

**Progetto Sibilla - Esperienze di microbiologia predittiva applicata  
Ferrara 8 giugno 2015**

# **Caratterizzazione della qualità microbiologica dei molluschi bivalvi vivi sottoposti a ciclo depurativo, prima della commercializzazione, nei centri depurazione molluschi**

**Boschetti L <sup>1</sup>, Berardelli C <sup>1</sup>, Rubini S <sup>2</sup>, Galletti G <sup>2</sup>**

**<sup>1</sup> Azienda USL di Ferrara – U.O.A.V. – U.O. Igiene degli Alimenti di Origine Animale;**

**<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna  
(IZSLER) – Sezioni di Ferrara e Bologna**





## **Dati produzione primaria**

★ **Vongole veraci**

**Ultima stima produttiva anno 2014: 16312 t**

★ **Mitili**

**Ultima stima anno 2014: 6420 t**

# Provincia di Ferrara

## 12 CDM:

- ★ **2 circuito aperto (captazione in mare dell'acqua di depurazione)**
- ★ **10 circuito chiuso (produzione dell'acqua di depurazione utilizzando acqua potabile)**

# Pericolo

```
graph TD; A[Pericolo] --- B[Biologico:]; A --- C[Chimico:]; A --- D[Fisico:]; B --- B1[Salmonella]; B --- B2[E. Coli]; B --- B3[Vibrio]; B --- B4[Virus]; B --- B5[Biotossine]; B --- B6[Parassiti]; C --- C1[IPA]; C --- C2[Metalli pesanti (Pb, Cd, Hg, ecc...)]; C --- C3[Diossina/Furani]; C --- C4[PCB diossina like]; D --- D1[Sabbia intervalvare, detriti sulle valve];
```

## Biologico:

*Salmonella*  
*E. Coli*  
*Vibrio*  
Virus  
Biotossine  
Parassiti

## Chimico:

IPA  
Metalli pesanti  
(Pb, Cd, Hg,  
ecc...)  
Diossina/Furani  
PCB diossina like

## Fisico:

Sabbia  
intervalvare,  
detriti sulle valve

## **Elementi che un CDM deve aver analizzato e definito nel proprio piano di autocontrollo**

- ★ **Grado di contaminazione iniziale**
- ★ **Carico di mbv del singolo bins/impianto**
- ★ **Temperatura**
- ★ **Salinità**
- ★ **Ossigeno disciolto**
- ★ **Torbidità dell'acqua**
- ★ **pH**
- ★ **Nitriti/nitrati**
- ★ **NH<sub>3</sub>**

## Temperatura dell'acqua

- ☆ mollusco a 0°C (praticamente non respira): **ridotta capacità depurativa**
- ☆ mollusco tra 10-20°C (massima capacità respiratoria, consumo di 1 ml/h di ossigeno): **massima capacità depurativa**
- ☆ mollusco tra 25-30°C (dimezzata capacità respiratoria, consumo di 0,5 ml/h di ossigeno): **capacità depurativa dimezzata**

## Ossigeno disciolto

- ☆ **70 – 110% di saturazione :**

**Temperatura H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> disponibile, influenzano fortemente la capacità respiratoria del mollusco, funzione vitale che permette la depurazione del mollusco**

Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131 tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano concernente linee guida per l'applicazione del Regolamento (CE) 854/2004 e del Regolamento (CE) 853/2004 nel settore dei molluschi bivalvi.

Rep. Atti n 79/CSR del 08.07.2010


**GIUNTA DELLA REGIONE EMILIA ROMAGNA:  
recepimento linee guida**

11 Ottobre 2010 prot. 1498/2010

**Il valore critico di ossigeno  
disciolto indicato è 5 mg/l**

<b>Temperatura</b>	<b>% Ossigeno disciolto (ml/l)</b>					
<b>°C</b>	<b>100</b>	<b>90</b>	<b>80</b>	<b>70</b>	<b>60</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>10.0</b>	<b>9.0</b>	<b>8.0</b>	<b>7.0</b>	<b>6.0</b>	<b>5.0</b>
<b>10</b>	<b>9.0</b>	<b>8.1</b>	<b>7.2</b>	<b>6.3</b>	<b>5.4</b>	<b>4.5</b>
<b>15</b>	<b>8.1</b>	<b>7.3</b>	<b>6.5</b>	<b>5.7</b>	<b>4.9</b>	<b>4.0</b>
<b>20</b>	<b>7.4</b>	<b>6.6</b>	<b>5.9</b>	<b>5.2</b>	<b>4.4</b>	<b>3.7</b>
<b>25</b>	<b>6.8</b>	<b>6.1</b>	<b>5.8</b>	<b>4.2</b>	<b>4.0</b>	<b>3.4</b>





# **Salinità:**

**minimo e massimo: tra 18-35 ‰**

**ottimale tra 25-35 ‰**

- ☆ Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131 tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano concernente linee guida per l'applicazione del Regolamento (CE) 854/2004 e del Regolamento (CE) 853/2004 nel settore dei molluschi bivalvi.  
Rep. Atti n 79/CSR del 08.07.2010
- ☆ Il limite di salinità dovrebbe variare al massimo del 20% rispetto a quello della zona dalla quale sono stati raccolti i molluschi . Se nel corso del ciclo di depurazione la salinità o la temperatura dell'acqua oltrepassano i limiti fissati dal piano HACCP gli stessi valori devono essere riportati nei limiti previsti ed il tempo del ciclo di depurazione riparte dal tempo 0



★ **pH: tra 7 – 8,4**

★ **Nitriti: 0,50 ppm**

★ **Nitrati: 50 ppm**

★  **$\text{NH}_4^+$ : 1 ppm (da valutare nell'eventuale  
uso di acque di pozzo)**

# TORBIDITÀ DELL'ACQUA

- ☆ Se l'impianto di depurazione utilizza un impianto a raggi UV per il trattamento dell'acqua, il limite massimo di torbidità dell'acqua accettabile è 20 NTU (unità nefelometriche di torbidità)
- ☆ Al di sopra dei 5 NTU l'attività di disinfezione dell'acqua da parte dei raggi UV subisce una diminuzione di efficacia

# TRATTAMENTO RAGGI UV

**E' riconosciuto scientificamente l'effetto battericida dell'area ultravioletta dello spettro elettromagnetico**

- ★ Le specifiche lunghezze d'onda responsabili di questa reazione sono situate tra 240 e 280 nanometri (nm) con un picco alla lunghezza d'onda di 265 nm (note come UV-C)
- ★ Gli impianti di trattamento a raggi UV operano generalmente nella gamma della radiazione UV-C tra i 200 ed i 280 nm.
- ★ Necessita la presenza di filtri per eliminare il materiale in sospensione

# TRATTAMENTO con OZONO



- ☆ E' un'azione combinata di ossidazione delle proteine e alterazione delle strutture molecolari
- ☆ L'ozonizzazione dell'acqua può essere realizzata come aggiunta dell'ozono (tre molecole di ossigeno aggregate) in forma di gas, oppure prodotto on-site attraverso scariche elettriche o raggi UV (picco a 185 nm). Il suo utilizzo per i trattamenti delle acque deve essere effettuato con estrema cautela ponendo particolare attenzione alle concentrazioni (mg/l) d'uso e rimozione degli eccessi prima dell'immissione nel bacino

**Limite critico > 0,5 mg/l**

# TRATTAMENTO con OZONO



- ☆ Questo procedimento va gestito da un isuratore/controllore del  
Potenziale Redox misurato in: **milli volt (mV)**
- ☆ la produzione di ozono è proporzionatamente richiesta dall'acqua dell'impianto di depurazione, in relazione alla quantità di arricchimento organico/batterico apportato dai molluschi

## TRATTAMENTO con CLORO

- ☆ Efficace contro batteri enterici, scarsa attività nella riduzione della presenza di spore batteriche virus e protozoi
- ☆ 0,1 mg/l: limite critico del cloro libero nell'acqua del processo di depurazione. In caso contrario i molluschi bivalvi non filtreranno compromettendo la depurazione

## Impianto a ciclo aperto





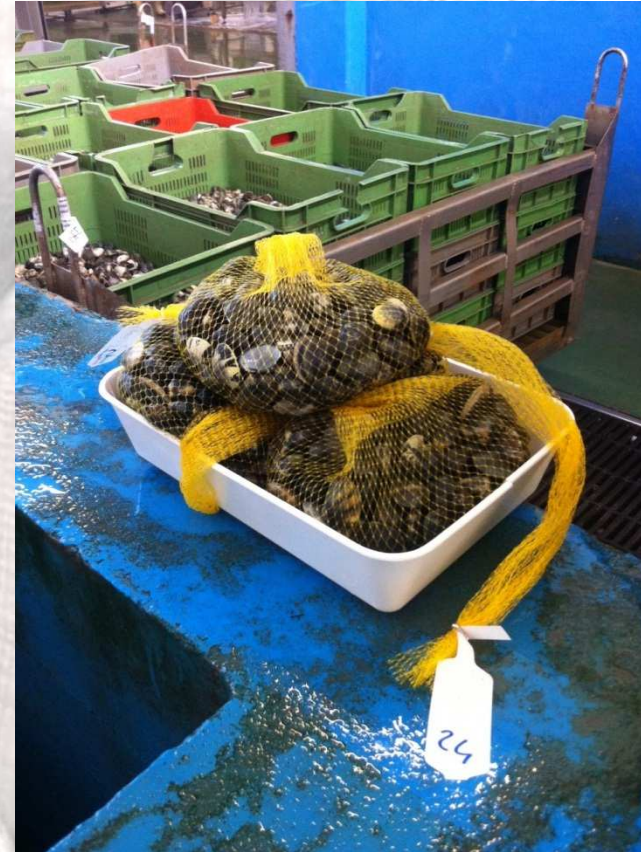
## Impianto a ciclo chiuso



## Fase della contaminazione dei molluschi



## Formazione delle aliquote



## Allestimento bins



# Molluschi contaminati in depurazione



## Campioni:

- ☆ Dopo **8 ore** (ore 19,30), recupero delle aliquote marcate con il n. 8 posizionate una sulla superficie e una a metà bins
- ☆ Dopo **12 ore** (ore 23,30), recupero delle aliquote marcate con il n. 12 posizionate una sulla superficie e una a metà bins
- ☆ Dopo **24 ore** (ore 11,30 del giorno seguente), recupero delle aliquote marcate con il n. 24 posizionate sul fondo del bins



**Seconda parte**

**ANALISI ESEGUITE  
E  
RISULTATI OTTENUTI**

# Analisi eseguite

## Fase 1 – Vongole e acque di stabulazione da tutti i CDM

In totale sono stati prelevati 96 campioni di acqua e 96 campioni di vongole veraci

Determinazione	Acqua	Molluschi
Coliformi fecali	X	
<i>Escherichia coli</i>	X	X
<i>Salmonella</i> sp.	X	X
<i>Shigella</i> sp.		X
Carica batterica mesofila totale a 22 e 36°C	X	
<i>Vibrio colera</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	X	X
Virus Epatite A (HAV)	X	X
Norovirus	X	X
Rotavirus	X	X
Enterovirus	X	X
<i>Cryptosporidium parvum</i>	X	X
<i>Toxoplasma gondii</i>	X	X



## Risultati fase 1

- ☆ Durante la fase 1 la contaminazione naturale delle vongole è risultata molto bassa. Infatti **solo 13 campioni** su 96 (13,5%) avevano cariche di *E. coli* comprese tra 230 e 4600 MPN *E. coli* / 100 g e **1 solo campione** (1%) eccedeva, anche se di poco (5400 MPN *E. coli* / 100 g) , il limite massimo della zona B
- ☆ Ad eccezione di **un unico caso**, gli impianti di depurazione si sono dimostrati in grado di abbattere la carica iniziale di *E. coli* tanto da rispettare il limite previsto dal Reg. 2073/2005

## MPN *E. coli* prima e dopo depurazione

<b>CDM</b>	<b>Non depurato</b>	<b>Dopo depurazione</b>
<b>4</b>	<b>5400</b>	<b>130</b>
<b>5</b>	<b>3500</b>	<b>790</b>
<b>6</b>	<b>1700</b>	<b>&lt;20</b>
<b>4</b>	<b>1700</b>	<b>&lt;20</b>
<b>6</b>	<b>1100</b>	<b>&lt;20</b>
<b>7</b>	<b>790</b>	<b>&lt;20</b>
<b>11</b>	<b>790</b>	<b>80</b>
<b>9</b>	<b>330</b>	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>330</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>230</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>230</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>230</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>230</b>	<b>50</b>

## Risultati fase 1

- ★ La ricerca di *Shigella* spp., Enterovirus, Norovirus, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, è risultata negativa in tutti i campioni sia in Fase 1 che in Fase 2
- ★ E' stata isolata una sola *Salmonella*, appartenente alla sierovariante Veneziana, da un campione di acqua prelevata a fine ciclo depurativo

## Risultati fase 1

- ☆ Il virus HAV e i Rotavirus hanno mostrato una prevalenza, rispettivamente, di 3,2% e 1,6% e sono stati rilevati nei molluschi sia prima che dopo la depurazione. Quindi la fase di decontaminazione, anche dopo 24 ore di permanenza in vasca dei molluschi, non si è dimostrata efficace per eliminare questi patogeni
- ☆ Su 312 campioni esaminati, 93 sono risultati positivi per vibroni potenzialmente patogeni, pari al 29,8%. Anche in questo caso la presenza di vibroni è risultata indipendente dalla depurazione

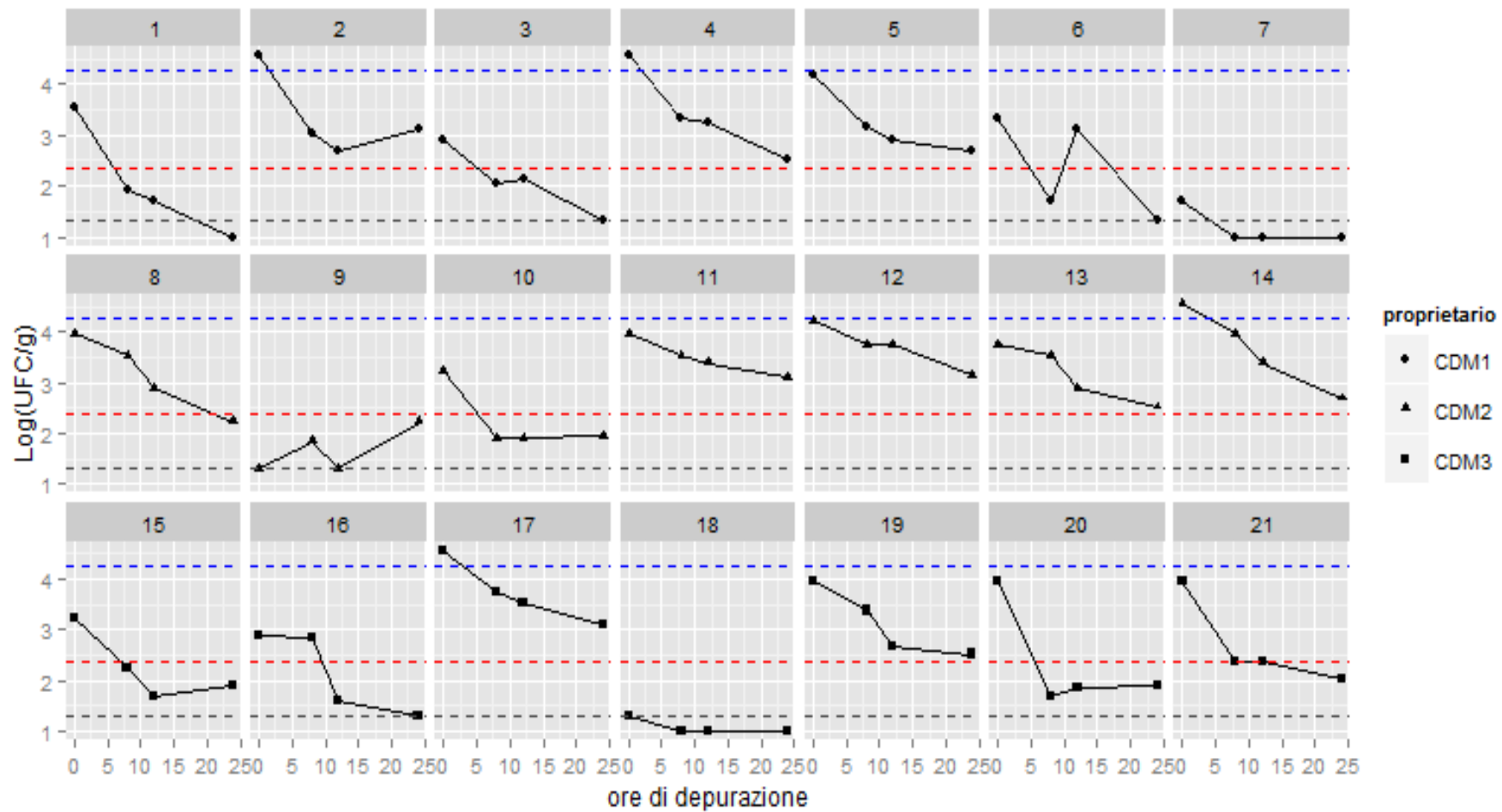
## Fase 2

- ☆ Sono stati selezionati **3 CDM** di cui 1 a circuito aperto e 2 a circuito chiuso
- ☆ Sono state eseguite **21 prove di depurazione**, rilevando la concentrazione di *E.coli* attraverso il metodo MPN:
  - ☆ prima della contaminazione
  - ☆ al termine della contaminazione del prodotto (circa 3 ore)
  - ☆ dopo 8 ore di depurazione
  - ☆ dopo 12 ore di depurazione
  - ☆ dopo 24 ore di depurazione
- ☆ Nei CDM a circuito chiuso, dove erano previste due aliquote posizionate in zone diverse dei bins, è stato considerato il valore massimo rilevato nelle due aliquote

## Fase 2

- ☆ Come indicato dalle LLGG CEFAS (EU, 2014), per l'elaborazione statistica dei risultati ottenuti a valori MPN <20 è stato assegnato 10, a valori >18000 è stato assegnato 36000
- ☆ I dati raccolti mostrano che in 9 prove di depurazione su 21 (43%) il prodotto presenta concentrazioni superiori a 230 UFC/g dopo 24 ore di depurazione
- ☆ Si nota un unico caso in cui la carica cresce, pur restando sempre inferiore al limite legale. Le concentrazioni rilevate, convertite in logaritmo base 10, sono mostrate nei grafici seguenti

# Grafici depurazione



## Ricerca vibroni potenzialmente patogeni

- ★ **FASE 1:** 35 campioni (molluschi e acqua) su 186, pari al 18,8% (IC95%: 13.5% –25.2%) sono risultati positivi per *Vibrio parahaemolyticus* e/o *V. cholerae*
- ★ **FASE 2:** 106 campioni (molluschi e acqua) su 210, pari al 50,5% (IC95%: 43.5% –57.4%) sono risultati positivi per *Vibrio parahaemolyticus* e/o *V. cholerae*



## Conclusioni

- ☆ Anche se il numero di prove eseguite non è sufficiente per trarre considerazioni conclusive, i risultati ottenuti permettono di affermare che se gli impianti di depurazione vengono gestiti nel modo corretto sono efficaci per quanto riguarda l'abbattimento delle cariche di *E. coli*
- ☆ Questo sia in quelli a ciclo aperto che a ciclo chiuso
- ☆ Non sono invece in grado di depurare i molluschi dalla presenza di virus enterici (in particolare HAV, Norovirus) e nemmeno dalla presenza di vibrioni potenzialmente patogeni

**PROPOSTA DI GESTIONE EMERGENZE IN CASO DI NC IN MBV  
DERIVANTI DAL MONITORAGGIO DELLE ZONE DI PRODUZIONE.  
Nota prot. 66436 del 27.10.2014 risposta RER prot. 164672 del  
16.03.2015**

Gestione rischio microbiologico per *E.coli*:  
CDM/CSM

- ☆ a) i lotti di MBV oggetto del ritiro/richiamo, raccolti nei giorni compresi tra la data del campionamento ufficiale e la data dell'adozione dell'atto di divieto raccolta, ma ancora in deposito presso il CDM in attesa della depurazione, devono essere rispediti alla cooperativa di origine per essere reimmersi;
- ☆ b) i lotti di MBV oggetto del ritiro/richiamo, raccolti nei giorni compresi tra la data del campionamento ufficiale e la data dell'adozione dell'atto di divieto raccolta, ma già immersi nelle vasche di depurazione, devono essere considerati in vincolo sanitario e devono subire un ciclo depurativo utile a garantire quanto indicato dal Reg. 2073/05. Il CDM deve disporre di una procedura validata nella quale sia definito il tempo minimo di depurazione in funzione della carica iniziale del prodotto non depurato. Il parametro "tempo minimo di depurazione" deve essere standardizzato attraverso prove di campo e deve essere tale da abbattere una carica di *E. coli* superiore al limite fissato per una zona di tipo B, al fine di assicurare il rispetto del limite fissato dal Reg. 2073/05. La liberalizzazione dei lotti considerati in vincolo sanitario è subordinata al possesso di documentazione con cui l'OSA possa provare di aver eseguito analisi microbiologiche in autocontrollo presso un laboratorio che deve disporre di prova accreditata. L'AC si riserva comunque di eseguire campioni ufficiali di verifica.

**PROPOSTA DI GESTIONE EMERGENZE IN CASO DI NC IN MBV  
DERIVANTI DAL MONITORAGGIO DELLE ZONE DI PRODUZIONE.  
Nota prot. 66436 del 27.10.2014 risposta RER prot. 164672 del  
16.03.2015**

- ☆ Se il CDM non dispone di protocollo validato può seguire una delle seguenti vie:
- 1) respingere il lotto raccolto nei giorni compresi tra la data del controllo ufficiale e la data dell'adozione dell'atto di divieto raccolta alla cooperativa speditrice per la successiva reimmersione;
  - 2) destinare il prodotto raccolto nei giorni compresi tra la data del controllo ufficiale e la data dell'adozione dell'atto di divieto raccolta, ad una ditta di trasformazione (punto 5, lettera A, Cap. II, Sezione VII dell'Allegato II del Reg. 853/04) o, in subordine, alla distruzione come materiale di Cat. 2 ai sensi del Reg. 1069/09;

**PROPOSTA DI GESTIONE EMERGENZE IN CASO DI NC IN MBV  
DERIVANTI DAL MONITORAGGIO DELLE ZONE DI PRODUZIONE.  
Nota prot. 66436 del 27.10.2014 risposta RER prot. 164672 del  
16.03.2015**

- ★ c) i lotti di MBV oggetto del ritiro/richiamo, raccolti nei giorni compresi tra la data del campionamento ufficiale e la data dell'adozione dell'atto di divieto raccolta, sottoposti ad un ciclo depurativo e già commercializzati verso il consumatore finale, nel caso in cui il CDM disponga di un protocollo validato nel quale è definito il tempo minimo di depurazione (in grado di documentare l'effettiva capacità di abbattere una carica di *E. coli* superiore al limite fissato per una zona di tipo B entro il limite fissato dal Reg. 2073/05) e dal controllo documentale risulti che il tempo di depurazione a cui è stato sottoposto il lotto di MBV è superiore o uguale al tempo definito nella procedura, non dovranno essere ritirati/richiamati dall'OSA, nè l'AC dovrà attivare il sistema di Allerta. Se invece il CDM non dispone di un tale protocollo, l'OSA deve attivare la procedura di ritiro/richiamo e l'AC deve attivare il sistema di Allerta.