



Guercino: Personificazione dell'Astrologia (ca. 1650-1655)

possibili utilizzi nell'attività di
controllo ufficiale degli Operatori
del Settore Alimentare

Titolo del progetto

Caratterizzazione della qualità microbiologica nei molluschi bivalvi vivi sottoposti a ciclo depurativo prima della commercializzazione nei CDM della provincia di Ferrara

Referente Tecnico Scientifico: **Dott. Paolo Boni**

Durata del progetto (mesi): **12**

<u>Aziende USL partecipanti</u>	1) <u>Ferrara</u>
--	--------------------------

Azienda USL capofila: Ferrara
IZS Referente: Ferrara

Abstract del progetto

Le aree di allevamento e/o raccolta dei molluschi bivalvi sono suddivise in zona tipo A, tipo B e tipo C sulla base dello stato sanitario, come previsto dai Regolamenti comunitari 853/2004 e 854/2004 e s.m.i. I molluschi provenienti da zone di tipo B, prima della immissione sul mercato, al fine di soddisfare il parametro *Escherichia coli* alla luce di quanto indicato dal Reg. 2073/2005, devono necessariamente subire un processo di depurazione in impianti denominati CDM (Centro Depurazione Molluschi) (CEFAS, 2011). Le capacità di depurazione dei molluschi bivalvi da parte degli impianti di depurazione hanno pochi riscontri bibliografici. Infatti, in bibliografia, si trovano lavori dedicati a specie non presenti o non allevate sul territorio ferrarese, o approntati in impianti sperimentali, che non rispecchiano le reali condizioni operative di campo (Serratore et al., 2000; Meloni et al., 2008; Barile et al., 2009).

In particolare, non sono stati trovati studi pubblicati sulle effettive capacità depurative dei CDM nei confronti delle vongole veraci (*Ruditapes philippinarum*). La vongola verace è, di fatto, la specie di molluschi più allevata nel territorio della provincia di Ferrara.

Obiettivo principale del presente lavoro è stato quello di verificare l'effettiva capacità depurativa dei CDM. A livello nazionale le specie di molluschi bivalvi maggiormente allevate sono i mitili (circa 120.000 t) e le vongole veraci (circa 50.000 t). Tenuto conto che nell'ambito del nostro territorio vi è la produzione di circa 14-15.000 t (dati 2011) di vongola verace (*Ruditapes philippinarum*), pari a circa il 35% della produzione nazionale, e buona parte di questa specie allevata viene depurata nei 12 impianti di depurazione presenti in provincia, si è ritenuto di indirizzare la sperimentazione su questa specie.

In particolar modo la sperimentazione si proponeva di sviluppare una caratterizzazione microbiologica dei molluschi bivalvi vivi destinati al consumo umano, attraverso:

- una definizione quali-quantitativa della composizione della flora microbiologica ammessa sul prodotto edibile;
- una valutazione oggettiva dei tempi minimi di depurazione in funzione della carica iniziale dei vari parametri microbiologici;
- l'esecuzione di prove di challenge.

Articolazione del progetto

Fase 1

Tra aprile e maggio 2012 sono stati esaminati campioni di molluschi provenienti da tutti i 12 CDM della provincia di Ferrara. Si è proceduto al campionamento di acqua in ingresso nell'impianto (dopo il suo passaggio di decontaminazione) e vongole veraci prima e dopo la loro sosta di 24 ore in vasca o nei bins per la fase depurativa. Durante questa fase sono stati rilevati i parametri di: salinità, ossigeno disciolto, temperatura dell'acqua dell'impianto e pH.

In totale sono stati prelevati 96 campioni di acqua (48 prima dell'immissione dei molluschi in vasca e 48 dopo depurazione) e 96 campioni di vongole veraci (48 prima della depurazione e 48 dopo la depurazione). Tutti i campioni prelevati e conservati in un frigorifero di servizio (la cui temperatura di conservazione veniva controllata all'atto della consegna), sono poi stati inviati nella giornata medesima (entro le ore 14,00) al laboratorio analisi dell'IZS di Ferrara.

Fase 2

Nella Fase 2 sono stati selezionati 3 CDM pilota di cui 1 a circuito aperto e 2 a circuito chiuso. I prelievi sono stati effettuati con cadenza mensile per ogni impianto pilota. Ogni intervento è stato effettuato in due giornate consecutive. Prima di iniziare operativamente la fase sperimentale è stato necessario stabilire per ogni singolo impianto come poter procedere alla contaminazione delle vongole veraci e quanto prodotto contaminare.

Si è stabilito di utilizzare una vasca di contaminazione attrezzata all'occorrenza con una pompa ad immersione per migliorare l'ossigenazione e facilitare così l'apertura delle valve da parte delle vongole veraci. Ancora si è dovuto quantificare il volume, in litri di acqua dove immergere i molluschi da contaminare, al fine di poter consentire al laboratorio di predisporre diluizioni di *E. coli* con un titolo compreso nei limiti previsti per i molluschi allevati in zona B (tra 231 e 4600 *E. coli*/100g). I litri di acqua a nostro avviso necessari per procedere alla contaminazione dei molluschi sono stati quantificati in 200 nell'impianto a circuito aperto e 300 in quelli a circuito chiuso;

La contaminazione è stata fatta immettendo nell'acqua della vasca di contaminazione una sospensione a titolo noto di *E. coli*, distribuendola in modo più omogeneo possibile. La quantità di *E. coli* utilizzata per ogni contaminazione è riportata in tabella 2.

Tabella 1 Parametri ricercati e metodi di prova

n°	Parametro	Metodo di Prova utilizzato
1	<i>Escherichia coli</i>	ISO/TS 16649-3:2005 "Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i> -- Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide"
2	<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579:2002/Cor 1:2004 "Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of <i>Salmonella</i> spp."
3	<i>Shigella</i> spp.	ISO 21567:2004 "Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of <i>Shigella</i> spp."
4	Carica batterica mesofila totale a 22 e 36°C (solo nell'acqua)	UNI EN ISO 6222:2001 "Qualità dell'acqua - Valutazione quantitativa dei microrganismi vitali - Conteggio delle colonie per inoculo su terreno agarizzato"
5	Vibrioni patogeni (<i>Vibrio cholera</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>)	ISO/TS 21872-1:2007/Cor 1:2008 "Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic <i>Vibrio</i> spp. -- Part 1: Detection of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>Vibrio cholera</i> "
6	Virus Epatite A (HAV)	Polymerase Chain Reaction (MP interno)
7	Norovirus	Polymerase Chain Reaction – Real Time (MP interno)
8	Rotavirus	Polymerase Chain Reaction – Real Time (MP interno)
9	Enterovirus	Polymerase Chain Reaction (MP interno)
10	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Polymerase Chain Reaction (MP interno)
11	<i>Toxoplasma gondii</i>	Polymerase Chain Reaction (MP interno)
12	<i>Giardia lamblia</i>	Polymerase Chain Reaction – Real Time (MP interno)
13	Coliformi fecali / <i>E. coli</i> (solo acqua)	APAT CNR IRSA 7020 B Man 29 2003 Coliformi fecali – Metodo A. metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Man 29 2003 in "Metodi Analitici per le Acque"

Tabella 2 Ufc/100 ml di *E. coli* utilizzate per la contaminazione

DATA	LITRI	PROPRIETARIO	ufc/100 ml
04/06/2012	1800	CDM 1	15
11/06/2012	300	CDM 3	530
18/06/2012	300	CDM 2	5300
02/07/2012	200	CDM 1	7000
10/07/2012	300	CDM 3	300
23/07/2012	300	CDM 2	4000
30/07/2012	200	CDM 1	1750
06/08/2012	300	CDM 2	1800
27/08/2012	300	CDM 3	4000
03/09/2012	200	CDM 1	10000
10/09/2012	300	CDM 2	15000
24/09/2012	300	CDM 3	800
01/10/2012	200	CDM 1	4500
08/10/2012	300	CDM 2	600
22/10/2012	300	CDM 3	530
05/11/2012	200	CDM 1	330
12/11/2012	300	CDM 2	6300
19/11/2012	300	CDM 3	530
03/12/2012	200	CDM 1	800
10/12/2012	300	CDM 2	500
11/12/2012	300	CDM 3	4600

Tenuto conto delle dinamiche operative dei tre distinti impianti è stato necessario contaminare tra gli 8 e i 12 Kg di vongole veraci. Nella prima giornata, prima di procedere alla contaminazione, è stato fatto un prelievo di acqua e di vongole veraci. Successivamente si è posto il quantitativo di vongole veraci da contaminare dentro alla vasca attrezzata e a quel punto si è versata la soluzione contenente l'*E. coli*. Nella prima prova di sperimentazione si è pensato di lasciare le vongole in vasca per circa 90 minuti, ma si è riscontrato che il tempo di esposizione era insufficiente. Si è pertanto aumentato il tempo di esposizione portandolo a 180 minuti, riscontrando che detto periodo era congruo per permettere alle vongole di contaminarsi in maniera significativa. Una volta trascorse le tre ore, si è proceduto a prelevare un campione di acqua contaminata, un campione di vongole veraci contaminate, al fine di stabilire la concentrazione di *E. coli* nelle vongole da sottoporre a depurazione. Successivamente si è proceduto a confezionare le singole aliquote di vongole veraci contaminate, 3 per l'impianto a circuito aperto e 6 per i due impianti a circuito chiuso, utilizzando le reti plastificate che normalmente vengono impiegate per il confezionamento del prodotto da destinare alla commercializzazione. Nei circuiti a ciclo chiuso sono state allestite due aliquote per avere un maggior numero di dati. Purtroppo, nel circuito aperto non è possibile eseguire questa operazione e ci si è limitati all'utilizzo di una sola aliquota.

Tutte le singole aliquote sono state poi sigillate in maniera comunque da consentire alle vongole di potersi muovere e quindi aprirsi. Le singole confezioni al momento della loro chiusura sono state corredate di un'etichetta con indicato il numero di ore di depurazione cui sarebbero state sottoposte (8, 12, 24).

Per le confezioni destinate ai CDM a circuito chiuso, l'etichetta riportava anche una lettera che indicava dove posizionare la confezione. Nello specifico la lettera A indicava che si trattava dell'aliquota da posizionare in superficie, la lettera B indicava che si trattava dell'aliquota da posizionare a metà bins, se non era riportata nessuna lettera l'aliquota era da posizionare sul fondo.

Una volta predisposte le aliquote si è proceduto ad allestire le ceste (in un caso) o i bins (negli altri due impianti), in modo da porre le aliquote contaminate nelle condizioni di normale operatività dell'impianto. In questa prima giornata verso le ore 08,20 si era in stabilimento, verso le ore 11,20 si era terminata la fase di contaminazione, per cui verso le ore 19,30 si è proceduto al recupero delle aliquote A (superficie) e B (metà bins) contrassegnate con il numero 8 (pari a 8 ore di depurazione), verso le ore 23,30 si è proceduto al recupero delle aliquote A e B contrassegnate con il numero 12 (pari a 12 ore di depurazione).

Nella seconda giornata l'arrivo in impianto avveniva per le ore 10,30 circa, immediatamente si procedeva al campionamento delle aliquote prelevate alle 19,30 e 23,30 del giorno prima, per poi passare al recupero delle aliquote contrassegnate con il numero 24 (pari a 24 ore di depurazione) e ad un campione dell'acqua dell'impianto in cui sostavano le aliquote appena prelevate.

In questa seconda fase sono stati prelevati 63 campioni di acqua e 147 campioni di vongole veraci come di seguito specificato in tabella 3.

Tabella 3 – Elenco CDM e fasi operative del challenge.

ditta	H ₂ O non contaminata	H ₂ O contaminata	Vongola non contaminata	Vongola contaminata	Vongola dopo 8 ore di depurazione	Vongola dopo 12 ore di depurazione	Vongola dopo 24 ore di depurazione
CDM 1	7	14	7	7	7	7	7
CDM 2	7	14	7	7	14	14	14
CDM 3	7	14	7	7	14	14	14
Totale	21	42	21	21	35	35	35

Risultati ottenuti

Fase 1

Tranne il valore di 9,3 (rilevato in un'unica evenienza), il pH rilevato era compreso in un intervallo tra 7,4 e 7,8. L'episodio del pH a 9,3 era legato ad una tardiva azione di rinnovo parziale dell'acqua di mare dell'impianto di depurazione.

Dal punto di vista microbiologico, in questa prima fase, i valori di *E. coli* dell'aliquota non depurata non hanno evidenziato, se non in un caso, livelli elevati, anche perché in questi due mesi le condizioni meteo-climatiche non erano particolarmente avverse. Comunque nella quasi totalità delle aliquote depurate si è assistito ad un riscontro di livelli o valori di *E. coli* rispondenti al limite previsto dal Reg. 2073/2005. Solo in 1 campione di vongole veraci depurate su 48 (2%) si è riscontrato che il prodotto dopo 24 ore di depurazione non era rientrato nel limite in MPN di 230/100g. Un'analisi successiva sulle possibili cause che avevano causato la non conformità, aveva evidenziato che la ditta era in attesa dell'intervento manutentivo dell'impianto con la sostituzione delle lampade UV.

Fase 2

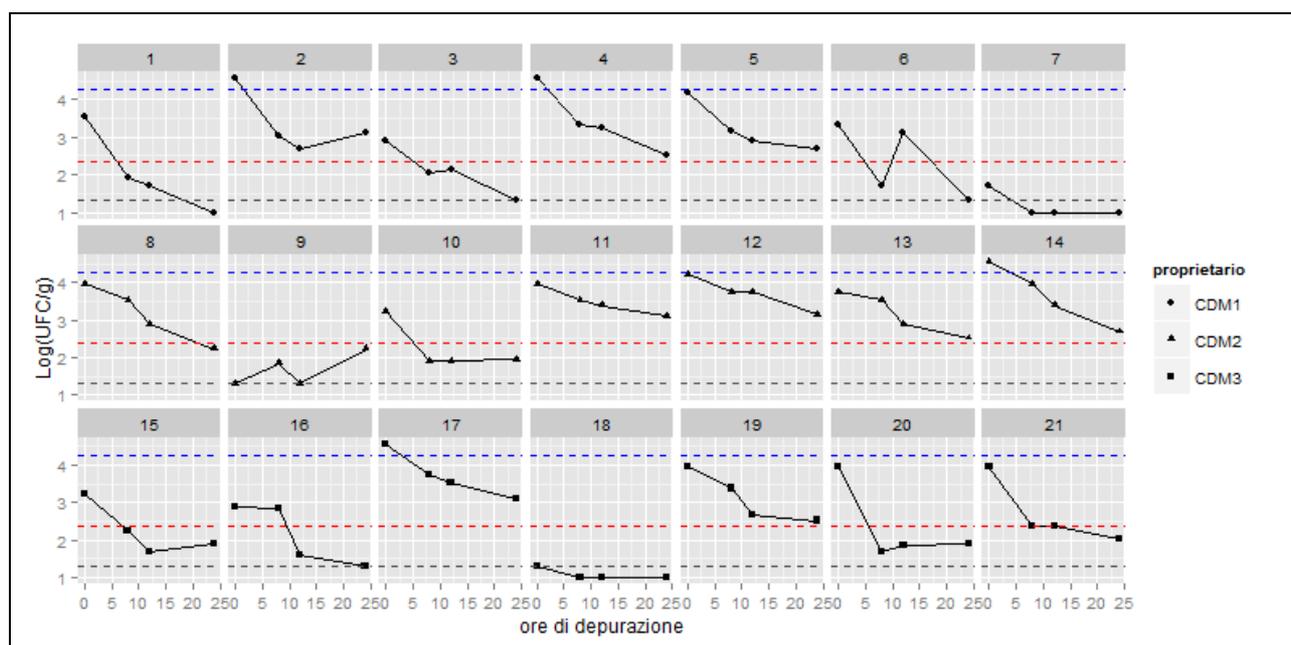
La procedura seguita è stata documentata con immagini fotografiche allegate alla presente relazione. Sono state eseguite 21 prove di depurazione, rilevando la concentrazione di *E.coli* attraverso il MP 01/107 (metodo MPN) al termine della contaminazione del prodotto, e dopo 8, 12 e 24 ore di depurazione.

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.

Il metodo utilizzato restituisce valori non definiti; questi sono stati riclassificati secondo le linee guida CEFAS (EU, 2014). In particolare 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 nel Grafico 1.

Grafico 1 – Profile plot, logaritmo in base 10 della concentrazione di *E. coli*. Le tre linee tratteggiate rappresentano, dall'alto verso il basso: il limite di rilevazione superiore del metodo, pari a 16000 UFC/g (linea blu); il limite legale di concentrazione di *E. coli*, pari a 230 UFC/g (linea rossa centrale); il limite di rilevazione inferiore del metodo, pari a 20 UFC/g (linea grigia).



Considerazioni finali

Dato che le analisi eseguite hanno fornito numerosi dati, tutti degni di commento, i risultati verranno presentati nel seguente ordine:

- I. Fase 1 – Contaminazione da *E. coli* e capacità depurativa dei CDM
- II. Fase 2 – Prove di contaminazione con *E. coli* e capacità depurativa dei CDM
- III. Fasi 1 e 2 – Risultati delle altre analisi eseguite
- IV. Risultati della messa a confronto del metodo MPN e della numerazione in piastra per la numerazione di *E. coli*

Tutte le vongole provenivano da aree di tipo B situate geograficamente a nord e a sud della foce di Po.

- I. 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. Comunque è stato osservato che, ad eccezione di un unico caso, gli impianti di depurazione si sono dimostrati in grado di abbattere, dopo 24 ore, la carica iniziale di *E. coli* tanto da rispettare il limite previsto dal Reg. 2073/2005.
- II. Nella fase 2 i molluschi sono stati contaminati artificialmente con concentrazioni note di *E. coli* allestite in laboratorio. Dai risultati ottenuti si evidenzia la capacità di decontaminazione da parte di entrambe le tipologie di impianto (ciclo aperto e ciclo chiuso) anche con cariche microbiche superiori a quelle previste per le zone di tipo B.
- III. 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. È stata isolata una sola *Salmonella*, appartenente alla sierovariante Veneziana, da un campione di acqua prelevata a fine ciclo depurativo. La ricerca di virus HAV è risultata positiva in 10 campioni su 350 (2.9%, IC95% 1.4% – 5.2%); la ricerca di Rotavirus è risultata positiva in 5 campioni su 350 (1.4%, IC95% 0.5% – 3.3%). Tali positività sono state rilevate 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 sufficiente per eliminare questi patogeni come peraltro già evidenziati in altri studi (Lee et al, 2008). Uno degli HAV rinvenuti in un campione non depurato ha mostrato capacità infettanti su coltura cellulare. Al momento di organizzare il progetto si è ritenuto che valesse la pena inserire anche l'indagine su virus e vibriani all'interno del progetto Sibilla stesso al fine di raccogliere dati utili in tal senso in modo da poter essere propositivi alla luce di quanto stabilito:
 - a) dal Reg. 853/2004 che all'Articolo 11 "Decisioni specifiche" ed in particolar modo al comma 5) in cui si indica la possibilità di stabilire requisiti igienico-sanitari supplementari per i molluschi bivalvi vivi in collaborazione con il laboratorio comunitario di riferimento pertinente, tra cui le procedure per le analisi virologiche e le relative norme virologiche;
 - b) dal Reg. 2073/05 che nel suo considerando n. (11), riferisce che il 19 e 20 settembre 2001 il CSMVSP ha adottato un parere sul *Vibrio vulnificus* e sul *Vibrio parahaemolyticus*, concludendo che dai dati scientifici al momento a disposizione non si rilevava la necessità di fissare criteri specifici per il *Vibrio vulnificus* e il *Vibrio parahaemolyticus* patogeni nel pesce e nei **frutti di mare**, pur raccomandando l'istituzione di codici di condotta per garantire l'applicazione di buone prassi igieniche.

- IV. Ricerca Vibrio
- 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*.
- I risultati sono riportati nelle tabelle 4 e 5.

La fase di depurazione si è dimostrata influente per quanto riguarda la presenza di vibroni, come d'altra parte più volte riportato in letteratura. (Lee *et al.*, 2008)

Tabella 4 Ricerca vibroni Fase 1

Matrice	<i>Vibrio para- haemolyticus</i> ToR+	<i>Vibrio para- haemolyticus</i> TDH+	<i>Vibrio para- haemolyticus</i> TRH+	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>V. cholerae</i> e <i>V. parahaemolyticu s</i>	Negativi	TOTALE
Acqua prima della depurazione					1		44	45
Acqua dopo depurazione	4						41	45
Mollusco prima della depurazione	11	1	2	2	2	1	29	48
Mollusco dopo depurazione	7	1		2	1		37	48

Tabella 5 Ricerca vibrioni Fase 2

Matrice	<i>Vibrio para-haemolyticus</i> ToR+	<i>Vibrio para-haemolyticus</i> TDH+	<i>Vibrio para-haemolyticus</i> TRH+	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>V. cholerae</i> e <i>V. parahaemolyticus</i>	Negativi	TOTALE
Acqua prima della depurazione	10			1		1	13	25
Acqua dopo depurazione	13	1					24	38
Mollusco prima della contaminazione	11	1	1			1	7	21
Mollusco dopo contaminazione	8	2	1				10	21
Molluschi dopo 8 h di depurazione	11	3	2				19	35
Molluschi dopo 12 h di depurazione	13	1	1		2	1	17	35
Molluschi dopo 24 h di depurazione	17	1	1		1	1	14	35

Bibliografia:

Barile N B, Scopa M, Nerone E, Mascilongo G, Recchi S, Cappabianca S, Antonetti L. 2009. Studio sull'efficacia di un sistema di depurazione a ciclo chiuso su molluschi bivalvi. *Veterinaria Italiana* 45 (4): 541-553

CEFAS. 2011 Inspection and Approval of Purification (Depuration) Systems – Guidance Notes for Local Enforcement Authorities. Version 3: 1-31 (D024_V3_2011)

CEFAS - EU Working Group on the Microbiological Monitoring of Bivalve Mollusc Areas. Microbiological Monitoring of Bivalve Mollusc Areas. Guide to Good Practice: Technical Application. Issue 5: June 2014

Intesa ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131 tra Governo, e 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

Lee R., Lovatelli A., Ababouch L., . 2008. Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. *FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER* 511 , giugno: 1-161

Meloni D., Mureddu A., Pisanu M., Serra S., Piras A., Virgilio S., Mazzette R. 2008. Efficacia della depurazione sulla sicurezza di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) allevati nel golfo di Olbia. *A.I.V.I.* , Settembre n.1: 53-56

Regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull' igiene dei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 139 30.04.2004: 1-54

Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 139 30.04.2004: 55-205

Regolamento (CE) N. 854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 139 30.04.2004: 206-320

Regolamento (CE) N. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 338 22.12.2005: 1-26

Serratore P, Squintani G, Giulini G, Paesanti F, Milandri S, Rey A, Selvatico L. 2000. La depurazione di *Chamelea gallina*. Il Pesce, Aprile (2): 13

Dati complessivi relativi al progetto

	NUMERO
Partecipazione/comunicazioni a convegni nazionali ed internazionali	2
Articoli pertinenti pubblicati su riviste nazionali ed internazionali	
Divulgazione mediante iniziative rivolte agli Operatori sanitari, agli Osa in ambito locale/regionale	1

Dichiarazione

Non esistono interessi finanziari in conflitto con lo scopo del presente lavoro.