasferire i loro geni di resistenza ad altri batteri della flora endogena umana.

A questo proposito è utile riportare uno dei punti della conclusione del Joint FAO/OIE/WHO workshop on "Non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance" (dicembre 2003) sul rischio da antibiotico-resistenza, che viene definito significativamente più serio del rischio stesso associato alla presenza dei residui di antibiotici in un alimento.

In generale, si raccomanda di ridurre l'impiego degli antibiotici in campo veterinario. Questo può essere ottenuto con il miglioramento dei metodi di allevamento, l'eradicazione delle malattie, l'impiego di vaccini e lo sviluppo di nuovi e nel caso di utilizzo di antibiotici, dovrebbero essere privilegiati quelli a spettro ristretto e sotto il diretto controllo veterinario (18).

A questo proposito è importante ribadire che è possibile, anche nel settore dell'acquacoltura, modificare le tecniche di allevamento in modo da operare una significativa riduzione degli antibiotici. Per fare questo è necessario prevenire piuttosto che curare le malattie.

Un esempio di come sia possibile ridurre l'impiego di antibiotici in acquacoltura viene dalla Norvegia. In questo Paese sono state introdotte modifiche sostanziali ad alcune pratiche di produzione con l'ottimizzazione delle rese, il controllo delle acque, l'impiego di vaccini e lo sviluppo di nuovi, e soprattutto le buone pratiche zootecniche. In questo modo, è stato possibile nell'arco di soli 10 anni, ridurre del 90% la quantità nazionale degli antibiotici utilizzati in acquacoltura, passando da una quantità globale di 48570 kg di sostanza attiva (furazolidone, acido ossolinico, ossitetraciclina e co-trimazina) nel 1987 a un totale di 746 kg (florfenicolo, flumechina, acido ossolinico, ossitetraciclina) per tutta la Norvegia.

Bibliografia

1. Mc Vicar AH. Interaction of pathogens in aquaculture with wild fish populations. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 1997;17:197-200.
2. Bernoth, et al. *Furunculosis: multidisciplinary fish disease research*. New York: Academic Press; 1997.
3. Wiklund T, Dalsgaard I. Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmoid and samoid fish species, a review. *Dis Aquat Org* 1998;32:49-69.

4. Dear G. *Yersinia ruckeri* isolated from Atlantic salmon in Scotland. *Bull Euro Ass Fish Pathos* 1988;8:18-20.
5. Wood SC, McCashion RN, Lynch WH. Multiple low level antibiotic resistance in *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;26:992-6.
6. Barnes, *et al.* Cross resistance between oxytetracycline and oxolinic acid in *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* 1990;60:337-339.
7. Hayes MV, Thomson CJ, Amyes SG. Three beta-lactamases isolated from *Aeromonas salmonicida* including a carbapenemase not detectable by conventional methods. *Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1994; 13, 805-811.
8. Guerin-Faublee V, Delignette-Muller ML, Vigneulle M, Flandrois JP. Application of modified disc diffusion technique to antimicrobial susceptibility testing of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* clinical isolates. *Vet Microbiol* 1996; 51, 137-149.
9. Anderson IG, IG, Shamsudin MN, Shariff M, Nash G. Bacterial septicaemia in juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* baculovirus, cytoplasmic reo-like virus and rickettsial and bacterial infections, from Malaysia brackishwater ponds. *Asian Fish Sci* 1988; 1: 47-649.
10. Lavilla-Pitogo CR. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* 1990; 91: 1-13.
11. Austin B. Vibrionaceae representatives as pathogens of penaeid shrimps. In: Calderon J, Sorgeloos P, (Ed.). *Memorias II Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, 1995.
12. Hameed ASS, Balasubramanian G. Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia nauplii* and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. *Aquaculture* 2000;183:195-205.
13. Teo JWP. Novel β -lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;5:1309-14.
14. Abraham JT, Manley R., Palaniappan R., Dhevendaran K. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio Harveyi* isolated from diseased penaeid shrim. *J Aqua Trop* 1997;12:1-8.
15. Mohny LL, Bell TA, Lightner DV. Shrimp antimicrobial testing. In vitro susceptibility of 13 Gram-negative to twelve antimicrobials. *J Aquat Anim Health* 1992;4:257-61.
16. Nash P, Pearson M, Limsuwan C, Roberts RJ. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand. In: Shariff M, Subasinghe RP, Arthur JR (Ed.). *Diseases in Asian aquaculture*. Quezon City: J Asian Fisheries Society; 1992.
17. Chanratchakool P, Pearson M, Limsuwan C, Roberts RJ. Oxytetracycline sensitivity of *Vibrio* species isolated from diseased black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *J Fish Dis* 1995;18:79-82.
18. Van de Bogaard AE. A veterinary antibiotic policy, a personal view on the perspectives in the Netherlands. *Microbiology* 1993;35:303-12.

QUALITÀ DELL'AMBIENTE MARINO E ACQUACOLTURA INTENSIVA

Eva Alessi (a), Daniela Mattei (b), Luciana Migliore (c)

(a) Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Laboratorio di Ecologia Sperimentale e Acquacoltura, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma

Introduzione

Negli ultimi decenni la necessità di un incremento produttivo, dovuto al progressivo aumento della domanda, ha reso necessario svincolare il processo produttivo dai limiti imposti dalla capacità ambientale (1): oggi le varie forme di allevamento intensivo, sia che si tratti di zootecnia sia di acquacoltura, consentono di ottenere rese molto elevate per animale, in spazi ristretti. Questo risultato viene raggiunto fornendo un'alimentazione completa e regolare, ma anche somministrando dosi sub-terapeutiche di antibiotici come promotori di crescita (*Antibiotic Growth Promoters*, AGP) per incrementare l'efficienza di assimilazione con conseguente aumento di peso. Sembra che l'impiego di AGP incrementi lo sviluppo degli animali sino all'8% (2). Inoltre, le condizioni di elevata densità cui gli animali sono mantenuti facilitano l'insorgenza e la diffusione di malattie dovute a patogeni opportunisti che vengono controllate con la somministrazione di farmaci antibiotici; gli animali sono perciò sottoposti a piani programmati di profilassi e terapia di massa nei confronti di malattie batteriche, parassitarie e virali. Dunque, le quantità di antibiotici usate sistematicamente nella pratica zootecnica e in acquacoltura sono rilevanti; inoltre, poiché gli antibatterici vengono somministrati principalmente per via orale, sotto forma di mangime medicato, sono solo parzialmente assimilati, e percentuali non trascurabili vengono eliminate in forma attiva con le deiezioni e con queste immesse nell'ambiente (3, 4).

Attualmente sono ancora da definire il destino ambientale e gli effetti di questi composti sul comparto terrestre e marino; da verificare se possano esserci effetti indesiderati su organismi che accidentalmente vengono in contatto con residui di farmaci presenti nell'ambiente. Non ci sono, inoltre, ancora dati sull'entità della contaminazione in Mediterraneo, né degli effetti sugli ecosistemi confinanti, sebbene, in saggi di laboratorio è stata dimostrata la tossicità di diversi farmaci su organismi non target (come piante terrestri e acquatiche e invertebrati acquatici) (5-11).

Farmaci nell'ambiente

Dopo il 1970, con l'inizio dell'utilizzo su vasta scala di grandi quantità di antibiotici in zootecnia, sono cominciate le difficoltà e si sono moltiplicati gli studi sui farmaci, sugli effetti collaterali indesiderati, sulla tossicità, sull'accumulo tissutale e sui residui pericolosi per il consumatore (4). Si è accresciuta la preoccupazione che i farmaci veterinari potessero concentrarsi negli ambienti circostanti le zone di maggiore pressione zootecnica è diventata sempre più forte. È noto, infatti, che la fonte principale di contaminazione dell'ambiente da

parte dei principi attivi dei farmaci, è rappresentata non dai reflui dei processi produttivi dell'industria farmaceutica, ma dal loro impiego diretto sugli animali e nell'uomo.

I farmaci utilizzati nell'allevamento intensivo vengono scelti sulla base della loro efficienza farmacologica e di caratteristiche fisiche come stabilità e persistenza, e una volta introdotti nell'ambiente, possono diventare pericolosi per gli ecosistemi in cui vengono introdotti.

Nel farmaco, la lipofilia e l'assenza di cariche elettriche facilitano l'assorbimento, ma rappresentano caratteristiche sfavorevoli all'eliminazione, favorita invece da caratteristiche idrofile. La lipofilia dei farmaci è una delle caratteristiche che fa ipotizzare il loro possibile effetto tossico nell'ambiente: permette di attraversare le membrane biologiche degli organismi senza alterarsi, di accumularsi negli organismi e concentrarsi lungo le reti alimentari (12).

Il farmaco viene prodotto, inoltre, con lo scopo primario di indurre, a determinate concentrazioni, un effetto biologico specifico, che però può manifestarsi anche su altri organismi (inclusi i batteri) con i quali viene in contatto. Infatti, la presenza di antibiotici nell'ambiente contribuisce a selezionare ceppi resistenti nell'ambito della flora commensale, non patogena, con possibilità che queste resistenze vengano trasmesse ai patogeni (1, 13). Il trasferimento orizzontale della resistenza limita l'efficacia dei trattamenti, e comporta rischi anche per la salute umana.

Oltre a ciò, mentre le sostanze organiche naturali possono essere completamente degradate dai microrganismi presenti nell'ambiente (terreno, piante, acqua), che le utilizzano come fonte di energia e di carbonio, le sostanze di sintesi, tra cui i farmaci di più recente acquisizione, possono andare incontro a una parziale degradazione, che permette loro di mantenere attività biologica, ma anche possedere grande resistenza metabolica che impedisce di subire degradazione biologica e quindi divenire responsabili di fenomeni di inquinamento come conseguenza dell'accumulo nell'ambiente. In uno studio del 1996, sono stati identificati in campioni ambientali 25 tipi differenti di antibiotici per arrivare a 68 nel 1999, il range di concentrazione di queste sostanze nell'ambiente è dell'ordine di ng/L e associato spesso a matrici complesse (suolo, sedimento, ecc.) (14).

Sorprendentemente si conosce poco dell'effetto sull'ambiente dei medicinali usati in zootecnia e acquacoltura. Questo dipende soprattutto dal fatto che, a differenza dei prodotti usati in agricoltura, fino a pochi anni fa per brevettare farmaci per l'allevamento intensivo non era necessaria alcuna verifica di impatto ambientale. La maggior parte dei medicinali ad uso zootecnico e per l'acquacoltura oggi in uso non è perciò stata saggiata per valutarne l'ecotossicità sull'ambiente (15).

Acquacoltura intensiva

L'allevamento implica forme di intervento finalizzate ad incrementare la produzione, quali, la somministrazione di cibo, la protezione dai predatori, la semina, ecc. e il confinamento degli organismi allevati.

La realtà operativa, la sperimentazione e la ricerca hanno ormai codificato tre tipologie di acquacoltura o maricoltura:

- a) acquacoltura di tipo estensivo;
- b) acquacoltura di tipo semi-intensivo;
- c) acquacoltura di tipo intensivo.

Si definisce "estensivo" un allevamento in cui non si ha alcun apporto alimentare da parte dell'uomo e il cibo è tratto esclusivamente dall'ambiente. È la forma più economica e naturale di acquacoltura, di grande e antica tradizione e capace di attivare aspetti collaterali di valorizzazione turistico-paesaggistica. Questa forma di acquacoltura è possibile nelle aree

costiere o prossimali alla costa che, per la loro geomorfologia particolare, presentano bacini, avvallamenti naturali del terreno (le cosiddette valli di pesca da cui il termine “vallicoltura) e comunicazioni con il mare attraverso le quali avviene lo scambio d’acqua e di risorse, sia in direzione mare-terra che viceversa.

L’intervento umano consiste fondamentalmente nel favorire la montata naturale autunnale di giovani pesci, che dal mare si muovono verso le lagune, nella loro cattura e nel mantenere vivo e vitale il bacino in cui viene effettuato l’allevamento provvedendo, laddove necessario, a favorire la circolazione idraulica.

L’allevamento “semi-intensivo” prevede l’integrazione del cibo disponibile nell’ambiente con alimenti generalmente a bassa tecnologia e ridotto contenuto proteico.

Infine, nell’allevamento “intensivo” l’alimentazione è totalmente fornita dall’esterno.

L’allevamento intensivo può essere effettuato in vasche a terra o in gabbie in mare. L’acquacoltura in vasche a terra è un’attività che comporta alta tecnologia e alti costi in termini non solo di strutture, ma anche di energia. Le acque marine salmastre devono essere infatti prelevate dal mare o bacini o pozzi salmastri, previo trattamento di depurazione e reimmesse dopo l’utilizzo; sono necessari, quindi, impianti di trattamento delle acque di scarico che risultano cariche di nutrienti quali azoto e fosforo, causa, nei corpi idrici recettori, di problemi di eutrofizzazione. Di recente si sta affermando la piscicoltura in mare, in gabbie galleggianti, per fattori sia di tipo economico, perché comporta investimenti di capitale inferiori rispetto agli impianti a terra a parità di volume produttivo (16).

Impatto ambientale dell’acquacoltura

Come già osservato l’acquacoltura, salvo che per gli impianti a circuito chiuso, è strettamente correlata alle risorse ambientali confinanti. Le normali attività produttive di acquacoltura comportano una continua immissione (diretta o indiretta) di elevate quantità di nutrienti e di farmaci negli ecosistemi acquatici confinanti. In particolare negli impianti intensivi in mare aperto anche il mangime medicato non consumato contribuisce all’immissione di questi composti nell’ambiente.

La quantificazione dell’impatto ambientale risulta difficile in quanto dipende da differenti fattori quali: la densità di allevamento, il tipo di alimento, il regime alimentare e, nel caso delle gabbie, anche dall’idrodinamismo e dalla profondità nell’area interessata. In linea generale le conseguenze delle attività di acquacoltura sull’ambiente sono determinate dalla relazione tra quantità e natura dei prodotti di rifiuto e stato del corpo idrico recettore dei reflui.

I potenziali impatti possono riguardare: la massa d’acqua, il sedimento, le comunità naturali e altri aspetti (uso dell’acqua, pesca, paesaggio, ecc.) (16).

Tra i possibili effetti si riscontrano: aumento della torbidità delle acque; variazione del pH; riduzione dell’ossigeno disciolto; crescita batterica e fenomeni di eutrofizzazione per l’aumento dei nutrienti, dovuto all’escrezione e all’accumulo di alimento non consumato ricco di antiossidanti, vitamine e antibiotici (tetracicline, macrolidi, aminoglicosidi, cloramfenicolo, β -lattamici, sulfamidici, chinoloni, nitrofurani).

Oltre alla contaminazione dovuta al mangime e alle deiezioni, va considerato l’uso di prodotti chimici per la protezione delle strutture che possono avere un impatto sull’ambiente circostante dovuto principalmente alla deposizione di tali sostanze nei sedimenti.

I sedimenti sono una struttura semi-solida comprendente minerali, materiale organico, acqua interstiziale e numerosissime componenti fisiche, chimiche e biologiche, organizzate in micro e macro strutture.

Il ruolo significativo che i sedimenti giocano negli ecosistemi acquatici è, dunque, imputabile alla presenza di un gran numero di batteri per grammo di sedimento che, nello spazio di qualche millimetro, occupano nicchie critiche in cui decompongono, metabolizzano e riciclano specifici composti organici, azoto, zolfo, metano, acidi organici e idrogeno depositati sul fondo; partecipando ai cicli biogeochimici e agli apporti di fattori nutritivi ai livelli trofici superiori.

La dimensione e la diversità delle comunità microbiche variano a seconda della profondità. Il numero dei batteri è inversamente proporzionale alla profondità, anche perché gli strati superiori del sedimento sono aerobi, mentre quelli inferiori anaerobi, con conseguente presenza di batteri quali *Clostridium*, *Desulfovibrio* e metanogeni.

L'accumulo dei prodotti organici di rifiuto (valutati spesso come TOC, *Total Organic Carbon*) sotto le gabbie galleggianti porta inizialmente ad un arricchimento della fauna bentonica aerobica che determina, per effetto dell'attività eterotrofa dei batteri, un aumento della domanda di ossigeno biologico (BOD, *Biological Oxygen Demand*). I gas e le sostanze solubili, prodotti in queste zone profonde dalla degradazione microbica, possono invece risalire fino agli strati più superficiali (zone di produttività) e stimolare l'attività di altri gruppi microbici. Se invece il materiale organico si accumula più velocemente di quanto non venga degradato, il livello dell'ossigeno diminuisce. Il perdurare di questa situazione porta allo sviluppo della componente batterica anaerobica, con aumento di idrogeno solforato e metano che, rilasciati dai sedimenti, non solo alterano le caratteristiche del sistema (es. il pH) ma possono anche risultare direttamente tossici per altri organismi acquatici.

Attività sperimentale

La dispersione di medicinali e altri agenti chimici nelle pratiche di allevamento contribuisce ad alterare la comunità batterica selezionando ceppi microbici resistenti: la presenza di tali microrganismi resistenti può essere un indice della contaminazione, anche pregressa, di una qualche matrice ambientale con tracce di farmaco. In uno dei nostri progetti abbiamo determinato, assieme alla presenza di farmaci nei sedimenti, la quota di ceppi microbici resistenti allo stesso farmaco in un'area di acquacoltura intensiva sia a mare sia a terra. Sono stati studiati i microrganismi eterotrofi aerobi, che rappresentano una quota consistente della comunità e sono quindi un utile strumento di monitoraggio delle comunità microbiche. Il farmaco scelto è stato la Flumequina, antibiotico di sintesi appartenente alla classe dei fluorochinoloni (17), che solo a partire dalla metà degli anni '90 viene utilizzato anche in Italia in acquacoltura intensiva; è stato scelto in quanto la resistenza ai chinoloni non può essere trasmessa attraverso elementi genetici trasferibili ma si ottiene per selezione di mutazioni successive già presenti nelle grandi popolazioni batteriche (18).

Dunque il lavoro è stato articolato su due set di dati: uno chimico-analitico relativo alla presenza di residui di Flumequina nel sedimento, e uno microbiologico, relativo alla frequenza di ceppi resistenti tra i microrganismi coltivati.

Questi dati possono dare indicazioni sui rischi per gli ambienti naturali e la salute umana, ma anche una valutazione dei possibili danni all'economia delle attività di acquacoltura, dovuto alla selezione di ceppi resistenti tra i batteri patogeni dei pesci.

Sono state effettuate 4 campagne di campionamento nell'inverno e nell'estate del 2001 e del 2002, e sono stati raccolti in totale 68 campioni (31 in inverno-autunno; 37 in estate-primavera) da un'area di circa 500 m intorno alle gabbie galleggianti. Il campionamento è stato effettuato con una benna Petersen da 25 cm³. Un litro di sedimento veniva raccolto, posto in bottiglie di plastica conservate al fresco e al buio. I campioni sono stati rapidamente trasferiti in laboratorio

per l'analisi microbiologica, effettuata entro 24 ore dal campionamento, il rimanente veniva conservato a -20 °C per le analisi chimiche, effettuate in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) - rilevatore Fluorimetrico.

Analisi microbiologica

Per l'analisi microbiologica 5 g di sedimento erano diluiti serialmente (1:5; 1:25; 1:125; 1:625) in acqua di mare sterile e 0,1 mL di ciascuna diluizione erano piastrati su agar marino per la conta batterica. La diluizione 1:5 era piastrata anche su agar marino addizionato con 10 µg/mL di Flumequina per contare gli organismi resistenti. Le piastre venivano tenute a 24 °C per 3 giorni, al buio. Le colonie cresciute su entrambi i terreni sono state contate dopo 2-3 giorni e riportate come unità formanti colonie (CFU) per grammo di sedimento. Sulla base della loro diversa morfologia, sono state isolate 975 colonie (419 dai campionamenti invernali e 563 da quelli estivi). Le colonie isolate sono state identificate secondo il colore e altri caratteri fenotipici (Gram, motilità, presenza di citocromo ossidasi, attività emolitica, utilizzo del lattosio e del fruttosio, ovvero crescita su Mac Conkey Agar e su TCBS cholera medium). Sulla base della risposta, ciascun ceppo è stato identificato in tipi differenti: in totale ne sono stati identificati 236 (169 in inverno e 141 in estate).

Tutte le colonie sono state saggiate per determinare la loro MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) per la Flumequina, da 0,008 a 128 µg/mL.

Analisi chimiche

L'analisi chimica della Flumequina nel sedimento è stata effettuata in HPLC - rilevatore Fluorimetrico. Il sedimento è stato seccato a 40 °C per 4 giorni; 5 g di sedimento (addizionato con 100 ng di Acido Ossolinico, come standard interno) sono stati estratti e purificati secondo il metodo di Sørensen and Hansen (2001); il residuo portato a secco in flusso d'azoto e risospeso in 100 µl di metanolo. 50 µl venivano iniettati in un sistema Water 600, con colonna LiChrocart (5 µm) 100 RP-18 (250 x 4 mm) e rilevatore Fluorimetrico (Water 466). Le condizioni cromatografiche erano le seguenti: fase mobile acetonitrile (80%)/acido ossalico 0,035 M (pH 2,2) 2:8 all'inizio della corsa. Gradiente lineare dopo il 1° minuto fino al 100% di acetonitrile al 15° minuto; ritorno alle condizioni iniziali in 3 min. Flusso: 0,75 mL/min; loop: 50 µl; rilevatore fluorimetrico impostato a $\lambda_{ex} = 327$ nm; $\lambda_{em} = 369$ nm. Tassi di recupero attorno al 70%; LOD (*Limit Of Determination*) = 20 ng.

Risultati

Nei campioni di sedimento sono stati rilevati sia la presenza di ceppi resistenti alla Flumequina (10 µg/mL) nella comunità microbica eterotrofa aerobia, sia residui del farmaco. Le conte batteriche totali su terreno non selettivo sono abbastanza costanti, tra $4,1 \times 10^3$ e $2,5 \times 10^4$ in inverno e $2,6 \times 10^3$ e $4,7 \times 10^4$ CFU/g in estate. I ceppi resistenti alla Flumequina sono presenti in tutti i campioni, tra $1,0 \times 10^2$ e $1,2 \times 10^4$ nei campioni invernali e tra $5,0 \times 10^2$ e $8,5 \times 10^3$ nei campioni estivi. Quindi la resistenza si rileva nella grande maggioranza dei ceppi isolati (82,07% dei 975 ceppi isolati in totale – il 82,7% in inverno e l'81,4% in estate – sono in grado di crescere in presenza di concentrazioni ≥ 4 µg/mL di Flumequina); la loro MIC è generalmente tra 16-32, 64-128 µg/mL, sebbene alcuni ceppi siano in grado di crescere a concentrazioni > 128 µg/mL di Flumequina

Le analisi chimiche mostrano che in totale il 61,76% dei campioni analizzati contiene concentrazioni < 5 ng/g, il 38,82% contiene concentrazioni tra 5 e 10 ng/g, e il 4,41% contiene concentrazioni > 10 ng/g di Flumequina.

Discussione e conclusione

Le analisi del sedimento in un'area di attività di acquacoltura hanno mostrato alterazioni ambientali che possono essere collegate all'uso di Flumequina nell'allevamento intensivo dei pesci.

La presenza di ceppi batterici resistenti a 10 µg/mL di Flumequina è diffusa sia su scala spaziale che temporale: si trovano in tutti i campioni e in entrambe le stagioni. La percentuale di ceppi resistenti è, per la gran parte dei casi, inferiore al 30%, ma in alcuni casi sale fino al 99%. Anche la presenza di residui di Flumequina è diffusa e le concentrazioni sono sempre abbastanza basse da permettere la selezione di resistenti senza importanti effetti tossici.

Questi risultati indicano la possibile selezione di ceppi resistenti dovuta alla presenza dei residui di antimicrobico (che entrano nell'ambiente con le deiezioni e con il mangime medicato non mangiato) nel sedimento. In linea generale questi dati possono fornire indicazioni: a) sul rischio per gli ambienti naturali, in relazione alla possibile modificazione delle comunità batteriche naturali, coinvolte in molti processi, incluso il riciclo dei nutrienti; b) sui possibili danni economici per le stesse attività di acquicoltura, dovuti alla selezione di ceppi resistenti tra i batteri patogeni dei pesci, ma anche, in prospettiva; c) dei possibili rischi futuri per la salute umana dovuto al diffondersi delle resistenze.

Bibliografia

1. Achene L, Agrimi U, Bozzano A, Caprioli L. Reflui zootecnici e inquinamento. Il caso del bacino idrografico del Po. *Documenti veterinari* 1989;9:49-55.
2. Monno R, Costi A, De Nicolò T, Corrente M. Uso di antibiotici in campo veterinario: un ulteriore contributo all'emergenza di resistenze nei batteri. *Giornale Italiano di Microbiologia Medica Odontoiatrica e Clinica* 2003;7(2):109-14.
3. Hektoen H, Berge JA, Hormazabal V and Yndestad M. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 1995;133:175-84.
4. Sczesny S, Nau H, Hamscher G. Residue analysis of tetracycline and their metabolites in eggs and in the environment by HPLC coupled with a microbiological assay and tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2003;51:697-703.
5. Migliore L, Brambilla G, Cozzolino S, Gaudio L. Effects of Sulphadimethoxine for agriculture on plants (*Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*). *Agric Ecosyst Envir* 1995;52:103-10.
6. Migliore L, Lorenzi C, Civitareale C, Laudi O, Brambilla G. Flumequine and marine ecosystem: aquaculture output and toxicity to *Artemia salina* (L.). In: *SITE. Atti del VI Congresso Nazionale della Società Italiana di Ecologia*; Venezia, 26-29 settembre 1994. 1995;p. 365-67.
7. Migliore L, Brambilla G, Civitareale C, Dojmi di Delupis G. Toxicity of several important antibiotics to *Artemia*. *Water Research* 1997;31(7):1801-906.
8. Migliore L, Civitareale C, Brambilla G, Cozzolino S, Casoria P, Gaudio L. Effect of Sulphadimethoxine on cosmopolitan weeds (*Amaranthus retroflexus* L, *Plantago major* L, *Rumex acetosella* L.). *Agric Ecosyst Envir* 1997;65(2):163-68.
9. Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. Phytotoxicity to and uptake of Flumequine used in intensive aquaculture on the aquatic weed, *Lythrum salicaria* L. *Chemosphere* 2000;40:741-50.

10. Migliore L, Alessi E, Busani L, Caprioli A. Effects of the use of Flumequine in aquaculture: microbial resistance and sediment contamination. *Fresenius Environ Bull* 2002;11(9):557-61.
11. Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere* 2003;52(7):1233-44.
12. Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lutzhoft HC, Jørgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in environment. A review. *Chemosphere* 1998;36(2):357-93.
13. Barbosa TM, Levy ST. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug resistance updates* 2000;3:303-11.
14. Jørgensen SE, Halling-Sørensen B. Drugs in the environment. *Chemosphere* 2000;40:691-9.
15. Jjemba PK. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Agric Ecosyst Envir* 2002;93:267-78.
16. Cataudella S, Carrara GC. *Un mare di risorse. Introduzione alla conservazione e alla gestione delle risorse ittiche*. Roma: UNIPROM; 2000.
17. Quevauviller P, Maier EA, Boenke A. Quality assurance of sampling and sample pre-treatment for soil and sediment analysis. *Quin Anal* 1994;13:124-31
18. Hooper D. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis* 2002;2:530-38.
19. Sørensen LK, Hansen H. Determination of oxolinic acid in marine sediment by HPLC with fluorescence detection. *J Liq Chrom Rel Technol* 2001;24(2):469-76.

ZOONOSI PARASSITARIE TRASMESSE DA PRODOTTI ITTICI

Edoardo Pozio

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Le infezioni parassitarie legate al consumo di prodotti ittici rappresentano un grave problema di salute pubblica a livello mondiale. Infatti, l'Organizzazione Mondiale della Sanità stima una prevalenza di circa 60 milioni di casi a livello mondiale e una popolazione esposta al rischio di infezione di circa 400 milioni. In Italia la situazione è nettamente più favorevole soprattutto per le abitudini alimentari che non contemplano il consumo di elevate quantità di prodotti ittici crudi o poco cotti sia di origine marina che di acque dolci. Al problema delle infezioni vere e proprie acquisite per consumo di prodotti ittici, bisogna aggiungere il recente aumento delle allergie legate al consumo di prodotti ittici infetti da parassiti, anche se questi sono stati devitalizzati con la cottura.

In Italia, per molte di queste infezioni parassitarie trasmesse dai prodotti ittici non sono mai stati raccolti dati epidemiologici sulla prevalenza per permettere una stima del rischio per il consumatore. Per alcuni parassiti la loro presenza si basa su più o meno frequenti episodi di infezioni nell'uomo o sulla base della prevalenza nei prodotti ittici.

Tuttavia poiché l'obiettivo è quello di fornire al consumatore prodotti ittici non infetti come anche riportato nel libro bianco della Commissione Europea sulla sicurezza alimentare, il personale addetto al controllo deve essere in grado di conoscere e mettere in pratica tutte le metodologie necessarie a scongiurare la trasmissione di questi patogeni all'uomo. Ne consegue la necessità di continuare ad investire nella formazione e nelle procedure di controllo per garantire un alimento ittico esente da parassiti. A questa situazione di ipoendemia in Italia, bisogna però aggiungere il mutare delle abitudini alimentari sia degli italiani sia di soggetti provenienti da altri Paesi e l'aumento di importazioni di prodotti ittici da Paesi ad elevata endemia per queste parassitosi. Da qui l'importanza nella valutazione dell'igienicità di un alimento e di procedere ad esami parassitologici correlati anche alla natura e modalità di consumo dell'alimento stesso.

Parassiti presenti nei prodotti ittici delle acque dolci

Botriocefalo (*Diphyllobothrium* sp.)

La botriocefalosi è causata da diverse specie di cestodi (vermi piatti) appartenenti al genere *Diphyllobothrium*. *Diphyllobothrium latum* è certamente quella più importante, sebbene la tassonomia delle specie appartenenti a questo genere sia in corso di studio. Si tratta di vermi di medie e grandi dimensioni. La testa (detta scolice) è provvista di 2 botrii (solchi allungati) generalmente ben sviluppati, occasionalmente ridotti a delle sottili pieghe. *D. latum* ha uno scolice piuttosto appiattito (a forma di spatola) e un collo sviluppato, lungo circa 8 mm. Il corpo del verme (detto strobilo) di *D. latum* è generalmente lungo più di 5 metri, ma facilmente

raggiunge i 10 metri con oltre 3.000 proglottidi. La larghezza dei segmenti è superiore a 15 mm e lo strobilo si allarga gradualmente a partire dalla metà anteriore. *D. dendriticum* mostra una estrema variabilità di dimensioni in relazione alla specie ospite; nelle infezioni umane raggiunge i 2 m di lunghezza, ha uno scolice di forma lanceolata o a spatola e ha un collo molto ridotto. Lo strobilo si allarga rapidamente a partire dal terzo anteriore e i segmenti hanno una larghezza minima di 20 mm. A differenza di altre tenie che infettano l'uomo, i cestodi della famiglia Diphylobothriidae non rilasciano le proglottidi gravide ma le uova opercolate vengono emesse direttamente attraverso un poro uterino. Le uova racchiudono un embrione immaturo, che per svilupparsi necessita di un ambiente acquatico. Al momento della loro eliminazione le uova di *D. latum* misurano 58-76 x 40-51 µm e sono di colore bruno dorato.

Ciclo

Il ciclo di sviluppo richiede la presenza di due ospiti intermedi, il primo è un crostaceo copepode e il secondo un pesce di acqua dolce. A distanza di 15 giorni dalla loro emissione, nell'uovo si sviluppa un embrione ciliato (detto coracidio). Per la sopravvivenza delle uova e lo sviluppo del coracidio sono necessarie acque dolci ben ossigenate che non ghiacciano nel periodo invernale. Tuttavia, le uova di *D. latum* possono svilupparsi anche in acque profonde in cui la tensione di ossigeno è ridotta. La temperatura ottimale di incubazione è compresa tra 18 e 20 °C. Al di sopra dei 20 °C aumenta la mortalità delle uova e decresce la sopravvivenza del coracidio, al di sotto dei 7 °C lo sviluppo è notevolmente rallentato. Il coracidio per poter proseguire il suo sviluppo deve essere ingerito entro 12 ore da un copepode (genere *Cyclops* in Europa). Il coracidio attraversa l'intestino medio del copepode e si localizza nella cavità celomatica del crostaceo in cui si trasforma in circa 2-3 settimane in una larva procercoide. I pesci d'acqua dolce si infettano ingerendo i copepodi infetti dal procercoide. Queste larve si localizzano nei muscoli, gonadi, cavità celomatica, fegato e altri organi del pesce ed evolvono allo stadio successivo denominato plerocercioide o spargano. I grossi pesci predatori a loro volta contraggono l'infezione nutrendosi di pesci di taglia inferiore portatori di plerocercoidi. Queste larve una volta ingerite dal nuovo ospite perforano l'intestino e si localizzano nei muscoli o in altri organi subendo un ulteriore processo di reincapsulamento. I plerocercoidi vivono molto a lungo e possono accumularsi nei tessuti, ne consegue che i pesci predatori possono presentare delle cariche infettanti anche molto elevate. Il plerocercioide è una larva di aspetto vermiforme di dimensioni variabili (plerocercioide di *D. latum* > 5cm, plerocercioide di *D. dendriticum* >15-20 cm) provvista già di uno scolice completamente retratto in *D. latum* o parzialmente retratto in *D. dendriticum*. L'uomo e gli altri ospiti definitivi contraggono l'infezione consumando pesce crudo o insufficientemente cotto. Nell'intestino dell'ospite definitivo, incluso l'uomo, i plerocercoidi estroflettono lo scolice che aderisce alla mucosa intestinale e si trasformano in vermi adulti e iniziano a deporre le uova. Per *D. latum*, il periodo di prepatenza nell'uomo è di 3-6 settimane.

Epidemiologia

Tra gli ospiti definitivi di *D. latum* oltre all'uomo anche il cane e il gatto possono essere parassitati ma il loro ruolo nel ciclo del parassita è abbastanza limitato. Infatti, il cestode sopravvive solo una decina di mesi nell'intestino del cane e nel gatto dove raramente raggiunge la maturità e non è in grado di produrre uova. Nell'ambiente selvatico, gli ospiti definitivi sono gli uccelli piscivori e tra i mammiferi l'orso e la volpe. I pesci che possono trasmettere l'infezione all'uomo appartengono alle famiglie dei percidi (pesce persico, *Perca fluviatilis*; acerina, *Gymnocephalus cernua*; lucioperca, *Stizostedion lucioperca*), esocidi (lucio, *Esox* spp.), gadidi (bottatrice, *Lota lota*) e salmonidi (*Trota iridea*, *Salmo gairdneri*; trota comune,

Salmo trutta). Tuttavia, a seconda della specie ittica varia il numero di plerocercoidi, così come varia la localizzazione nei diversi organi o tessuti. Nel luccio, i plerocercoidi (fino a 150 larve) sono distribuiti preferenzialmente nella cavità celomatica soprattutto a carico delle gonadi. Nella bottatrice invece l'infezione è massiva (sono stati isolati fino a un migliaio di plerocercoidi per pesce) ma le larve si distribuiscono in maniera più uniforme tra muscolo e visceri. Ne consegue che, a seconda delle abitudini culinarie, l'infezione umana può essere contratta non solo mangiando le parti muscolari non cotte o poco cotte ma anche degustando uova o gonadi di pesci solamente salate. Le specie ittiche risultate portatrici di plerocercoidi di *D. dendriticum* sono la trota iridea, il salmone rosso (*Oncorhynchus nerka*), il salmerino di lago (*Salvelinus namaycush*), il salmerino alpino (*Salvelinus alpinus*) e alcune specie di coregonidi. Anche i pesci che compiono migrazioni tra il mare e le acque dolci possono essere fonte di infezione per l'uomo.

Le regioni in cui si riscontra l'infezione umana sono localizzate nelle regioni subartiche e temperate dell'Eurasia con prevalenze elevate nell'Europa dell'est e negli stati della Federazione Russa. Focolai endemici sono presenti in Siberia. Nel resto dell'Europa e dell'Asia la prevalenza è modesta e l'infezione viene talvolta riscontrata tra le popolazioni che vivono nelle aree circostanti i grandi laghi o i fiumi. Si stima che questo parassita infetti 13 milioni di persone a livello mondiale. In Italia, *D. latum* è stato individuato nei grandi laghi del Nord e in particolare nel Lago Maggiore, di Como e d'Iseo in cui si ritiene che il parassita sia endemico. Il progressivo aumento dell'inquinamento delle acque degli affluenti e dei bacini lacustri stessi sembra rappresentare il fattore principale della riduzione della prevalenza di questa elmintosi per la sua influenza sulle popolazioni dei crostacei (primo ospite intermedio) e di alcune specie di pesci. Tuttavia nell'ultimo decennio è stato osservato un aumento delle infezioni umane (circa un centinaio) nelle località rivierasche dei laghi subalpini al confine italo-svizzero. Tutte le infezioni erano state causate dal consumo di pesce persico. L'incremento del consumo di pesce crudo (filetti di pesce persico al limone, carpaccio, tartare o insalate di pesce crudo) possano avere avuto un ruolo importante nella riemersione di questa infezione.

Infezione nell'uomo

Le infezioni umane da *D. latum* sono generalmente sostenute da un solo esemplare che si fissa alla mucosa dell'ileo e più raramente a quella del digiuno. Il parassita raramente può causare ostruzione intestinale. La parassitosi decorre nella maggiore parte dei casi in forma subclinica. La sintomatologia, estremamente variabile, si manifesta 1-3 settimane dall'ingestione del pesce infetto ed è caratterizzata da disturbi nervosi, acuto senso di fame, ripienezza epigastrica, perdita di appetito, anoressia, nausea, vomito, diarrea alternata a stipsi, dolori addominali, perdita di peso, debolezza e anemia. La complicazione più grave in corso di diphyllobotriosi è una anemia megaloblastica che viene diagnosticata nel 2% dei pazienti. L'anemia è generalmente osservata nei casi in cui il cestode si impianta a livello di digiuno ed entra in competizione con l'ospite per quanto riguarda l'assorbimento della vitamina B12. *D. latum* è in grado di assorbire dall'80 al 100% di una dose di vitamina B12 radioattiva somministrata per via orale all'ospite. La sintomatologia nei soggetti affetti è quella di un'anemia perniziosa ipercromica ed è caratterizzata da ittero, febbre, glossite, edemi, emorragie, debolezza e parestesie.

Diagnosi

La diagnosi viene generalmente effettuata mediante il riscontro delle uova opercolate (70 x 50 µm) nelle feci. Le dimensioni e la forma delle uova, sono tipiche di questi cestodi ma non consentono di identificare la specie che è invece possibile identificare solo attraverso lo studio

dello scolice e della struttura delle proglottidi mature. La diagnosi può essere inoltre effettuata dall'esame di proglottidi o parti dello strobilo che il soggetto infetto rilascia spontaneamente. Non è possibile effettuare una diagnosi su base clinica per la mancanza di segni e sintomi patognomici ma informazioni anamnestiche quali la residenza in un'area endemica e il consumo di pesce crudo possono indirizzare il clinico verso un sospetto di diphyllotriosi.

Trattamento delle infezioni umane

La niclosamide (Yomesan) è il farmaco di scelta (2 g in dose singola) che può essere utilizzato anche in gravidanza e nei soggetti fortemente debilitati. Rari sono gli effetti collaterali quali dolori addominali, nausea e prurito. Altri farmaci efficaci sono la paramomicina (Humatin, 1 g ogni 4 ore qid) e il praziquantel (Biltricide, 10 mg/kg). L'efficacia del trattamento farmacologico è confermata dall'espulsione dell'intero parassita compreso lo scolice, se quest'ultimo non viene ritrovato nelle feci è necessario ricontrollare lo stato di infezione del soggetto tre mesi dopo la somministrazione del farmaco.

Profilassi

La migliore profilassi è l'educazione sanitaria mirante ad evitare il consumo di pesce d'acqua dolce crudo. Il congelamento tra -10 e -20 °C nella parte interna del pesce per almeno 6 ore è in grado di devitalizzare gli spargani. Anche la salagione con una concentrazione del 7% o più è sufficiente a devitalizzare le forme larvali presenti nei muscoli del pesce. La salagione con una quantità di sale del 35-45% in rapporto al peso del pesce è in grado di devitalizzare gli spargani in 4-8 giorni ad una temperatura di 10-15 °C; una concentrazione salina del 35-40% in ghiaccio ad una temperatura di -3 - -5 °C è in grado di devitalizzare gli spargani in pesci di 3 kg in 7-10 giorni. Tuttavia per pesci di peso superiore ai 4 kg necessitano 35-39 giorni. Il pesce che deve essere consumato crudo deve essere prima congelato. Nelle aree in cui l'infezione è endemica, è necessario informare i consumatori sul rischio di infezione legato al consumo di pesce crudo d'acqua dolce ma anche di salmone. La prevenzione di questa parassitosi in area endemica deve essere effettuata mediante il controllo ispettivo dei pesci commercializzati.

Opistorchide (*Opisthorchis felineus*)

Il verme adulto di *Opisthorchis felineus* è di colore arancione, piatto, lanceolato, lungo circa 1 cm, largo 2-2,5 mm. Questo trematode vive nelle vie biliari di alcuni carnivori e dell'uomo. Le uova, di 30 x 12 µm di diametro, opercolate, sono già mature quando vengono espulse con le feci.

Ciclo

Quando le uova vengono ingerite da molluschi d'acqua dolce del genere *Bulinus* (primo ospite intermedio), il primo stadio larvale (detto miracidio) esce dal guscio nel loro intestino, entra nei tessuti del mollusco (primo ospite intermedio) e si trasforma in una sporocisti da cui prendono origine le redie (secondo stadio larvale). Dalle redie si sviluppano nella stagione calda le cercarie (terzo stadio larvale) lunghe circa 0,6 mm, ocellate, con la coda carenata; si concentrano sul fondo di stagni e altri corsi di acqua e si attaccano al tegumento di varie specie di pesci d'acqua dolce (secondo ospite intermedio), penetrano perdendo la coda e si incistano nei muscoli. Dopo circa 6 settimane le metacercarie sono mature e quando il pesce infestato viene ingerito crudo esse emergono dalle cisti nel duodeno dell'ospite definitivo. Di qui le larve risalgono i dotti biliari, dove maturano in poco più di tre settimane.

Epidemiologia

Questo trematode è diffuso in prossimità di laghi e corsi d'acqua in vari Paesi della Federazione Russa (principalmente Ucraina e Kazakistan), dove si stima una prevalenza di circa 1,6 milioni. Infezioni sporadiche sono state segnalate in viaggiatori al loro rientro da zone endemiche che si sono nutriti di pesci cucinati secondo le abitudini locali, specialmente insalate contenenti pesce crudo d'acqua dolce sminuzzato. Numerosi specie di pesci d'acqua dolce fungono da secondo ospite intermedio, e alcune di queste specie hanno un ruolo rilevante nelle tradizioni alimentari delle aree endemiche. Carpe e tinche sono i più importanti ospiti di *O. felineus*. Le specie più comuni appartengono alla famiglia Cyprinidae. Recentemente sono stati descritti alcuni casi di infezione umana per consumo di pesce pescato da un lago dell'Italia centrale. Si ritiene che queste infezioni siano state causate dall'introduzione di pesci provenienti da regioni endemiche o da immigrati infetti provenienti da queste regioni le cui feci abbiano contaminato le acque del lago dove sono presenti gli ospiti intermedi necessari al completamento del ciclo del parassita.

Clinica

Il quadro clinico è caratterizzato da anoressia, problemi di digestione, dolori addominali aspecifici per lo più localizzati al quadrante superiore destro, stanchezza e perdita di peso, diarrea, episodi di ittero con o senza febbre. Nei casi avanzati si sviluppano ipertensione portale, infiammazione cronica e iperplasia dell'epitelio delle vie biliari, compresa la possibile invasione del dotto pancreatico. La cirrosi del fegato, o anche il colangiocarcinoma, possono sopraggiungere a complicare i quadri tardivi della malattia. *Opisthorchis felineus* vive nei canalicoli biliari distali, soprattutto nel lobo destro del fegato, dove può sopravvivere fino a 15 anni. La patogenicità è dovuta ad azioni spogliatrici, distruttive e meccaniche (di scarsa importanza nelle infezioni lievi), irritative (proliferazione dell'epitelio biliare, iperplasia del connettivo periportale e formazione di capsule connettivali attorno a nidi di uova deposte nei tessuti) e tossemiche (alterazioni delle pareti dei capillari biliari, anche se non raggiunti direttamente dai trematodi).

L'uomo tollera abbastanza bene fino a qualche centinaio di questi parassiti; ma in limitate zone iperendemiche migliaia di questi vermi provocano ostruzione dei canali biliari, estesa distruzione del parenchima epatico e grave fibrosi con ipertensione portale. Il fegato è soggetto ad ascessi e ad infezioni batteriche secondarie. Talvolta i parassiti raggiungono anche il pancreas. Nei casi gravi la letalità raggiunge il 16%; lo stato di malattia può perdurare per anni dopo la morte dei parassiti.

Diagnostica

La diagnosi si basa sulla ricerca delle uova nelle feci. La sensibilità dell'esame può essere aumentata da metodi di concentrazione come il formolo-etere.

Trattamento

Il praziquantel (Biltricide, 25 mg per kg 3 volte al dì per 2 giorni) è estremamente efficace verso questi vermi trematodi.

Parassiti presenti nei prodotti ittici di origine marina

Vermi nematodi della famiglia Anisakidae

L'anisakiasi è una zoonosi dovuta a forme larvali di nematodi ascaridoidei appartenenti ai generi *Anisakis* e *Pseudoterranova*. Le larve del genere *Anisakis* al terzo stadio (L3), biancastre di 15-30 mm di lunghezza, possono essere identificate a livello di genere per l'esofago diviso in una parte muscolare e in una parte ghiandolare (ventricolo); le larve del genere *Pseudoterranova*, zone di colore rossastro di 20-40 mm di lunghezza, con un esofago muscolare seguito da un breve ventricolo ghiandolare e un'appendice intestinale diretta anteriormente. L'identificazione delle larve a livello di specie invece è possibile solo mediante marcatori molecolari. Le specie *Anisakis simplex* e *Pseudoterranova decipiens*, ritenute i principali responsabili dell'anisakiasi umana sono complessi di specie: *Anisakis simplex* s.s., *Anisakis pegreffii* e *Anisakis simplex C* e *Pseudoterranova decipiens* s.s., *Pseudoterranova krabbei*, *Pseudoterranova azarasi* e *Pseudoterranova bulbosa*. Queste specie differiscono per la struttura genetica, preferenza d'ospite e distribuzione geografica. L'importanza epidemiologica per l'uomo delle diverse specie, la loro specificità e patogenicità per l'uomo sono tuttora da chiarire.

Ciclo

Le forme adulte vivono nello stomaco di mammiferi marini (ospiti definitivi) e producono uova che eliminate con le feci liberano larve di secondo stadio (L2) che, ingerite da varie specie di crostacei, si sviluppano in larve L3. Pesci e cefalopodi si infettano ingerendo crostacei parassitati. I mammiferi marini (principalmente cetacei per il genere *Anisakis* e pinnipedi per il genere *Pseudoterranova*) si infettano ingerendo pesci e/o cefalopodi parassitati. L'uomo si inserisce in questo ciclo biologico, come ospite accidentale, infettandosi con le larve vive presenti sui visceri e/o nella muscolatura dei pesci, nella quale migrano qualche ora dopo la morte dell'ospite.

Epidemiologia

L'anisakiasi umana ha assunto un'importanza sanitaria ed economica sempre maggiore in particolare in Paesi, quali il Giappone, dove è diffusa l'abitudine di consumare pesci e cefalopodi crudi, ma casi umani vengono sempre più spesso segnalati negli Stati Uniti e in molti Paesi europei (Gran Bretagna, Francia, Spagna e Italia). In Italia oltre cinquanta casi di anisakiasi sono stati documentati sulla base di reperti parassitologici in seguito a endoscopia o esame istologico e altri casi sono stati segnalati in seguito a esame sierologico, ma il numero di casi umani sembra essere sottostimato, considerando che forme larvali del genere *Anisakis* sono presenti in diverse specie ittiche dei mari italiani quali le acciughe, i melù, i naselli, gli sgombri, i suri e i pesci sciabola, talvolta con prevalenze di infezione abbastanza elevate, e che il consumo di pesce crudo è relativamente comune in alcune regioni.

Nel Mediterraneo su oltre 15.000 esemplari esaminati appartenenti a 99 specie di 47 famiglie, le larve di 3° stadio dei nematodi della famiglia Anisakidae sono state osservate in 31 specie con una prevalenze dal 1,3 al 100% e con un'intensità di infezione da 1 a oltre 300 larve per esemplare (Tabella 1).

Tabella 1. Prevalenza delle larve di nematode della famiglia Anisakidae nei pesci del Mediterraneo

Specie	Nome comune	Prevalenza
<i>Lepidopus caudatus</i>	pesce sciabola	100
<i>Trachurus trachurus</i>	suro	95
<i>Micromesistius poutassou</i>	melù	95
<i>Merlangius merlangius</i>	molo	76
<i>Scomber japonicus</i>	lanzardo	75
<i>Scomber scombus</i>	sgombro	71
<i>Conger conger</i>	gronco	44
<i>Merluccius merluccius</i>	nasello	40
<i>Boops boops</i>	boga	35
<i>Zeus faber</i>	pesce S. Pietro	33
<i>Lophius piscatorius</i>	rana pescatrice	32
<i>Todarodes sagittatus</i>	totano	22
<i>Trachinus dracho</i>	tracina	21
<i>Phycis phycis</i>	musdea	20
<i>Trisopterus minutus</i>	busbana	19
<i>Engraulis encrasicolus</i>	alice	17
<i>Diplodus annularis</i>	sparaglione	16
<i>Trigla lyra</i>	gallinella	16
<i>Pagellus erytrinus</i>	pagello	10
<i>Mullus barbatus</i>	triglia	10
<i>Mugil cefalus</i>	cefalo	9
<i>Cepola rubescens</i>	cepola	9
<i>Sardina pilchardus</i>	sardina	1

Clinica

L'anisakiasi del tratto digerente si manifesta dal punto di vista clinico con una forma acuta o con una forma moderata e, a seconda della localizzazione, si possono distinguere una forma gastrica (AG) e una forma intestinale (AI). Le forme acute, a prevalente localizzazione gastrica, sono caratterizzate da nausea, vomito e epigastralgie, che insorgono da 4 a 6 ore circa dopo l'ingestione del pesce parassitato; nella AI le forme acute si manifestano dopo circa 7 giorni dall'infezione con dolori addominali, nausea, vomito, febbre, diarrea, sangue occulto nelle feci, leucocitosi e rara eosinofilia. Le forme moderate di AG, sono caratterizzate da perdita di appetito, epigastralgie e riscontro di pseudotumore gastrico; molto più subdola invece è l'evoluzione delle forme moderate di AI. Sono state anche documentate rare localizzazioni nella cavità addominale, mesenterici, e nel grande omento. Forme larvali di *Anisakis* sono ritenute responsabili di reazioni allergiche mediate da IgE, con una sintomatologia clinica che va dall'orticaria, all'asma fino allo shock anafilattico, talvolta seguito dall'exitus.

Diagnosi

La diagnosi può essere effettuata mediante prelievo endoscopico della larva o con l'esame istologico di biopsie endoscopiche o chirurgiche. Test cutanei (*skin prick test*) e prove serologiche (ELISA, immunoblot) non sono ancora di sicura specificità.

Trattamento

La rimozione endoscopica della larva sembra essere la terapia di scelta, considerando che i comuni antielmintici non sono stati ritenuti fino ad ora efficaci. Tuttavia studi recenti hanno evidenziato un'azione dell'albendazolo (Zentel, 400 mg 2 volte al dì per 4 giorni) nei confronti di questi nematodi.

Profilassi e controllo

Per la profilassi bisogna procedere ad una pronta eviscerazione dei pesci e molluschi dopo la pesca per evitare che le larve presenti nella cavità celomatica migrino nei tessuti muscolari. Per la ricerca delle larve nel pesce bisogna esaminare la cavità celomatica e se i pesci non sono stati eviscerati e sono trascorse alcune ore dalla loro morte bisogna ricercare le larve tra le fibre muscolari tramite sfilettatura e osservazione controluce artificiale, o tramite digestione artificiale. Nei pesci morti da poche ore le larve di *Anisakis* vengono generalmente reperite sulla superficie delle sierose parietali e viscerali. Le larve possono essere devitalizzate mediante congelamento a -20 °C per almeno 24 ore o mediante trattamento termico ad almeno 60 °C per 10'. Chiaramente questi valori devono riguardare la parte interna del pesce per cui i protocolli variano in relazione alla specie e alla taglia del pesce.

Il mantenimento in ghiaccio del pescato ritarda la migrazione delle larve. Bisogna inoltre evitare il consumo di pesce crudo o poco cotto. In 1 minuto a 65 °C o oltre, si disattivano le larve eventualmente presenti nei muscoli, è importante che questa temperatura sia raggiunta nel cuore del filetto. Le temperature dei congelatori domestici non sono sempre in grado di disattivare le larve. Ad una temperatura di -20 °C sono necessari almeno 3 giorni per devitalizzare le larve. L'affumicatura e la marinatura non sono in grado di devitalizzare con sicurezza le larve di anisakidi. La salagione secca, se il sale è in grado di raggiungere tutte le parti del muscolo devitalizza il parassita. Nella circolare ministeriale del 14 marzo 1992 si parla di una stagionalità dell'infezione con prevalenza nel tardo autunno e nell'inverno. Questa asserzione è del tutto arbitraria in quanto non supportata da lavori scientifici che abbiano dimostrato la stagionalità dell'infezione poichè il pesce una volta acquisita l'infezione non si libera della larva se non alla sua morte. Piuttosto bisogna considerare la taglia del pesce sia perché un pesce di maggiori dimensioni ha maggiore probabilità di essere parassitato sia perché con il variare della taglia varia anche la dieta. La normativa attualmente in vigore è quella della Circolare del Ministero della Sanità n.10 dell'11 marzo 1992 (*Gazzetta Ufficiale* del 14/03/92 *Serie Generale* n.62 pag. 27-28) e dall'ordinanza del 12 maggio 1992 (*Gazzetta Ufficiale* del 25/05/92 *Serie Generale* n.121, pag. 27-28). In particolare si fa divieto di immettere sul mercato e somministrare preparazioni a base di pesce crudo che non sia stato precedentemente trattato con la congelazione in stabilimenti autorizzati. La relativa rarità nel nostro Paese di casi conclamati di infezione da nematodi della famiglia Anisakidae è legato alle abitudini alimentari diffuse nel nostro Paese. Infatti, il controllo sul pescato, effettuato a campione, non assicura alcuna protezione al consumatore. Per una corretta profilassi bisogna agire sull'educazione sanitaria, raccomandando di non consumare prodotti ittici crudi o poco cotti o che abbiano subito trattamenti inefficaci (salagione, affumicatura, marinatura, ecc.), abitudine peraltro rischiosa sotto il profilo igienico generale.

Ricerca delle forme larvali di *Diphyllobotrium latum* (spargani) e delle larve degli Anisakidi

La ricerca delle larve nella cavità celomatica o nei muscoli dei pesci d'acqua dolce (spargano di *D. latum*) o marini (larve di Anisakidi) può essere effettuata mediante esame ispettivo macroscopico o con l'utilizzo dell'apparato. La tecnica più comunemente impiegata per determinare la presenza o assenza delle larve di Anisakidi nei filetti di pesce è la speratura. Questa si effettua esaminando filetti di pesce posti sopra una lastra di vetro al di sotto della quale vi è una sorgente luminosa (tubi al neon in grado di produrre circa 400 lux a una distanza di 13 cm al di sopra del piano di lavoro), questo non è possibile nel caso di pesci con carni scure.

Letture consigliate

- Cheng TC. Anisakiosis. In: Palmer SR, Soulsby EJJ, Simpson DIH (Ed.). *Zoonoses: biology, clinical practice, and public health control*. Oxford, New York: Oxford University Press; 1998. p. 823-40.
- Cross J.H. (1998). Capillariosis. In: Palmer SR, Soulsby EJJ, Simpson DIH (Ed.). *Zoonoses: biology, clinical practice, and public health control*. Oxford, New York: Oxford University Press; 1998. p. 759-81.
- D'Amelio S. Ordine Ascaridida. In: Genchi C, Pozio E. (Ed.), *Parassitologia generale e umana*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana; 2004. p. 373-5.
- De Carneri I. Ordine Enoplida. In: Genchi C, Pozio E. (Ed.), *Parassitologia generale e umana*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana; 2004. p. 360.
- Hui YH, Gorham JR, Murrell KD, Cliver DO. *Foodborne disease handbook*. vol. 2. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc; 1994.
- Ishikura H, e Kikuchi K. *Intestinal Anisakiasis in Japan: Infected fish, sero-immunological diagnosis, and prevention*. Tokyo: Springer-Verlag; 1990.
- Loaharanu, P, Murrell KD. The role of irradiation in ther control of foodborne parasites. *Trends Food Sci Technology* 1994;5:190-195.
- Manfredi MT. Ordine Pseudophyllidea. In: Genchi C, Pozio E. (Ed.). *Parassitologia generale e umana*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana; 2004. p. 301-6.
- Urbani C. Ordine Plagiorchiida. In: Genchi C, Pozio E. (Ed.). *Parassitologia generale e umana*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana; 2004. p. 289-91.
- Urbani C. Ordine Opistorchiida. In: Genchi C, Pozio E. (Ed.). *Parassitologia generale e umana*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana; 2004. p. 293-7.

RUOLO DELL'ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE NEL CONTROLLO DEI VIRUS ENTERICI NEI MOLLUSCHI

Marina Nadia Losio, Enrico Pavoni

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

Dati epidemiologici e clinici hanno recentemente permesso di mettere in evidenza come il ruolo degli agenti virali nel determinismo di tossinfezioni alimentari stia progressivamente aumentando, sia come conseguenza dell'incremento dell'età media della popolazione, che comporta maggiori complicanze legate alle patologie gastrointestinali, che della globalizzazione che ha velocizzato lo scambio dei prodotti. Questo incremento dell'importanza dei virus nelle patologie legate al consumo di alimenti è stato recepito anche dall'Organizzazione Mondiale della Sanità che ha segnalato un possibile aumento del trend d'incidenza. Sino al momento attuale si ritiene che l'incidenza di tali infezioni sia stata, e sia ancora, fortemente sottostimata soprattutto a causa di un inadeguato sistema di sorveglianza, condizionato dalla scarsa disponibilità di adeguate procedure di controllo.

I virus enterici – con particolare riferimento a Norovirus, virus dell'epatite A (*Hepatitis A Virus*, HAV) ed enterovirus – vengono trasmessi per contatto diretto o attraverso acqua e alimenti contaminati. La via diretta rappresenta la fonte più comune e in tale caso la dose infettante è estremamente bassa (10-100 particelle infettanti). Le tipologie di alimento ad elevato rischio di trasmissione sono tutte caratterizzate dalla stessa matrice di infezione che è rappresentata dall'acqua, che a sua volta può essere contaminata dalla presenza di materiale fecale proveniente dalle acque di scolo.

Tra le diverse classi di alimenti, comunque, i molluschi eduli lamellibranchi, sono quelli a maggiore rischio di contaminazione, in considerazione delle loro capacità metaboliche per lo più riferibili all'elevata capacità di filtrazione. Ciò comporta un forte accumulo, a livello dell'epatopancreas, di tutta la sostanza organica e pertanto anche dei patogeni eventualmente presenti nell'acqua. Nonostante esistano specifici decreti ministeriali che regolamentano la commercializzazione di tali prodotti, sino al momento attuale non è prevista nessuna regolamentazione nei confronti delle contaminazioni virali ed è stata anche accertata l'assoluta assenza di correlazione tra contaminazione virale e batterica.

La sottostima delle infezioni gastroenteriche di origine virale dipende quindi fondamentalmente dall'assenza di metodi diagnostici adeguati. In particolare, sino ad epoca recente, l'approccio diagnostico è stato rivolto soprattutto all'evidenziazione o isolamento dell'agente di infezione dalle feci o da tamponi umani mentre le tecnologie disponibili sono risultate inadeguate per l'analisi degli alimenti e/o delle acque.

L'approccio tradizionale per l'analisi virologica è, infatti, basato sull'isolamento del virus in colture cellulari sensibili e sulla evidenziazione dell'agente di infezione mediante microscopia elettronica. Nel controllo degli alimenti, tuttavia, la prima tecnica risulta limitata da diversi fattori, quali la scarsa sensibilità, le difficoltà di crescita di alcuni virus (HAV) che inducono effetto citopatico di lieve entità e in tempi estremamente lunghi e l'assenza di capacità di replicare in monostrati cellulari di alcuni virus, quali i calicivirus. La microscopia elettronica risulta a sua volta limitata dall'elevato limite di sensibilità (10⁵, 10⁶ particelle/mL) così come le tecniche ELISA disponibili per alcuni virus quali rotavirus e adenovirus ma ancora in fase di perfezionamento per HAV e Norovirus.

In assenza di adeguati metodi di analisi un approccio è stato rivolto all'identificazione di un criterio epidemiologico (1) sulla base del quale è stato accertato come percentuali varianti dal 32 al 42% delle infezioni sostenute da alimenti contaminati sia di origine virale. I metodi molecolari, pertanto, in grado di amplificare sequenze specifiche dei virus di interesse, nonostante il limite intrinseco di non potere discriminare la reale infettività, rappresentano pertanto gli strumenti più promettenti per una reale conoscenza del rischio sanitario associato a questi agenti virali.

Su questa base, quindi, è stata attivata, a partire dal 1998, una strategia di conoscenza della situazione epidemiologica da parte dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna mediante un monitoraggio dei mitili provenienti dalle coste di competenza territoriale.

Gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), enti sanitari di diritto pubblico, costituiscono infatti, sulla base del decreto legislativo 270/93, aziende con competenza regionale e interregionale, che operano sulla base della programmazione regionale e nazionale, effettuando prevalentemente ricerche e prestazioni di laboratorio. Rappresentano lo strumento tecnico e operativo del Servizio Sanitario Nazionale (SSN) per quanto compete la sanità animale, il controllo di salubrità e qualità degli alimenti di origine animale, l'igiene degli allevamenti e il corretto rapporto tra insediamenti umani, animali e ambiente. Nel loro complesso costituiscono una rete estesa sull'intero territorio nazionale formata da 10 Sedi Centrali e 90 sezioni diagnostiche periferiche presenti in quasi tutte le province italiane. Per rispondere alla domanda di sanità del Paese, la rete degli IZS effettua ogni anno circa 30 milioni di analisi batteriologiche, chimiche, virologiche, istologiche, immunologiche, ecc.: tale rete costituisce pertanto un importante strumento operativo di cui dispone l'SSN per assicurare, ad esempio, la sorveglianza epidemiologica, la ricerca sperimentale, la formazione del personale e un adeguato supporto diagnostico e di laboratorio nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti. La rete degli Istituti rappresenta pertanto uno strumento applicabile anche a nuovi piani di sorveglianza epidemiologica e di controllo del rischio associato alla presenza di patogeni emergenti, quali possono essere, ad esempio, i virus enterici a trasmissione oro-fecale, veicolati da alimenti contaminati.

Per quanto più specificamente riguarda l'IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, lo sviluppo delle coste di quest'ultima regione e, ancor di più, il crescente sviluppo della mitilicoltura, hanno contribuito all'interesse per le problematiche sanitarie associate al consumo di alimenti a rischio e, in particolare, alla messa a punto di controlli che, se pure a fronte di ingenti problematiche sanitarie, non sono comunque coperti da alcuna legislazione. L'obiettivo che ci si è posti, quindi, cioè di addivenire ad una corretta gestione del rischio associato alla presenza di virus nei mitili, ha trovato applicazione in una serie di progetti di ricerca finanziati che, in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e Università ha consentito, a partire dal 1999 e sino al momento attuale, di mettere a punto e di perfezionare tecniche di biologia molecolare adeguate alla ricerca di tali agenti virali nonché di dare inizio a piani di monitoraggio delle coste di competenza territoriale. Di particolare rilievo in questo contesto è l'approvazione, nel 2003, di un progetto di ricerca corrente che vede il coinvolgimento, tra gli altri, di tutti gli IZS: ciò potrebbe consentire una corretta e reale conoscenza della situazione nazionale e, attraverso un'armonizzazione dei metodi e delle procedure, l'attivazione di un piano di sorveglianza che consentirebbe di pianificare una adeguata gestione del rischio.

Al momento attuale le nostre conoscenze sono relative a campioni prelevati nel periodo compreso tra gennaio 2000 e aprile 2004 nel quale sono stati analizzati 1014 campioni costituiti esclusivamente da matrici già in fase di commercializzazione, prelevate ai mercati ittici o provenienti da ASL o Istituti Zooprofilattici per l'attuazione di piani di controllo. Tuttavia, a causa della messa a punto delle prove e della necessaria fase di organizzazione nel periodo

iniziale, è stato possibile risalire con esattezza alla provenienza dei campioni soltanto a partite dall'anno 2002 e, specificamente, sono stati registrati 391 campioni. Di essi, 335 erano di provenienza nazionale, mentre i rimanenti 56 erano pervenuti alla sezione di Brescia dell'IZS della Lombardia ed Emilia-Romagna come campioni ufficiali conoscitivi richiesti per l'importazione: 24 erano di origine francese, 16 di origine spagnola, 4 greci, 3 provenienti dalle coste tunisine e 3 belghe, 2 irlandesi, 2 olandesi e 2 addirittura peruviani. L'84,7% dei campioni prelevati a livello nazionale, pur provenienti da mercati di diverse aree (comprese quelle siciliane e pugliesi) erano comunque mitili allevati nella zona settentrionale del mare Adriatico.

Tutti i campioni sono stati processati per la ricerca di virus seguendo in linea di principio la metodica standardizzata in collaborazione con l'ISS: in particolare, 75 g di mollusco venivano omogeneizzati con 75 mL di tampone glicina 0,05 M (pH 9,2). La parte di mollusco ideale per l'indagine della presenza di patogeni è la ghiandola dell'epatopancreas che accumula la maggior parte dei virus durante la fase di filtrazione; è evidente quindi che concentrando il materiale e utilizzando solo questo organo, la metodica risulterebbe molto più sensibile. Tuttavia, essendo l'epatopancreas una parte esigua del mollusco, si riscontrano ancora notevoli difficoltà ad ottenere quantità sufficienti di materiale per l'omogeneizzazione ed è per questo motivo che al momento attuale negli esami di routine sono impiegati i molluschi in toto, anche se ciò comporta un rischio di aumento del fattore di diluizione del patogeno. Dopo centrifugazione a 10.000xg per 20 minuti, il surnatante veniva lasciato una notte a contatto con polietilenglicole 8000 (PEG 8000) in rapporto 1:4. Il precipitato così ottenuto era centrifugato a 10.000xg per 60 minuti e il pellet risospeso in 10 mL di PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Dopo una ulteriore centrifugazione a 10.000xg per 20 minuti, il surnatante era nuovamente modificato aggiungendo PEG 8000 in rapporto 1:4 e lasciato in leggera agitazione a + 4 °C per tutta la notte. Il terzo giorno, dopo centrifugazione a 10.000xg per 60 minuti, il pellet era risospeso in 3 mL di PBS e sottoposto ad ulteriore centrifugazione a 10.000xg per 20 minuti. Il surnatante, contenente le particelle virali e privato dei potenziali inibitori della RT-PCR, era sottoposto ad estrazione dell'RNA che veniva successivamente retrotrascritto in cDNA (DNA complementare).

La scelta dei *primer* per le reazioni di PCR è stata effettuata seguendo la letteratura e ha comunque consentito di selezionare sequenze oligonucleotidiche specifiche per regioni maggiormente conservate dei genomi virali (Tabella 1). Più specificatamente, per il virus dell'epatite A, sono state amplificati i tratti per le proteine VP1-VP3 del capsido (2), per gli enterovirus la regione 5' non codificante dell'RNA genomico (3), per i Norovirus la regione della ORF1 (*Open Reading Frame 1*) codificante per la Polimerasi (4). I *primer* specifici per rotavirus localizzavano nel *gene-segment 6* del genoma virale (5), mentre per HEV sono ancora in fase di prova *primer* specifici sia per la ORF2 che per la ORF1. A partire dal 2004 è stata realizzata anche una PCR per la ricerca di toxoplasma Gondii i cui *primer* erano indirizzati alla sequenza di un gene per l'RNA ribosomale (6). In seguito, i campioni positivi ad HAV sono stati inoculati sulla linea cellulare Frp3 (*Fetal Rhesus Monkey Kidney*) mentre i campioni positivi per gli enterovirus sulle linee cellulari BGM (*Buffalo Green Monkey Kidney*). La comparsa di un effetto citopatico alcuni giorni dopo la data dell'inoculo rappresentava un indicatore della presenza di particelle infettanti.

Nell'anno 2000 sono stati analizzati 365 campioni soltanto per HAV: di questi, 32 sono risultati positivi in PCR (8,7%) e 4 di essi, a seguito di un inoculo su cellule, hanno dato effetto citopatico (12,5%). Nell'anno 2001, sono stati analizzati per HAV 275 campioni di cui nessuno positivo, mentre per enterovirus 4 campioni sono risultati positivi su 150 prove (2,7%). Di questi, 1 era infettante (25%). Campioni analizzati per NLV sono stati 50 di cui tutti negativi.

Nell'anno 2002, su 137 campioni analizzati, 8 (5,8%) erano positivi per HAV (Infettanti: 3 (37,5%)), 2 (1,45%) (erano positivi per enterovirus (infettanti: 1 (50%)), mentre nessuno era positivo per Norwalk-like virus. Nell'anno 2003, su 137 campioni analizzati 4 (2,9%) erano

positivi per HAV, ma nessuno infettante, 1 era positivo per enterovirus (0,72%) e allo stesso tempo infettante, mentre 6 campioni erano positivi per NLV a seguito di una modifica nella reazione di PCR che prevedeva una seconda amplificazione con i medesimi parametri della prima (reazione di “booster PCR”). Di questi campioni, due sono stati purificati e successivamente sequenziali; per uno di essi si è dimostrata una divergenza significativa con la sequenza di controllo Lordsdale appartenente al genogruppo II (campione genotipizzato come Amsterdam (GGII), mentre per il secondo si è riscontrata una stretta correlazione col genotipo Sagunt. Infine, nessun campione è risultato positivo per rotavirus.

Nel periodo gennaio – aprile 2004 su 100 campioni analizzati, 7 sono risultati positivi per HAV dei quali nessuno infettanti, 18 positivi per enterovirus (infettanti: 4 (22,2%)), 6 positivi a NLV (dei quali 3 genotipizzati ggIIb), 1 positivo per rotavirus e 2 positivi per *Toxoplasma Gondii*.

Tabella 1. Sequenze dei primer utilizzati per la determinazione dei più importanti virus enterici

Patogeno	Sequenze primer	Amplicone
HAV	<i>Primer PCR</i> AV 1: 5'-GGAAATGTCTCAGGTACTTTCTTTG-3' AV 2: 5'-GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG-3'	247 pb
	<i>Primer seminested PCR</i> AV 2: 5'-GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG-3' AV 3: 5'-TCCTCAATTGTTGTGATAGC-3'	210 pb
Enterovirus	<i>Primer PCR</i> EN1: 5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3' EN2: 5'-CGGTACCTTTGTACGCCTGT-3'	540 pb
	<i>Primer nested PCR</i> EN5: 5'-TCCGGCCCCTGAATGCGGCTA-3' EN6: 5'-GAAACACGGACACCCAAAGTA-3'	123 pb
NLV	<i>Primer PCR e booster PCR</i> JV12Y: 5'-ATACCACTATgATgCAgAYTA-3' JV12I: 5'-TCATCATCACCATagAAIlgAg-3'	326 pb
Rotavirus	<i>Primer PCR</i> ROT3: 5'-AAAGATGCTAGGGACAAAATTG-3' ROT5: 5'-TTCAGATTGTGGAGCTATTCCA-3'	309 pb
	<i>Primer nested PCR</i> ROT6: 5'-GACAAAATTGTCGAAGGCACATTATA-3' ROT7: 5'-TCGGTAGATTACCAATTCTCCAG-3'	121 pb
Toxoplasma	<i>Primer PCR</i> TOX213f: 5'-CCGGTGGTCCTCAGGTGAT -3' TOX332r: 5'-TGCCACGGTAGTCCAATACAGTA-3'	120 pb

Osservando l'andamento dei risultati per NLV (Tabella 2) si può notare come siano stati ottenuti campioni positivi soltanto a seguito dell'introduzione della doppia amplificazione (“booster PCR”, ovvero 2 PCR ripetute con i medesimi parametri), mentre in precedenza una singola reazione non dava esiti soddisfacenti. Tuttavia, dal momento che i primer JV12I e JV12Y contengono una base degenere (I= inosina, Y=C/T) (Tabella 1) e dal momento che il rischio di amplificare prodotti aspecifici è elevato, si rende necessario un sequenziamento degli ampliconi.

Tabella 2. Risultati delle analisi su molluschi effettuate nel periodo 2000-2004

Anno	N. analisi	HAV		Enterovirus		NLV	Rotavirus	T. gondii
		positivi	infettanti	positivi	infettanti	Positivi	Positivi	Positivi
2000	365	32 (8,7%)	4 (12,5%)					
2001	275	0	0	4* (2,7%)	1 (100%)	0**		
2002	137	8 (5,8%)	3 (37,5%)	2 (1,45%)	1 (50%)	0		
2003	137	4 (2,9%)	0	1 (0,72%)	1 (100%)	6*** (9,8%)	0	
2004	100	7 (7%)	0	18 (18%)	4 (22,2%)	6 (6%)	1 (1%)	2 (2%)

Totale	1014							

* 150 campioni su 275 sono stati analizzati per enterovirus (la percentuale 2,7% è calcolata sul valore 150)

** 50 campioni analizzati per NLV su 275

*** 61 campioni su 137 sono stati analizzati con la "booster PCR" e 6 di essi sono risultati positivi (la percentuale 9,8% è calcolata sul valore 61)

**** Periodo gennaio-aprile

Inoltre, data l'elevata variabilità genetica dei virus NLV, tale sequenziamento permette una genotipizzazione all'interno dei due genogruppi di appartenenza (GGI e GGII) che a loro volta si suddividono rispettivamente in 7 e 8 genotipi differenti, consentendo anche di applicare un criterio epidemiologico facendo riferimento ai dati di tossinfezioni provocate da NLV sul territorio nazionale.

Recentemente è stata introdotta una nuova *nested PCR* per l'indagine dei Norovirus, che prevede l'utilizzo di *primer* interni e specifici per la zona 5' dell'amplificone ottenuto con la coppia JV12Y/JV12I (*primer* Ni/E3 (7) il cui amplificato è di 114 pb.

I risultati ottenuti, quindi, mettono in evidenza come, a fronte di una completa negatività nei confronti di patogeni batterici, sia stato possibile riscontrare positività nei confronti dei virus enterici ribadendo pertanto la necessità della pianificazione di adeguate procedure di controllo. Se l'impiego di tali metodiche, per lo più riferibili a tecniche di biologia molecolare, è stato limitato dalla impossibilità di discriminare tra presenza di virus e infettività, si ritiene tuttavia che, in considerazione della labilità dell'acido ribonucleico in presenza di inibitori naturalmente presenti negli alimenti di interesse e ampiamente descritta in letteratura, essi possano comunque trovare impiego per piani estesi di monitoraggio al fine di attivare un'adeguata sorveglianza epidemiologica fornendo quindi un requisito essenziale per la gestione del rischio, ampiamente auspicato dalla normativa vigente.

Bibliografia

1. Kaplan JE, Feldman R, Campbell DS, Lookabaugh C, Gary GW. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastro-enteritis. *Am J Publ Health* 1982;72:1329-32.
2. Le Guyader F, Dubois E, Menard D, Pommepuy M. Detection of Hepatitis A Virus, Rotavirus and Enterovirus in Naturally Contaminated Shellfish and Sediment by Reverse Transcription-Seminested PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994;60(10):3665-71.
3. Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:3376-82.

4. Vinjé J, Koopmans MPG. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996;174:610-15.
5. Elschner M, Prudlo J, Hotzel H, Otto P, Sachse K. Nested reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction for the detection of Group A Rotaviruses. *J Vet Med* 2002;49:77-81.
6. Arkush D, Miller MA, Leutenegger CM, Gardner IA, Packham AE, Heckerath AR, Tenter AM, Barr BC, Conrad PA. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus gallo provincialis*). *Int J Parasitol* 2003;33:1087-97.
7. Maguire AJ, Green J, Brown DWG, Desselberger U, Gray JJ (1999). Molecular Epidemiology of Outbreaks of Gastroenteritis associated with Small Round-Structured Viruses in east Anglia, united Kingdom, During the 1996-1997 season. *J Clin Microbiol* 1999;37(1):81-9.

PIOMBO, CADMIO, ARSENICO E MERCURIO NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ITTICA: LIVELLI DI PRESENZA E STIMA DELLE ASSUNZIONI IN ITALIA E NELL'UNIONE EUROPEA

Giuseppe Baldini, Fabrizio Novelli, Massimo Baldini
*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità,
Roma*

Le qualità nutrizionali dei prodotti ittici sono note da tempo. Negli ultimi anni le proprietà terapeutiche degli omega 3 e omega 6 hanno aggiunto altro valore agli alimenti di origine marina. Essi, infatti, tra l'altro, combattono l'ipercolesterolemia e sono quindi in grado, se inseriti nella dieta, di prevenire l'aterosclerosi. Per questo motivo le autorità sanitarie nazionali e internazionali hanno promosso numerose campagne di informazione allo scopo di incrementare il consumo di questi prodotti da parte dei consumatori. D'altra parte i prodotti ittici sono esposti, così come avviene per tutti gli esseri viventi, alla esposizione di contaminanti presenti nell'ambiente sia per cause naturali che per cause riconducibili alla attività umana. Per tale motivo il consumo dei prodotti ittici deve essere attentamente valutato in funzione del rapporto rischio/beneficio, soprattutto riguardo fasce di popolazione particolarmente vulnerabili, come bambini, donne in gravidanza, anziani e forti consumatori di pesce.

Nella Tabella 1 è riportato l'elenco dei principali contaminanti presenti nei prodotti ittici. Tra essi rivestono particolare importanza, sotto l'aspetto sanitario, i metalli tossici.

Tabella 1. Contaminanti chimici dei prodotti ittici

Tipo di contaminazione	Contaminante
Ambientale	Metalli pesanti Diossine Pesticidi PCB Composti organostannici
Endogena	Ittiotossine
Da processo	Aldeide formica IPA (trattamenti termici impropri, affumicatura) Residui di farmaci per uso veterinario (ittiocoltura)

Nelle Tabelle 2 e 3 sono riportati i principali aspetti tossicologici di alcuni metalli tossici necessari negli alimenti ma tossici in eccesso

Tabella 2. Tossicità dei metalli

Tossicità	Metallo
Elevata	Antimonio, Arsenico, Cadmio, Cromo, Piombo, Mercurio, Nickel
Modesta	Rame, Ferro, Manganese, Selenio, Zinco
Molto bassa	Alluminio, Argento, Stronzio, Tallio, Stagno

Tabella 3. Effetti tossici di alcuni metalli

Metallo	Effetto
Pb, Cd, Hg	biaccumulo nell'organismo danni al sistema nervoso e osseo
As	danni cerebrali
Cu, Zn, Fe	necessari negli alimenti ma tossici in eccesso

Da un punto di vista strettamente sanitario, cadmio, piombo, mercurio e arsenico sono da tempo gli elementi che destano le maggiori preoccupazioni per la salute umana. A tale scopo, di seguito sono riportate le maggiori caratteristiche tossicologiche di questi metalli.

Arsenico

L'arsenico è presente nei prodotti ittici ad elevati livelli di concentrazione, principalmente sottoforma di composti organici dell'arsenico. Le forme metilate dell'elemento (es. dimetilarsinato) hanno un basso livello di tossicità. Nei pesci e nei crostacei l'arsenico si trova principalmente sottoforma di arsobetaina, considerata virtualmente non tossica. Nei molluschi e nelle alghe l'arsenico è presente principalmente come arsenozuccheri. La tossicità di queste specie chimica non è conosciuta in dettaglio ma si ritiene ragionevolmente che sia molto bassa.

Le forme inorganiche più tossiche dell'arsenico presenti negli alimenti sono As(III) and As (V).

In letteratura sono disponibili numerosi dati sulla presenza di arsenico in forma organica nei prodotti ittici, molto scarsa invece è la disponibilità di dati sulla presenza di arsenico inorganico.

I sintomi di avvelenamento da arsenico sono debolezza, perdita di capelli, perdita di peso. L'arsenico inorganico è considerato carcinogenico (1-6).

Per l'arsenico è stato stabilito un PTWI (*Provisional Tolerable Weekly Intake*) nell'acqua potabile (0,015 mg kg⁻¹ p.c.) nella forma di arsenico inorganico, ma non negli altri alimenti. Il Rapporto del 1989 della *World Health Organization* (WHO) (1) indica che alcune popolazioni etniche e regionali con un elevato consumo di pesce, hanno un *intake* di arsenico (nella forma di arsenozuccheri) di circa 0,050 mg/kg p.c., senza effetti sulla salute. Questo corrisponde a un *intake* giornaliero di 3,5 mg per una persona del peso di 70 kg. Attualmente non ci sono raccomandazioni particolari riguardo l'*intake* di arsenico da parte dei bambini.

Cadmio

Il cadmio può essere presente in alte concentrazioni nei molluschi lamellibranchi e nei reni degli animali di maggiore età. Anche alcuni funghi selvatici possono contenere alti livelli di cadmio.

Il cadmio si accumula principalmente nei reni e può indurre disfunzioni renali, modificazioni scheletriche e deficienze riproduttive.

Nel 1993 lo IARC ha classificato il cadmio e i suoi composti nel Gruppo I (carcinogeni per l'uomo) sulla base di evidenze da studi umani, principalmente quelli su tumori del polmone associati alla inalazione del cadmio in ambienti di lavoro e da studi sugli animali. La classificazione della *International Agency for Research on Cancer* (IARC) è soltanto qualitativa.

Lo *Scientific Committee on Food* della UE, nella sua Opinione del 2 giugno 1995, ha raccomandato maggiori sforzi per ridurre la esposizione al cadmio attraverso la dieta, poiché per l'uomo gli alimenti rappresentano la fonte principale dell'*intake* di cadmio (7-13).

Per il cadmio è stato stabilito un PTWI di 0,007 mg/kg (7 µg/kg) p.c. che corrisponde a 0.49 mg/sett. (490 µg/sett.) per una persona del peso di 70 kg.

Piombo

Negli ultimi decenni il livello di piombo negli alimenti è diminuito in maniera significativa grazie alle misure adottate per ridurre le emissioni di piombo nell'ambiente e anche al miglioramento della qualità delle analisi chimiche.

Il piombo è presente negli alimenti a basse concentrazioni, mentre nel fegato e nel rene degli animali e nei molluschi può essere contenuto a elevati livelli.

Gli alimenti prodotti e lavorati in aree contaminate rappresentano la principale fonte per l'ingestione di piombo attraverso la dieta.

L'assorbimento e l'ingestione di piombo può costituire un serio rischio per la salute pubblica. Alcuni effetti cronici da avvelenamento da piombo sono coliche, costipazione e anemia. Negli adulti può causare l'aumento della pressione sanguigna e malattie cardiovascolari. Nei bambini si può verificare una riduzione della capacità di apprendimento, mentre nel feto può provocare effetti sullo sviluppo cerebrale (14-16)

Per il piombo è stato stabilito un PTWI di 0,025 mg/kg (25 µg/kg) p.c. corrispondente a 1,75 mg/sett. (1750 µg/sett.) per una persona del peso di 70 kg.

Mercurio

Il mercurio è un elemento tossico e si trova principalmente nel pesce e nei prodotti ittici. Il metilmercurio, la principale forma in cui il mercurio è presente nel pesce, è la più tossica tra le specie del mercurio. Il contenuto di metilmercurio nel pesce e nei molluschi varia, ma si assume che generalmente, oltre il 90% del mercurio totale sia presente sottoforma di metilmercurio.

Esso può indurre alterazioni sul normale sviluppo del cervello infantile e può, ad alti livelli, indurre cambiamenti neurologici negli adulti.

Bambini esposti al metilmercurio prima della nascita possono subire effetti negativi sullo sviluppo mentale. Per questo, le concentrazioni di mercurio e metilmercurio negli alimenti dovrebbe essere tenuto a il livello più basso possibile. (tenuto conto che per ragioni fisiologiche, alcune specie ittiche concentrano mercurio più facilmente nei loro tessuti rispetto ad altri (17-24).

Per il mercurio totale è stato stabilito un PTWI di 0,05 mg/kg (5 µg/kg) p.c. corrispondente a 0,35 mg/sett. (350 µg/sett.) per una persona del peso di 70 kg.

Il JECFA (*Joint FAO/OMS Expert Committee For Food Additives*) nel giugno 2003 ha ridotto il PTWI del metilmercurio a 0,0016 mg/kg p.c.

Caratteristiche chimico-tossicologie di arsenico, cadmio, piombo e mercurio

Le Tabelle 4-7 riportano le caratteristiche tossicologie di arsenico, cadmio, piombo e mercurio.

Tabella 4. PIOMBO: caratteristiche tossicologiche

PTWI	1972	50 µg/kg p.c adulto, bambino
JEFCA	1986	25µg/kg p.c, bambino
	1993	25µg/kg p.c adulto, bambino
Impieghi	Processi di fusione Vernici Antiparassitari Sostanze plastiche Combustibili	
Esposizione	Inalazione del piombo atmosferico Alimenti e bevande Contaminazione ambientale delle materie prime, processi di trasformazione, impiego di contenitori che possono cedere il piombo al prodotto	
Contributo delle varie fonti di assunzione sui livelli ematici di piombo	assunzione attraverso la dieta	45-90%
	assunzione di acqua	0-30%
	assunzione inalatoria	10-20%

Tabella 5. CADMIO: caratteristiche tossicologiche

PTWI	7 µg/kg p.c.	
JEFCA	<i>equivalente a 490 µg di cadmio/sett. per un individuo adulto del peso di 70 kg</i>	
Impieghi	Produzione di accumulatori Ricopertura di metalli Produzione di vernici Stabilizzante di materie plastiche Additivo per carburanti di aerei Assorbenti di neutroni in reattori nucleari Batterie Ni-Cd	
Esposizione	Inalazione del cadmio atmosferico Alimenti e bevande: Contaminazione ambientale delle materie prime.	

Tabella 6. MERCURIO: caratteristiche tossicologiche

PTWI	Mercurio totale: 0,005 mg/kg p.c.	
JEFCA	<i>equivalente a 0.3 mg /sett.per individuo adulto (60 kg)(FAO/OMS JECFA 1972)</i>	
	Metilmercurio: 0,0016 mg/kg p.c (JECFA, giugno 2003). <i>Particolarmente esposte le donne in gravidanza o in allattamento.</i>	
Assorbimento	1) via respiratoria(Hg inorganico) 2) tratto gastroenterico(Hg organico)	
Eliminazione	1) deiezioni 2) via urinaria	
Organi bersaglio	1) sistema nervoso centrale 2) rene	
Effetti	1) disturbi sensoriali alle estremità, alla lingua, alle labbra. 2) atassia 3) disturbi visivi	

Tabella 7. ARSENICO: caratteristiche tossicologiche

PTWI JEFCA	15 µg/kg p.c. Equivalente a 1050 µg di arsenico/sett. per un individuo adulto del peso di 70 kg (JECFA, 1988)
Presenza negli alimenti e nell'acqua	Arsenico inorganico: cancerogeno. (presenza nelle acque potabili di alcune aree geografiche-India)
Arsenico nei prodotti ittici	livelli di alcuni mg/kg sottoforma di composti organici nel pesce (arsobetaina, arsocolina), non metabolizzati.
Arsenico nelle alghe	arsenozuccheri (80% del totale), metabolizzati. •Incompleta valutazione tossicologica

Nella Tabella 8 sono riportati i limiti massimi di piombo, cadmio e mercurio stabiliti dai Regolamenti Comunitari 466/2001, 221/2002.

Tabella 8. Limiti massimi di piombo, cadmio e mercurio in alcune derrate alimentari

Prodotto	Tenore massimo (mg/kg di peso fresco)	Criteri di prestazione per	
		<i>campionamento</i>	<i>metodi di analisi</i>
PIOMBO			
3.1.4 Muscolo di pesce escluse le categorie indicate al punto 3.1.4.1	0,2	Dir. 2001/22/CE	Dir. 2001/22/CE
3.1.4.1. Muscolo di: Palamita (<i>Sarda sarda</i>) Sarago fasciato comune (<i>Diplodus vulgaris</i>) Anguilla (<i>Anguilla anguilla</i>) Cefalo (<i>Mugil labrosus labrosus</i>) Grugnolo (<i>Pomadasys benneti</i>) Sgombro (<i>Trachurus trachurus</i>). Sardina (<i>Sardina pilchardus</i>) Sardinops (<i>Sardinops</i> spp.) Spigola macchiata (<i>Dicentrarchus punctatus</i>) Tonno (<i>Thunnus</i> species e <i>euthynnus</i> spp.) Sogliola cuneata (<i>Dicologlossa cuneata</i>)	0,4	Dir. 2001/22/CE	Dir. 2001/22/CE
3.1.5. Crostacei, ad eccezione delle carni scure del granchio	0,5	Dir. 2001/22/CE	Dir. 2001/22/CE
3.1.6. Molluschi bivalvi	1,5	Dir. 2001/22/CE	Dir. 2001/22/CE
3.1.7. Cefalopodi (senza visceri)	1,0	Dir. 2001/22/CE	Dir. 2001/22/CE
CADMIO			
3.2.5. Muscolo di pesce secondo quanto definito alle categorie a),b) dell'elenco che figura all'articolo 1 del Reg. (CE) n. 104/2000 del Consiglio (G.U. l 17 del 21.1.2000, pag.22), escluse le specie elencate al punto 3.2.5.1	0,05	Dir. 2001/22/CE	Dir. 2001/22/CE

segue

continua

Prodotto	Tenore massimo (mg/kg di peso fresco)	Criteri di prestazione per	
		campionamento	metodi di analisi
CADMIO (continua)			
3.2.5.1. Muscolo di: Palamita (<i>Sarda sarda</i>) Sarago fasciato comune (<i>Diplodus vulgaris</i>) Anguilla (<i>Anguilla anguilla</i>) Alice (<i>Engraulis encrasicolus</i>) Cefalo (<i>Mugil labrosus labrosus</i>) Sgombro (<i>Trachurus trachurus</i>) Pesce gallo (<i>Luvarus imperialis</i>). Sardina (<i>Sardina pilchardus</i>) Sardinops (<i>Sardinops</i> spp.) Tonno (<i>Thunnus</i> e <i>Euthynnus</i> spp.) Sogliola cuneata (<i>Dicologlossa cuneata</i>)	0,1	Dir. 2001/22/CE	Dir. 2001/22/CE
3.2.6. Crostacei, escluse carni scure di granchio ed esclusa testa o torace di aragosta e analoghi Grossi crostacei (nephropidae e palinuridae) Quando il pesce deve essere consumato intero, il tenore massimo si applica al pesce intero	0,5	Dir. 2001/22/CE	Dir. 2001/22/CE
3.2.7. Molluschi bivalvi	1,0	Dir. 2001/22/CE	Dir. 2001/22/CE
MERCURIO			
3.3.1. Prodotti della pesca, ad eccezione dei prodotti indicati al punto 3.3.1.1	0,5	Dir. 2001/22/CE	Dir. 2001/22/CE
3.3.1.1. Rana pescatrice (<i>Lophius</i> sp.) Lupo di mare (<i>Anarhichas lupus</i>) Spigola (<i>Dicentrarchus labrax</i>) Molva azzurra (<i>Molva dipterygia</i>) Palamita (<i>Sarda sarda</i>) Anguilla (<i>Anguilla</i> sp.) Pesce specchio atlantico (<i>Hoplostethus atlanticus</i>) Granatiere (<i>Coryphaenoides rupestris</i>) Ipoglosso (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) Aguglia imperiale (<i>Mokaira</i> spp.) Luccio (<i>Esox lucius</i>) Palamita bianca (<i>Orcynopsis unicolor</i>) Palombo (<i>Centroscymnes coelolepis</i>) Razze (<i>Raja</i> spp.) Scorfano (<i>Sebastes marinus</i>) Pesce vela (<i>Istiophorus platypterus</i>) Pesce sciabola (<i>Lepidopus caudatus</i> , <i>Aphanopus carbo</i>) Squali (tutte le specie) Tirsite (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i> , <i>Ruvettus pretiosus</i> , <i>Gempylus serpens</i>) Storione (<i>Acipenser</i> spp.) Pesce spada (<i>Xiphias gladius</i>) Tonno (<i>Thunnus</i> spp. e <i>Euthynnus</i> spp.)	1,0	Dir. 2001/22/CE	Dir. 2001/22/CE

Valutazione dell'assunzione di arsenico, cadmio, piombo e mercurio nei Paesi europei

Nel 2002-2003 l'Unione Europea, nel quadro della Cooperazione Scientifica, ha costituito la Task 3.2.11 "Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States", coordinata dall'Italia e dalla Svezia.

Hanno partecipato alla Task: Austria, Belgio, Danimarca, Finlandia, Francia, Grecia, Germania, Irlanda, Italia, Norvegia, Portogallo, Olanda, Svezia, Gran Bretagna, Spagna.

Austria e Spagna non hanno inviato dati.

Ogni Paese ha inviato ai coordinatori i dati nazionali sui livelli di concentrazione di arsenico, cadmio, mercurio e piombo nei diversi alimenti; quindi combinando le concentrazioni medie dei 4 metalli con i dati sui consumi alimentari di ciascun Paese, sono state calcolate le assunzioni medie di arsenico, cadmio, mercurio e piombo con la dieta per ognuno dei 13 Paesi.

I risultati hanno messo in evidenza che i livelli di presenza di cadmio, piombo e mercurio negli alimenti, per i quali sono stati stabiliti limiti massimi (ML) nei Regolamenti 466/2001 e 221/2002, sono generalmente al di sotto di detti limiti.

In particolare, per ciascun elemento:

1) *Arsenico*

L'*intake* giornaliero dal pesce e dagli altri prodotti ittici è stimato al di sotto di 0,35 mg (<2,5 mg/sett.). Pesce e altri prodotti ittici rappresentano la fonte principale di arsenico nella dieta per la popolazione media adulta (più del 50% dell'*intake* medio). Non è stato possibile definire una accurata stima dell'*intake* totale nella maggior parte dei Paesi Membri. Forti consumatori di pesce e di altri prodotti ittici possono avere un *intake* di 1 mg As/giorno (7 mg/sett.) o più.

2) *Cadmio*

L'*intake* giornaliero per la popolazione media adulta negli Stati Membri è inferiore al 30% del PTWI, ad eccezione dell'Olanda (38%). Cereali, frutta e vegetali, carne e pesce sono le fonti principali di cadmio nella dieta. Fegato e rene animali, crostacei, molluschi e cefalopodi generalmente contengono livelli più elevati di cadmio, ma il loro contributo alla assunzione di cadmio con la dieta è scarso, perché il consumo è basso.

3) *Piombo*

L'*intake* giornaliero per la popolazione media adulta negli Stati Membri è stimato pari a 0,042 mg/giorno (0,29 mg/sett.), corrispondente a una media del 17% del PTWI. I risultati indicano che in 11 Stati Membri l'ingestione media con la dieta è inferiore al 25% del PTWI. Nessuno degli alimenti maggiormente consumati presenta elevati livelli di piombo.

4) *Mercurio*

L'*intake* giornaliero per la popolazione media adulta negli Stati Membri è inferiore al 30% del PTWI per il mercurio totale. I valori di *intake* nei Paesi Membri sono nell'intervallo 9,6 µg/sett. (Irlanda, con solo 3 categorie alimentari), e 100,7 µg/sett. (Portogallo, con 4 categorie alimentari), corrispondente rispettivamente al 2,56%-28,8% del PTWI del mercurio. Il pesce è la fonte principale di mercurio nella dieta. I pesci predatori generalmente contengono livelli più elevati di mercurio; naturalmente il loro contributo alla dieta è piccolo perché il loro consumo è basso. Nessun Paese Membro ha presentato dati sul metilmercurio nei prodotti ittici.

I risultati sono riportati nelle Tabelle 9-15.

Tabella 9. ARSENICO: intake settimanale ($\mu\text{g}/\text{settimana}$) da parte della popolazione adulta media

Alimento	BE	DK	FI	FR	DE	HE	IR	IT	PT	SE	UK	Media
Latte e derivati		27,3	7		1,10						0,77	9,0
Grassi e oli					0,72						0,56	0,64
Frutta e vegetali		43,4		51,6	53,2	0,04					6,65	31
Cereali e prodotti da forno		58,1		5,5	65,8			5,32			14	30
Carne e frattaglie		18,2			24,6		6,86				2,06	13
Pesce	1680	228,9	95,9	943	78,4	2,8		2156		707	427	702
Molluschi bivalvi, cefalopodi e crostacei	175				7,69	0,35						61
Uova		1,4			1,17						0,07	0,88
Dolciumi					0,55			0,105			2,24	0,97
Sale e spezie				14,2	1,19							7,7
Bevande		67,9		19,4	22,9				0,007		7	23
Cibi pronti											0,07	0,07
Totale	1885	445	103	1034	257	3,2	6,9	2161	0,007	707	460	880

Tabella 10. CADMIO: intake settimanale ($\mu\text{g}/\text{settimana}$) da parte della popolazione adulta media

Alimento	BE	DK	FI	FR	DE	HE	IR	IT	NL	NO	PT	SE	UK	Media
Latte e derivati	0,71	2,45	2,94	0,36		0,77		1,82	2,94			1,2	0,42	1,51
Latte condensato formaggio e yogurt	0,18	0,00			0,871			10,3				0,38	0,49	2,04
Grassi e oli		0,70			0,86			0,07			0,77		0,49	0,57
Frutta e vegetali	55,4	29,5	12,60	40,1	61,39	8,19		105	66,4	21,6	99,0	12	37,2	37,88
Prodotti confezionati		2,1	0,21		2,91				1,19	1,26				1,54
Cereali e prodotti da forno	32,0	57,8	44,5	11,8	38,15	9,38		23,9	30,4	52,2	2,70	27	35,0	30,42
Carne	23,1	2,03	0,63	4,63	14,49	1,89			50,0	5,25		2,4	3,71	10,81
Frattaglie	0,24		0,73	1,65	1,40	3,01					0,21		0,56	1,11
Pesce		2,03	2,2	1,43	1,24	97,0	0,5	0,77	0,70	24,9	1,42	0,67	1,26	11,33
Molluschi bivalvi, cefalopodi e crostacei	2,35		1,085	4,74	0,63	15,0	2,2				7,35			4,77
Uova	0	0,07	0,00	0,17	0,70					0,60		0,037	0,07	0,21
Dolciumi			0,00	0,38	0,43					0,07	3,29	0,007	3,15	1,04
Sale e spezie				3,01	0,56				8,19					3,92
Bevande		13,0	0,67	5,95	11,1*				6,79	3,29	0,77		1,33	
Cibi pronti									2,31	1,26			0,84	1,47
Cibi elaborati									6,93					6,93
Totale	114	112	66	74	135	135	2,7	141	176	110	116	45	85	101

Tabella 11. CADMIO: intake settimanale in % del PTWI, da parte della popolazione adulta media (PTWI per Cd = 0,007mg/kg peso corporeo = 7µg/kg peso corporeo)

Alimento	BE	DK	FI	FR	DE	HE	IR	IT	NL	NO	PT	SE	Mean
Peso medio corporeo [kg]	60	72	77,1	66,4	70,5	70	75	70	65,8	73	70	73,7	70,3
Latte e derivati	0,17	0,49	0,54	0,08		0,16		0,37	0,64			0,23	0,335
Latte condensato formaggio e yogurt	0,04	0			0,18			2,1				0,07	0,48
Grassi e oli		0,14			0,17			0,01			0,16		0,12
Frutta e vegetali	13,2	5,85	2,33	8,64	12,44	1,67		21,4	14,4	4,23	20,2	2,4	9,7
Prod confezionati		0,42	0,04		0,59				0,26	0,25			0,31
Cereali e prodotti da forno	7,61	11,5	8,25	2,54	7,73	1,91		4,87	6,60	10,2	0,55	5,3	6,10
Carne	5,50	0,40	0,12	1,00	2,94	0,39			10,8	1,03		0,48	2,52
Frattaglie	0,06		0,14	0,36	0,28	0,61					0,04		0,25
Pesce		0,40	0,41	0,31	0,255	19,8	0,09	0,16	0,15	4,88	0,29	0,13	2,44
Molluschi bivalvi, cefalopodi e crostacei	0,56		0,20	1,02	0,13	3,06	0,43				1,5		0,99
Uova	0	0,01	0,00	0,04	0,14					0,12		0,007	0,045
Dolciumi			0,00	0,08	0,087					0,01	0,67	0,001	0,14
Sale e spezie				0,65	0,11				1,78				0,85
Bevande		2,57	0,12	1,28	2,25				1,47	0,64	0,16		1,22
Cibi pronti									0,50	0,25			0,37
Cibi elaborati									1,50				1,5
Totale	27,1	22,2	12,2	16,0	27,3	27,6	0,5	28,9	38	21,6	23,6	8,68	22

Tabella 12. PIOMBO: intake settimanale (µg/settimana) da parte della popolazione adulta media

Alimento	BE	DK	FI	FR	DE	HE	IR	IT	NO	PT	SE	UK	Media
Latte e derivati	6,65	4,13	14,7	2,24		9,66		6,37	6,51		2,38	1,96	6,1
Latte condensato formaggio e yogurt	5,18	1,33			9,0			13,6	0,43		1,75	3,36	4,9
Grassi e oli		4,2			5,2			1,54		3,36		0,98	3,1
Frutta e vegetali	122	27,9	12	176	96	2,03		117	10,6	819	4,83	34,9	129
Prod confezionati		5,18			2,8				0,28	0,217			2,1
Cereali e prodotti da forno		16,5	0,56	67,4	42	22,3		30,4	15,4	3,76	10,0	28	24
Carne		6,93	8,75	12,8	78	29,5	2,94	19,7	22,7		5,18	8,61	20
Frattaglie	0,07		0,98	0,98	1,1	1,61		8,19	0,46	1,05		0,63	1,7
Pesce		1,12	3,40	4,88	2,5	96,3	2,38	8,89	6,79	15,5	0,462	1,96	13
Molluschi bivalvi, cefalopodi e crostacei			0,28	5,56	0,54	14,2	2,45		8,4	3,57			5,0
Uova		0,21	1,33	0,85	4,9			0,98	2,94		0,056	0,28	1,4
Dolciumi	0,28		0,14	3,31	4,6				0,33	1,19	0,161	7,0	2,1
Sale e spezie				27,5	15								21
Bevande	131	60,3	3,36	95,7	68			29,4	70,7	85,2	8,19	98	62
Cibi pronti									0,06			0,14	0,1
Totale/Stato Membro	265	128	46	397	330	176	7,8	208	146	933	33	186	296

Tabella 13. PIOMBO: intake settimanale in % del PTWI da parte della popolazione adulta media (PTWI per Pb = 0,025 mg/kg peso corporeo = 25 µg/kg peso corporeo)

Alimento	BE	DK	FI	FR	DE	HE	IR	IT	NO	PT	SE	UK	Media
Peso medio corporeo [kg]	60	72	77,1	66,4	70,5	70	75	70	73	70	73,7	70,1	70,6
Latte e derivati	0,44	0,23	0,76	0,14		0,55		0,36	0,36		0,13	0,11	0,34
Latte condensato formaggio e yogurt	0,35	0,07			0,51			0,78	0,02		0,09	0,19	0,29
Grassi e oli		0,23			0,29			0,09		0,19		0,06	0,17
Frutta e vegetali	8,12	1,5	0,62	10,6	5,42	0,12		6,68	0,58	46,8	0,26	1,99	7,52
Prodotti confezionati		0,29			0,16				0,02	0,01			0,12
Cereali e prodotti da forno		0,91	0,03	4,06	2,39	1,28		1,74	0,84	0,21	0,54	1,60	1,36
Carne		0,39	0,45	0,77	4,43	1,68	0,16	1,13	1,24		0,28	0,49	1,10
Frattaglie	0,00		0,05	0,06	0,06	0,09		0,47	0,03	0,06		0,04	0,10
Pesce		0,062	0,17	0,29	0,14	5,50	0,13	0,51	0,37	0,89	0,03	0,11	0,75
Molluschi bivalvi, cefalopodi e crostacei			0,01	0,34	0,03	0,81	0,13		0,46	0,20			0,28
Uova		0,012	0,07	0,05	0,28			0,06	0,16		0,003	0,02	0,08
Dolciumi	0,02		0,01	0,20	0,26				0,02	0,07	0,01	0,40	0,12
Sale e spezie				1,65	0,86								1,26
Bevande	8,74	3,3	0,17	5,76	3,87			1,68	3,87	4,87	0,44	5,59	3,67
Cibi pronti									0,003			0,01	0,01
Totale/Stato Membro	18	7	2,4	24	19	10	0,4	12	8,0	53,3	1,8	11	14

Tabella 14. MERCURIO: intake settimanale(µg/settimana) da parte della popolazione adulta media

Alimento	BE	DK	FI	FR	DE	HE	IR	IT	NL	NO	PT	SE	UK	Media
Latte e derivati	0,88	2,66			1,15								1,61	1,57
Grassi e oli		0,14			0,86								0,56	0,52
Frutta e vegetali		4,27		24,4	22,9				7,35				2,03	12,2
Cereali e prodotti da forno		4,06		8,15*	9,21				2,94				4,34	5,74
Carne e Frattaglie		1,40			11,4		2,94				0,63		1,47	3,56
Pesce	17,7	6,72	43,4	19,1	19,6	31,6	6,44	60,2	1,33	23,4	91,7	19	7,00	26,7
Molluschi bivalvi, cefalopodi e crostacei	0,83			1,06	0,12	4,62	0,21			5,04	5,6			2,50
Uova		0,21			1,17								0,14	0,51
Dolciumi					0,35						2,73		1,33	1,47
Sale e spezie				3,44	0,14				0,63					1,4
Bevande		5,11		2,83	2,52								2,59	3,26
Cibi pronti													0,07	0,07
Cibi composti									0,28					0,28
Totale	19,4	24,5	43,4	59	69	36	9,6	60	12,6	28	101	19	21	38,7

Tabella 15. MERCURIO: intake settimanale in % del PTWI da parte della popolazione adulta media (PTWI per Hg = 0,005 mg/kg peso corporeo = 5 µg/kg peso corporeo)

Alimento	BE	DK	FI	FR	DE	HE	IR	IT	NL	NO	PT	SE	Media
Peso medio corporeo [kg]	60	72	77,1	66,4	70,5	70	75	70	65,8	73	70	73,7	70,3
Latte e derivati	0,29	0,74			0,33								0,45
Grassi e oli		0,04			0,24								0,14
Frutta e vegetali		1,19		7,36	6,49				2,23				4,32
Cereali e prodotti da forno		1,13		2,46	2,62				0,89				1,78
Carne e Frattaglie		0,39			3,22		0,78				0,18		1,14
Pesce	5,90	1,87	12,0	5,76	5,56	9,02	1,72	17,2	0,40	6,41	26,2	5,13	8,10
Molluschi bivalvi, cefalopodi e crostacei	0,28			0,32	0,04	1,32	0,06			1,38	1,6		0,71
Uova		0,06			0,33								0,19
Dolciumi					0,10						0,78		0,44
Sale e spezie				1,04	0,04				0,19				0,42
Bevande		1,42		0,85	0,72								1,00
Cibi pronti													
Cibi composti									0,1				0,99
Totale	6,47	6,81	12,1	17,8	19,7	10	2,6	17	3,8	7,8	29	5,1	18,78

Bibliografia

1. *Evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on food additives.* Geneva: World Health Organization; 1989. (WHO Technical Report Series).
2. Kagaku K. *Environmental effects of arsenic and antimony compounds*, Maeda, Shigeru, 1998; 49 (12):941-7.
3. Abernathy CO, Thomas DJ, Calderon RL. Health effects and risk assessment of arsenic. *Journal of Nutrition* 2003;133(5-1):1536-8.
4. Velez D, Montoro R. Inorganic arsenic in foods; current overview and future challenges. *Recent Research Developments in Agricultural & Food Chemistry* 2001;5:55-71.
5. Hindmarsh, JT, Abernathy CO, Peters GR, McCurdy RF. Environmental aspects of arsenic toxicity. *Heavy Metals in the Environment* 2002;217-9.
6. Le, X Chris. Arsenic speciation in the environment and humans. *Environmental Chemistry of Arsenic* 2002;95-116.
7. *Evaluation of certain food additives and contaminants. 41st report of JECFA.* Geneva: World Health Organization; 1993. (WHO Technical Report Series 837).
8. Dietary Exposure to Cadmium Science and Techniques- Report on Task for Scientific Co-operation - European Commission, 1996.
9. Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S, Haswell-Elkins M, Reilly Paul EB, Williams, David J, Moore, Micheal R, A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters* 2003;137(1-2):65-83.
10. Daniel O, Schlatter J. Toxicity of dietary cadmium. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 1999;90(6):734-50.

11. Anke M, Mueller M, Truepschuch A, Mueller R. Intake and effects of cadmium, chromium and nickel in humans. *Journal of Commodity Science* 2002, 41(1), 41-63.
12. Willecke-Wetstein C, Steinbach J, Luker E, Bacon J, Breen. Cadmium and lead in the food chain of industrial point source in Eastern Europe. Megen- und Spurenelemente, Arbeitstaging, 19th, Jena, Germany, Dec, 3-4, 1999:95-103.
13. Dudka S, Miller WP. Accumulation of potentially toxic element in plants and their transfer to human food chain. *Journal of Environmental Science and Health, part B: Pesticides, Food Contaminant, and Agricultural Waste* 1999;B34(4):681-708.
14. Bolger M, Carrington C, Larsen JC, Petersen B. *Lead*. WHO Food Additives series 2000, 44, (safety evaluation of certain Food Additives and Contaminants), 273-312.
15. Rubio C, Frias I, Hardisson A. Lead toxicology and its presence in food. *Alimentaria* 1999;305:77-85.
16. Willecke-Wetstein C, Steinbach J, Luker E, Bacon, J, Breen. Cadmium and lead in the food chain of industrial point source in Eastern Europe, Megen- und Spurenelemente, Arbeitstaging, 19th, Jena, Germany Dec, 3-4, 1999:95-103.
17. Bellinger DC, Bolger M, Carrington C, Dewailly E, Magos LPA, Petersen B. *Methylmercury*. WHO Food Additives series 2000, 44 (Safety evaluation of certain Food Additives and Contaminants) 313-391.
18. Clarkson TW. Human toxicology of mercury. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 1998;11(2/3):303-17.
19. Boisset M. Toxicological aspects of food contamination by mercury. Part 4. Epidemiological aspects of mercury and methylmercury exposure in the general population, Plomb, Cadmium et Mercure dans l'Alimentation: Evaluation et Gestion du Rique 1996,181-183
20. Abernathy CO, Thomas DJ, Calderon RL. Nutritional factors may modify the toxic action of methyl mercury in fish-eating populations. *Journal of Nutrition* 2003;133(5-1):1539s-43s.
21. Boisset M. Plomb. Toxicological aspects of food contamination by mercury. Major toxic effects of mercury and methylmercury in animal and humans. Cadmium et Mercure dans l'Alimentation: Evaluation et Gestion du Rique 1996,171-176.
22. Myers GJ, Davidson PW, Shamlaye CF. A review of methylmercury and child development. *Neurotoxicology* 1998;19(2):313-8.
23. Summary and conclusions, Published on the web: [ftp://ftp,fao.org/es/esn/jecfa/jecfa61sc.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa61sc.pdf) WHO, 2003, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants, Sixty-first meeting
24. Scoop Task 3,2,11, Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States E,U, SCIENTIFIC CO-OPERATION ON QUESTIONS RELATING TO FOOD 2003, Published on the web

VIRUS TRASMESSI DAI PRODOTTI ITTICI

Dario De Medici, Mara Paniconi

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

L'aumentata importanza della trasmissione attraverso gli alimenti di malattie di origine virale è stata più volte segnalata sia dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (1), che dal *Codex Alimentarius* (2).

Tra gli alimenti implicati nella trasmissione di malattie virale i molluschi bivalvi rivestono sicuramente un ruolo predominante, in quanto questi animali sono potenti filtratori e possono concentrare più di 100 volte gli eventuali virus presenti nelle acque in cui sono allevati o pescati (3-6).

La depurazione a cui sono sottoposti i molluschi che provengono da acque con limitata contaminazione di origine fecale mentre si è dimostrata di grande utilità per la prevenzione delle contaminazioni batteriche si è rilevata, invece, poco efficace ad eliminare i virus dal corpo dei molluschi contaminati (7).

Anche il controllo della qualità delle acque e dei molluschi basato sulla determinazione o quantificazione di organismi indice di contaminazione fecale, quali l'*E. coli* o i batteriofagi, si è rilevato non correlabile alla presenza di virus enterici (8). Infine, anche la determinazione diretta dei virus dai molluschi e dalle acque utilizzando le tecniche di biologia molecolare è un approccio in corso di valutazione perché non evidenzia l'effettiva infettività dei virus presenti e quindi la loro reale pericolosità per la salute pubblica (9, 10).

Virus coinvolti nelle tossinfezioni alimentari

I virus sono microrganismi di piccole dimensioni (15-400 nm) che possono causare una gran quantità di malattia sia nelle piante, sia negli animali sia nell'uomo. Le infezioni non avvengono però in maniera casuale, infatti, ogni virus ha un suo trofismo (cioè esplica la sua azione infettiva solo verso un tipico gruppo di specie ospiti e di cellule bersaglio).

Numerosi gruppi di virus enterici possono infettare l'uomo per ingestione ed essere successivamente diffusi nell'ambiente con le feci e l'emesi.

I virus che si è ipotizzato che siano in grado di causare patologie a seguito della loro trasmissione attraverso gli alimenti e le acque possono essere suddivisi in:

- virus che provocano gastroenteriti: rotavirus, adenovirus tipo 40 e 41, e due generi di calicivirus enterici umani i Norovirus (NV) e i sapovirus (SV);
- virus dell'epatite a trasmissione oro-fecale: virus dell'epatite A (*Hepatitis A Virus*, HAV) e virus dell'epatite E (*Hepatitis E Virus*, HEV);
- virus che replicano nell'intestino umano ma provocano patologie in altri organi, quali il sistema nervoso centrale o il fegato (enterovirus) (11).

Per molti virus enterici, varianti genomicamente differenti da quelle umane sono state ritrovate in diverse specie animali. Recentemente, NV sono stati isolati frequentemente sia in

vitelli che in maiali. Tali ceppi sono però geneticamente ben distinti da quelli isolati nell'uomo, e non è stata mai documentata la trasmissione zoonotica di questi virus all'uomo (12).

Similmente virus dell'Epatite E isolati in maiali sono risultati essere geneticamente molto simili a quelli ritrovati a livello clinico, anche se è da sottolineare che l'isolamento di HEV in questi animali è abbastanza comune anche in quei Paesi dove HEV è raramente diagnosticato nell'uomo (13). Quanto detto suggerisce che il rischio di trasmissione zoonotica dei virus enterici è veramente molto basso, anche se non può essere completamente escluso, e che c'è la necessità, anche in relazione alla flessibilità genetica che tutti i virus a RNA normalmente dimostrano di avere, di monitorare continuamente questi virus nell'ambiente per evidenziare prontamente qualunque cambiamento del loro comportamento (14).

Calicivirus

In base alle proprietà biologiche e alla analisi filogenica dell'RNA dei calicivirus, questi sono stati divisi in quattro gruppi:

- due gruppi associati a malattie a carico di specie animali:
 - *Vesivirus* responsabili dell'esantema vescicolare del maiale, alcune malattie dei mammiferi acquatici e alla infezione respiratoria del gatto.
 - *Lagovirus* che sono responsabili di alcune malattie della lepre e del coniglio.
- due gruppi associati a gastroenteriti trasmesse all'uomo:
 - *Norovirus* (NV) precedentemente conosciuti come *Norwalk-Like Viruses* (NLV) o come *Small Round Structured Viruses* (SRVS);
 - *Sapovirus* (SV), precedentemente conosciuti come *Sapporo-Like Viruses* (SLV) o come "typical caliciviruses".

I calicivirus sono dei virus piccoli e privi d'involucro (rivestimento) di circa 27-35 nm, contenenti un genoma costituito da un singolo filamento poliadelinato a polarità positiva, composto approssimativamente da 7,3 (Virus di Manchester) a 7,6 (Virus Norwalk) kb. Il genoma dei calicivirus è organizzato tipicamente in due o tre aree maggiori ORF (*Open Reading Frames*) che sono diversamente organizzate nei NV e nei SV e che li caratterizzano genomicamente. L'analisi della sequenza dei calicivirus isolati in diverse epidemie e in diverse località hanno permesso di dividere i NV in due genogruppi principali: e più di 15 genotipi. Nel genogruppo 1 (GI) vengono classificati, tra gli altri, il Norwalk virus (che è il prototipo del genotipo GI-1), il *Southampton Virus* (GI-2), il *Desert Shield virus* (GI-3) e il virus Valletta (GI-4); mentre nel genotipo 2 (GII) sono inclusi gli Hawaii virus (GII-1), i *Snow Mountain virus* e il virus Melksham (GII-2), il virus Mexico (GII-3) e il virus Grimsby (GII-4). Recentemente sono stati proposti due nuovi genogruppi di NV: il GIII che ha come prototipo il virus Jena che è stato isolato dalle feci di vitello (15); il GIV che è costituito da alcuni virus umani, che hanno come prototipo il virus Alphanon, che si collocano in una posizione intermedia tra virus appartenenti al GI e al GII (16), e il GV costituito dal Norovirus murino 1 (MNV-1) (17).

I SV sono stati classificati in tre principali genogruppi: il genogruppo I (SG-I), che include il virus Sapporo, il Parkville e lo Stoccolma; l'SG-II che include il virus London; e infine il SGIII che include il calicivirus dell'enterite suina. Recentemente sono stati ipotizzati due nuovi genogruppi di SV umani: il GIV e il GV.

I NV differiscono dai SV principalmente per quanto riguarda la loro epidemiologia, infatti, mentre i NV causano malattia in persone di tutte le età, i SV causano diarrea specificamente nei bambini. Dati epidemiologici raccolti nell'ambito del progetto europeo "Foodborne viruses in Europe" evidenziano che la maggior parte delle epidemie che annualmente si susseguono in Europa sono causate da un singolo genotipo di NV (GII-4), che dimostra avere notevoli mutazioni sul gene della polimerasi (18).

I calicivirus umani sono caratterizzati da elevata infettività, meno di 10 particelle virali sono necessarie per sviluppare la malattia, che favorisce la loro ampia diffusione tra la popolazione. La malattia è considerata essere autolimitante, i sintomi si manifestano dopo un periodo di incubazione di 1-3 giorni e consistono generalmente in febbre, vomito, diarrea e nausea. Sono più lievi nei bambini, a differenza delle altre gastroenteriti virali. La loro risoluzione avviene generalmente entro 2-3 giorni.

In uno studio epidemiologico condotto in Olanda è stato notato, con sorpresa da parte degli autori, che più del 20% delle persone coinvolte in casi di gastroenterite da NV riportava sintomi anche dopo due settimane dall'inizio della malattia. Tale studio suggerisce che la malattia potrebbe essere occasionalmente più grave di quanto precedentemente evidenziato (19).

Le infezioni si presentano durante tutto l'anno con un andamento stagionale in rapido cambiamento, inizialmente vennero classificate come "malattie invernali da vomito" proprio per la loro caratteristica di evidenziarsi in maggior misura durante i mesi più freddi dell'anno, successivamente confermata da numerosi studi epidemiologici (20); va però rilevato che un recente studio ha evidenziato un aumento dei casi di gastroenteriti da NV nel Regno Unito durante i mesi primaverili ed estivi (21). Tale differenza di picco epidemico sembra essere dovuto alla diffusione in di una nuova variante del genogruppo GII-4 (18) che oltre ad avere un picco epidemico diverso sembra possedere un potere di virulenza superiore ai ceppi precedentemente circolanti in Europa (22).

L'immunità conferita sembra essere di breve durata e limitatamente cross-protettiva tra un ceppo e l'altro. Si stima che il 50% della loro diffusione derivi da infezioni secondarie, per trasmissione da persona a persona. Probabilmente, nel corso della vita sono possibili reinfezioni. È stata dimostrata la trasmissione tramite l'acqua, gli alimenti (soprattutto molluschi) e l'aerosol. Epidemie gastroenteriche sono state frequentemente individuate in case per anziani, reparti ospedalieri e scuole. Si stima che negli Stati Uniti su 23 milioni di casi di gastroenterite acuta ogni anno, di queste più del 50% delle gastroenteriti trasmesse dagli alimenti sembra dipendere da NV. In Olanda, questa percentuale sale all'80%, con oltre il 50% nei reparti di neonatologia (11). In Inghilterra e nel Galles tra il 1992 e il 1994 le malattie trasmesse da NV hanno rappresentato il 27% di tutte le malattie gastrointestinali sottoposte a sorveglianza (23). In Finlandia il 56% delle epidemie alimentari erano confermate essere dovute a NV (24).

I calicivirus umani (NV e SV) non sono coltivabili (25), il metodo di diagnosi più utilizzato al momento per la loro identificazione è la RT-PCR, anche se un consenso internazionale sulla scelta dei *primer* da utilizzare non è stato ancora trovato. La maggior parte degli autori individua nella regione codificante la polimerasi la parte del genoma più interessante sia da un punto di vista diagnostico sia per studi di carattere epidemiologico (26).

Virus dell'epatite A

Il virus dell'epatite A è un virus della famiglia delle Picornaviridae recentemente classificato come unico rappresentante del genere degli epatovirus. L'HAV è un virus piccolo, privo d'involucro (rivestimento) di circa 27-32 nm; contenente un singolo filamento di RNA a polarità positiva di circa 7,5 kb, distinto in tre regioni:

1. la regione 5' NCR, divisa in sei domini ed è covalentemente legata con la proteina virale VPg.
2. un singolo ORF che codifica una lunga poliproteina (27); questa poliproteina è quindi scissa da una poliproteinasi prodotta nella regione 3' C in quattro proteine strutturali e sette non strutturali.
3. una corta regione 5' NTR, che termina con un tratto poliadenilico.

La regione 5' NCR, come anche per gli altri picornavirus è la regione più conservata dell'intero genoma ed è stata ampiamente utilizzata per sviluppare metodi di analisi per la

diagnosi specifica in differenti substrati ambientali e clinici. Diversamente la regione VP1 risulta la regione meno conservata, per questo motivo è stata ampiamente studiata per comprendere la distribuzione geografica del virus dell'epatite A (28), analogamente a quanto già fatto per il poliovirus (29). In particolare la classificazione dell'HAV è stata effettuata comparando la percentuale di identità delle basi nella congiunzione tra la proteina virale 1 e la proteina non strutturale 2A (VP1/2A) del genoma, anche se alcuni autori suggeriscono che la comparazione di solo questo tratto (circa 168 basi) non è sufficiente, e che tutto il gene VP1 dovrebbe essere comparato per comprendere la evoluzione molecolare dell'HAV (30). Sulla base dell'identità delle basi nella congiunzione VP1/2A sono stati identificati sette diversi genotipi (I-VII). Un genogruppo è definito come un gruppo di virus con più del 85% di omologia della sequenza nucleotidica. I primati sono i soli ospiti naturali del HAV, i virus appartenenti a quattro genotipi (I, II, III e VII) sono stati isolati in casi umani, mentre quelli appartenenti agli altri tre genotipi (IV, V e VI) sono stati isolati in scimmie in cattività e che mostravano una malattia simile all'epatite umana.

I Genotipi I e III sono stati divisi in due distinti subgenotipi che differiscono per non più del 7,5% delle posizioni delle basi.

La variabilità notata a livello nucleotidico non si riflette, però, in un equivalente grado di variazione a livello aminoacidico. Tale basso livello di diversità antigenica comporta che, attualmente, tutti i virus di HAV appartengono allo stesso sierotipo, e che l'immunità acquisita a seguito di un'infezione, anche asintomatica, perdura per tutta la vita verso tutti i diversi genotipi umani.

L'infezione da HAV avviene usualmente attraverso il contatto diretto con feci infette o mediante l'ingestione di cibi e acque contaminati con il virus.

La sequenza di eventi, che porta dalla penetrazione del virus per via orale alla replicazione nel fegato, non è ancora stata completamente chiarita. Sebbene il sito bersaglio della replicazione dell'HAV sia l'epatocita, da molti anni si cerca di determinare se il virus abbia anche siti di replicazione differenti dalle cellule epatiche. In effetti, studi recenti condotti in scimmie hanno suggerito che il virus possa inizialmente riprodursi nelle cellule intestinali, dove è stato messo in evidenza alcuni giorni prima che negli epatociti (31). I sintomi clinici dell'epatite (tra cui l'ittero, l'aumento delle transaminasi, e gli squilibri della funzionalità epatica) sono la diretta conseguenza della distruzione delle cellule infette, in seguito alla moltiplicazione virale.

Dopo l'infezione con il virus si verifica un periodo di incubazione di circa 2-7 settimane, che può essere seguito dalla comparsa dei sintomi clinici (epatite itterica) o dare luogo ad una epatite inapparente. L'infezione lieve o inapparente, si verifica prevalentemente nei soggetti molto giovani; si stima che un'elevata percentuale dei bambini venga a contatto del virus e acquisisca l'immunità nei primi dieci anni di vita. Nei Paesi industrializzati, in cui le condizioni igieniche sono buone, la circolazione del virus è limitata e gli adulti si trovano spesso privi di anticorpi. La ospedalizzazione e l'eventuale morte sono eventi rari e correlati con l'aumento dell'età del paziente. Negli USA i dati riportati dal CDC indicano che la percentuale di mortalità nelle persone con oltre 50 anni di età è del 1,8%, spesso in soggetti con pregresse malattie croniche a carico del fegato. Inoltre, diversamente da ciò che avviene nel caso di altri virus epatitici, l'infezione acuta da HAV non tende mai alla cronicizzazione. Il pericolo di disseminazione virale da parte dei soggetti infetti è maggiore durante l'ultima parte del periodo di incubazione, dal momento che l'apparente buona salute del soggetto non impone misure di cautela.

Circa il 20% dei casi di epatite A riscontrati durante una epidemia è dovuta a casi di trasmissione secondaria. La somministrazione di immunoglobuline con un elevato titolo anticorpale avviata prima dell'esposizione dei casi secondari è stata a lungo utilizzata per

ridurre l'incidenza di questi casi secondari. L'immunità di tipo passivo che comunque conferiscono le immunoglobuline è limitata a pochi mesi.

Uno studio recentemente condotto in Italia, sulla vaccinazione dei contatti familiari di casi di HAV, ha dimostrato una efficacia vaccinale nella prevenzione delle infezioni secondarie di circa l'80%, inoltre la vaccinazione ha l'ulteriore vantaggio di conferire una immunità permanente (32).

In Italia esiste un Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA) creato nel 1984 presso l'Istituto Superiore di Sanità; con questo sistema è possibile una valutazione dell'incidenza delle epatiti acute, ed è possibile impostare delle strategie di prevenzione.

Il SEIEVA utilizza le notifiche giunte al centro di riferimento mediante il modulo di trasmissione settimanale per calcolare i tassi di incidenza utilizzando come denominatore i dati dei censimenti, mentre utilizza un questionario *ad hoc* per quanto riguarda i dati clinici e i fattori di rischio. Utilizzando i dati provenienti dal sistema di sorveglianza, è stato possibile osservare che l'epatite A costituisce attualmente il 64% delle epatiti virali acute (circa 1000 casi anno). I tassi di incidenza indicano una diminuzione dei casi notificati passando da un valore di 10 per 100,000 nel 1985 ad un valore di incidenza del 2 per 100,000 nel 2002. Nel corso del 1996 e il 1997 a causa di un'estesa epidemia in Puglia che ha coinvolto circa 11,000 persone, il tasso di incidenza della malattia è risultato essere di 19 per 100,000. La classe di età più colpita risulta quella dei giovani adulti (15-24 anni), questo è dovuto al fatto che diminuendo l'infezione in età infantile, a causa di un miglioramento delle condizioni igienico sanitarie, si è creata una quota di soggetti suscettibili nella età in cui è più probabile l'esposizione a fattori di rischio per l'epatite A, come il consumo di frutti di mare. L'abitudine di consumare frutti di mare crudi o poco cotti è in molti Paesi il principale fattore di rischio per quanto riguarda i casi primari mentre la trasmissione oro-fecale è la principale causa della trasmissione nei casi secondari.

In certe aree sia del continente africano che asiatico, l'epatite A è ancora particolarmente endemica con tassi di incidenza che possono arrivare a 30-40 casi per 100,000 durante i periodi epidemici.

In alcuni studi epidemiologici condotti in USA, in Germania e in UK, il consumo di molluschi è stato stimato essere responsabile rispettivamente del 19, il 20 e il 25% dei casi totali di epatite A in quei Paesi.

La prima epidemia da epatite A dovuta al consumo di molluschi fu riportata in Svezia nel 1956 dove 629 casi di epatite furono associati al consumo di ostriche.

Negli USA il primo caso riportato dovuto al consumo di molluschi fu registrato nel 1961. La più importante epidemia fu segnalata nella regione di Shangai, in Cina, nel 1988 dove più di 288.000 di malattia, con nove morti, furono correlati al consumo di molluschi di fiume crudi o poco cotti (33).

Virus dell'epatite E

Il virus dell'epatite E (*Hepatitis E Virus*, HEV) è formalmente conosciuto come il "virus delle epatiti a trasmissione enterica non-A e non-B" (34). L'acqua contaminata da feci è la causa più importante di trasmissione della malattia, e molte epidemie sono state frequentemente osservate nei Paesi tropicali dopo la stagione delle piogge. La malattia itterica causata dal virus dell'epatite E è molto simile a quella causata dal virus dell'epatite A. La malattia ha un periodo di incubazione medio di 6 settimane, con un range di 2-9 settimane. Non è stato mai evidenziato cronicizzazione della malattia, mentre è stata rilevata in più epidemie un alto tasso di mortalità nelle donne in gravidanza (approssimativamente del 20%), specialmente durante il primo

trimestre (35). Epidemiologicamente, sono state descritte importanti epidemie che hanno interessato giovani e adulti. La patologia è stata rilevata raramente nei bambini. Il primo studio di una epidemia dovuta al consumo di acque contaminate venne riportata nel 1956 a Nuova Delhi (India) con circa 29.000 casi (36), mentre la più vasta epidemia venne osservata dal 1986 al 1988 nel nordovest della Cina nella regione dello Xinjiand Uighur con 119.289 casi clinici. Molte altre epidemie sono state successivamente riportate in molti Paesi in via di sviluppo dell'Africa, dell'Asia, e dell'America Centrale come conseguenza di scarse condizioni sanitarie, insufficiente approvvigionamento idrico e contaminazione fecale dell'ambiente (37). Nonostante l'assenza di casi accertati di epatite E nei Paesi industrializzati, un'indagine compiuta in Catalogna (Spagna) ha evidenziato che l'84,2% delle acque di scarico analizzate durante il biennio 2001-2002 sono risultate positive alla ricerca dell'HEV, tale dato può indicare che la prevalenza delle infezioni dovute a questo virus in questi Paesi possa essere sottostimato (38)

Bibliografia

1. Motarjemi Y, Käferstein F, Moy G, Miyagishima K, Miyagawa S, Reilly A. *Food technologies and public health*. Geneva: Food Safety Unit Division of Food and Nutrition, World Health Organization; 1995. (WHO/FNU/FOS/95.12; Food Safety Issues).
2. Codex Committee on Food Hygiene. *Discussion paper on viruses in food*. Roma. FAO - Codex Alimentarius Commission; 1999. (CX/FH 99/11).
3. Sugieda M, Nakajima K, Nakajima S. Outbreaks of Norwalk-like virus-associated gastroenteritis traced to shellfish: coexistence of two genotypes in one specimen. *Epidemiol Infect* 1996;116(3):339-46.
4. Leoni E, Bevini C, Degli Esposti S, Graziano A. An outbreak of intrafamilial hepatitis A associated with clam consumption: epidemic transmission to a school community. *Eur J Epidemiol* 1998;14(2):187-92.
5. Normann A, Pfisterer-Hunt M, Schade S, Graff J, Chaves RL, Crovari P, Icardi G, Flehmig B. Molecular epidemiology of an outbreak of hepatitis A in Italy. *J Med Virol* 1995;47(4):467-71.
6. Lopalco PL, Malfait P, Salmaso S, Germinario C, Quarto M, Barbuti S, Cipriani R, Mundo A, Pesole G. A persisting outbreak of hepatitis A in Puglia, Italy, 1996: epidemiological follow-up. *Euro Surveill* 1997;2(4):31-2.
7. De Medici D, Ciccozzi M, Fiore A, Di Pasquale S, Parlato A, Ricci-Bitti P, Croci L. Closed-circuit system for the depuration of mussels experimentally contaminated with hepatitis A virus. *J Food Prot* 2001;64(6):877-80.
8. Croci L, De Medici D, Scalfaro C, Fiore A, Divizia M, Donia D, Cosentino AM, Moretti P, Costantini G. Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *E. coli* in Adriatic Sea mussels. *J Appl Microbiol* 2000;88(2):293-8.
9. De Medici D, Croci L, Di Pasquale S, Fiore A, Toti L. Detecting the presence of infectious hepatitis A virus in molluscs positive to RT-nested-PCR. *Lett Appl Microbiol* 2001;33(5):362-6.
10. De Medici D, Croci L, Di Pasquale S, Fiore A, Toti L. The presence of viral RNA is a real risk for the consumer? *J Clinl Vir* 2001;22:170.
11. Koopmans M, von Bonsdorff CH, Vinje J, De Medici D, Monroe S. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26(2):187-205.
12. Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* 1998;143(6):1215-21.

13. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(18):9860-5.
14. Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate Noroviruses. *J Gen Virol* 2004;85(Pt 1):79-87.
15. Liu BL, Lambden PR, Gunther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses, *J Virol* 1999;73(1):819-25.
16. Koopmans M, Vinje J, Duizer E, de Wit M, van Duijnhoven Y. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. In: *Novartis Found Symp* 2001. p. 197-214
17. Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HWT. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus, *Science* 2003;299(5612):1575-8.
18. Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negredo A, Buesa J, Schreier E, Reacher M, Brown D, Gray J, Iturriza M, Gallimore C, Bottiger B, Hedlund KO, Torven M, von Bonsdorff CH, Maunula L, Poljsak-Prijatelj M, Zimsek J, Reuter G, Szucs G, Melegh B, Svennson L, van Duijnhoven Y, Koopmans M. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new Norovirus variant. *Lancet* 2004;363(9410):682-8.
19. Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinje J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, Koopmans M. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2002;35(3):246-53.
20. Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J and Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 2):S284-7.
21. Lopman BA, Reacher M, Gallimore C, Adak GK, Gray JJ, Brown DW. A summertime peak of "winter vomiting disease": surveillance of Noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. *BMC Public Health* 2003;3(1), p. 13.
22. Gallimore CI, Green J, Lewis D, Richards AF, Lopman BA, Hale AD, Eglin R, Gray JJ, Brown DW. Diversity of Noroviruses cocirculating in the north of England from 1998 to 2001. *J Clin Microbiol* 2004;42(4):1396-401.
23. Djuretic T, Wall PG, Ryan MJ, Evans HS, Adak GK, Cowden JM. General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales 1992 to 1994. *Commun Dis Rep CDR Rev* 1996;6(4):R57-63.
24. Maunula L, Piiparinen H, von Bonsdorff CH. Confirmation of Norwalk-like virus amplicons after RT-PCR by microplate hybridization and direct sequencing. *J Virol Methods* 1999;83(1-2):125-34.
25. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(1):15-37.
26. Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II Noroviruses. *J Virol Methods* 2004;116(2):109-17.
27. Najarian R, Caput D, Gee W, Potter SJ, Renard A, Merryweather J, Van Nest G, Dina D. Primary structure and gene organization of human hepatitis A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(9):2627-31.
28. Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S, Ito K, et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 1992;73(Pt 6):1365-77.
29. Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, Kew OM. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology* 1987;160(2):311-22.
30. Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercof R, Casane D, Colina R, Garcia L, Vega I, Glikman G, Romanowsky V, Castello A, Nicand E, Gassin M, Billaudel S, Ferre V. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol* 2002;76(18):9516-25.

31. Asher LV, Binn LN, Mensing TL, Marchwicki RH, Vassell RA, Young GD. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J Med Virol* 1995;47(3):260-8.
32. Sagliocca L, Amoroso P, Stroffolini T, Adamo B, Tosti ME, Lettieri G, Esposito C, Buonocore S, Pierri P, Mele A. Efficacy of hepatitis A vaccine in prevention of secondary hepatitis A infection: a randomised trial. *Lancet* 1999;353(9159):1136-9.
33. Butt AA, Sanders CV. Infections related to the ingestion of seafood Part I: Viral and bacterial infections. *Lancet Infect Dis* 2004;4(4):201-12.
34. Reyes GR, Huang CC, Tam AW, Purdy MA. Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Arch Virol Suppl* 1993;7:15-25.
35. Paul DA, Knigge MF, Ritter A, Gutierrez R, Pilot-Matias T, Chau KH, Dawson GJ. Determination of hepatitis E virus seroprevalence by using recombinant fusion proteins and synthetic peptides. *J Infect Dis* 1994;169(4):801-6.
36. Viswanathan R. A review of the literature on the epidemiology of infectious hepatitis. *Indian J Med Res* 1957;45(Suppl):145-55.
37. Worm HC, van der Poel WH, Brandstatter G. Hepatitis E: an overview. *Microbes Infect* 2002;4(6):657-66.
38. Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardi R, Martin M, Bofill-Mas S, Girones R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* 2003;9(4):448-54.

DETERMINAZIONE DI NOROVIRUS IN MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI

Elisabetta Suffredini, Bruna Auricchio

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

I Norovirus (NV) rappresentano la più importante causa di epidemie gastroenteriche di origine virale nel mondo (1-3). La trasmissione mediante acqua e alimenti è comune e largamente documentata (4-10) e differenti studi epidemiologici hanno implicato gli NV in epidemie collegate al consumo di molluschi (11-17).

In numerose epidemie di questo tipo, tuttavia, l'agente causativo non è stato identificato a causa della mancanza di un metodo analitico sufficientemente sensibile per l'analisi dei molluschi implicati (18). Infatti, a causa del basso livello di contaminazione riscontrabile nei molluschi, la ricerca dei virus in questa matrice necessita di metodi analitici di elevata sensibilità. Per gli NV, inoltre, contestualmente al problema della sensibilità del metodo, è necessario considerare anche le difficoltà poste dall'elevatissima variabilità genomica di questo gruppo (19-22) allo sviluppo di un metodo capace di rilevare contemporaneamente tutti i ceppi virali noti.

Il presente lavoro riporta, congiuntamente ad una rassegna dei metodi analitici attualmente disponibili per la ricerca degli NV nei molluschi, il protocollo del metodo (denominato *Reverse Transcriptase-booster-Polymerase Chain Reaction, RT-booster-PCR*) sviluppato presso l'Istituto Superiore di Sanità.

Metodi

Microscopia elettronica

A partire dal primo rilevamento degli NV nei campioni di feci (23) la microscopia elettronica diretta (*Electronical Microscopy, EM*) e l'immunolettromicroscopia (*ImmunoElectro Microscopy, IEM*) sono rimasti i test più largamente usati per esaminare i campioni di feci per la presenza di NV. Per visualizzare i virus mediante tali tecniche, tuttavia, la concentrazione del virus nella feci deve essere almeno 10^6 - 10^7 particelle/mL (24) e, poiché durante le infezioni da NV è possibile che si abbia un basso livello di rilascio del virus (25), la diagnosi mediante IEM può portare a falsi negativi.

Nonostante gli innegabili problemi relativi alla scarsa sensibilità di tale metodo di diagnosi, la microscopia elettronica, permettendo la diagnosi a prescindere dalle varianti genetiche e antigeniche, rimane il metodo di riferimento per la diagnosi dei virus gastrointestinali nei campioni clinici.

Per quanto concerne l'analisi su matrici alimentari, la microscopia elettronica è raramente utilizzata, non essendo in grado di competere con i metodi molecolari né per la sensibilità della determinazione, né in termini di praticità, trattandosi di uno strumento diagnostico scarsamente disponibile sul territorio e con un alto costo di gestione (Tabella 1).

Tabella 1. Metodi per la determinazione di Norovirus

Metodo	Sensibilità	Note
EM/IEM	10^{6-7}	- individuazione di tutti i ceppi virali - scarsa praticità / economicità - scarsa sensibilità
ELISA	10^{4-6}	- individuazione solo di alcuni ceppi virali - praticità - scarsa sensibilità
RT-PCR	10^{2-4}	- individuazione solo di alcuni ceppi virali - sensibilità
Colture cellulari	Non sono ancora disponibili linee cellulari per la coltura degli NV	

ELISA

A partire dal 1978, utilizzando le quantità limitate di reagenti ottenuti grazie a studi su volontari, si intraprese lo sviluppo di saggi RIA (*RadioImmuno Assay*) (26) e più tardi saggi ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) per la determinazione dei ceppi virali maggiormente circolanti (27, 28). Benché questi saggi si dimostrassero pratici per l'utilizzo in larga scala, l'elevata specificità del riconoscimento impediva la cross-reattività con virus di genotipi differenti (29) e ne limitava l'uso nelle analisi epidemiologiche. Attualmente, grazie alla possibilità di esprimere in modo eterologo la proteina capsidica dei diversi ceppi virali (30), sono stati sviluppati nuovi saggi ELISA basati su sieri iperimmuni a particelle ricombinanti. La produzione di anticorpi monoclonali verso proteine capsidiche ricombinanti (31, 32) ha permesso inoltre la costruzione di panel anticorpali multivalenti con reattività ad ampio spettro, capaci di rilevare un'estesa gamma di genotipi all'interno dei due genogruppi. Saggi ELISA di questo tipo, commercialmente disponibili, si sono dimostrati (33-35) un valido mezzo per lo screening preliminare di campioni clinici implicati in epidemie. Tuttavia l'elevato numero di falsi negativi, legato al mancato riconoscimento di alcuni dei ceppi circolanti e alla bassa sensibilità del saggio (Tabella 1), rende tali test scarsamente applicabili per le determinazioni in campo alimentare.

Metodi molecolari

Il clonaggio e sequenziamento completo del genoma del Norwalk virus (36, 37) aprì la porta per lo sviluppo, a partire dal 1990, di metodi molecolari (RT-PCR, *RT-nested-PCR*, ibridazione con sonde, ecc.) che hanno progressivamente rimpiazzato gli altri strumenti diagnostici per gli NV.

Le prime applicazioni dei metodi di rilevazione molecolari si dimostrarono, in verità, piuttosto deludenti (38) poiché i *primer* disegnati sulla base delle sequenze disponibili (Norwalk e Southampton) risultarono incapaci di rilevare i virus nella maggior parte dei campioni risultati positivi mediante microscopia elettronica. L'elevata variabilità genica del genere, allora non sospettata, fu messa in luce a partire dal 1994, quando, alle iniziali informazioni genetiche, andarono ad aggiungersi ulteriori sequenze ottenute sulla regione della RNA-polimerasi (39) che evidenziarono come il grado di variabilità del genere superasse di gran lunga quello atteso.

A tutt'oggi tale variabilità costituisce l'ostacolo principale che si presenta nello sviluppo di metodi per il rilevamento degli NV. L'identità aminoacidica calcolata per la proteina capsidica (ORF2) fra ceppi appartenenti a diversi genogruppi, infatti, varia fra il 37 e il 44% mentre, all'interno del medesimo genogruppo l'identità oscilla approssimativamente fra il 60 e il 99,8% (19). A tale varietà della proteina corrisponde una altrettanto elevata variabilità del genoma che rende estremamente complesso lo sviluppo di *primer* di PCR in grado di rilevare tutti i ceppi

circolanti. Questa difficoltà di carattere pratico si ripercuote, inoltre, nella scelta di quale regione (la proteina maggiore del capsido codificata nella ORF2 o la polimerasi-RNA dipendente della ORF1) utilizzare come target delle determinazioni. Mentre infatti la regione capsidica, fornendo un legame fra mutazione genetica e mutazione antigenica, risulta particolarmente significativa da un punto di vista filogenetico, la polimerasi-RNA dipendente, grazie ad un maggiore conservazione della sequenza, presenta minori difficoltà alla definizione di *primer* comuni a diversi genotipi.

Un secondo problema, fondamentale nel campo delle analisi su matrici alimentari, è quello della sensibilità della determinazione. Data la bassa concentrazione del virus negli alimenti la sensibilità offerta dalle *PCR single-round* spesso non è sufficiente a garantire la sicurezza dell'alimento. L'analisi mediante *PCR-nested*, è tuttavia complicata, come già accennato, dalla difficoltà di rintracciare sequenze conservate nei diversi ceppi e, molto spesso, richiede per la sua esecuzione l'utilizzo di molteplici set di *primer*. È inoltre necessario tener presente che, a prescindere dal tipo di PCR adottata, la preparazione del campione deve essere condotta attraverso un protocollo che garantisca sia un'adeguata concentrazione del virus, sia un'adeguata rimozione dei fattori inibenti la PCR presenti nella matrice alimentare.

Insieme a tali difficoltà di carattere pratico bisogna infine tenere conto di altre esigenze delle analisi su matrici alimentari. Nell'ambito di un'indagine epidemiologica, infatti, determinare la presenza del virus costituisce solo una parte delle attività richieste, poiché in assenza di un'identificazione e caratterizzazione del virus stesso ci si preclude la possibilità di collegare in modo sicuro i casi di malattia (sporadici od epidemici) con gli alimenti che sono stati veicolo di infezione. Tale esigenza implica la necessità di utilizzare come target dell'analisi una regione epidemiologicamente significativa, in grado di fornire informazioni di sequenza sufficienti a collegare l'alimento contaminato con i casi clinici.

RT-booster-PCR

Aspetti generali

La *booster-PCR* è stata per la prima volta proposta da Ruano *et al.* nel 1989 per applicazioni in ambito forense e di genetica di popolazione (19, 40, 41) e da allora è stata riproposta in una serie diversificata di utilizzi per l'analisi di patogeni alimentari (42, 43), di patogeni di vegetali (44, 45) nonché per l'analisi dell'HIV (46, 47).

Il principio della *booster-PCR* è una doppia amplificazione effettuata, a differenza della *nested-PCR*, con l'utilizzo della medesima coppia di *primer*. Al fine di ottimizzare la reazione i *primer* in prima e seconda PCR devono essere utilizzati in concentrazioni differenti. In particolare la concentrazione in prima PCR deve essere tale che i *primer* siano approssimativamente equimolari con il target (Ruano); ciò significa che per ottenere una maggiore efficienza di amplificazione in presenza di un target in basso numero di copie (ovvero campioni con bassa concentrazione di virus) i *primer* della prima PCR devono essere fortemente diluiti. La concentrazione dei *primer* della prima PCR deve essere inoltre ottimizzata in funzione della loro concentrazione nella seconda PCR, in modo tale da diminuire la probabilità di formazione di strutture, come i dimeri dei *primer*, che riducono l'efficienza della reazione polimerasica.

Gli effetti di una *booster-PCR* sono sostanzialmente di due tipi:

1. aumento della sensibilità della determinazione rispetto ad una *PCR single-round*;
2. mantenimento delle dimensioni dell'amplicone; tale caratteristica è particolarmente utile ai fini dell'analisi epidemiologica poiché consente il sequenziamento di una regione più lunga del genoma rispetto a quando normalmente consentito dalle *nested PCR*.

Rilevamento degli NV nei molluschi

Utilizzando il principio delle *booster-PCR* presso il Laboratorio Nazionale di Riferimento per la contaminazione batteriologica e virale dei molluschi bivalvi (il Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e i Rischi Alimentari dell'Istituto Superiore di Sanità) è stato sviluppato un metodo per la determinazione degli NV nei molluschi che si propone di coniugare le esigenze di sensibilità con quelle del rilevamento di un ampio spettro di ceppi di NV e dell'amplificazione di un segmento di genoma significativo ai fini del sequenziamento (48).

Fra le differenti strategie di RT-PCR proposte per permettere il rilevamento dei differenti genotipi (49), un approccio dimostratosi efficace per il rilevamento dei ceppi comunemente circolanti nei Paesi dell'Unione Europea (50) consiste nell'associare *primer* selezionati in una regione maggiormente conservata (RNA polimerasi-RNA dipendente) con l'utilizzo di temperature di *annealing* poco stringenti, in grado di favorire il riconoscimento anche di sequenze divergenti (51, 52). Tale approccio, unito all'incremento di sensibilità ottenuto mediante una *booster-PCR* è alla base del metodo sviluppato per il rilevamento degli NV.

Nelle prove effettuate su sospensioni fecali, la *RT-booster-PCR* è stata in grado di rilevare la presenza di NV fino alla seconda diluizione decimale oltre l'ultima evidenziata da una PCR single-round (52) utilizzata come riferimento (Figura 1) e tale incremento di sensibilità è stato confermato su molluschi sperimentalmente contaminati, con risultati paragonabili a quelli ottenuti sulle sospensioni virali (Figura 2).

PROTOCOLLO della *RT-booster-PCR*

Concentrazione del virus dai molluschi: Precipitazione PEG-glicina come descritto in De Medici *et al.* (53).

Estrazione dell'RNA virale: Estrazione con soluzione D come riportato in Croci *et al.* (54); risospensione del pellet di RNA in 5 mL di acqua per PCR contenente 1U/μl di inibitore delle RNasi. In alternativa, estrazione con kit commerciale.

Primer: descritti in Vinjé *et al.* (51)

JV12 (forward) 5'- ATA CCA CTA TGA TGC AGA TTA -3'

JV13 (reverse) 5'- TCA TCA TCA CCA TAG AAA GAG -3'

Materiali: Access RT-PCR system (Promega)

Trascrizione inversa: 1X AMV/Tfl buffer, 200 μM dNTPs, 1 mM MgSO₄, 5 U di AMV trascrittasi inversa, 4 μl del *primer* JV13 (5 μM), 5 μl di RNA, acqua per PCR fino al volume finale di 45 μl, Cicli di reazione: 48 °C per 60 min, 99 °C per 5 min.

Prima PCR: Aggiungere alle provette della retrotrascrizione 5 μl di una mix così composta: 1 μl Tfl DNA polimerasi (5 U/μl), 1 μl del *primer* JV13 (5 μM), 1 μl del *primer* JV12 (5 μM), 2 μl di acqua per PCR. Cicli di reazione: 2 min a 94 °C; 20 cicli di 94 °C per 1 min, 37 °C per 4 min, 68 °C per 2 min; estensione finale a 68 °C per 7 min.

Seconda PCR: 1X AMV/Tfl buffer, 200 μM dNTPs, 1 mM MgSO₄, 5 U di Tfl DNA polimerasi, 1 μl del *primer* JV13 (50 μM), 1 μl del *primer* JV12 (50 μM), 5 μl del prodotto di prima PCR, acqua per PCR fino al volume finale di 50 μl. Cicli di reazione: 2 min a 94 °C; 40 cicli di 94 °C per 1 min, 37 °C per 1 min e 30 s, 68 °C per 2 min; estensione finale a 68 °C per 7 min.

Gel elettroforesi: Far correre i prodotti di PCR su gel d'agarosio al 2% colorato con bromuro di etidio. Verificare la presenza del frammento di 326 bp atteso. Procedere all'esecuzione del Southern hybridization a prescindere dalla presenza visibile di tale frammento.

Southern hybridization: Utilizzare le seguenti sonde marcate con biotina in 5' (Vinjé, comunic. personale)

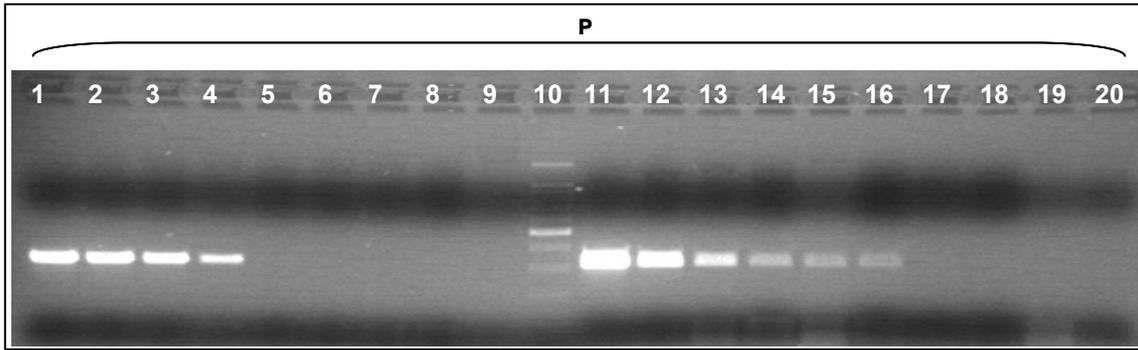
UK-3 5'-GTC CCC TGA CAT CAT ACA GGC T-3'

JV-5 5'-CTC ACC AGA GGT TGT CCA AGC-3'

GG-I 5'-ATG GAY GTT GGY GAY TAT GT-3'

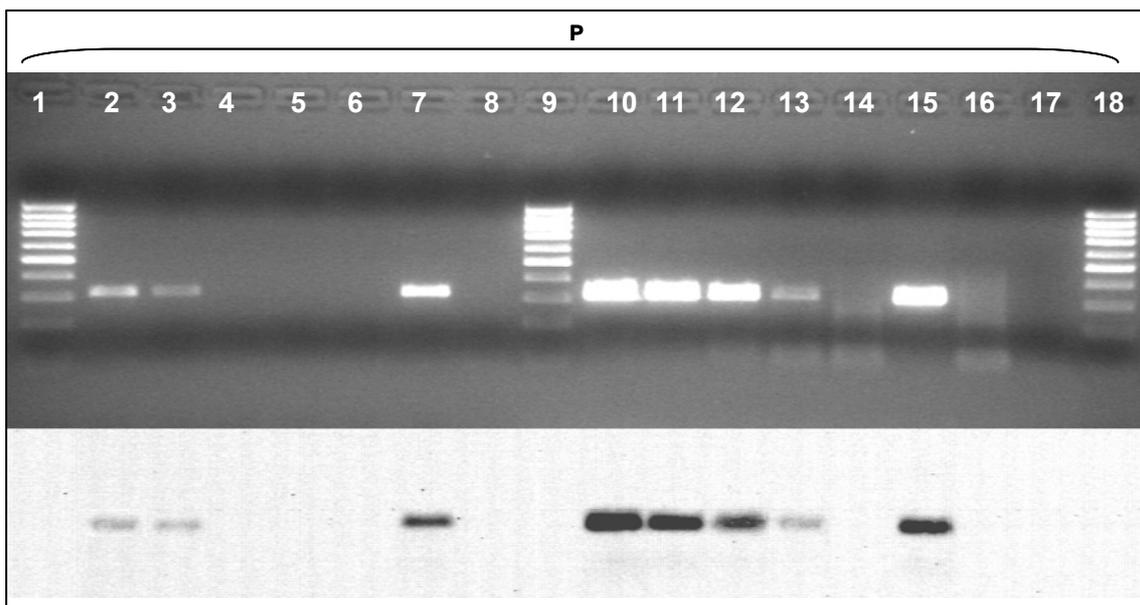
GG-II 5'-GAA YTC CAT CRC CCA YTG-3'

Procedere come descritto in Bergmans *et al.* (55) effettuando una ibridazione a 42 °C overnight. Evidenziare il legame delle sonde mediante rilevazione della chemiluminescenza (sistema biotina – streptavidina perossidasi – luminolo).



Pozzetti (P) 1-8: diluizioni decimali dell'RNA virale sottoposti a RT-PCR; P 9: controllo negativo della RT-PCR; P 10: marker elettroforetico (100 bp), P 11-18: diluizioni decimali dell'RNA virale sottoposti a RT-booster-PCR; P 19 e 20: controlli negativi della 1^a e 2^a PCR della RT-booster-PCR)

Figura 1. Confronto dei risultati ottenuti mediante RT-PCR single-round e RT-booster-PCR su RNA virale estratto da un campione clinico



Pozzetti (P) 1, 9 e 18: marker elettroforetico (100 bp); P 2-5: campioni sperimentalmente contaminati con diluizioni decimali di NV genotipo Hawaii sottoposti a RT-PCR; P 6: campione non contaminato sottoposto a RT-PCR, P 7- 8: controllo positivo e controllo negativo della RT-PCR; P 10-13: campioni sperimentalmente contaminati con diluizioni decimali di NV genotipo Hawaii sottoposti a RT-booster-PCR, Pozzetto 14: campione non contaminato sottoposto a RT-booster-PCR; P 15-17: controllo positivo e controlli negativi della RT-booster-PCR

Figura 2. Confronto dei risultati ottenuti mediante RT-PCR single-round e RT-booster-PCR su molluschi sperimentalmente contaminati (gel elettroforetico e Southern blot)

Bibliografia

1. Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect* 2000;124(3):481-7.
2. Koopmans M, von Bonsdorff CH, Vinje J, de Medici D, Monroe S. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26(2):187-205.
3. Lopman BA, Brown DW, Koopmans M. Human caliciviruses in Europe. *J Clin Virol* 2002;24(3):137-60.
4. Anderson AD, Garrett VD, Sobel J, Monroe SS, Fankhauser RL, Schwab KJ, Bresee JS, Mead PS, Higgins C, Campana J, Glass RI. Multistate outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis associated with a common caterer. *Am J Epidemiol* 2001;154(11):1013-9.
5. Anderson AD, Heryford AG, Sarisky JP, Higgins C, Monroe SS, Beard RS, Newport CM, Cashdollar JL, Fout GS, Robbins DE, Seys SA, Musgrave KJ, Medus C, Vinje J, Bresee JS, Mainzer HM, Glass RI. A waterborne outbreak of Norwalk-like virus among snowmobilers-Wyoming, 2001. *J Infect Dis* 2003;187(2):303-6.
6. Boccia D, Tozzi AE, Cotter B, Rizzo C, Russo T, Buttinelli G, Caprioli A, Marziano ML, Ruggeri FM. Waterborne outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. *Emerg Infect Dis* 2002;8(6):563-8.
7. Daniels NA, Bergmire-Sweet DA, Schwab KJ, Hendricks KA, Reddy S, Rowe SM, Fankhauser RL, Monroe SS, Atmar RL, Glass RI, Mead P. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *J Infect Dis* 2000;181(4):1467-70.
8. Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, von Bonsdorff CH. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 1999;180(6):1771-6.
9. Parshionikar SU, Willian-True S, Fout GS, Robbins DE, Seys SA, Cassady JD, Harris R. Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a norovirus. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(9):5263-8.
10. Schvoerer E, Bonnet F, Dubois V, Rogues AM, Gachie JP, Lafon ME, Fleury HJ. A hospital outbreak of gastroenteritis possibly related to the contamination of tap water by a small round structured virus. *J Hosp Infect* 1999;43(2):149-54.
11. Berg DE, Kohn MA, Farley TA, McFarland LM. Multi-state outbreaks of acute gastroenteritis traced to fecal-contaminated oysters harvested in Louisiana. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 2:S381-6.
12. Chalmers JW, McMillan JH. An outbreak of viral gastroenteritis associated with adequately prepared oysters. *Epidemiol Infect* 1995;115(1):163-7.
13. Doyle A, Barataud D, Gallay A, Thiolet JM, Le Guyaguer S, Kohli E, Vaillant V. Norovirus foodborne outbreaks associated with the consumption of oysters from the Etang de Thau, France, December 2002. *Euro Surveill* 2004;9(3).
14. Kingsley DH, Meade GK, Richards GP. Detection of both hepatitis A virus and Norwalk-like virus in imported clams associated with food-borne illness. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(8):3914-8.
15. Kohn MA, Farley TA, Ando T, Curtis M, Wilson SA, Jin Q, Monroe SS, Baron RC, McFarland LM, Glass RI. An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oysters. Implications for maintaining safe oyster beds. *Jama* 1995;273(6):466-71.
16. Stafford R, Strain D, Heymer M, Smith C, Trent M, Beard J. An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis following consumption of oysters. *Commun Dis Intell* 1997;21(21):317-20.
17. Sugieda M, Nakajima K, Nakajima S. Outbreaks of Norwalk-like virus-associated gastroenteritis traced to shellfish: coexistence of two genotypes in one specimen. *Epidemiol Infect* 1996;116(3):339-46.

18. Le Guyader F, Neill FH, Estes MK, Monroe SS, Ando T, Atmar RL. Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl Environ Microbiol* 1996;62(11):4268-72.
19. Green J, Vinje J, Gallimore CI, Koopmans M, Hale A, Brown DW, Clegg JC, Chamberlain J. Capsid protein diversity among Norwalk-like viruses. *Virus Genes* 2000;20(3):227-36.
20. Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 2:S336-48.
21. Vinje J, Green J, Lewis DC, Gallimore CI, Brown DW, Koopmans MP. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Arch Virol* 2000;145(2):223-41.
22. Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, Takeda N. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 2002;299(2):225-239.
23. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972;10(5):1075-81.
24. Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee JS, Monroe SS. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 2:S254-61.
25. Thornhill TS, Kalica AR, Wyatt RG, Kapikian AZ, Chanock RM. Pattern of shedding of the Norwalk particle in stools during experimentally induced gastroenteritis in volunteers as determined by immune electron microscopy. *J Infect Dis* 1975;132(1):28-34.
26. Greenberg HB, Kapikian AZ. Detection of Norwalk agent antibody and antigen by solid-phase radioimmunoassay and immune adherence hemagglutination assay. *J Am Vet Med Assoc* 1978;173(5 Pt 2):620-3.
27. Herrmann JE, Nowak NA, Blacklow NR. Detection of Norwalk virus in stools by enzyme immunoassay. *J Med Virol* 1985;17(2):127-33.
28. Madore HP, Treanor JJ, Pray KA, Dolin R. Enzyme-linked immunosorbent assays for Snow Mountain and Norwalk agents of viral gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1986;24(3):456-9.
29. Treanor J, Dolin R, Madore HP. Production of a monoclonal antibody against the Snow Mountain agent of gastroenteritis by in vitro immunization of murine spleen cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(10):3613-7.
30. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992;66(11):6527-32.
31. Brinker JP, Blacklow NR, Estes MK, Moe CL, Schwab KJ, Herrmann JE. Detection of Norwalk virus and other genogroup 1 human caliciviruses by a monoclonal antibody, recombinant-antigen-based immunoglobulin M capture enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1998;36(4):1064-9.
32. Herrmann JE, Blacklow NR, Matsui SM, Lewis TL, Estes MK, Ball JM, Brinker JP. Monoclonal antibodies for detection of Norwalk virus antigen in stools. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2511-3.
33. Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, Hadley LA, Glass RI, Ando T. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. *J Clin Microbiol* 2004;42(6):2587-95.
34. Rabenau HF, Sturmer M, Buxbaum S, Walczok A, Preiser W, Doerr HW. Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best? *Intervirology* 2003;46(4):232-8.
35. Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, Cotterill H, Ratcliffe S, Jenkins M, Appleton H, Gallimore CI, Gray JJ, Brown DW. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol* 2003;26(1):109-15.

36. Jiang XN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 1990;250(4987):1580-3.
37. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 1993;195(1):51-61.
38. Moe CL, Gentsch J, Ando T, Grohmann G, Monroe SS, Jiang X, Wang J, Estes MK, Seto Y, Humphrey C, *et al.* Application of PCR to detect Norwalk virus in fecal specimens from outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1994;32(3):642-8.
39. Ando T, Mulders MN, Lewis DC, Estes MK, Monroe SS, Glass RI. Comparison of the polymerase region of small round structured virus strains previously classified in three antigenic types by solid-phase immune electron microscopy. *Arch Virol* 1994;135(1-2):217-26.
40. Ruano G, Fenton W, Kidd KK. Biphasic amplification of very dilute DNA samples via 'booster' PCR. *Nucleic Acids Res* 1989;17(13):5407.
41. Ruano G, Kidd KK, Stephens JC. Haplotype of multiple polymorphisms resolved by enzymatic amplification of single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(16):6296-300.
42. Saulnier P, Andremont A. Detection of genes in feces by booster polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30(8):2080-3.
43. Cohen ND, McGruder ED, Neibergs HL, Behle RW, Wallis DE, Hargis BM. Detection of Salmonella enteritidis in feces from poultry using booster polymerase chain reaction and oligonucleotide primers specific for all members of the genus Salmonella. *Poult Sci* 1994;73(2):354-7.
44. Picard C, Ponsonnet C, Paget E, Nesme X, Simonet P. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1992;58(9):2717-22.
45. Wang PH, Chung CY, Lin YS, Yeh Y. Use of polymerase chain reaction to detect the soft rot pathogen, *Pythium myriotylum*, in infected ginger rhizomes. *Lett Appl Microbiol* 2003;36(2):116-20.
46. Filice G, Debiaggi M, Cereda PM, Romero E. Booster PCR: evaluation of an improved method for amplification of a few HIV-1 proviral DNA sequences. *New Microbiol* 1993;16(2):129-33.
47. Rhodes D, Solomon A, Bolton W, Wood J, Sullivan J, Learmont J, Deacon N. Identification of a new recipient in the Sydney Blood Bank Cohort: a long-term HIV type 1-infected seroindeterminate individual. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15(16):1433-9.
48. De Medici D, Croci L, Suffredini E, Toti L. Reverse transcription-booster PCR for detection of noroviruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(10):6329-32.
49. Atmar RL, Neill FH, Woodley CM, Manger R, Fout GS, Burkhardt W, Leja L, McGovern ER, Le Guyader F, Metcalf TG, Estes MK. Collaborative evaluation of a method for the detection of Norwalk virus in shellfish tissues by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1996;62(1):254-8.
50. Vinje J, Vennema H, Maunula L, von Bonsdorff CH, Hoehne M, Schreier E, Richards A, Green J, Brown D, Beard SS, Monroe SS, de Bruin E, Svensson L, Koopmans MP. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1423-33.
51. Vinje J, Koopmans MP. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996;174(3):610-5.
52. Vinje J, Koopmans MP. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol* 2000;38(7):2595-601.
53. De Medici D, Croci L, Di Pasquale S, Fiore A, Toti L. Detecting the presence of infectious hepatitis A virus in molluscs positive to RT-nested-PCR. *Lett Appl Microbiol* 2001;33(5):362-6.

54. Croci L, De Medici D, Morace G, Fiore A, Scalfaro C, Beneduce F, Toti L. Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested reverse transcription-PCR. *Int J Food Microbiol* 1999;48(1):67-71.
55. Bergmans AM, Groothedde JW, Schellekens JF, van Embden JD, Ossewaarde JM, Schouls LM. Etiology of cat scratch disease: comparison of polymerase chain reaction detection of Bartonella (formerly Rochalimaea) and Afipia felis DNA with serology and skin tests. *J Infect Dis* 1995;171(4):916-23.

APPLICAZIONE DELLA REAL TIME PCR PER IL RILEVAMENTO DEL VIRUS DELL'EPATITE A

Simona Di Pasquale, Elisabetta Delibato

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Nel corso degli anni, diverse metodiche sono state applicate per l'isolamento e l'identificazione del virus dell'epatite A (*Hepatitis A Virus*, HAV) negli alimenti, in particolare nei molluschi, nelle acque e nei vegetali (1-3).

La scelta del metodo da impiegare è legata alla valutazione di diversi aspetti analitici che sono principalmente: la concentrazione virale, la matrice alimentare, i tempi di determinazione e i costi.

Al momento attuale, i metodi più utilizzati nella determinazione e identificazione dei virus sono le colture cellulari, le tecniche di biologia molecolare (sonde, *Polymerase Chain Reaction* o PCR) e i sistemi integrati (colture cellulari-PCR) (4).

Inizialmente, la presenza di virus in una derrata alimentare, era rilevata mediante l'utilizzo di linee cellulari suscettibili (5). Tale tecnica, anche se rimane comunque la più valida ai fini della sicurezza alimentare, perchè è in grado di mettere in evidenza l'infettività virale, necessita, specialmente per la determinazione dell'HAV, di tempi lunghi, tali da renderli poco utili per l'igienicità dei prodotti in esame (6). Per ridurre i tempi di risposta e renderli compatibili con le esigenze di un sistema di controllo, sono stati proposti diversi metodi rapidi e innovativi. Tra questi la reazione di polimerizzazione a catena del DNA (PCR) (7, 8), che offre il vantaggio di minori costi e maggiore rapidità, e, inoltre, consente di rilevare la presenza anche di poche catene di RNA virale.

In questi ultimi anni, si sta affermando, anche per i virus enterici, oltre che per il rilevamento di batteri patogeni in differenti matrici alimentari, una metodica innovativa la *Real Time PCR* che oltre ad offrire tutti i vantaggi della PCR classica, come la sensibilità, la specificità e la rapidità di risposta, presenta il vantaggio di poter monitorare la reazione di amplificazione in tempo reale (9). Questa peculiarità viene sfruttata per eliminare tutte quelle fasi post-PCR quali la elettroforesi, il blotting o il sequenziamento, necessari per caratterizzare l'amplicone, ma che allungano i tempi di analisi e necessitano dell'uso di reagenti tossici o mutageni. La *Real Time PCR* permette, inoltre, di rendere quantitativa la risposta della reazione determinando l'accumulo degli ampliconi all'inizio della fase esponenziale della PCR.

Tale metodo, rappresenta quindi, un valido strumento applicabile sia al controllo delle derrate alimentare sia in estesi piani di monitoraggio necessari per la valutazione del rischio microbiologico (9).

I sistemi di rilevamento di questa metodica, si basano sul principio della *Fluorescent Resonant Energy Transfer* (FRET), e si avvalgono dell'utilizzo di coloranti che si legano specificamente ai doppi filamenti di DNA sintetizzati o di sonde specifiche legate a molecole fluorescenti (10).

Il primo sistema utilizza coloranti, che emettono fluorescenza quando si legano alla struttura secondaria del doppio filamento di DNA che si crea durante l'amplificazione (11). Tra i coloranti proposti il *SYBR Green I* (che emette una fluorescenza a 520 nm quando si lega con il DNA) è quello che ha fornito migliori risultati ed è, inoltre, meno mutageno del bromuro di

etidio (12). È da tener presente che, reazioni di amplificazione diverse, possono fornire, a parità di concentrazione iniziale del target, intensità di fluorescenza diversa in funzione della lunghezza dell'amplicone. Più di una molecola di colorante, infatti, può legarsi a un singolo filamento di DNA, così ampliconi lunghi generano una fluorescenza più intensa di quelli corti.

La *Real Time PCR*, che utilizza il colorante SYBR-Green I, è una tecnica non specifica, in quanto, il colorante si lega indiscriminatamente con qualunque filamento di DNA sintetizzato durante l'amplificazione, per tale motivo la specificità della reazione viene determinata definendo la temperatura di *melting* (*Temperature of Melting*, TM) dei prodotti di amplificazione (13). Tale temperatura è specifica per ogni amplicone e viene misurata immediatamente dopo la reazione di polimerizzazione a catena, sottoponendo il prodotto specifico di PCR ad una fase di riscaldamento, durante la quale si verifica sia la denaturazione della doppia catena di DNA, con formazione di singoli filamenti, che la liberazione di molecole di *SYBR Green* con conseguente diminuzione della fluorescenza (14).

Il secondo sistema utilizza una sonda fluorescente, che si lega in modo specifico alla sequenza del genoma compresa tra i *primer*, aumentando la specificità del sistema sopra descritto (9, 10).

La sonda è costituita da un oligonucleotide che, in prossimità della posizione 5', lega una molecola fluorescente ad alta energia detta "Reporter", mentre in prossimità della posizione 3', lega una molecola fluorescente a bassa energia, il "Quencher".

Le molecole fluorescenti che possono essere utilizzate come Reporter sono diverse quali: FAM (6-carboxy-fluorescein), TET (tetrachloro-6-carboxy-fluorescein), JOE (2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxy-fluorescein), HEX (hexachloro-6-carboxy-fluorescein) e il VIC; mentre per quanto riguarda il Quencher, viene normalmente utilizzato il TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine).

Durante la reazione, la sonda fluorescente si ibridizza per prima alla sequenza di DNA complementare, successivamente si legano i due *primer* che innescano l'attività 5'-esonucleasica della DNA polimerasi. Tale enzima catalizza sia la degradazione della sonda che la contemporanea estensione di un nuovo filamento.

Quando la sonda è integra il Quencher limita l'emissione da parte del Reporter, così la fluorescenza emessa è molto bassa, mentre quando la sonda è degradata, e il Quencher viene separato dal Reporter, quest'ultimo emette fluorescenza alla sua specifica lunghezza d'onda.

La fluorescenza così emessa, è registrata in automatico dallo strumento e analizzata da un apposito software, che correla il suo incremento con il numero dei cicli di amplificazione; la media della fluorescenza e la sua deviazione standard, evidenziata durante i primi cicli (solitamente i primi 15 cicli), vengono utilizzate per calcolare la linea di base (*threshold line*), cioè un rumore di fondo il cui superamento segnala un aumento visibile dei risultati di amplificazione. Il ciclo, in cui si evidenzia quest'aumento della fluorescenza, costituisce l'inizio della fase esponenziale e viene definito ciclo soglia (*Cycle Threshold*, CT). Il CT dipende dal numero di copie iniziali di DNA, dall'efficienza della reazione di PCR e dalla capacità di distacco della sonda fluorescente.

Più è alto il numero di copie di DNA in un campione, minore sarà il numero di cicli (valore del CT) necessario per raggiungere un livello rilevabile della fluorescenza.

Lo scopo del seguente studio è stato quello di definire un metodo *Real Time PCR* per la determinazione del virus dell'HAV mettendo a confronto i risultati ottenuti da tre diversi metodi:

1. *SYBR Green Real Time PCR*
2. *Sonda Real Time PCR*
3. *Nested Sonda Real Time PCR*

Materiali e metodi

Ceppo virale

HAV (ceppo FG), utilizzato nelle prove sperimentali, è stato isolato da feci di un paziente affetto da epatite virale acuta (15). Il virus è stato fatto crescere su un monostrato cellulare di Frp/3 (cellule di rene di scimmia africana), derivate dalla linea cellulare FRhK-4 (16), e conservato a -80°C (17).

Scelta dei *primer* e della sonda

Gli ologonucleotidi (*primer* e sonda) sono stati scelti nella regione 5'NTR, già ampiamente descritta in letteratura come parte altamente conservata del genoma dell'HAV. Tale regione non codificante, che costituisce solo il 10% del genoma virale, si lega covalentemente ad una proteina virale (VPg) che interviene nella replicazione.

Le sequenze nucleotidiche dei cinque più diffusi ceppi di HAV, appartenenti sia al genogruppo IA, quali Los Angeles (K02990), BGM (X75214, FG (83302) che al genogruppo IB, quali HM175 (M14707) e MBB (M20273) (18), erano allineate utilizzando il software MTT Navigator (Applied Biosystems). I *primer* e la sonda sono stati scelti con il software *Primer Express* (Applied Biosystems) nei tratti che hanno evidenziato il 100% di omologia tra i ceppi di HAV considerati, quindi sono stati controllati utilizzando *NCBI's Advanced Blast Program*, per verificare l'assenza di cross reattività con altri virus enterici.

I *primer* e la sonda impiegati in tale studio sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Sequenze dei *primer* impiegati durante lo studio

Oligonucleotide	Sequenza	Posizione HM175
<i>Primer</i> senso F1	5'-TAACAGCGCGGATATTGGT GAGTT-3'	426-435
<i>Primer</i> senso F2	5'-CCTCTCTGTGCTTAGGGCAA-3'	549-569
<i>Primer</i> senso F3	5'-GCGGCGGATATTGGTGAG-3'	432-451
<i>Primer</i> antisenso R2	5'-CAGGGGCATTAGGTTTTCC-3'	663-681
<i>Primer</i> antisenso R3	5'-TCTCATCCAGTGGATGCATTG-3'	486-597
Sonda P	5'-TTAAGACAAAACCATTCAACGCCGGAG-3'	453-480

Ottimizzazione della concentrazione dei *primer* con cDNA plasmidico

Inizialmente sono state effettuate delle prove preliminari, per scegliere la migliore concentrazione di *primer*, utilizzando 1 ng di cDNA plasmidico, 200 nM di sonda marcata con FAM (e testando differenti concentrazioni di *primer*). In particolare sono state prese in considerazione le seguenti concentrazioni di *primer*:

1. *SYBR Green Real Time PCR*: 300 nM (F2) / 300 nM (R2)
 300 nM (F2) / 50 nM (R2)
 50 nM (F2) / 300 nM (R2)
 50 nM (F2) / 50 nM (R2)
2. *Sonda Real Time PCR*: 900 nM (F3) / 900 nM (R3)
 900 nM (F3) / 300 nM (R3)
 300 nM (F3) / 900 nM (R3)
 300 nM (F3) / 300 nM (R3)

Estrazione e purificazione dell'RNA virale da lisato cellulare di HAV

334 μ l del lisato cellulare di epatite A sono stati aggiunti in una provetta Eppendorf contenente 666 μ l di Soluzione D e agitati con vortex per 30 secondi. Successivamente sono stati aggiunti sul fondo 100 μ l di cloruro di cesio (CsCl 5,7 M in 25 mM di Acetato di sodio, pH 5,0, RI=1,4000) e il campione così costituito è stato centrifugato a 13000 rpm per 20 minuti come descritto da Afzal e Minor (19).

Retrotrascrizione

Il pellet lavato ed essiccato è stato risospeso in una miscela di reazione contenente: Buffer 1X (Applied Biosystems), 3 mM di MgCl₂ (Applied Biosystems), 0,2 mM di ciascun deossinucleotide triosofosfato (dNTP) (Takara-Shuzo, Japan), 0,5 μ M di *primer* antisenso, 20 U di Inibitore delle RNase (Applied Biosystems), 1,25 U di AMV Trascrittasi inversa (Roche) e acqua distillata DNase e RNase *free* necessaria a raggiungere un volume finale di 20 μ l. Il campione così preparato era incubato prima a 42 °C per 60 minuti poi a 95 °C per 5 minuti per bloccare la reazione.

Amplificazione

SYBR Green Real Time PCR

5 μ l del campione, ottenuto dalla retrotrascrizione con *primer* antisenso R2, sono stati addizionati in un'ependorf contenente i reagenti per amplificazione: SYBR Green I 1X (Applied Biosystems), 3 mM di MgCl₂ (Applied Biosystems), 1 mM di dNTPs (Applied Biosystems), 300 nM di ciascun *primer* (F2-R2), 0,5 U di UNG, 1,25 U AmpliTaq e acqua distillata DNase e RNase *free*, necessaria a raggiungere un volume finale di 50 μ l.

La reazione di amplificazione consisteva in un primo ciclo a 50 °C per 2 minuti e 95 °C per 10 minuti, seguita da 40 cicli di amplificazione a 95 °C per 15 secondi e 60 °C per 1 minuto. La reazione è stata completata con un ciclo a 95 °C per 1 minuto, 60 °C per 1 minuto e 95 °C per 1 minuto. L'incremento della temperatura, da 60 °C a 95 °C, veniva effettuata lentamente (20 minuti) e durante tale periodo veniva determinata la T_M dell'amplicone.

I risultati sono stati visualizzati mediante un software ABI 7700 Sequence detector 1,7 (Applied Biosystem) e confermati con Microsoft Excel 2000.

Su tutti i campioni sono stati determinate le curve di *melting* degli ampliconi ottenuti, allo scopo di valutare la specificità della reazione.

Sonda Real Time PCR

Un'aliquota (5 μ l) del campione, ottenuto dalla retrotrascrizione con *primer* antisenso R3, è stata aggiunta in una miscela di reazione contenente: 25 μ l di Master Mix TaqMan (Applied Biosystems), 900 nM di ciascun *primer* (F3-R3), 200 nM di sonda, acqua distillata DNase e RNase *free*, necessaria a raggiungere un volume finale di 50 μ l.

La reazione ha previsto una fase a 50 °C per 2 minuti e 95 °C per 10 minuti, 40 cicli di amplificazione a 95 °C per 15 minuti, 60 °C per 1 minuto.

Nested Sonda Real Time PCR

20 μ l della soluzione, derivata dalla retrotrascrizione con *primer* antisenso R2, sono stati trasferiti in una provetta contenente 0,5 μ M di *primer* senso F1 e 1,25 U di AmpliTaqGold.

La reazione di amplificazione consisteva in un ciclo a 95 °C per 1 minuto, 10 cicli a 95 °C per 25 secondi, 60 °C per 10 secondi, 72 °C per 1 minuto. La reazione è stata completata con un tempo di estensione finale a 72 °C per 5 minuti.

Un'aliquota (5 µl) del prodotto amplificato durante la suddetta reazione, è stata addizionata ad una soluzione contenente: 25 µl di Master Mix TaqMan (Applied Biosystems), 900 nM di ciascun *primer* (F3-R3), 200 nM di sonda, acqua distillata DNase e RNase *free*, necessaria a raggiungere un volume finale di 50 µl.

La seconda amplificazione ha previsto un ciclo a 50 °C per 2 minuti e 95 °C per 10 minuti, 40 cicli di amplificazione a 95 °C per 15 minuti, 60 °C per 1 minuto.

Analisi delle temperature di *melting* della SYBR Green Real Time PCR

Allo scopo di valutare la specificità della reazione di amplificazione, su tutti i campioni è stata determinata la TM degli ampliconi ottenuti, che consente di discriminare il prodotto di amplificazione specifico rispetto ai prodotti aspecifici.

La TM (specifica per ogni amplicone) è stata determinata immediatamente dopo la reazione di polimerizzazione, sottoponendo l'amplificato ad una fase di riscaldamento lento da 60 °C a 95 °C in 19 min e 59 secondi. Alla specifica TM, si noterà la rapida riduzione della fluorescenza dovuta alla denaturazione degli ampliconi, con formazione di singoli filamenti di DNA e conseguente distacco del SYBR Green I.

La TM è caratteristica sia per la lunghezza che per la composizione in basi dello specifico amplicone.

Determinazione del limite di sensibilità dei metodi: SYBR Green Real Time PCR, Sonda Real Time PCR e Nested Sonda Real Time PCR

La determinazione del limite di sensibilità di ciascun metodo è stata effettuata mediante la costruzione di una retta di taratura ottenuta correlando i CT con concentrazioni scalari dei lisati cellulari di epatite A (10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 TCID₅₀ mL⁻¹).

Risultati

I dati ottenuti con la SYBR Green Real Time PCR sono riportati in Tabella 2 e mostrano una risposta in CT compresa tra $15,52 \pm 0,096$ (300 nM) e $19,41 \pm 0,127$ (50 nM). Quando la concentrazione dei *primer* diminuiva (50 nM), il CT aumentava, quindi in relazione ai CT per le nostre prove è stata scelta la concentrazione di 300 nM per ciascun *primer* (senso e antisense) e la specificità di ciascuna reazione è stata determinata mediante il rilevamento della temperatura di *melting* dell'amplicone, che risultava essere di 81 °C.

Tabella 2. Ottimizzazione della concentrazione di *primer* per la SYBR Green Real Time PCR

Concentrazione <i>primer</i> senso F2 (nM)	Concentrazione <i>primer</i> antisense R2 (nM)	Valore del ciclo soglia C_T ± DS
300	300	15,52 ± 0,096
50	300	15,77 ± 0,171
300	50	19,41 ± 0,127
50	50	19,13 ± 0,116

Per quanto riguarda i risultati relativi ai CT, riscontrati alle varie concentrazioni testate di *primer* e ottenuti con la *Sonda Real Time PCR*, sono riportati in Tabella 3. La concentrazione utilizzata per ciascun *primer* era rispettivamente di 900 nM.

Tabella 3. Ottimizzazione della concentrazione di *primer* per la *Sonda Real Time PCR*

Concentrazione <i>primer</i> senso F2 (nM)	Concentrazione <i>primer</i> antisense R2 (nM)	Valore del ciclo soglia $C_T \pm DS$
900	900	16,30 \pm 0,07
900	300	16,79 \pm 0,08
300	900	16,51 \pm 0,13
300	300	16,51 \pm 0,11

Le curve standard, effettuate nel range compreso tra concentrazioni di HAV pari a 10⁴ e 1 TCID₅₀ mL⁻¹, hanno dimostrato che, lo strumento in quell'intervallo ha una buona linearità di risposta $R^2=0,9597$ per la *SYBR Green Real Time PCR* e $R^2=0,9892$ per la *Sonda Real Time PCR*. I limiti di sensibilità delle reazioni sono stati rispettivamente: meno di 10 TCID₅₀ mL⁻¹ per la metodica di *SYBR Green Real Time PCR* e 10-100 TCID₅₀ mL⁻¹ per la *Sonda Real Time PCR* (Figura 2).

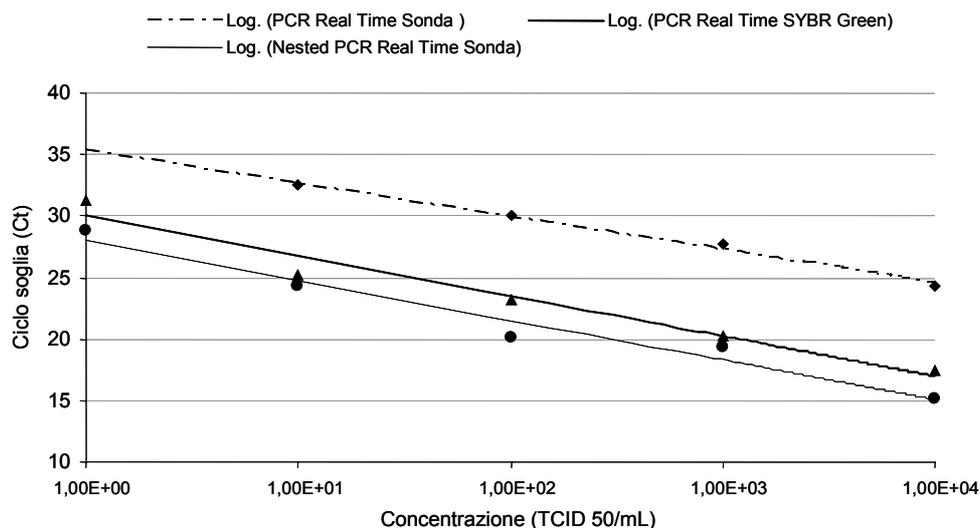


Figura 2. Confronto tra i limiti di sensibilità evidenziati analizzando concentrazioni scalari di HAV con i tre metodi proposti

Conclusioni

I risultati ottenuti mostravano che, il metodo *SYBR Green Real Time PCR* è più sensibile del metodo che utilizza la sonda, infatti, con il *SYBR Green I* possono essere rilevate meno di 10 TCID₅₀ mL⁻¹, mentre impiegando la sonda fluorescente vengono rivelate 10-100 TCID₅₀ mL⁻¹.

Pertanto, per incrementare la sensibilità del metodo *Sonda Real Time PCR* è stata introdotta una prima fase (Nested-PCR) costituita da pochi cicli di PCR.

L'applicazione di pochi cicli di amplificazione, permette di mantenere l'amplificazione nella fase logaritmica, così da avere un risultato quantitativo alla fine della fase esponenziale di PCR (20).

Questa aggiunta del metodo, permette di migliorarne la sensibilità, in modo da determinare meno di 10 TCID₅₀ mL⁻¹ come nel metodo di *SYBR Green Real Time PCR*, mantenendo così una elevata specificità.

Il metodo di *SYBR Green Real Time PCR* si è rivelato più sensibile del metodo *Sonda Real Time PCR* poiché, presumibilmente, un amplicone di 141 basi legando più di una molecola di colorante, mostra un limite di sensibilità più elevato di 10 volte di quanto mostrato dalla reazione che utilizza la sonda, la quale genera un solo fluorocromo per ogni nuova molecola di DNA.

La tecnica che si basa sull'utilizzo del *SYBR Green* è però meno specifica, di quella che impiega la sonda, perché questo colorante si lega indiscriminatamente ad ogni doppio filamento di DNA, anche nel caso si utilizzi la determinazione della TM dell'amplicone ottenuto.

Per tale motivo la *Real Time PCR* che utilizza sonde fluorescenti, è stata scelta dal Comitato Europeo di Normazione (gruppo di lavoro TAG 4 del WG6) come standard di riferimento da utilizzare per lo sviluppo di metodi normalizzati, per la ricerca di virus enterici nelle derrate alimentari.

L'aumento della sensibilità del metodo *Sonda Real Time PCR* si può ottenere, in questo caso, aggiungendo un preventivo ciclo di amplificazione, costituito da pochi cicli, a patto che sia interrotto durante la fase logaritmica, così che la *Nested PCR* continui a dare risposte quantitative.

La *Nested PCR*, anche quando applicata alla *Real Time PCR*, può fornire risultati falsamente positivi, se non vengono strettamente utilizzate particolari accortezze quali: la separazione fisica delle varie fasi in cui si articola il metodo (almeno tre differenti ambienti), l'utilizzo di differenti set di micropipette, l'utilizzo di puntali con il filtro, ecc. L'ottimizzare il metodo non può quindi prescindere dal prendere in considerazione anche le altre fasi che costituiscono il procedimento analitico quali: il campionamento, la concentrazione del virus e l'eliminazione degli inibenti della reazione di amplificazione.

Bibliografia

1. Rabenau HF, Sturmer M, Buxbaum S, Walczok A, Preiser W, Doerr HW. Laboratory diagnosis of Norovirus: which method is the best? *Intervirology* 2003;46(4):232-8.
2. Cook N. The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *J Microbiol Methods* 2003;53(2):165-74.
3. Leggitt PR, Jaykus LA. Detection methods for human enteric viruses in representative foods. *J Food Prot* 2000;63(12):1738-44.
4. De Medici D, Croci L, Di Pasquale S, Fiore A, Toti L. Detecting the presence of infectious hepatitis A virus in molluscs positive to RT-nested-PCR, *Letters in Applied Microbiology*, 2001;33(5):362-6.
5. Metcalf TG, Moulton E, Eckerson D. Improved method and test strategy for recovery of enteric viruses from shellfish. *Appl Environ Microbiol* 1980;39(1):141-52.
6. Lemon SM, Whetter L, Chang KH, Brown EA. Why do human hepatitis viruses replicate so poorly in cell cultures? *FEMS Microbiol Lett* 1992;79(1-3):455-9.

7. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239(4839):487-91.
8. Shampo MA, Kyle RA, Kary B. Mullis--Nobel Laureate for procedure to replicate DNA. *Mayo Clin Proc* 2002;77(7):606.
9. McKillip JL, Drake M. Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J Food Prot* 2004;67(4):823-32.
10. De Medici D, Di Pasquale S, Delibato E, Gonzalez-Mejuto R, Ciccaglioni G, Toti L. Application of quantitative PCR to foodborne pathogenic microorganisms to evaluate preventive measures applied in food safety. *Alimentaria* 2002;336:11-16.
11. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22(1):130-1, 134-8.
12. Kyger EM, Krevolin MD, Powell MJ. Detection of the hereditary hemochromatosis gene mutation by real-time fluorescence polymerase chain reaction and peptide nucleic acid clamping. *Anal Biochem* 1998;260(2):142-8.
13. Al-Robaïy S, Rupf S, Eschrich K. Rapid competitive PCR using melting curve analysis for DNA quantification. *Biotechniques* 2001;31(6):1382-6, 1388.
14. Bohling SD, Wittwer CT, King TC, Elenitoba-Johnson KS. Fluorescence melting curve analysis for the detection of the bcl-1/JH translocation in mantle cell lymphoma. *Lab Invest* 1999;79(3):337-45.
15. Beneduce F, Pisani G, Divizia M, Pana A, Morace G. Complete nucleotide sequence of a cytopathic hepatitis A virus strain isolated in Italy. *Virus Res* 1995;36(2-3):299-309.
16. Flehmig B. Hepatitis A virus in cell culture, II, Growth characteristics of hepatitis A virus in Frhk-4/R cells. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1981;170(2):73-81.
17. Venuti A, Di Russo C, del Grosso N, Patti AM, Ruggeri F, De Stasio PR, Martiniello MG, Pagnotti P, Degener AM, Midulla M, *et al.* Isolation and molecular cloning of a fast-growing strain of human hepatitis A virus from its double-stranded replicative form. *J Virol* 1985;56(2):579-88.
18. Croci L, De Medici D, Morace G, Fiore A, Scalfaro C, Beneduce F, Toti L. Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested reverse transcription-PCR. *Int J Food Microbiol* 1999;48(1):67-71.
19. Afzal MA, Minor PD. Instant RNA isolation from virus-infected tissue culture fluid for the polymerase chain reaction. *Vaccine* 1994;12(11):976-7.
20. Haff LA. Improved quantitative PCR using nested primers. *PCR Methods Appl* 1994;3(6):332-7.

VIBRIONI PATOGENI VEICOLATI DAI PRODOTTI DELLA PESCA

Loredana Cozzi, Gianni Ciccaglioni

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

I prodotti della pesca, pur avendo un elevato livello nutrizionale, rappresentano un rischio per la salute pubblica. Infatti la contaminazione delle acque marine costiere dovuta a scarichi fognari, l'eutrofizzazione e le fioriture fitoplanctoniche hanno contribuito alla modificazione della flora microbica e alla selezione di particolari ceppi batterici responsabili di infezioni. Microrganismi normalmente presenti nell'ambiente marino, possono anch'essi costituire un rischio per la salute pubblica, a volte come patogeni opportunisti, veicolati dai prodotti della pesca.

Negli ultimi anni batteri autoctoni dell'ambiente marino sono stati responsabili del 20% delle malattie e del 99% degli eventi fatali legati al loro consumo (1). Tra questi i maggiori responsabili di malattie sono alcune specie di Vibrionaceae, che possono indurre gastroenteriti specialmente dopo il consumo di prodotti ittici, crudi o poco cotti, provenienti da mari caldi. Tra i prodotti della pesca, i molluschi eduli lamellibranchi sono maggiormente implicati nella trasmissione di malattie gastroenteriche come febbri tifoidi e colera.

Soltanto a partire dagli anni '50, grazie all'uso di opportune tecniche per il trattamento delle acque di scarico e all'attività di controllo delle acque destinate all'allevamento e raccolta dei molluschi, la frequenza di tali malattie è notevolmente diminuita. Ciò nonostante i molluschi sono ancora tra i prodotti a maggior rischio.

Ancora oggi il colera è diffuso in vaste aree del mondo. Nel nostro Paese, epidemie di colera si sono verificate nel 1973 interessando la zona di Napoli e la Puglia (2), si sono poi ripetute in Sardegna nel 1979 e fra ottobre e dicembre del 1994, una dozzina di casi di colera sono stati segnalati nella provincia di Bari (3). Si ritiene comunque che i dati epidemiologici disponibili siano sottostimati, infatti, in molti casi il consumo di molluschi provoca solo sintomi gastrointestinali di lieve entità che non richiedono l'intervento del medico.

Contaminazione batterica dei prodotti ittici

La flora microbica dei pesci e dei molluschi è strettamente correlata alle caratteristiche microbiologiche dell'ambiente in cui vivono e alle loro abitudini di vita. Nel pesce i microrganismi sono localizzati principalmente sulla cute, sulle branchie e nell'intestino, mentre le masse muscolari ne sono prive. Esse possono contaminarsi durante l'eviscerazione. Sulla cute e nelle branchie generalmente predominano specie aerobiche (*Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp.), mentre a livello intestinale prevalgono germi Gram-negativi aerobi-anaerobi facoltativi (*Vibrio* spp. in gran maggioranza, *Alcaligenes* spp., *Flavobacterium* spp., *Xanthomonas* spp.) e in forma più modesta alcuni Gram-positivi (*Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Corinebacterium*) (4).

I molluschi, costituiti in gran parte da animali sessili o sedentari, si nutrono di piccole particelle alimentari presenti nell'acqua o nei sedimenti mediante un'intensa attività di filtrazione durante la quale trattengono nel loro organismo anche i batteri eventualmente presenti nell'ambiente. Sono in grado di filtrare diversi litri di acqua al giorno e la loro attività di filtrazione varia a seconda delle dimensioni e della specie. Ad esempio le ostriche possono concentrare *Vibrio* spp. a livelli 100 volte maggiori di quelli riscontrabili nell'acqua circostante (5).

La normativa vigente non assicura che i molluschi siano esenti da agenti potenzialmente patogeni in quanto la presenza di batteri indici di contaminazione fecale non è correlata alla presenza di Vibrionaceae, normalmente presenti nell'ambiente marino.

Vibrionaceae

La classificazione delle Vibrionaceae è in continua evoluzione. Attualmente tale famiglia comprende il genere *Vibrio* e alcuni generi meno noti nell'ambito della microbiologia degli alimenti come *Allomonas*, *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Ferrania*, *Grimontia*, *Listonella*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* (NCBI Taxonomy browser), Attualmente vengono riconosciute appartenere al genere *Vibrio* circa 70 specie, tutte isolate dall'ambiente acquatico.

Genere *Vibrio*

Il genere *Vibrio* comprende bacilli Gram-negativi con dimensioni comprese tra 0,5 e 0,8 µm in lunghezza, di forma leggermente ricurva e mobili per la presenza di un flagello polare monotrico o multitrice, racchiuso in un rivestimento continuo con la membrana esterna della parete cellulare. I vibriani presentano metabolismo ossidativo e fermentativo, alcuni con produzione di gas. Sono ossidasi-positivi ad eccezione di *V. metschnikovii* (6). Non producono spore. La crescita della maggioranza dei vibriani è stimolata dalla presenza di sodio e per alcune specie (es. *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*) tale ione è indispensabile ad una concentrazione uguale o superiore al 3%.

Alcune specie di vibriani rivestono importanza rilevante, poiché provocano infezioni comprese fra le malattie che richiedono quarantena e obbligo di notifica all'Organizzazione Mondiale della Sanità (es. *V. cholerae*), o perché note per essere associate ad alta mortalità (es. *V. vulnificus*) o perché causa di un elevato numero di tossinfezioni in alcuni Paesi (es. *V. parahaemolyticus* in Giappone). Altre specie, quali *V. mimicus*, *V. alginolyticus* e *Photobacterium damsela*, sono riconosciute patogene per l'uomo (Tabella 1) (7-8). Attualmente *V. parahaemolyticus* è la specie più comunemente associata a tossinfezioni nell'uomo, seguito da *V. cholerae* non O1, *V. hollisae*, *V. alginolyticus* e *V. fluvialis* (5).

I vibriani, come altri microrganismi autoctoni ambientali, sono costretti a subire talvolta profonde e frequenti modificazioni dell'ambiente circostante, relative a vari fattori, quali temperatura, concentrazione dei nutrienti, salinità, pressione osmotica, pH ecc. A tali cambiamenti i vibriani reagiscono adottando una serie di adattamenti di carattere fisiologico e biochimico. Uno di questi è rappresentato dalla capacità di entrare in una fase di quiescenza, durante la quale essi rimangono vitali, ma diventano non coltivabili con i metodi tradizionali di laboratorio. Durante tale fase subiscono diverse modificazioni morfologiche e fisiologiche: cambiano dimensione riducendo di molte volte il loro volume, rallentano il ritmo respiratorio, incrementano le vie metaboliche in grado di evitare i danni indotti da carenze di determinati nutrienti, arrestano i cicli di divisione.

Tabella 1. Vibrioni patogeni associati a patologie umane

Specie Vibrio	Sito di infezione						
	App. digerente	Cute (ferite)	Orecchio	Sangue (setticemia)	Sangue (batteriemia)	App. respiratorio	SNC (meningi)
1 <i>V. cholerae</i> O1/O139	++	(+)	?	?	?	?	?
<i>V. cholerae</i> non O1/ non O139	++	+	+	(+)	(+)	?	(+)
2 <i>V. parahaemolyticus</i>	++	+	(+)	?	(+)	(+)	(+)
3 <i>V. vulnificus</i>	+	++	?	++	+	(+)	(+)
4 <i>V. fluvialis</i>	++	?	?	?	?	?	?
5 <i>V. alginolyticus</i>	?	++	+	?	(+)	?	?
6 <i>Ph. damsela</i>	?	++	?	?	?	?	?
7 <i>V. furnissii</i>	(+)	?	?	?	?	?	?
8 <i>V. hollisae</i>	++	?	?	(+)	?	?	?
9 <i>V. mimicus</i>	++	+	+	?	?	?	?
10 <i>V. metschnikovii</i>	(+)	?	?	(+)	?	?	?
11 <i>V. cincinnatiensis</i>	?	?	?	?	(+)	?	(+)
12 <i>V. carchariae</i>	?	++	?	?	?	?	?

++: il più comune sito di infezione, +: altri siti di infezione, (+): raro sito di infezione, ?: da stabilire (7-8).

I fattori che influiscono maggiormente sulla vitalità dei vibrioni sono la temperatura e la salinità. Essi si trovano nelle migliori condizioni quando la temperatura dell'acqua è compresa tra 10 °C e 30 °C e quando la salinità è tra il 5‰ e il 30‰. In relazione a questi fattori è anche comprensibile l'andamento stagionale, ampiamente documentato, della loro presenza nell'ambiente, come pure l'incremento nei mesi estivi delle tossinfezioni da essi causate. Ciò è stato confermato anche da un'indagine recentemente condotta presso l'Istituto Superiore di Sanità nell'ambito di un progetto sulla salvaguardia del Mare Adriatico dal quale è emerso che su 726 ceppi isolati da molluschi il 46,9% apparteneva al genere *Vibrio*, il 29,7% al genere *Aeromonas*, mentre il rimanente 23,4% era costituito dai generi *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Agrobacterium* e *Ochrobacterium*. Tra i batteri appartenenti al genere *Vibrio* è stato riscontrato *V. alginolyticus* (67,9%) e alcune specie patogene come il *V. parahaemolyticus* (10%), *V. vulnificus* (10%) e il *Photobacterium damsela* (10,9%). Tali percentuali di rilevamento variavano comunque a seconda della stagione, infatti il genere *Vibrio* risultava particolarmente frequente nella stagione estiva, diminuiva in autunno e in primavera mentre era piuttosto scarso nei mesi invernali (9). Ciò è probabilmente dovuto alla capacità di questi microrganismi di adattarsi alle condizioni avverse entrando in una fase di quiescenza.

V. cholerae

V. cholerae è suddiviso in circa 200 sierogruppi in base all'antigene somatico O, polisaccaride termostabile incluso nello strato lipopolisaccaridico cellulare superficiale.

Il sierogruppo O1, il più importante dal punto di vista sanitario, è suddiviso in due biotipi: Classico, responsabile delle sei pandemie verificatesi tra il 1817 e il 1923, El Tor, responsabile della 7^a pandemia avvenuta nel 1961.

Gli altri sierogruppi sono conosciuti come *V. cholerae* non-O1. Essi sono responsabili di casi sporadici di gastroenterite e di forme meno gravi di malattia simili al colera. Tuttavia alcune epidemie di colera sono state attribuite ad un sierogruppo emergente, il *V. cholerae* O139 detto

anche Bengala dal luogo in cui è comparso la prima volta nel 1992 e da cui si è diffuso rapidamente.

La malattia ha un periodo di incubazione di 12-72 ore e si manifesta con una diarrea secretoria. La dose infettante è piuttosto alta, circa 10^8 unità, a causa della sensibilità del vibrione all'acidità gastrica ma può essere minore, circa 10^3 - 10^5 unità, in pazienti affetti da ipocloridria o problemi gastrici (10).

I fattori di virulenza principali sono: l'enterotossina colerica e il pilo coregolato con la tossina che media la colonizzazione dell'intestino tenue.

V. parahaemolyticus

V. parahaemolyticus è presente nell'ambiente marino costale delle regioni tropicali e temperate di tutto il mondo, Nelle regioni temperate però non sono facilmente rintracciabili durante l'inverno, quando la temperatura delle acque è inferiore a 20 °C.

Epidemie e singoli casi di infezione di origine alimentare causati da *V. parahaemolyticus* sono stati associati al consumo di cibo sia crudo che parzialmente cotto, Nelle società occidentali, tali cibi includono crostacei (gamberi, gamberetti e granchi) e molluschi (ostriche), Il pesce, invece, è un importante veicolo alimentare in Paesi, come il Giappone, dove tale alimento è tradizionalmente consumato crudo, *V. parahaemolyticus* è molto sensibile al calore (10 min, a 50 °C sono sufficienti a ridurre il numero di questi batteri da 105 ufc/g a valori non determinabili) e, pertanto epidemie dovute a cibi cotti sono causate molto spesso da inadeguata cottura, cattive pratiche nella lavorazione o cross-contaminazione con altri prodotti della pesca crudi o con ambienti di lavorazione contaminati.

Le concentrazioni di *V. parahaemolyticus* nei prodotti della pesca sono generalmente inferiori a 103 per grammo, ma possono essere più alte quando la pesca avviene in acque molto calde (11). Tale eventualità, unita con i rapidi tempi di replicazione, risulta essere particolarmente pericolosa poiché permette in alcuni casi di raggiungere rapidamente concentrazioni in grado di indurre malattia, La dose infettante è superiore alle 105 unità (12).

Le infezioni alimentari da *V. parahaemolyticus* si manifestano generalmente dopo un periodo di incubazione di 4-96 ore, I sintomi comprendono nausea, vomito, diarrea e dolori addominali tuttavia l'esito è sempre favorevole.

I ceppi di *V. parahaemolyticus* sono classificati come Kanagawa-positivi o Kanagawa-negativi in base alla loro capacità di produrre una emolisina termostabile diretta (*Thermostable Direct Hemolysin*, TDH) che lisa i globuli rossi umani, Tuttavia ceppi TDH negativi sono stati isolati da casi di gastroenterite a dimostrazione dell'esistenza di altri principi tossici, Infatti ceppi di *V. parahaemolyticus* isolati dall'uomo sono risultati produttori di diverse sostanze tossiche, fra cui alcune emolisine correlate con la TDH (*TDH-Related Hemolysin*, TRH) e diversi fattori di adesione che facilitano l'attacco alle cellule intestinali umane.

V. vulnificus

V. vulnificus è veicolato principalmente dai molluschi in cui è solitamente presente a basse concentrazioni, tuttavia tale concentrazione può raggiungere 105 cellule/ g di mollusco quando questi ultimi provengono da acque molto calde (13). *V. vulnificus* è in grado di svilupparsi anche in acque relativamente fredde, tanto che, in alcuni casi, è stato isolato nei pressi delle coste settentrionali nordamericane (Maine, Nuova Scozia; USA) e in acque costali dell'Olanda.

Le infezioni alimentari da *V. vulnificus* si manifestano dopo un periodo di incubazione di circa 35-40 h. I sintomi includono brividi, febbre, nausea e, in molti casi, lesioni cutanee e setticemia. La morte avviene nel 40-60% dei casi (14).

La dose infettante è molto bassa, circa 103 unità, ma può essere inferiore per quei soggetti con patologie predisponenti: malattie epatiche, diabete, stati di immunodepressione, neoplasie (15-16).

Non sono stati descritti fattori di virulenza che possano far distinguere ceppi patogeni da ceppi non patogeni.

Metodi di determinazione dei vibriani negli alimenti

Attualmente il metodo più utilizzato per la determinazione dei vibriani patogeni negli alimenti è quello colturale classico (secondo FDA Bacteriological Analytical Manual 8th edition, 1995 o ISO 8914:1990) che prevede una fase di arricchimento, l'isolamento su terreno selettivo e l'identificazione biochimica, effettuata con gallerie di test (sistema API o equivalenti). Tuttavia alcune difficoltà di interpretazione dei test e l'ampia variabilità biochimica dei ceppi ambientali rendono questi sistemi non sempre affidabili per un'identificazione sicura.

Per quanto riguarda *V. parahaemolyticus*, essendo un germe potenzialmente patogeno, è soggetto alle normative generali che garantiscono il consumatore da alimenti nocivi o pericolosi per la salute pubblica (L. 283/1962; art. 444 cp.). Il criterio comunemente adottato in Italia è attualmente quello di accertare l'assenza in 25 g di prodotto. Ciò comporterebbe un respingimento di molte partite non conformi di prodotti della pesca importati dal nostro Paese, per cui è emersa la necessità di limitare le non conformità ai soli casi di presenza di *V. parahaemolyticus* tossigeno. In letteratura diversi autori hanno proposto l'identificazione e la caratterizzazione di *V. parahaemolyticus* mediante l'impiego di tecniche biomolecolari, quali la PCR.

In un nostro recente studio è stata valutata l'efficacia di diversi metodi di PCR per l'identificazione di *Vibrio parahaemolyticus* mediante il riscontro di differenti sequenze geniche specifiche (*toxR*, *gyrB*, *pR72H* e *tl*) proposte in letteratura da diversi autori (17-20) paragonandoli ai risultati ottenuti con l'API 20NE (modificato con l'aggiunta del 2,5% di NaCl).

Nel corso della ricerca sono stati analizzati un considerevole numero di vibriani di provenienza nazionale e internazionale (isolati da acqua di mare, molluschi, gamberi, feci) e ceppi ATCC di *V. parahaemolyticus* scelti come riferimento.

I ceppi sospetti di essere *V. parahaemolyticus* in base ad almeno uno dei metodi scelti sono stati poi sottoposti ad ulteriore PCR per la ricerca dei geni TDH e TRH responsabili della produzione di tossine.

I risultati ottenuti hanno dimostrato in diversi casi una relativa discordanza tra la presenza/assenza delle sequenze geniche prescelte e la probabilità ottenuta con il sistema API 20NE.

Quando l'API 20NE indicava un'elevata probabilità di identificazione come *V. parahaemolyticus*, in circa la metà dei casi vi era positività per *toxR* e un numero leggermente superiore di casi era positivo per *gyrB*.

Anche se l'uso di *gyrB* ha indicato un maggior numero di ceppi positivi rispetto a *toxR*, molti tracciati sono risultati però di difficile interpretazione per la presenza di bande aspecifiche.

L'uso di *pR72H* ha indicato un numero ancor minore di positivi rispetto ai precedenti e anch'esso è di difficile interpretazione per la presenza di ampliconi di dimensioni variabili.

L'uso di *tl*, infine, ha confermato la maggioranza dei ceppi positivi con l'API 20NE, tuttavia ha pure indicato come positivi 20 ceppi con bassa probabilità di essere *V. parahaemolyticus* con l'API 20NE.

Quindi, per definire quale metodo sia più utile per l'identificazione di *V. parahaemolyticus*, occorre paragonare i risultati ottenuti con i metodi descritti, con il sequenziamento di aree del genoma, convenzionalmente riconosciute come caratteristiche del microrganismo (es. tratto codificante per l'rNAr 16S). Da questo studio è emerso, infine, che i ceppi tossigeni sono rari; infatti fra i ceppi ambientali esaminati, solo uno, isolato da molluschi di origine italiana, e due, isolati da casi clinici provenienti dall'Angola, hanno mostrato la presenza del gene TDH e quindi sono stati identificati come in grado di produrre tossina. Ciò non toglie che altri fattori di patogenicità meno noti possano essere rilevanti nel determinare condizioni di pericolosità.

Bibliografia

1. Lipp EK, Rose JB. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Rev Sci Tech* 1997;16:620-40.
2. Baine W, Mazzotti M, Pocchiari F, *et al.* Epidemiology of cholera in Italy in 1973. *Lancet* 1974;2(7893):1370-4.
3. Maggi P, Carbonara S, Fico C, *et al.* Epidemiological, clinical and therapeutic evaluation of the Italian cholera epidemic in 1994. *Eur J Epidem* 1997;13:95-7.
4. Shewan JM. The microbiology of sea water-fish. In: Borgstrom G (Ed.). *Fish as food*. New York, London: Academic Press; 1961.
5. Butt AA, Aldridge KE, Sanders C. Infections related to the ingestion of seafood, Part I: viral and bacterial infections. *Lancet* 2004;4:201-12.
6. Murray PR (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. Washigton (DC): ASM Press; 1995.
7. West PA. The human pathogenic Vibrios. A public health update with environmental perspectives. *Epidemiol Infect* 1989;103:1-34.
8. Oliver JD, Kaper JB. Vibrio species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (Ed.). *Food Microbiology. Fundamentals and frontieres*. Washington (DC): ASM Press; 1997. p. 228-64.
9. Croci L, Serratore P, Cozzi L, Stacchini Al, Milandri S, Suffredini E, Toti L. Detection of Vibrionaceae in mussels and their sea water growing area. *Lett Appl Microbiol* 2001;32:57-61.
10. Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal KS. *Medical microbiology*,. London: Wolfe International Student Edition; 1994.
11. De Paola A, Hopkins LH, Peeler JT, *et al.* Incidence of Vibrio parahaemolyticus in US coastal waters and oysters. *Appl Env Microbiol* 1990;56:2299-302.
12. Cliver DO. *Foodborne diseases*. San Diego: Academic Press; 1990.
13. Desmachelier PM. Vibrio, introduction, including *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. In: Robinson RK (Ed.). *Encyclopedia of food microbiology*. London: Academic Press; 2000. p. 2237-57.
14. Varnam AH, Evans MG. *Foodborne pathogens*. London: Wolfe Publishing Ltd; 1991.
15. Chart H, Griffiths E. The aviability of iron and the groth of *Vibrio cholerae* in the sera of patients with haemachromatosis. *FEMS Microbiol, Lett* 1985;26: 2227-31.
16. Johnson JM, McFarland LM. *Vibrio vulnificus*: man and sea. *J Am Med Assoc* 1985;253:2580-3.
17. Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the toxR gene. *J Clinl Microbiol* 1999; 3(4):1173-77.
18. Venkateswaran K, Dohmoto N, Harayama S. Cloning and nucleotide sequence of the gyrB gene of Vibrio parahaemolyticus and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(2):681-87.

19. Lee CY, Pan SF, Chen CH. Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. *Appl Environ Microbiol* 1995;61(4):1311-17.
20. Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MCL, Jones DD, Kaysner CA. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tdh and trh. *J Microbiol Methods* 1999;36:215-25.

RUOLO DEI MICRORGANISMI INDICATORI E PROCESSI DI DEPURAZIONE

Eva Alessi, Luciana Croci

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

I prodotti ittici, per le loro qualità nutrizionali, costituiscono da sempre un'importante fonte per l'alimentazione umana.

Il ruolo svolto dai molluschi bivalvi nella trasmissione di alcune patologie umane è ormai noto da tempo e, già dall'inizio del secolo scorso, è cresciuta l'esigenza di un controllo microbiologico accurato di questi prodotti della pesca e dell'acquacoltura; l'ambiente in cui essi vivono e crescono, le singolari modalità di nutrizione e alcune diffuse consuetudini nel consumo, ne hanno confermato l'importanza nella trasmissione all'uomo di malattie batteriche e virali in Italia e nel mondo (1).

A partire dagli anni '50 comunque, grazie al miglioramento delle tecniche per il trattamento delle acque di scarico e allo sviluppo di standard per la classificazione delle aree di allevamento e raccolta dei molluschi, l'incidenza di tali malattie, soprattutto febbre tifoide e colera, ha iniziato a declinare. Ciononostante i molluschi non hanno smesso di costituire un problema per la salute umana: secondo i dati dei *Centers for Disease Control and prevention* (CDC), ad esempio, nel decennio 1978-1987, si sono verificate solo negli USA un totale di 128 epidemie gastroenteriche di vario tipo e 3747 casi associati al consumo di molluschi (*National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods*, 1992). È ragionevole comunque ritenere che i dati epidemiologici a disposizione siano sottostimati; in molti casi, infatti, il consumo di molluschi provoca solo sintomi gastrointestinali di lieve entità che non determinano il ricorso al sistema sanitario.

La flora microbica di un prodotto ittico è strettamente correlata alle sue abitudini di vita e alle caratteristiche microbiologiche dell'ambiente in cui esso nasce e si sviluppa. I molluschi bivalvi si nutrono filtrando acqua mediante le branchie e trattenendo plancton e particelle organiche necessarie al loro metabolismo. A seconda delle dimensioni, della specie e della temperatura di stabulazione, i molluschi sono in grado di filtrare quantità variabili di acqua: un mitilo filtra a 14° C circa 1,5 litri di acqua l'ora, l'ostrica europea ne filtra 12 a 15° C, mentre quella americana supera i 18 litri a 20° C, per un totale di acqua filtrata che va da 36 a 432 litri al giorno. Durante questa intensa attività di filtrazione, i molluschi sono naturalmente esposti al rischio di accumulo di inquinanti biologici e chimici eventualmente presenti nell'ambiente idrico. Sono in grado di concentrare nelle proprie carni da 100 a 200 volte il contenuto microbico e virale sospeso nell'acqua (2).

Microrganismi indice di contaminazione

Dalla difficoltà di utilizzare di routine tecniche finalizzate alla ricerca di tutti i possibili microrganismi patogeni per la definizione della qualità del cibo, dell'acqua o dell'ambiente, é

sorta la necessità di ricercare organismi indice di contaminazione, la cui presenza potesse essere indice della presenza di patogeni (3).

Già nel 1850 con la scoperta di Snow e Budd della correlazione tra l'incidenza della febbre tifoide e la presenza di acqua contaminata, nasce l'esigenza di identificare di microrganismi indice appropriati. Nel 1880 von Fritch identifica la *Klebsiella* come indice di contaminazione umana per il controllo dell'acqua potabile. Nel 1885 Escherich descrive il *Bacterium coli* (che nel 1919 prenderà il nome di *Escherichia coli*) che sarà suggerito da Schardinger, nel 1892, come indice di inquinamento fecale. Nel 1914 il Sistema Sanitario degli Stati Uniti adotta come indice di qualità per l'acqua potabile, i Coliformi fecali.

Ma è nel 1977 che Ingram prima e Mossel poi propongono l'uso di batteri *marker* la cui ricerca informasse tanto sulla probabilità che il prodotto possa albergare germi patogeni quanto sull'efficacia del processo cui il prodotto è sottoposto (4).

Per quel che concerne gli organismi utilizzati quali *marker* di qualità è opportuno definire cosa si intende per organismo indice: secondo la definizione corrente "la presenza di un organismo indice in un alimento, in concentrazione superiore a determinati limiti, indica la possibile presenza di organismi patogeni ecologicamente correlati". Tra gli indici di contaminazione più usati ci sono *E. coli*, la cui presenza in un alimento indica la fecalizzazione dello stesso e la possibile presenza di enterobatteri patogeni a habitat simile, e lo *Staphylococcus aureus*.

In campo alimentare, la scelta di individuare organismi *marker*, è legata all'alto costo, alla necessità di laboratori attrezzati e personale altamente specializzato richiesti per la ricerca di tutti i potenziali patogeni; alla possibilità di risultati negativi anche quando tali patogeni sono presenti, causa il basso numero o causa una distribuzione non omogenea nell'alimento stesso.

Secondo la *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 2003), un organismo *marker* deve godere di caratteristiche precise: deve essere simile al patogeno per ecologia, sopravvivenza, stabilità e caratteristiche di crescita, deve possedere caratteristiche biochimiche ben definite e identificabili, deve essere presente nell'alimento in quantità tale da non costituire problemi per la ricerca, deve avere un metodo per la determinazione e/o quantificazione facile, rapido, economico, sensibile, validato, non pericoloso per la salute dell'operatore e i risultati ottenuti devono essere applicabili al processo produttivo monitorato e devono mostrare correlazione tra la concentrazione dell'indicatore e il livello di pericolosità dell'organismo patogeno.

Normativa

Dal punto di vista legislativo, è importante delimitare e differenziare il settore della molluschicoltura da quello degli altri prodotti della pesca per le sue peculiarità e per l'importanza che riveste dal punto di vista sanitario. La produzione e la commercializzazione dei molluschi lamellibranchi filtratori, destinati al consumo umano diretto o alla trasformazione prima del consumo, è disciplinato dal DL.vo 30 dicembre 1992 n. 530 in attuazione della direttiva 91/492/CEE e stabilisce le norme igienico sanitarie di seguito riportate:

- limiti di tollerabilità per i contaminanti chimici e biologici;
- distinzione delle zone di provenienza;
- destino diversificato per i molluschi in base alla zona di provenienza, in particolare la depurazione e la stabulazione di tutti i molluschi provenienti da acque classificate non idonee.

Le acque destinate alla mitilicoltura sono classificate dall'Autorità Sanitaria Regionale, attraverso un procedimento ripetuto con scadenza triennale, in tre categorie:

– *Zona A*

i cui molluschi possono essere raccolti e utilizzati per il consumo umano diretto.

Tali molluschi devono soddisfare i seguenti requisiti:

- contenere meno di 300 coliformi fecali o meno di 230 *E. coli* per 100 g di polpa e di liquido intervalvare;
- non contenere salmonelle 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 nuclidi radioattivi non superiore ai limiti fissati dalla CEE;
- avere un tenore massimo di veleno paralizzante (*Paralytic Shellfish Poison*) nelle parti commestibili non superiore a 80 µg per 100 g (misurato mediante metodo biologico);
- non dare, con i metodi di analisi biologica, reazione positiva per la presenza di veleno diarrogeno (*Diarrhetic Shellfish Poison*);
- avere un tenore massimo di ASP (*Amnesic Shellfish Poison*) non superiore ai 20 µg di acido domoico per grammo (metodo di analisi HPLC).

– *Zona B*

i cui molluschi possono essere destinati al consumo umano diretto solo dopo aver subito un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A. I molluschi raccolti da tali zone non devono superare i livelli di 6,000 coliformi fecali per 100 g di polpa o 4,600 *E. coli* per 100 g di polpa nel 90% dei campioni. 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 C*

i cui molluschi possono essere destinati al consumo umano diretto esclusivamente previa stabulazione, per un periodo non inferiore a due mesi, in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A; 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 60,000 coliformi fecali per 100 g di polpa.

I centri di depurazione devono garantire il rispetto delle buone pratiche di lavorazione mediante controllo da parte di un laureato in discipline mediche, biologiche o chimiche e devono provvedere ad effettuare i controlli analitici sulle caratteristiche igienico-sanitarie dei molluschi in un laboratorio annesso alla struttura o avvalendosi di un laboratorio esterno riconosciuto dal Ministero della Sanità.

La normativa stabilisce, inoltre, che la depurazione sia effettuata in Centri riconosciuti dal Ministero della Sanità, che consenta ai molluschi di raggiungere i parametri precedentemente citati mediante il rilascio della contaminazione residua, che metta i molluschi nelle condizioni di mantenere intatta la loro vitalità e di riprendere rapidamente la nutrizione mediante filtrazione. Stabilisce che il processo di depurazione debba essere ininterrotto, che lotti diversi di molluschi non si trovino mai a stabulare nelle medesime vasche nello stesso momento; che utilizzi acqua di mare ricostituita mediante aggiunta dei principali elementi chimici all'acqua potabile oppure acqua di mare pulita o resa tale mediante trattamento.

Disinfezione delle acque destinate alla depurazione dei molluschi

Attualmente i metodi di disinfezione delle acque destinate alla depurazione dei molluschi si basano sull'utilizzo di particolari agenti chimici, quali cloro, iodofori e ozono o agenti fisici quali UV e filtrazione.

Il cloro è forse il metodo di disinfezione più antico e, sebbene sia efficace nel ridurre la contaminazione batterica, non risulta efficace nei confronti dei virus enterici. Inoltre, già a bassi livelli di concentrazione, può influenzare l'attività di filtrazione dei molluschi e necessita, quindi, di trattamento con tiosolfato e aereazione per abbattere la concentrazione residua nell'acqua prima che questa sia immessa nelle vasche di depurazione.

Gli iodofori vengono utilizzati a concentrazioni che vanno da 0,1 a 0,4 mg/L; non hanno alcun apparente effetto sull'attività dei molluschi né sulle loro caratteristiche di edibilità, riducono in breve tempo la quantità di batteri presenti, ma non sono efficaci nei confronti dei virus enterici se non a concentrazioni che danneggiano i molluschi stessi (l'HAV viene inattivato a concentrazioni di iodio attivo superiori a 100 ppm).

L'impiego dei raggi UV per la disinfezione delle acque è un sistema efficace in pochi secondi, capace di distruggere i microrganismi quando questi vengano a stretto contatto con la luce, attivo nei confronti sia di batteri che di virus. Inoltre, a differenza degli altri metodi, non lascia residui e non influenza i processi fisiologici dei molluschi. È un metodo molto utilizzato negli USA, ma necessita di un'acqua poco torbida, di un flusso a strato sottile e di lampade sempre efficienti. Il sistema deve essere regolarmente pulito per permettere una buona penetrazione della luce UV, pena la perdita di efficacia della disinfezione. Proprio per queste ragioni questo metodo comporta costi di esercizio molto elevati.

L'utilizzo dell'ozono si è notevolmente incrementato negli ultimi anni soprattutto nel nostro Paese. L'ozono agisce sui batteri alterandone le strutture molecolari (agisce sulle proteine ossidando gruppi SH) e causando blocco enzimatico. Agisce allo stesso modo sui virus con la differenza che l'ossidazione delle loro proteine avviene più facilmente perché privi di membrana cellulare.

Efficacia dei processi depurativi

L'acqua, una volta depurata, viene immessa in apposite vasche dove vengono posti a stabulare i mitili che, mediante un meccanismo di rilascio, riescono a purificarsi dei microrganismi accumulati.

L'avvenuta depurazione, secondo il DL.vo 530/1992, si basa su parametri batteriologici: i molluschi vengono ritenuti idonei alla commercializzazione e al consumo in base alla riduzione del numero di *E. coli* al di sotto delle 230 unità per 100 g di polpa o liquido intervalvare. La riduzione di tale parametro non assicura l'eliminazione da parte del mollusco di altri patogeni, come Vibrionacee e virus enterici. La famiglia delle Vibrionacee è costituita da batteri autoctoni dell'ambiente marino, la cui presenza non è quindi correlabile alla presenza di batteri indice di contaminazione fecale (5). I virus enterici derivano invece da contaminazione fecale nel mezzo idrico ma per il loro rilascio da parte dei molluschi, è stato più volte dimostrato, sono necessari tempi di depurazione più lunghi di quelli necessari per i batteri coliformi su cui sono basati gli attuali tempi di depurazione (48 ore) (6).

Già da alcuni anni nel nostro laboratorio sono state affrontate queste problematiche, sono state condotte numerose prove: per verificare nei molluschi la scarsa di correlazione tra *E. coli* e

la presenza di Vibrionacee e virus enterici e per studiare i diversi tempi di rilascio di questi microrganismi.

In uno studio sulla depurazione dei molluschi, campioni sperimentalmente contaminati con il virus dell'epatite A, sono stati posti contemporaneamente sia in acqua non trattata che in acqua trattata con ozono, effettuando dei prelievi a tempi stabiliti fino alle 120 ore. Sono state utilizzate che consentivano di regolare e mantenere costanti parametri come salinità e temperatura, particolarmente importanti per il metabolismo dei molluschi. Le nostre prove hanno mostrato, nelle prime 48 ore di trattamento, un rapido decremento della concentrazione di HAV da 10^4 TCID₅₀/mL fino ad una quantità inferiore al limite di rilevabilità del metodo quantitativo su cellule (<10 TCID₅₀/mL). Il virus, però, evidenziato mediante RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*), risulta ancora presente nei campioni anche dopo 120 ore di depurazione (7).

Prove analoghe condotte su molluschi sperimentalmente contaminati con batteri del genere *Vibrio*, in particolare *V. cholerae* O1 e *V. parahaemolyticus*, hanno ugualmente dimostrato la scarsa efficacia dei sistemi di depurazione anche su questi microrganismi. È emerso, infatti, che sia *V. cholerae* O1 che *V. parahaemolyticus* presentano un comportamento differente rispetto a *E. coli*. In particolare, dopo 44 ore di permanenza in acqua ozonizzata, si ottiene un abbattimento della concentrazione iniziale di *E. coli* pari ad un fattore 1000, mentre per i due vibriani pari ad un fattore 10 (8). Nella realtà un rapido rilascio dei batteri coliformi può determinare, dopo poche ore di trattamento (5 ore), il raggiungimento dei limiti batteriologici imposti per legge e quindi consente agli stabilimenti di depurazione dei molluschi di utilizzare tempi brevi, economicamente più vantaggiosi. Tali trattamenti di ridotta durata, però, condotti su molluschi con un'alta concentrazione di partenza di vibriani (es. molluschi raccolti da acque molto calde), indurrebbero una riduzione di questi ultimi non sempre sufficiente a garantire la sicurezza di quelle fasce di consumatori a rischio, suscettibili anche a dosi infettanti inferiori alla norma. Inoltre, in caso di conservazione poco idonea, si potrebbero determinare condizioni particolarmente favorevoli alla proliferazione dei vibriani presenti, per la diminuzione di microflora competitiva.

Batteriofagi come indicatori di contaminazione virale

Dai risultati ottenuti dagli esperimenti e per quanto esposto fin ora appare evidente che gli attuali organismi indice (*E. coli* e salmonella) non garantiscono che i molluschi siano esenti da agenti altri patogeni, in particolare da vibriani e virus enterici.

L'esigenza di ottenere un indice che sia un vero organismo di controllo, anche nei confronti di virus e vibriani, ha portato l'Unione Europea a proporre i batteriofagi come indici indiretti di contaminazione virale e indicatori di efficacia del processo depurativo, da affiancare o sostituire agli attuali parametri microbiologici (9).

In particolare è stato scelto come indicatore il fago MS2 appartenente alla famiglia delle Leviviridae e al genere *Levivirus* che, assieme alla famiglia degli Allolevivirus, comprende batteriofagi che infettano enterobatteri (10).

Si tratta di fagi F-specifici con involucro proteico con morfologia estremamente semplice, un capsido icosaedrico di dimensioni 24-27 nm, costituito da una sola proteina e una RNA-polimerasi associata all'RNA a singolo filamento (11). Sono in grado di moltiplicarsi esclusivamente all'interno della cellula batterica ospite metabolicamente attiva e competente. Le loro modalità replicative non differiscono da quelle dei virus animali.

I dati riguardanti la distribuzione nell'ambiente dei fagi sono ancora frammentari, è possibile comunque individuare la loro presenza in tutte le matrici ambientali. In particolare, per quanto

concerne gli ambienti acquatici, le informazioni più importanti riguardano la presenza di fagi infettanti batteri del genere *E. coli* (colifagi) la cui presenza stata più volte riscontrata nel tratto digerente dell'uomo e degli animali. È stato dimostrato, infatti, che il 23,5% di campioni di feci umane contiene colifagi in concentrazione pari a 10^5 Unità Formanti Placca (UFP) per grammo di feci (12).

La capacità di moltiplicazione dei Colifagi F-specifici è in funzione della presenza di *E. coli* e del sex-pilus sulla superficie del batterio. La sintesi di questo recettore avviene a temperature superiori a $+30^\circ\text{C}$ ed è presumibile, quindi, che la moltiplicazione nell'ambiente di questi fagi sia realizzabile soltanto se il batterio ospite ha precedentemente sintetizzato il sex-pilus nell'intestino degli omeotermi prima di essere rilasciato nel mezzo idrico.

I batteriofagi sopravvivono nell'ambiente acquatico più a lungo dei batteri autoctoni e in particolare dei batteri indicatori di contaminazione fecale. Allo stesso modo dei virus animali, la durata della loro sopravvivenza dipende dalla presenza di sostanza organica nel mezzo, dall'associazione con le particelle solide, dalla temperatura, dall'esposizione ai raggi ultravioletti, dal pH, ecc. (13).

Le motivazioni che hanno suggerito l'utilizzo dei colifagi come indicatori della presenza di virus sono riferibili alla loro ubiquarietà, soprattutto per quelli provenienti dall'uomo e dagli animali omeotermi, alla loro abbondanza nelle acque residue e contaminate; alla consistenza della loro popolazione rispetto agli enterovirus; all'incapacità di riprodursi in assenza del batterio ospite; ai metodi di isolamento e quantificazione semplici e poco costosi e con tempi di risposta sono più brevi che per gli enterovirus e alla maggiore resistenza all'inattivazione e disinfezione rispetto agli enterovirus

Dalla proposta dell'UE, è nato un progetto che ha avuto come scopo quello di valutare nei molluschi bivalvi (in particolare vongole appartenenti alla specie *Tapes philippinarum* e mitili appartenenti alla specie *Mytilus galloprovincialis*) l'efficacia degli indici di processo e di contaminazione fecale attualmente in uso e degli indici alternativamente proposti, i batteriofagi.

Al progetto hanno preso parte tre Paesi europei tra cui l'Italia, con il Laboratorio alimenti dell'Istituto Superiore di Sanità (responsabile scientifico la dott.ssa Luciana Croci), la Spagna, con l'Università di Santiago di Compostela Dipartimento di Microbiologia e Parassitologia, (responsabile scientifico dott. Jesus Romalde) e l'Inghilterra e in particolare il centro CEFAS con il dott. Bill Dorè e il dott. David Lee.

Il lavoro ha previsto, per quel che riguarda l'Italia, il prelievo settimanale di campioni di molluschi sia prima che dopo il processo depurativo, per un periodo che va da giugno a dicembre 2003 con l'esclusione del mese di agosto durante il quale, per l'eccezionalità delle temperature delle acque registrate ($24-29^\circ\text{C}$), si è verificata una moria quasi totale di mitili.

I molluschi, utilizzati nella sperimentazione, sono stati prelevati in tre zone di allevamento della Sacca di Goro (Mare Adriatico) classificati, secondo la normativa vigente, zone di tipo B e sottoposti a processo di depurazione presso tre centri che utilizzano diverse modalità di trattamento dell'acqua (ozono, cloro e raggi UV).

Tutti i campioni sono stati analizzati prima e dopo depurazione per la presenza di *E. coli*, batteriofagi, virus dell'epatite A e Norovirus.

Dei 63 campioni complessivamente analizzati, 46 (73%) facevano registrare valori di *E. coli* entro i parametri di legge già prima del processo depurativo, nonostante la provenienza da Zona di tipo B; nei rimanenti 17 campioni il processo depurativo ha riportato 12 (85,7%) di questi al di sotto dei 230 *E. coli*/100 g di polpa o liquido intervallare.

Per quel che riguarda i batteriofagi nel primo trimestre la loro presenza è stata al di sotto del limite di rilevabilità del metodo (< 30 ufp/100 g), a causa delle elevate temperature dell'acqua di allevamento. Nel secondo trimestre (ottobre, novembre e dicembre), in relazione al graduale decremento della temperatura, si sono osservati valori crescenti di batteriofagi da 30 a 436.320

ufp/100 g. In seguito al processo di depurazione, è stato osservato, in media, un tasso di riduzione dei batteriofagi del 43,6%. È stato possibile osservare, in alcuni casi, livelli di batteriofagi nei campioni non depurati inferiori al valore nei depurati, segnale di una distribuzione non omogenea nei vari lotti di molluschi.

L'analisi virologica ha mostrato la presenza di HAV o NV in 18 (28,5%) campioni, 5 (7,9%) dei quali positivi per la presenza di HAV, 12 (19%) per i Norovirus mentre solo in 1 (1,6%) campione si registra la presenza di entrambi i virus.

Di questi 18 campioni, 15 (83,3%) presentavano valori di *E. coli* al di sotto del limite stabilito dalla normativa vigente per commerciabilità dei molluschi; all'opposto dei 17 campioni con valori di *E. coli* al di sopra dei parametri previsti dalla legge, solo in 3 (17,6%) viene riscontrata presenza di virus enterici. Per quel riguarda i batteriofagi, dei 18 solo in 11 (61,1%) si sono riscontrati valori di batteriofagi medio-alti. È stato quindi dimostrato che non sempre c'è coerenza tra *E. coli*, batteriofagi e positività virale: nel 38,8% dei campioni contaminati da virus, infatti, non si riscontra presenza di nessuno dei due indici.

Tali indagini hanno quindi confermato inadeguatezza di *E. coli* come indice di presenza di virus enterici nei molluschi sia prima che dopo i processi di depurazione e l'inaffidabilità, allo stato attuale dell'indagine e nei tempi e nelle condizioni di depurazione monitorati in Italia, dei batteriofagi quali organismi indicatori a causa dell'influenza della temperatura sulla loro sopravvivenza, per la non costanza del tasso di riduzione e per il non raggiungimento dello standard di riduzione proposto dall'UE (> 95%), dato confermato anche dai risultati presentati dagli altri Paesi coinvolti nell'indagine. I batteriofagi hanno mostrato, però rispetto batteri coliformi, una maggiore resistenza ai processi depurativi il che avvicina il loro comportamento a quello dei virus enterici e dei vibroni.

Bibliografia

1. Croci L, Suffredini E. Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici. *Ann Ist Super Sanità* 2003;39(1):35-45.
2. Richards GP. Microbial purification of shellfish. *J Food Prot* 1998;51:218-51.
3. Tortorello ML. Indicator organism for safety and quality-uses and methods for detection: Minireview. *JAOAC Intern* 2003;86(6):1208-17.
4. Mossel DAA, Weenk GH, Morris GP, Struijk Corry B. Identification, assessment and management of food-related microbiological hazard: historical, fundamental and psycho-social essentials. *Intern J Food Microbiol* 1998;40:211-43.
5. Douglas AW, Hackeney CR, Carric RJ, Lovelace G, Sobsey MD. Enteric bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in hard shell clams. *J Food Prot* 1983;46:493-6.
6. Goyal SM, Adams WN, O'Malley ML, Lear DW. Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the middle Atlantic region. *Appl Environ Microbiol* 1984;48:758
7. De Medici D, Ciccozzi M, Fiore A, Di Pasquale S, Parlato A, Ricci-Bitti P, Croci L. Closet-Circuit system for depuration of mussels experimentally contaminated with Hepatitis A virus. *J Food Prot* 2001;64(6):877-80.
8. Croci L, Suffredini E, Cozzi L, Toti L. Effects of depuration of mollusc experimentally contaminated with *E. coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Appl Microbiol* 2002;92:460-5.
9. Dorè WJ, Henshilwood K, Lees DN. Evaluation of F-specific DNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:1280-5.
10. Baggi F, Demarta A, Peduzzi R. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Res Microbiol* 2001;152:743-51.

11. Bollback JP, Huelsenbeck JP. Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family Leviviridae). *J Mol Evol* 2001;52(2):117-28.
12. Allwood PB, Malik YS, Hedberg CW, Goyal SM. Survival of F-specific RNA coliphage, feline calicivirus, and *E. coli* in water: a comparative study. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(9):5707-10.
13. Mujika IM, Girones R, Tofino-Quesada G, Calvo M, Lucena F. Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round structured virus involved in outbreaks of nonbacterial gastroenteritis in USA. *J Med Virol* 2003;53:372-83.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, settembre 2005 (n. 3) 12° Suppl.