

**Metodi di prova microbiologici:  
esperienze acquisite**

**Ferrara 27 marzo 2012**

**Silva Rubini - IZSLER Sezione di Ferrara ([silva.rubini@izsler.it](mailto:silva.rubini@izsler.it))**

## Workshop dei Laboratori operanti nel Controllo Ufficiale dei Molluschi Bivalvi - Ancona, 6-7 marzo 2012

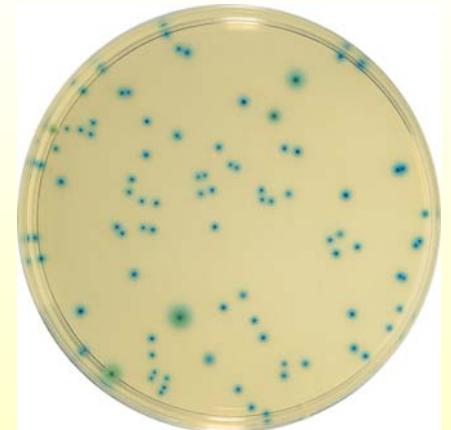
- **Risoluzione Codex Alimentarius - Proposta di armonizzazione tra Codex e Legislazione UE**
- **Il Codex propone, per *E. coli*, un piano di campionamento a 3 classi, su 5 unità campionarie:**
  - ★  **$n = 5$   $c = 1$   $m = 230$   $M = 700$**  (campioni legali in unica istanza)
  - ★  **$n = 1$   $m = 230$   $M = 700$**  nell'**80% dei campioni** del Piano di Monitoraggio, applicato nel tempo. (Però l'intervallo di tempo non è stato ancora definito)

# Workshop dei Laboratori operanti nel Controllo Ufficiale dei Molluschi Bivalvi - Ancona, 6-7 marzo 2012

## ➤ Metodi di Analisi per *Escherichia coli*

- ★ MPN (ISO 16649-3) indicato da Reg. 2073/2005
- ★ Impedometrico (Bactrac)
- ★ TBX

## Vantaggi e svantaggi dei diversi metodi



## Workshop dei Laboratori operanti nel Controllo Ufficiale dei Molluschi Bivalvi - Ancona, 6-7 marzo 2012

### ➤ Negoziati per l'esportazione di molluschi negli USA

- ★ Metodi di Analisi (ISO / FDA-BAM)
- ★ Matrici analizzate (molluschi / acqua)
- ★ Parametri microbiologici discordanti (classificazione acque e coliformi totali e fecali / molluschi e *E. coli*)
- ★ CDM (?) Secondo Love *et al.*, 2010 ci sono 14 CDM in Nord America (4 in USA e 10 in Canada) mentre in Europa sono circa 1730 (... secondo IZSUM solo in Portogallo sono oltre 2000 e più di 1400 in Francia ....)

## Workshop dei Laboratori operanti nel Controllo Ufficiale dei Molluschi Bivalvi - Ancona, 6-7 marzo 2012

### ➤ *Vibrio* spp.

#### ★ Metodi Normati

- ISO 21872 - 1
- ISO 21872 - 2

#### ★ Introduzione di metodi di biologia molecolare per caratterizzare la patogenicità

#### ★ Numerazione vibroni (FDA-BAM, 2004)

#### ★ *Vibrio vulnificus* nelle acque di balneazione e nei molluschi:

- 41.000 casi negli USA finora segnalati con un aumento del "periodo critico" da maggio-ottobre a marzo-novembre

**Workshop dei Laboratori operanti nel Controllo Ufficiale dei  
Molluschi Bivalvi - Ancona, 6-7 marzo 2012**

- ***Salmonella* spp. c'è discordanza nella  
interpretazione della legislazione**

**Reg. 853/2004 e Reg. 854/2004**

**VS.**

**Reg. 2073/2005**

# Workshop dei Laboratori operanti nel Controllo Ufficiale dei Molluschi Bivalvi - Ancona, 6-7 marzo 2012

## ➤ Virus

- ★ **Alta presenza di norovirus nei molluschi europei**
- ★ **Dati incompleti su HAV**
- ★ **Gruppi di lavoro EFSA**
  - ★ **Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options - EFSA Journal 2012; 10(1):2500 [39 pp.]**
  - ★ **Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses - EFSA Journal 2011; 9(7):2190 [96 pp.]**

# Workshop dei Laboratori operanti nel Controllo Ufficiale dei Molluschi Bivalvi - Ancona, 6-7 marzo 2012

## ➤ IZSAM - Depurazione Molluschi

- ★ Eseguito in laboratorio
- ★ *Chamelea gallina* e *Mytilus galloprovincialis*
- ★ Carico dell'impianto molto basso
- ★ Contaminazione sperimentale con:
  - *Escherichia coli*
  - *Salmonella* Typhimurium
  - *Vibrio parahaemolyticus*



# Workshop dei Laboratori operanti nel Controllo Ufficiale dei Molluschi Bivalvi - Ancona, 6-7 marzo 2012

## IZSAM - Depurazione Molluschi RISULTATI

### *Chamelea gallina*

- ★ 1700 MPN *E. coli* dopo 24 ore <230
- ★ 18.000 MPN *E. coli* dopo 48-60 ore <230
- ★ 430-930 MPN *S.Typhimurium* dopo 72-84 ore <0,3 MPN/g
- ★ 2400-9000 MPN *V. parahaemoliticus* dopo oltre 60 ore il 75% dei campioni risulta <0,3 MPN/g ma il 25% dei campioni rimane positivo

### *Mytilus galloprovincialis*

- ★ 3500 MPN *E. coli* dopo 6-12 ore <230
- ★ 430-930 MPN *S.Typhimurium* dopo 24-36 ore <0,3 MPN/g
- ★ 2400-9000 MPN *V. parahaemoliticus* dopo 36-48 ore <0,3 MPN/g

# Workshop dei Laboratori operanti nel Controllo Ufficiale dei Molluschi Bivalvi - Ancona, 6-7 marzo 2012

- **IZSLER - Risultati del PMM dal 2007 al 2011**

## Osservazioni ricevute e Commenti



# *Escherichia coli* - Mitili



Anno	Mitili - Zona A		Mitili - Zona B	
	<i>E. coli</i> N° esami	<i>E. coli</i> NC (>230)	<i>E. coli</i> N° esami	<i>E. coli</i> NC (>4600)
2007	31	2 (6,5%)	47	3 (6,4%)
2008	39	10 (25,6%)	41	1 (2,4%)
2009	47	6 (12,8%)	33	1 (3,0%)
2010	62	9 (14,5%)	31	1 (3,2%)
2011	49	7 (14,3%)	36	0

# PMM - *Salmonella* spp. 2005 - 2009



# PMM - *Salmonella* spp. 2007 - 2011

MATRICE	n° CAMPIONI	POSITIVI <i>Salmonella</i>	% POSITIVI
Acqua Zona A	379	0	0%
Acqua Zona B	1050	25	2,4%
Chamelea - Zona A	161	2	1,2%
Chamelea - Zona B	80	0	0%
Gasteropodi	31	0	0%
Tapes - Zona B	770	28	3,6%
Ostriche - Zona A	22	0	0%
Ostriche - Zona B	127	0	0%
Mitili - Zona A	204	3	1,5%
Mitili - Zona B	228	2	0,9%
TOTALE ESAMI	3021	60	2,0%

MATRICE	n° CAMPIONI	POSITIVI <i>Salmonella</i>	% POSITIVI
Acqua Zona A	366	2	0,5%
Acqua Zona B	977	30	3,1%
Chamelea - Zona A	146	2	1,4%
Chamelea - Zona B	80	0	0%
Gasteropodi	25	0	0%
Tapes - Zona B	766	33	4,3%
Ostriche - Zona A	19	0	0%
Ostriche - Zona B	104	0	0%
Mitili - Zona A	228	3	1,3%
Mitili - Zona B	188	1	0,5%
TOTALE ESAMI	2819	71	2,5%

# *Vibrio* sp.



- ★ Dal 2007 al 2011 sono state eseguite 230 analisi per ricerca di *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus*
- ★ Da settembre 2011 stanno pervenendo campioni di acque di balneazione
- ★ Nel settembre 2010 è iniziato un PRC che prevede, tra l'altro, la ricerca di vibrioni nei molluschi
- ★ Punto critico di particolare rilievo: determinazione di *Vibrio vulnificus*

# Parassiti e Virus (PRC 2009)



Risultati riferiti al periodo settembre 2010-dicembre 2011

Molluschi	Positivi	Negativi	N. analisi
HAV	57 (5,6%)	959	1016
Enterovirus	14 (1,9%)	726	740
Calicivirus	1 (0,1%)	788	789
Rotavirus	26 (3,4%)	737	763
HEV	11 (1,7%)	615	626
<i>Toxoplasma gondii</i>	6 (2,4%)	240	246
<i>Cryptosporidium parvum</i>	8 (1,6%)	481	489
<i>Giardia</i> spp.	0	489	489

# Parassiti e Virus (PRC 2009)



Risultati / matrice (settembre 2010-dicembre 2011)

Molluschi	Cozze	Ostriche	Vongole	Altri molluschi	Totale
Pos. HAV	17	7	33	0	57
Pos. Enterovirus	2	2	10	0	14
Calicivirus	0	0	1	0	1
Pos. Rotavirus	4	3	19	0	26
Pos. HEV	3	0	8	0	11
Pos. <i>T. gondii</i>	1	1	4	0	6
Pos. <i>C. parvum</i>	0	0	8	0	8
% positività nella matrice	9	14,6	13,6	0	12
Totale analisi effettuate	314 (30,3%)	89 (8,6%)	625 (60,3%)	9 (0,8%)	1037

# Analisi virali nei molluschi eduli lamellibranchi



- Piano monitoraggio molluschi 2010 Regione Lombardia (Dott. Daminelli)
- Autocontrollo
- Campioni PIF
- Vincoli UVAC
- Emergenze sanitarie

<b>Analisi HAV</b>	<b>354</b>	
<b>Positivi HAV</b>	<b>13</b>	<b>3,70%</b>
<b>Infettanti</b>	<b>1</b>	<b>7,70%</b>
<b>Analisi HEV</b>	<b>324</b>	
<b>Positivi HEV</b>	<b>4</b>	<b>1,20%</b>
<b>Infettanti</b>	<b>0</b>	





# Progetto Sibilla - Molluschi Bivalvi Vivi

Ferrara 2 aprile 2012 - 31 marzo 2013

## ➤ Attività dei Laboratori IZSLER: Ferrara - Brescia

### **Mollusco (Depurato e N.D.)**

*E. coli* (MPN)

*E. coli* (TBX)

*Salmonella* spp.

vibrioni patogeni (*V. colera*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*)

virus HAV

Norovirus

Rotavirus

Enterovirus

*Cryptosporidium*

*Toxoplasma gondii*

*Giardia lamblia*

### **Acqua (Inizio e Fine ciclo)**

CBT a 22 e 36°C

*E. coli* (MF)

*Salmonella* spp.

vibrioni patogeni (*V. colera*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*)

virus HAV

Norovirus

Rotavirus

Enterovirus

*Cryptosporidium*

*Toxoplasma gondii*

*Giardia lamblia*

# Progetto Sibilla - Molluschi Bivalvi Vivi

Ferrara 2 aprile 2012 - 31 marzo 2013

- **Il Progetto Sibilla è diviso in due fasi**
  - 1) Controllo su tutti i CDM della provincia prelevando campioni di acqua e molluschi prima e dopo la depurazione**
  - 2) Controlli sistematici su 3 CDM e prove di contaminazione sperimentale per verificare l'efficienza dell'impianto**

# Progetto Sibilla - Molluschi Bivalvi Vivi

Ferrara 2 aprile 2012 - 31 marzo 2013

## ➤ Perché Sibilla ....?

**1) Che cos'ha di interessante questo Progetto?**

**2) Quali risultati ci si aspetta di ottenere?**

# Progetto Sibilla - Molluschi Bivalvi Vivi

Ferrara 2 aprile 2012 - 31 marzo 2013

## 1) Che cos'ha di interessante questo Progetto?

In bibliografia ci sono:

- ★ Pochi lavori fatti su *T. philippinarum*
- ★ Molti lavori su ostriche e mitili
- ★ La frase ricorrente suona circa così "*i molluschi bivalvi sono accumulatori di batteri patogeni e figurano tra gli alimenti che causano più spesso tossinfezioni alimentari*"
- ★ Mancano dati "sostenibili" sui processi di depurazione

# Progetto Sibilla - Molluschi Bivalvi Vivi

Ferrara 2 aprile 2012 - 31 marzo 2013

## 2) Quali risultati ci si aspetta di ottenere?

- ★ **DATI, NUMERI, VALORI**
  
- ★ **PUBBLICAZIONI SCIENTIFICAMENTE CORRETTE**
  
- ★ **.... Tutto ciò che può essere utile**
  - **agli Enti Scientifici preposti alla formulazione di "Pareri" e per eseguire una corretta analisi del rischio**
  - **Agli Operatori del Settore perché possano applicare parametri adeguati di depurazione in tempi ragionevoli**