



**PROGETTO QUALITA' E  
SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI  
ORIGINE ITTICA**

## **PROGETTO QUALITA' E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ITTICA**

# **Virus enterici: presenza in molluschi bivalvi di produzione italiana**

Luciana Croci

Istituto Superiore di Sanità  
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

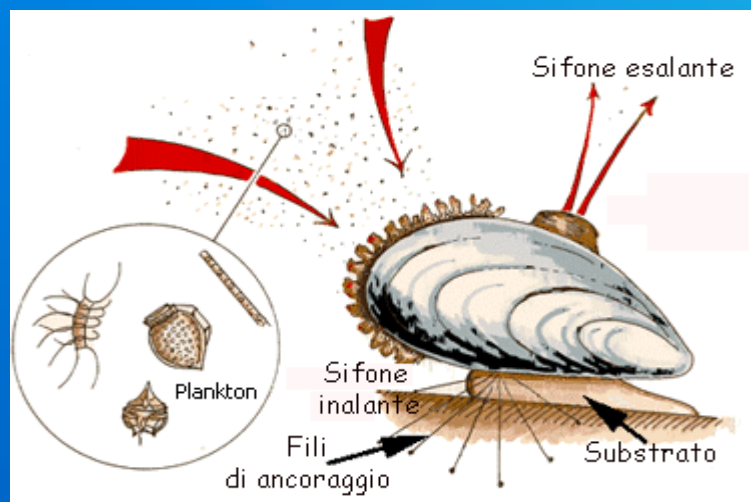
.....

**Roma 19 aprile 2011**



## Molluschi bivalvi: alimenti ad alto rischio

- Distribuiti in tutto il mondo
- Importante apporto nutrizionale per l'uomo
- Animali scavatori sessili o sedimentari, che si nutrono di piccole particelle alimentari presenti nell'acqua o nei sedimenti, mediante un meccanismo di filtrazione trattenendo nel loro organismo non solo il plancton necessario al loro metabolismo ma anche batteri e virus eventualmente presenti nell'ambiente



	°C	Litri/ora
Mitilo	14	1,5
Ostrica Europea	15	12
Ostrica Americana	20	18

36-432 litri/giorno



## Regolamenti 853-854/2004

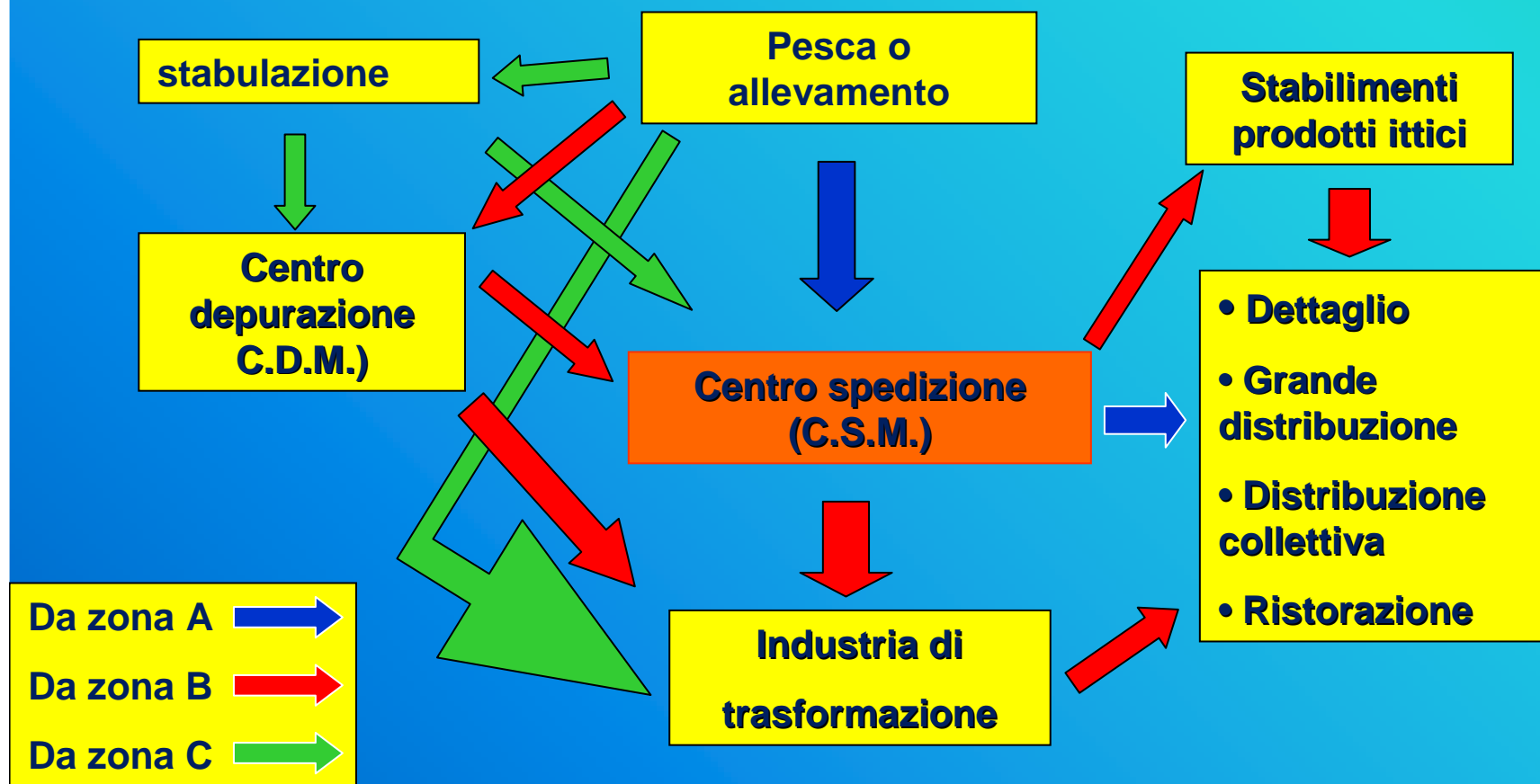
### Classificazione delle aree di produzione/stabulazione dei molluschi bivalvi vivi

- Ø Classificazione A,B e C basata sul numero di *E.coli*:
  - **A** <230 *E.coli*/100g;
  - **B** < 4600 *E.coli*/100g (Tolleranza analitica del 10% )
  - **C** <46000 *E.coli*/100g
- Ø Molluschi provenienti da area B: devono essere sottoposti a **depurazione** presso Centri autorizzati (854 e 853/2004 part C)
- Ø Molluschi provenienti da area C: stabulazione di lunga durata, almeno due mesi (854 e 853/2004 part C)



## La filiera dei molluschi bivalvi

Passaggi commerciali dei molluschi bivalvi dalla produzione al consumo  
(Reg 853/2004 e 854/2004)





## **Molluschi : veicolo di malattie**

**Implicati da sempre nella trasmissione di malattie gastroenteriche di diversa gravità**



**Riduzione gastroenteriti da patogeni classici  
(es.salmonelle)**

**Aumento malattie dovute a batteri autoctoni marini  
(vibrioni) e virus enterici**





# VIRUS - caratteristiche

- Oltre 120 tipi di virus enterici
- Irregolarmente sferici, diametro variabile da 25 nm (Picornavirus) a 75 nm (Rotavirus)
- Singola catena ad RNA, doppia catena ad RNA (Rotavirus), doppia catena DNA (Adenovirus)
- Specificità d'ospite
- Infettività variabile (dose infettante generalmente 10-100 unità virali; eliminati con le feci in grande quantità ( $10^8$ - $10^{10}$  /g))





## **Virus enterici trasmessi da MEL**

- Ø **Virus che causano gastroenteriti: Rotavirus, Adenovirus tipo 40 e 41 e i Calicivirus (NoV e SaV)**
- Ø **Virus dell'epatite entericamente trasmessa: HAV e HEV**
- Ø **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: Enterovirus**



# Classificazione e sintomatologia

	<b>Virus</b>	<b>N° sierotipi</b>	<b>Sintomatologia causata</b>
<b>Enterovirus</b>	Poliovirus	3	Meningite, paralisi, febbre
	Echovirus	32	Meningite, diarrea, rash, febbre, malattie respiratorie
	Coxsackievirus A	23	Meningite, erpangina, febbre malattie respiratorie
	Coxsackievirus B	6	Miocarditi, anomalie cardiache congenite, pleurodinia, malattie respiratorie, febbre, rash, meningite
	Enterovirus 68-71	>4	Meningiti, encefaliti, congiuntivite acuta emorragica, febbre, malattie respiratorie
<b>Epatovirus</b>	Epatite A (ex enterovirus 72)	1	Epatite infettiva
	Rotavirus	6	Diarrea, sintomi respiratori
	Reovirus	3	Non chiaramente stabilito
	Adenovirus	47	Febbre, sintomi respiratori, congiuntiviti, diarrea
<b>Calicivirus</b>	Norovirus ■	2	Diarrea, vomito, febbre
	Sapovirus ■	2	Diarrea, vomito, in età pediatrica
	Epatite E	1	Epatite
	Astrovirus	5	Gastroenteriti
	Coronavirus e altri virus (torovirus, picobirnavirus, parvovirus, ecc)	?	?





## **Virus enterici: resistenza in ambiente marino**

- Resistenza ai trattamenti delle acque (clorazione)
- Lunga resistenza in acqua di mare (fino a 130 gg)
- Fattori che influenzano la loro sopravvivenza:
  - temperatura dell'acqua
  - salinità
  - antagonismo microbico
  - radiazioni solari
  - associazione con plancton e sedimenti



## Regolamento (CE) 2073/2005 e suo aggiornamento 1441/2007: Criteri microbiologici

### Criteri di sicurezza

Alimento	Microrganismo	Piano di campiona mento		Limiti	Metodo di analisi	Fase a cui si applica il criterio
		n	c			
Molluschi bivalvi vivi, echinodermi tunicati e gasteropodi vivi	Salmonella	5	0	Assente in 25g	EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
	<u>E.coli</u>	1	0	230MPN/ 100g	ISO TS 16649-3	



## Regolamento (CE) 2073/2005 consideranda

### Punto 12 - :

- ...gli indicatori fecali non sono affidabili per dimostrare la presenza o assenza di NLV
- ....non è una pratica sicura basarsi sulla rimozione degli indicatori batterici per determinare i tempi di depurazione dei frutti di mare

### Punto 23:

In particolare, è opportuno che i criteri per i virus patogeni nei molluschi bivalvi vivi siano fissati quando i metodi d'analisi sono stati sufficientemente messi a punto. ...

**Punto 27** –Si ribadisce la necessità dello sviluppo di metodi di analisi per virus enterici e per altri rischi microbiologici (V.parahaemolyticus)

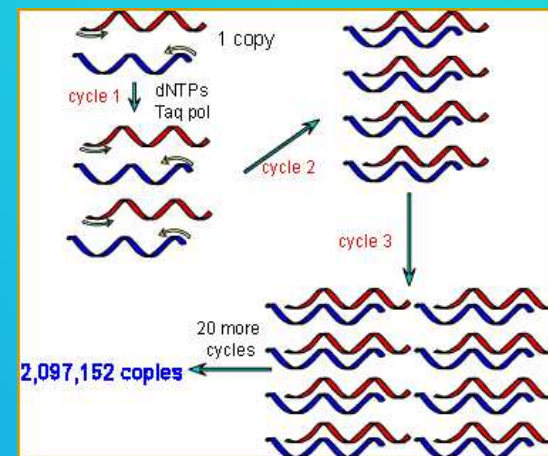


## Metodi per la determinazione di virus enterici

Ultimi 10-15 anni: sviluppo di metodi molecolari per la determinazione di virus enterici (HAV e NoV) poco o affatto coltivabili su colture cellulari



Diversità di metodologie: sia per modalità di estrazione e purificazione dell'RNA, che per condizioni di amplificazione e primers usati.



necessità di metodi standardizzati ed internazionalmente riconosciuti

**Gruppo CEN/TC275/WG6/TAG4**

“Detection viruses on food” (2004). Coordinatore dr. David Lee (CEFAS-Weymouth)





## Real Time PCR per la determinazione di HAV e NoV nei molluschi

- **Metodo qualitativo Real Time PCR** (basato su protocollo CEN/TAG4) –accreditato secondo ISO 17025/2005
- Hepatopancreas (2g) was treated with proteinase K (0.1 mg/ml) (at 37°□1.0 for 60 min and at 60.0°□2.0 for 15 min)
- Centrifugation 3000g for 5 min
- Nucleic acid (500µl of sample) was extracted with NucliSense MiniMag extraction kit (BioMerieux)
- One-step Real Time RT PCR
- Retrotranscription and one step PCR were performed on ABI Prism 7700 (Applied Biosystems)
- Mengo virus TCID<sub>50</sub> 3.2 x 10<sup>5</sup>/ml (process control)
- RNA-EC (inhibition control)
- Two negative controls for each run

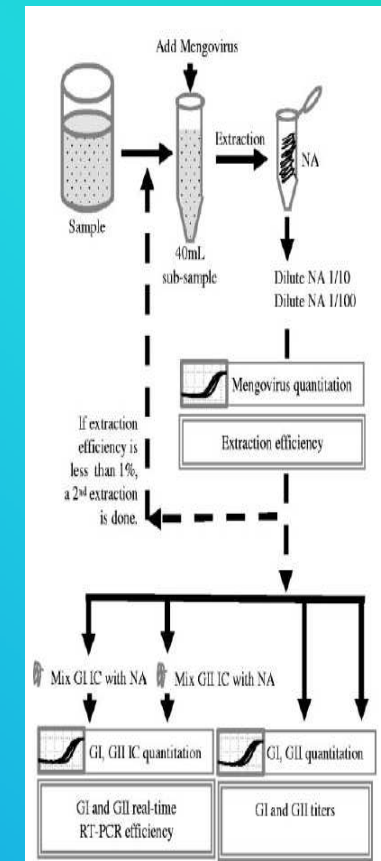


# Metodo di riferimento (CEN/TC275/WG6/TAG4)

## Retrotrascrizione e PCR

### Controlli:

1. **Controllo di processo (efficienza della procedura di concentrazione del virus ed estrazione dei NA)**
  - a) amplificazione del virus tal quale
  - b) amplificazione del virus estratto dal campione
2. **Controllo interno (efficienza della reazione di PCR)**
  - a) amplificazione di RNA di sintesi
  - b) amplificazione dell'RNA di sintesi insieme al campione
3. **Curva standard**  
(diluizioni RNA di sintesi con n° di copie quantificate)







## Prevalenza di HAV and NoV in molluschi bivalvi allevati e/o commercializzati in Italia

Disponibilità di metodi analitici/ progetti di ricerca



Monitoraggi per la presenza di virus enterici (HAV e NoV) nei molluschi  
bivalvi allevati o commercializzati in diverse aree italiane





## Prevalenza di HAV in molluschi bivalvi allevati e/o commercializzati in Italia

HEPATITIS A IN SHELLFISH SAMPLES (1999-2008)

Shellfish samples <u>analysed</u>				
Year	Total number of samples	Positive	%	infectious *
1999	170	24	14.1	<u>n.a.</u>
2000	365	32	8.8	<u>n.a.</u>
2001	565	53	9.4	18
2002	137	8	5.8	<u>n.a.</u>
2003	199	10	5.0	0
2004	411	25	6.1	11
2005	346	3	0.9	1
2006	208	0	0.0	
2007	182	10	5.5	0
2008	204	6	2.9	1
<b>total</b>	<b>2787</b>	<b>171</b>	<b>6.1</b>	<b>31</b>

\* Virus infectivity was tested on cell culture



## Prevalenza di NoV in molluschi bivalvi allevati e/o commercializzati in Italia

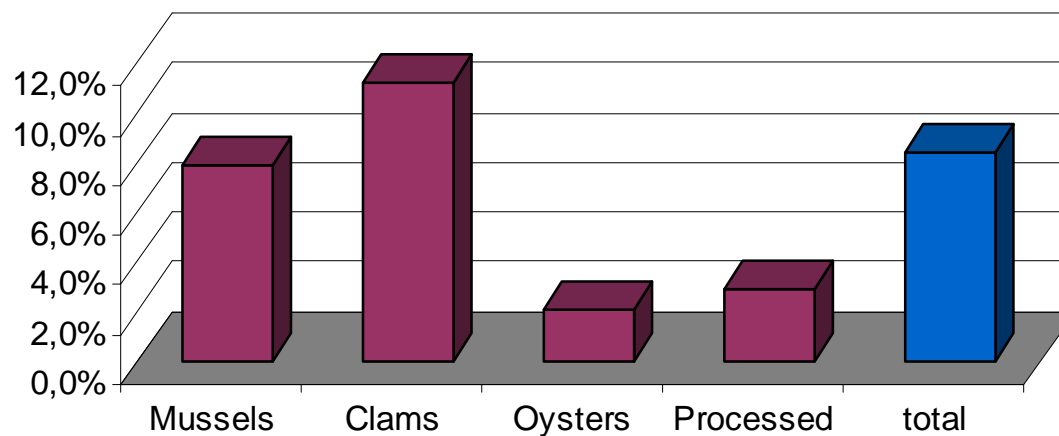
NoV in shellfish samples from different Italian regions

<u>Origin (year)</u>	<u>Number of samples</u>	<u>Positive samples</u>	<u>Negative samples</u>	<u>characterised samples</u>	<u>Only GI +</u>	<u>Only GII +</u>	<u>GI + e GII +</u>
Veneto e Emilia Romagna (2003 - 2006)	355	46	309	46	2	42	2
UVAC(2007 - 2010)	31	9	22	9	0	7	2
Veneto (2008 - 2009)	70	36	34	36	2	10	24
Marche (2008 - 2009)	32	0	32	0	0	0	0
Lazio (2008 - 2009)	62	23	39	23	0	14	9
Campania (2008 - 2010)	163	94	69	94	1	46	47
Sardegna (2008 - 2010)	1080	107	973	107	0	41	66
<b>Total</b>	1793	315	1478	315	5	160	150
<b>% respect to total samples</b>		<b>17.6%</b>	<b>82.4%</b>	<b>17.6%</b>	<b>0.3%</b>	<b>8.9%</b>	<b>8.4%</b>
<b>% respect to positive samples</b>				<b>100.0%</b>	<b>1.6%</b>	<b>50.8%</b>	<b>47.6%</b>
<b>% respect to characterised samples</b>					<b>1.6%</b>	<b>50.8%</b>	<b>47.6%</b>



## HAV /NoV in diverse specie di molluschi (2001-2008)

Matrice	n.campioni	positivi (HAV and/or NoV)	%
Mitli	1358	108	8.0
Vongole	685	77	11.2
Ostriche	141	3	2.1
Trasformati	68	2	2.9
total	2252	190	8.4





## Prevenzione: valutazione e controllo della contaminazione virale nelle aree di produzione

**Non esiste un modello ideale** che possa essere utilizzato indifferentemente nelle diverse zone di produzione



Approcci specifici devono essere ogni volta proposti e verificati tenendo conto di:

- Fonti di contaminazione
- importanza di alcune variabili a livello locale, parametri, quali pH, T°, salinità, O<sub>2</sub> disciolto e torbidità, non hanno influenza per la predizione della presenza virale ma possono essere significativi a livello locale
- Condizioni metereologiche
- Correnti
- Portata dei fiumi, e/o cambiamenti nella portata dei fiumi presentano una indiscussa influenza sulle vicine zone di allevamento dei molluschi



## **Monitoraggio condotto in due aree di produzione del delta del PO (collaborazione dr G. Arcangeli)**

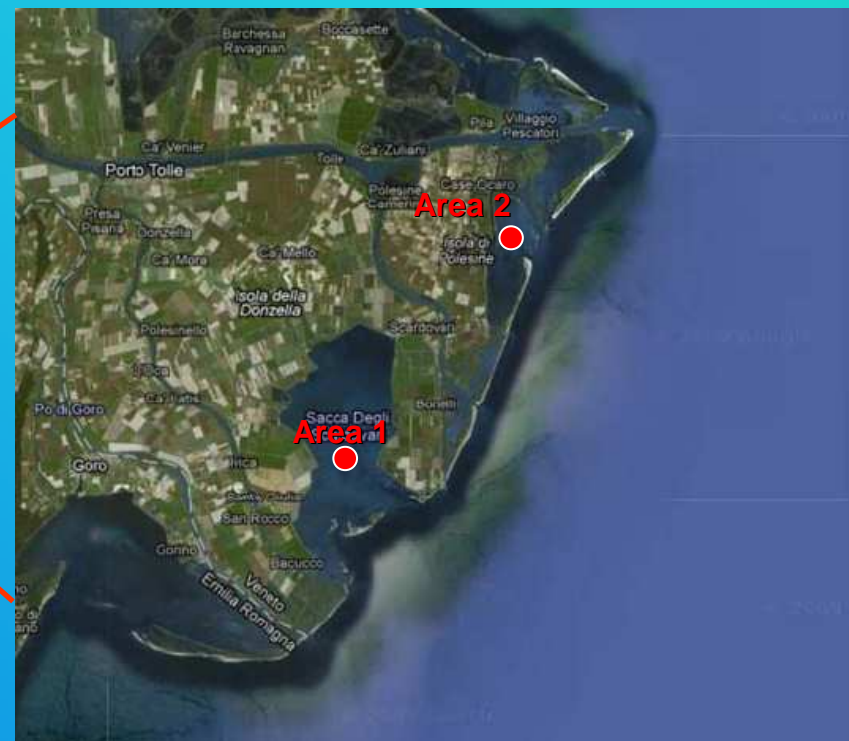
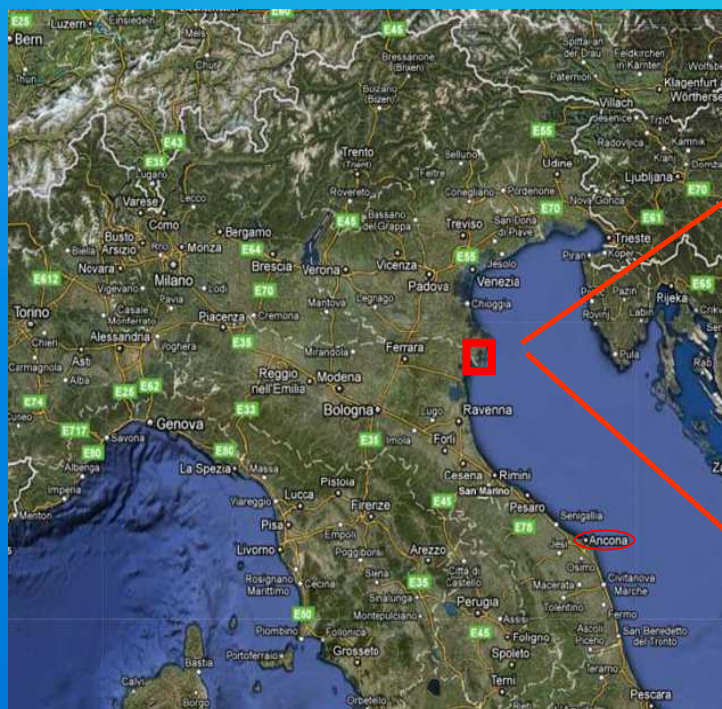
### **Valutazione:**

- **contaminazione da NoV nelle diverse stagioni dell'anno , influenza del Po e di altri parametri ambientali (T , salinità e livelli idrometrici del fiume)**
- **Tre specie di molluschi (mitili, vongole e ostriche) provenienti da due zone di allevamento di classe B, campionati mensilmente**





## Aree di produzione



- **Area 1:** basso impatto del Po (salinità più alta; minore variabilità)
- **Area 2:** più alto impatto del Po (salinità media più bassa; maggiore variabilità)



## Analisi dei campioni di molluschi

- 70 campioni analizzati (23 mitili, 24 vongole and 23 ostriche); n 35 per ciascuna area
- McNemar Test è stato usato per analizzare i risultati ottenuti dalle due aree e dai diversi tipi di molluschi

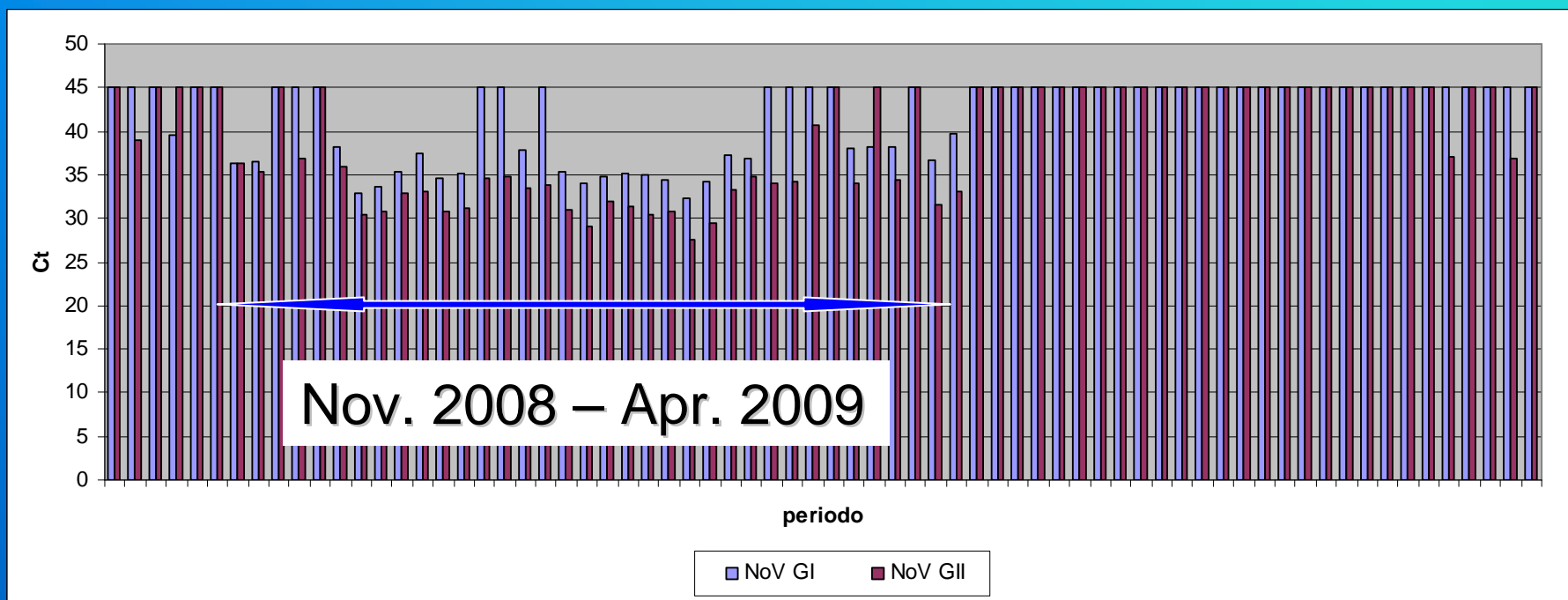
Campioni	n	%
<b>total</b>	<b>70</b>	
<b>positivi(tot)</b>	<b>36</b>	<b>51.4</b>
<b>GI pos (tot)</b>	<b>26</b>	<b>37.1</b>
<b>GII pos (tot)</b>	<b>34</b>	<b>48.5</b>
solo GI pos	2	2.9
solo GII pos	10	14.3
GI & GII pos	24	34.3



# Distribuzione di campioni positivi in un anno

**34 su 36 campioni positivi (94.4%) nel periodo Ottobre-Aprile**

Ott: 2/6   Nov: 4/6   Dic: 6/6   Gen: 6/6   Feb: 6/6   Mar: 5/6   Apr: 5/6   Sett:  
2/6





## Risultati nelle due aree di produzione

	Area 1		Area 2	
Samples	n	%	n	%
total	35		35	
positive (tot)	17	48.6	19	54.3
GI pos (tot)	13	37.1	13	37.1
GII pos (tot)	17	48.6	17	48.6
GI pos only	0	0	2	5.7
GII pos only	4	11.4	6	17.1
GI & GII pos	13	37.1	11	31.4

Differenze non statisticamente significative





## Risultati sulle tre specie di molluschi

	<b>Mitili</b>		<b>Vongole</b>		<b>Ostriche</b>	
<b>Campioni</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
totale	23		24		23	
positivi (tot)	14	60.9	11	45.8	11	47.8
GI pos (tot)	10	43.5	9	37.5	7	30.4
GII pos (tot)	13	56.5	11	45.8	10	43.5
Solo GI pos	1	4.3	0	0	1	4.3
Solo GII pos	4	17.4	2	8.3	4	17.4
GI & GII pos	9	39.1	9	37.5	6	26.1

Differenze non statisticamente significative



## **Positività in base ai campionamenti**

**In 12 campionamenti (mitili+vongole+ostriche):**

<b>Area 1:</b>	tutte le specie positive	→	5 campionamenti (41.7%)
	1 specie positiva	→	2 campionamenti
<b>Area 2:</b>	tutte le specie positive	→	4 campionamenti (33.3%)
	2 specie positive	→	1 campionamenti
	1 specie positive	→	3 campionamenti

**Mollusco indicatore di contaminazione fecale**





## Risultati Real Time PCR: Ct e recupero

		NoV GI average	SD	NoV GII average	SD
Area 1	mussels	35,85	5,33	33,46	2,08
	oysters	36,60	1,68	33,04	1,63
	clams	34,81	1,82	33,11	4,76
	spp	35,76	1,87	33,21	3,02
Area 2	mussels	36,09	1,74	34,73	2,91
	oysters	37,09	2,57	33,76	2,19
	clams	36,27	2,60	31,76	2,66
	spp	36,39	2,13	33,57	2,84

RECOVERY	min	max	med	ds
mussels	0,15%	1,15%	0,73%	0,30%
oysters	0,19%	1,27%	0,58%	0,36%
clams	0,02%	0,36%	0,21%	0,10%



# Conclusioni

- Conferma della stagionalità dei NoV: maggiore circolazione nel periodo da Ottobre-Aprile (94.4% di campioni positivi)
- Coesistenza dei due genogruppi (GI e GII) nella maggior parte dei campioni
- Predominanza del GII (48.5%), ma alta frequenza del GI (37.1%) non corrispondente allo scarso coinvolgimento di quest'ultimo nelle infezioni umane
- No differenze significative tra le due aree e tra le specie



organismi indicatori di contaminazione virale

mitili



## **RICADUTE**

- **Piani di monitoraggio flessibili (in base alle stagioni e agli eventi atmosferici)**
- **Uso di una specie ,come organismo indicatore,in aree in cui vengono allevate anche altre specie**



### **Ottimizzazione della gestione delle aree:**

- **Efficace azione di prevenzione e controllo della presenza di virus e loro diffusione**
- **Riduzione di costi e tempo**



**PROGETTO QUALITA' E  
SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI  
ORIGINE ITTICA**

**Grazie  
per l'attenzione**