



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO in

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E
SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale (XXVI CICLO)

(Coordinatore: Prof. Enrico De Santis)

**INDAGINE SULLA PRESENZA DI NOROVIRUS IN
MOLLUSCHI BIVALVI VIVI ALLEVATI E
COMMERCIALIZZATI NELLA REGIONE SARDEGNA**

Docente Guida
Prof. Enrico De Santis

Tutor
Dott.ssa Margherita Pisanu

Direttore
Prof. Sergio Ledda

Tesi di dottorato del
Dr. Riccardo Bazzardi

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

The research presented and described in this PhD thesis was conducted at the Department of Food Hygiene, Laboratory of Microbiology and Culture Media of the Experimental Zooprophyllactic Institute of Sardinia, Italy. The grant and development of the project is indented under the Regional Plan viruses in Bivalve Molluscan Shellfish (BMS) approved by the Department Health and Hygiene - Directorate-General of Health Services - Prevention of the Sardinia region (protocol 0001389/Resolution/23 26/01/2010) included in the Integrated National Plan of food control from 2011 to 2014 and approved by the Ministry of Health.

The Author grants to University of Sassari the non-exclusive right to publish the Work electronically and in a non-commercial purpose make it accessible on the Internet.

The Author warrants that he is the author to the Work, and warrants that the Work does not contain text, pictures or other material that violates copyright law.

© Riccardo Bazzardi, November 2013

Printed by Copia-Copia s.r.l. Italy - <http://www.copiacopia.it/azienda.htm>

The printing of this thesis was supported by Experimental Zooprophyllactic Institute of Sardinia, Italy (<http://www.izs-sardegna.it/>) and the writing was created by Microsoft® Office2007 Professional Edition - Redmond (USA) DTP and Scribus - Open Source Desktop Publishing®.

...a me stesso...

PREFAZIONE

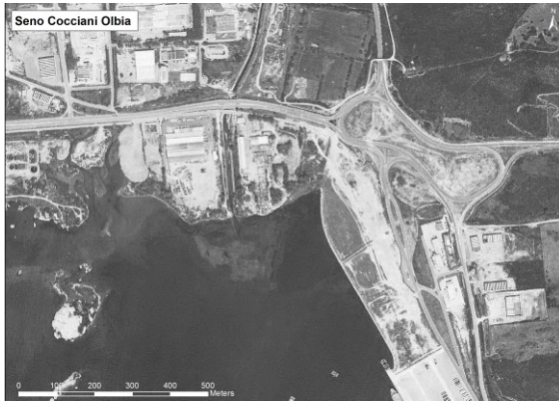
La mitilicoltura in Italia comprende più di 200 impianti con una produzione totale stimata di circa 60.000 tonnellate di prodotto (dati MIPAFF, 2009). Questo settore offre un grande potenziale in molti Paesi, compreso l'Italia. Per realizzare questo potenziale, sono stati avviati programmi di sviluppo ottenendo buoni risultati in termini di specie coltivate, produzione ed esportazione. Tuttavia, l'industria si trova ad affrontare una serie di problemi e vincoli che variano in grandezza e in gravità sulla base della zona geografica del paese produttore. Le difficoltà che emergono in questo settore possono essere classificate in tre principali gruppi: ambientali, sociali e biologiche. A tal proposito uno degli obiettivi di questo studio è stato quello di iniziare a comprendere tutti quei fenomeni causati direttamente o indirettamente dall'uomo che possono provocare danni all'ambiente naturale dei molluschi. In generale, il fattore che più si evidenzia è l'inquinamento dovuto a sostanze inorganiche, organiche e microbiologiche. In genere i luoghi più idonei per le attività di allevamento e di produzione dei molluschi sono le zone intertidali, gli estuari e le zone poco profonde lungo la costa. Proprio in questa specifica linea geografica si estendono i maggiori impianti di molluscoltura della Regione Sardegna. Di fatto questa attività rappresenta la principale voce produttiva per quanto riguarda l'acquacoltura regionale, ed è basata principalmente sull'allevamento di *Tapes philippinarum*, *Tapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum* e la produzione di mitili, *Mytilus galloprovincialis* ed ostriche, *Crassostrea gigas* ed *Ostrea edulis*. Il commercio di questi prodotti negli ultimi dieci anni ha registrato un sostanziale incremento sia sul territorio locale che in quello nazionale. La richiesta maggiore interessa prevalentemente i mitili, probabilmente a

causa delle tradizionali modalità di consumo o probabilmente solo perché percepiti dal consumatore come alimenti in sé “sani” e dietetici per via del loro valore nutrizionale.

Attualmente le aree adibite alla mitilicoltura tendono ad essere protette dalle dinamiche del mare. I fondali sono spesso sabbiosi o fangosi e con batimetriche che vanno dai 4 ai 12 metri; Aree entro le quali si riscontra un ideale trofismo delle acque (fitoplancton e zooplancton) e i giusti fattori abiotici (parametri chimico-fisici) e biotici (naturali). Questi parametri tendono a mantenere in equilibrio idro-biodinamico l’ambiente di produzione (Figura 1. Immagini relative ai principali siti marino-costieri: A; B; C; D, adibiti alla molluschicoltura nella Regione Sardegna).

Figura 1. Principali siti marino-costieri adibiti alla molluschicoltura nella Regione Sardegna.

A: Golfo di Olbia – *Località Seno Cocciani*



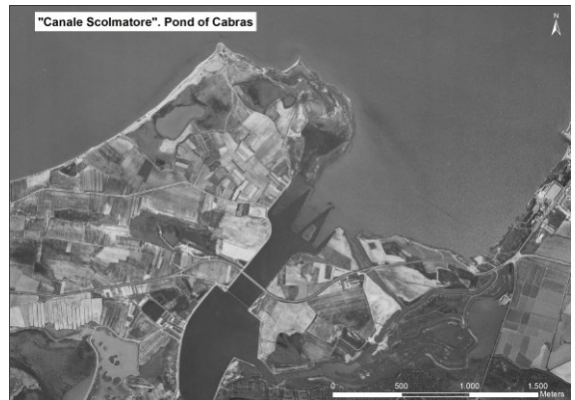
B: Golfo di Olbia – *Località Cala Saccaia*



C: *Stagno di Tortolì*



D: *Stagno di Cabras (Oristano)*



Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

ABBREVIAZIONI

µg	microgrammo
µl	microlitro
BMS	Bivalve Molluscan Shellfish
CDC	Centre for Disease Control
CDM	Centro Depurazione Molluschi
cDNA	DNA complementare
CE	Comunità Europea
Cefas	Centre for the Environment, Fisheries and Aquaculture Science
CEN	European Committee on Normalisation
Ct	Ciclo soglia (Cycle threshold)
DNA	Acido desossiribonucleico
dNTP	Deossi-nucleotide-tri-fosfato.
dsDNA	DNA a doppio filamento
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBM	Edible Bivalve Molluscs
FBVE	Foodborne Viruses in Europe
FCV	Feline Calicivirus
GI	Genogruppo I
GII	Genogruppo II
HAV	Virus dell'epatite A
HBGA	histo-blood group antigen
LNR	Laboratorio Nazionale di Riferimento
MBV	Molluschi Bivalvi Vivi
MEL	Molluschi Eduli Lamellibranchi
MPN	Most Probable Number
NoVGI	Norovirus genogruppo I
NoVGII	Norovirus genogruppo II
NoVs	Norovirus
ORF	open reading frame
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Reazione a catena della polimerasi
r.p.m	revolutions per minute
RdRp	RNA-dependant RNA-polymerase
Real time PCR	Reazione a catena della polimerasi in tempo reale
ssDNA	single stranded DNA
ssRNA	single stranded RNA
VPg	genome-linked virus protein

SUMMARY

Noroviruses (NoVs) belong to the *Caliciviridae* family and are the main etiological agents responsible for acute non-bacterial gastroenteritis in humans worldwide. They are extremely infectious with an estimated 50% 20-viral-particle infectious dose (ID₅₀). Genetically, they can be divided into five different genogroups: genogroup I (NoV GI) and genogroup II (GII NoV) are responsible for the majority of human clinical cases and are environmentally stable and resistant to different sanitation processes; they are transmitted mainly by fecal-oral route, often causing health risks associated with the contamination of food, especially bivalve molluscs, in particular when they are consumed raw or undercooked, thereby generating a serious threat to public health. In Italy, several studies have been conducted to assess the extent of this problem and, in certain regions such as Sardinia, no in-depth study has ever carried out. The principles of depuration of mussels are effective against some species of faecal contaminants but are not able to eliminate certain species of pathogenic bacteria such as *Vibrio parahaemolyticus*, *V.cholerae* and enteric viruses, such as hepatitis A virus and Norovirus. For this reason, it is very important to perform environmental investigations based on research of human pathogens in bivalve molluscs going to analyze and investigate the different production, growing and harvesting areas. It becomes, therefore, important to investigate and monitor the levels of microbial contamination even in the retail shellfish, since molluscs are a risk for the final consumer since they are easily available on the market and a potential risk of bacterial and viral

contamination. Several researchers have shown that these viruses are able to bind to specific carbohydrate ligands in mollusc tissues, similar to those found in the human digestive tube. It is therefore important to analyze the different strains of Norovirus in different animal species and in different environmental conditions. Indeed, different strains of NoVs bind with different intensity to the tissues of the oysters and environmental conditions, such as temperature, seem to be very important for the expression of the linkage of NoVs to oyster tissue to specific ligand. Therefore, the dynamics of virus bioaccumulation in other species of bivalve molluscs should also be studied. Viral contamination of shellfish usually occurs when wastewater is discharged into coastal waters where these animals are farmed.

The Regulations (EC) No. 852/2004, No. 853/2004, No. 854/2004 and No. 2073/2005 governs the sanitary side of the production and the marketing of live bivalve molluscs, providing for a whole series of microbiological, chemical, physical and biotoxin algals checks. The list of inspections that the competent authority must carry out, does not include the search for viruses, since the law does not regulate either limits of the sets of evaluation methods which public laboratories are to implement in their research.

Nevertheless, the MBV that are put on the market should be totally safe from the health and hygiene point of view, and therefore from the virological point of view; despite Regulation (EC) No. 178/2002 provides that the primary responsibility for food safety is borne by the producer who must exercise it, in order to achieve the objectives set by the legislation, to protect the health of the consumers, the competent authority is responsible for the carrying out of the necessary controls because the product on the

market must comply with food safety criteria, verifying the suitability of the production process and the procedures implemented by producers (*Hazard Analysis and Critical Control Points*).

In this research becomes important therefore the monitoring of marine farming environments that could lead to a better understanding of the presence of Norovirus, for example, water temperature control of production, UV rays, pH, salinity, rainfall, and all environmental parameters which, up to now, have not been taken into account directly or underestimated in Sardinia region.

In recent years, an increase in the number of outbreaks of viral gastroenteritis in the so-called developed countries of Northern Europe and North America, including the United States, has been registered. Most emerging epidemics are related to bivalve molluscs imported from endemic areas contaminated due to poor sanitation and poor manufacturing practices; therefore a study of the products imported from these countries should be conducted to improve the control and management of production.

For this reason, the Ministry of Health issued a recommendation for to research Noroviruses in food (DGSAN / VIII - 3734 of 20/04/2007). This note points out the lack of importance of the diagnosis of this pathogen which is not systematically check during infectious episodes. There is limited number of laboratories able to assess viral target and there are a great lack of data at the regional and national levels.

Currently it is not yet expected an official control of enteric viruses (including Norovirus and hepatitis A virus) in bivalve molluscs, although the Article 11, comma 5,

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

lett. B of the Regulation (CE) No. 853/2004 allow the possibility to lay down additional health standards for live bivalve molluscs in cooperation with the enduring Community Reference Laboratory (Cefas: Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Weymouth, UK), including virus testing procedures and virological standards.

Precisely for this reason, recently (May 2013) the group of experts CEN 275 WG 6 TG4 which also belong Italian researchers from the Istituto Superiore di Sanità, Rome – Italy has developed, drawing and edited the final line of the reference method for the determination of enteric viruses in food: Technical Specification ISO/TS 15216-1 and ISO/TS 15216-2, “Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for determination of hepatitis A virus and Norovirus in food using real-time RT-PCR – Part 1 (method for quantification) and Part 2 (method for qualitative detection). In order to standardize the method in national and international Country.

Now the present research had adopted and developed both procedures. The first part of the research has been conducted trying to develop and apply the qualitative method , or the presence / absence of the pathogen. The second part involved the development of the quantitative method.

Research is therefore based on molecular methods implementing polymerase chain reactions (PCR). Since many food matrices contain substances which inhibit RT-PCR, it is necessary to use an extraction method that produces purified RNA suitable for research. The real time RT-PCR verifies amplification during the PCR by measuring the excitation of molecules labelled with fluorophores and has been recognized as an elective technique.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

This work aims mainly to evaluate the importance of the transmission of Norovirus from the bivalve molluscs farmed and marketed on a regional territory also evaluating the factors which influence its survival in this environment and its quantification.

Please note that the detection of viruses, not being provided by law, can not be regarded as official control activities, but as a monitoring plan at an essentially cognitive and pre-emptive level. However, in case of positive results, all necessary measures are to be put in place to ensure the safety of the consumer.

INDICE

PREFAZIONE	I
ABBREVIAZIONI	IV
SUMMARY	V
INDICE	1
CAPITOLO 1 – Scopo della Tesi	4
CAPITOLO 2	8
2.1. I Norovirus	8
2.2. Classificazione dei Norovirus	12
2.3. Modalità di trasmissione	13
2.4. Infezione virale	15
2.5. Strategie di replicazione	16
2.6. Epidemiologia	17
2.7. Bibliografia	20
CAPITOLO 3	27
3.1. Le infezioni da Norovirus negli alimenti	27
3.2. Metodi analitici per l'identificazione dei Norovirus: Real time RT-PCR	29
3.2. Bibliografia	35
CAPITOLO 4	36
4.1. I Molluschi Bivalvi	36
4.2. La mitilicoltura in Italia e in Sardegna	44
4.3. Produzione ed allevamento dei molluschi bivalvi, aspetti normativi	49
4.4. Bibliografia	53
CAPITOLO 5	55
Monitoring on the presence of Norovirus, hepatitis A virus and bacterial contamination in edible lamellibranches molluscs in Sardinia region	
5.1. Summary	56
5.2. Introduction	56
5.3. Materials and Methods	58
5.4. Results and Discussion	60
5.5. Figures	62
5.6. Tables	62
5.7. References	64
CAPITOLO 6	66
Presence of Norovirus in imported shellfish in Sardinia Region	
6.1. Abstract	67
6.2. Introduction	68
6.3. Materials and Methods	69
6.4. Results	70
6.5. Discussion	70
6.6. Figures	72
6.7. References	76
CAPITOLO 7	77
Study on the Norovirus presence in <i>Mytilus galloprovincialis</i> subjected to depuration in two C.D.Ms. in the Sardinia region	
7.1. Summary	78

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

7.2. Introduction	78
7.3. Materials and Methods	80
7.4. Results	82
7.5. Conclusion	84
7.6. Tables	85
7.7. Bibliography	88
CAPITOLO 8	91
Preliminary study on Norovirus, hepatitis A virus, <i>Escherichia coli</i> and their potential seasonality in shellfish from different growing and harvesting areas in Sardinia region	
8.1. Abstract	92
8.2. Introduction	93
8.3. Materials and Methods	95
8.4. Results	99
8.5. Discussion and Conclusions	101
8.6. Figures	105
8.7. Tables	105
8.8. References	110
CAPITOLO 9	115
Assessment of Norovirus in <i>Mytilus galloprovincialis</i> harvested in Sardinia region: quantitative data	
9.1. Abstract	116
9.2. Introduction	117
9.3. Materials and Methods	118
9.4. Results	120
9.5. Discussion	120
9.6. Tables	122
9.7. References	127
CAPITOLO 10 – Conclusioni generali	130
ALLEGATO 1	133
Appendice – a	133
Appendice – b: Le Biotossine Marine	135
b.1. Introduzione	135
b.2. Tossine P.S.P. (Paralytic Shellfish Poison)	138
b.3. Specie algali tossiche e loro distribuzione	139
b.4. Struttura chimica delle tossine P.S.P.	141
b.5. Meccanismo d'azione e sintomatologia clinica	142
b.6. Epidemiologia	145
b.7. Limiti di legge per le tossine del tipo P.S.P.	147
b.8. Bibliografia	147
Appendice – c: Manoscritto	155
Riscontri di positività da biotossine algali del tipo P.S.P. (<i>Paralytic Shellfish Poison</i>) in mitili allevati nelle zone di Olbia e di Oristano (Sardegna) e fioriture di <i>Alexandrium minutum</i> ed <i>Alexandrium catenella</i> negli anni 2002 – 2012	
c.1. Summary	156
c.2. Introduzione	156
c.3. Materiali e Metodi	157

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

c.4. Risultati e Discussione	158
c.5. Figure	160
c.6. Tabelle	160
c.7. Bibliografia	164

CAPITOLO 1

SCOPO DELLA TESI

I Molluschi Bivalvi Vivi (MBV), essendo organismi filtratori, ricoprono un importante ruolo nella trasmissione di diverse patologie umane poiché sono in grado di trattenere e concentrare nel loro organismo oltre al plancton necessario al loro metabolismo, anche batteri, parassiti, microalghe tossiche, virus e contaminanti chimici presenti nell'ambiente in cui essi vivono. In Italia il loro consumo è basato principalmente sulle abitudini tradizionali locali e regionali dove spesso vengono consumati crudi o parzialmente cotti. Per tale ragione essi rappresentano veicolo di contaminazione e quindi un potenziale pericolo per la salute pubblica.

La Regione Sardegna risulta essere una tra le principali località nazionali dove si allevano specie ittiche nel comparto dell'acquacoltura, la cui produzione è basata in prevalenza su mitili (*Mytilus galloprovincialis*), ostriche (*Crassostrea gigas* e *Ostrea edulis*) e vongole (*Tapes philippinarum* e *Tapes decussatus*). La maggior parte dei siti di produzione si colloca a ridosso di zone marino-costiere ad alto impatto antropico e di conseguenza, l'inquinamento da parte dei microrganismi sia batterici che virali a ciclo oro-fecale, rappresenta un serio problema per la salute pubblica.

Il regolamento della Commissione Europea (CE) n.2073/2005 basa il giudizio di idoneità microbiologica dei MBV sulla determinazione di parametri batteriologici (*Salmonella* spp. ed *Escherichia coli*). Lo stesso regolamento sottolinea inoltre che la

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

determinazione degli indicatori fecali non garantisce l'assenza di contaminazione virale e non permette di valutare i corretti tempi dei processi di depurazione.

Fino al Marzo 2013 non era noto alcun criterio microbiologico per la determinazione diretta dei virus enterici nei molluschi bivalvi vivi, ciò era dovuto alla assenza di un metodo di analisi ufficiale riconosciuto dalla Unione Europea. A tal proposito si è definito che l'obiettivo del presente progetto di tesi si pianificasse sviluppando i seguenti punti:

i) ricerca e studio di un metodo molecolare di indagine per la rilevazione di Norovirus in molluschi bivalvi affinché possa essere utilizzato ed impiegato per analisi virologiche di routine; ii) valutazione dell'incidenza dei virus enterici nelle differenti specie di molluschi bivalvi, nelle aree di produzione e al commercio, con lo scopo di valutarne la reale distribuzione; iii) applicazione di una metodica molecolare Real time qRT-PCR come contributo all'indagine del livello di infezione delle specie ittiche allevate in aree regionali con maggior impatto antropico, in previsione dei futuri approcci diagnostici molecolari come integrazione al Regolamento (CE) 2073/2005.

Il primo studio, presentato nel Capitolo 5, è stata una larga osservazione sulla potenziale presenza di contaminazione batterica e virale in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nelle differenti aree di produzione della Regione Sardegna. Si è voluto valutare, oltre alla presenza di Norovirus e del virus dell'epatite A anche la presenza di *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Lo scopo di questa indagine è stato quello di stimare la prevalenza di tali microrganismi nelle specie animali che provenivano dalle aree di produzione, stabulazione, e dai centri di depurazione e spedizione molluschi.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Il secondo studio, presentato nel Capitolo 6, ha evidenziato la prevalenza di Norovirus in molluschi bivalvi importati da Paesi Terzi. L'obiettivo di questo studio è stato quello di stabilire una correlazione tra la presenza del virus enterico in prodotti alimentari inseriti nel circuito commerciale regionale da parte di aziende che hanno importato mitili da mercato estero.

Il terzo studio, presentato nel Capitolo 7, ha riguardato la valutazione dell'efficacia dei sistemi di depurazione nei confronti di Norovirus nei mitili allevati in due differenti aree di produzione regionale, separate geograficamente.

Il quarto studio, presentato nel Capitolo 8, riguarda l'indagine sulla presenza di virus enterici e contaminanti fecali, eseguita nelle aree di allevamento ritenute le più sensibili sul suolo regionale, prendendo in considerazione anche i parametri ambientali. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la correlazione tra la presenza stagionale di Norovirus e i parametri fisico-chimici delle acque di allevamento.

Il quinto studio, presentato nel Capitolo 9 come "draft", è la descrizione dell'applicazione della tecnica molecolare Real time qRT-PCR in *Mytilus galloprovincialis* ai fini di una determinazione quantitativa di Norovirus in questa matrice alimentare. Inoltre, alla fine dell'ultimo anno della Scuola di Dottorato, è stata pubblicata la norma ISO/TS 15216-1:2013 Parte 1 e Parte 2 che definisce il metodo di rilevazione quantitativa di Norovirus e del virus dell'epatite A nelle matrici alimentari, tale norma è stata applicata sui campioni di mitili prelevati da zone di allevamento di Classe B .

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

L'ultimo studio, presentato come allegato, affronta le tematiche sanitarie associate alla presenza di tossine di origine algale nei molluschi bivalvi, le quali sono da tempo una presenza costante nel territorio marino regionale rappresentando un grave pericolo per il consumatore. L'obiettivo principale di questo studio è finalizzato all'acquisizione di dati epidemiologici sulle produzioni locali.

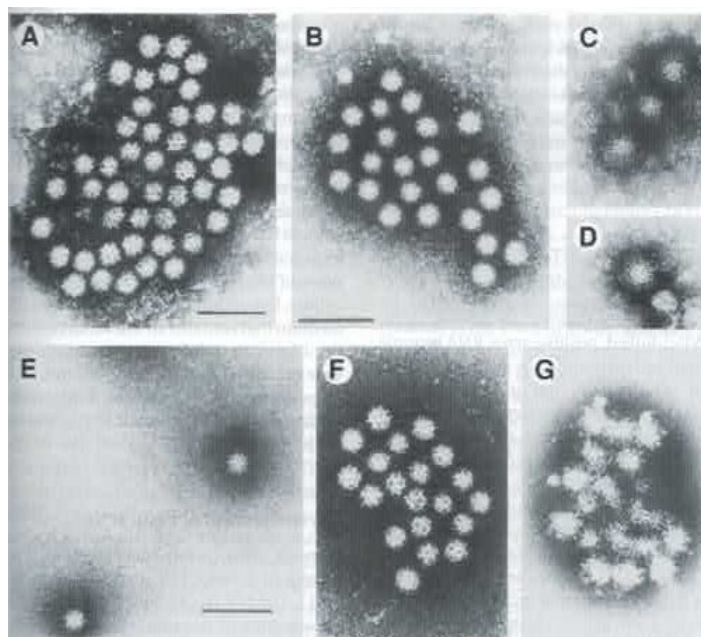
CAPITOLO 2

2.1. I Norovirus

I Norovirus conosciuti anche come “Norwalk virus”, dal luogo della prima epidemia identificata, o “small round structured virus” – “SRSV”, a causa della loro struttura rotondeggiante, vengono oggi inclusi nella famiglia dei Caliciviridae (Figura 2.1) e sono un gruppo di virus con la stessa struttura genomica di base, considerati la principale causa di gastroenteriti acute di origine virale nel mondo (Green *et al.*, 2000). I Norovirus furono scoperti per la prima volta a causa di una epidemia soprannominata “winter vomiting disease” che avvenne in una scuola elementare a Norwalk, Ohio, USA, nell’ottobre del 1968 (Adler *et al.*, 1969). Più della metà degli studenti ed insegnanti di una scuola sviluppò una gastroenterite, ed inoltre l’infezione si estese ad un terzo delle famiglie venute a contatto con i malati. I campioni fecali vennero successivamente prelevati ai malati e furono usati per fare nuovi inoculi per studi sperimentali all’NIH (National Institutes of Health) (Dolin *et al.*, 1971). Kapikian e colleghi (Kapikian *et al.*, 1972) usarono il TEM (Transmission Electron Microscope) per identificare le particelle virali nei campioni di volontari che erano stati infettati con un passaggio dell’inoculo del virus originale di Norwalk. La scoperta del virus Norwalk (Kapikian *et al.*, 1972.) e dei Rotavirus (Adams *et al.*, 1963; Bishop *et al.* 1973; Bridger *et al.*, 1975) come patogeni enterici ha stimolato la ricerca in questo settore e l’individuazione di molti altri virus enterici chiamati "SRSV" per le piccole strutture rotonde (letteralmente "virus a piccola struttura rotonda"), e per l'aspetto generale che

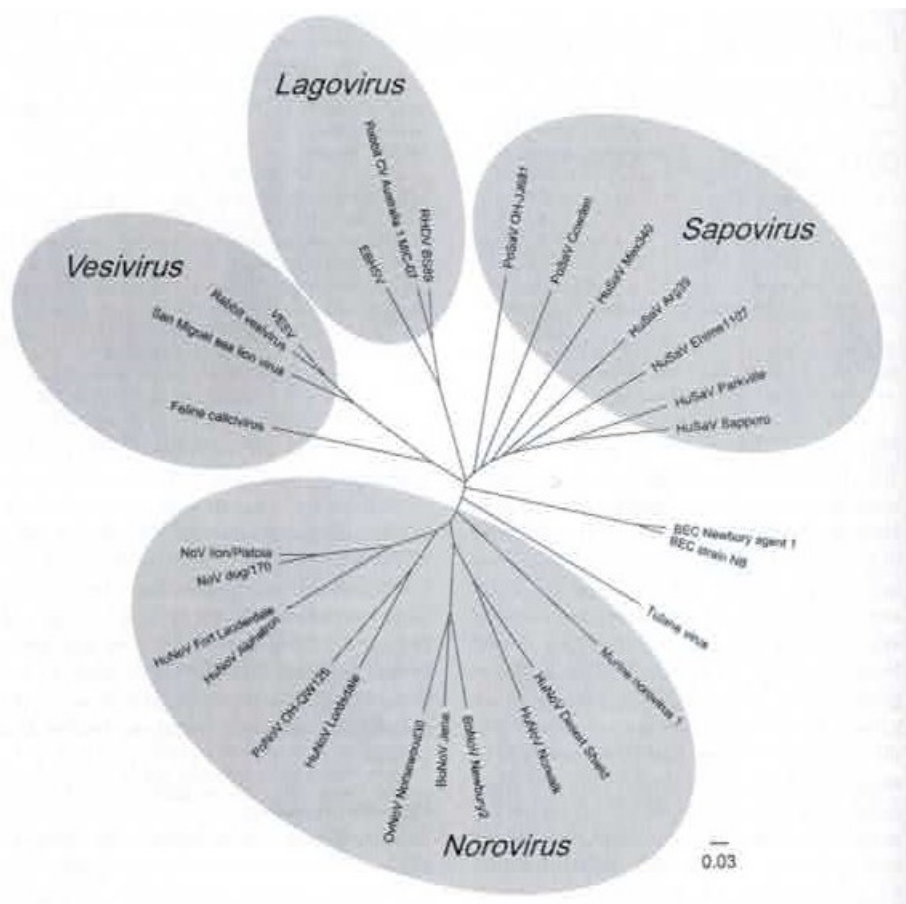
appariva alla microscopia elettronica (ME) (Appleton *et al.*, 1975; Madeley *et al.*, 1976; Chiba *et al.*, 2000). Grazie alla ME sono stati trovati molti altri virus con morfologia simile nelle feci di molti animali domestici tra cui bovini (Woode *et al.*, 1978) e suini (Bridger, 1980; Saif *et al.*, 1980). Il ceppo SW918, precursore del ceppo suino di NoV è stato individuato nel tratto ciecale di suini sani in Giappone nel 1997 (Sugieda *et al.*, 1998). Recentemente, sono stati isolati Norovirus da topi di laboratorio e sono stati individuati anche in un cucciolo di cane in Italia (Martella *et al.*, 2007). Infatti recentemente sono stati scoperti Norovirus in cani da compagnia e ovini (Martella *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2009).

Figura 2.1. Norwalk virus (NV), in A: Norovirus in Immune Electron Microscopy (IEM), Knipe & Howley – Virology (2007).



I Norovirus sono un gruppo di virus a forma icosaedrica e privi di envelope, con un genoma a RNA a singolo filamento, di senso positivo (Green *et al.* 2000). La famiglia dei Caliciviridae comprende quattro generi: i Norovirus, Sapovirus, Vesivirus e Lagovirus (Figura 2.2).

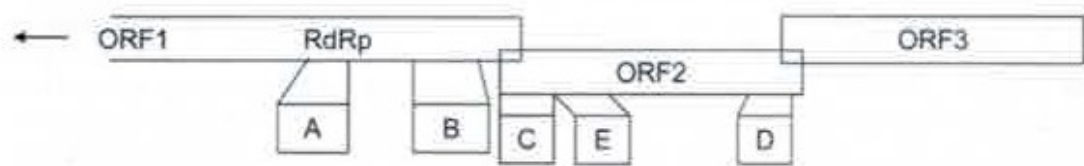
Figura 2.2. Famiglia Caliciviridae, Caliciviruses – Molecular and Cellular Virology; 2010 (Grant S. & Hansman)



Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Il genoma di questa specie virale è lungo 7,5-7,7 kb e comprende tre “Open Reading Frame” (ORFs). L’ORF1 (di 146-5359 nucleotidi) codifica una poliproteina di sei proteine non strutturali incluso p48, NTPase, p22, VPG (in 5’ necessaria per avviare la traduzione) 3CL^{pro} (proteasi), RdRp (RNA dipendenti RNA polimerasi). L’ORF2 codifica la principale proteina strutturale (VP1) di circa 60 kD che si ripiega in una S (shell) e P (curva) che è ulteriormente suddivisa in P1 e P2, P2 diventa la regione più ipervariabile del genoma e responsabile del legame con il recettore HBGA (Chen et al, 2004).

Figura 2.3. Rappresentazione schematica della localizzazione delle regioni genomiche di Norovirus (Vinjè e tal. 2004) pubblicato in Siebenga ey al., 2009. RdRp RNA-dipendente RNA polimerasi – schema suddivisione genomica.



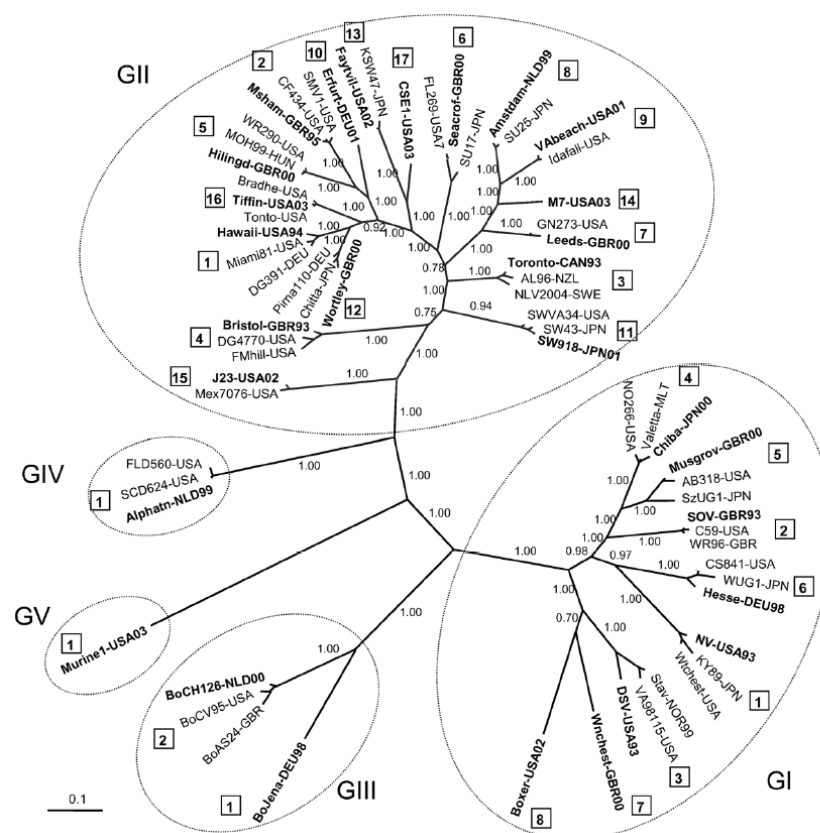
L’ORF3 (di 6938-7573 nucleotidi) codifica una proteina strutturale minore (VP2) con una funzione sconosciuta ma studi in vitro hanno dimostrato che questo gene regola l’espressione e la stabilità del VP1 (Bertolotti-Ciarlet et al, 2003). Il capside virale è composto da 180 copie della proteina VP1, organizzate in 90 capsomeri dimerici. Le proteine capsidiche consistono di due domini, S e P; il primo è adibito alla formazione della struttura icosaedrica del virione, mentre il secondo forma una struttura a curva e può essere suddiviso nei sottodomini P1 e P2 (Parashar *et al.* 1998) (Figura 2.3). Il sottodominio P2 è collocato sulla superficie esterna del capside e presenta elevata variabilità, per cui si ritiene che ricopra un ruolo principale nell’interazione con l’ospite.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

2.2. Classificazione dei Norovirus

I Norovirus non sono coltivabili in vitro per cui la classificazione in sierotipi è impraticabile; il metodo per la loro classificazione si basa sull'analisi filogenetica della ORF₂. Sono riconosciuti 5 genogruppi: i genogruppi GI, GII e GIV sono tipici umani, mentre i genogruppi GIII e GV sono bovino e murino (Hall *et al.* 2011) (Figura 2.4).

Figura 2.4. Albero filogenetico e nomenclatura dei NoV. (Huelsenbeck *et al.*, 2001).



Si è osservato che però alcuni ceppi di GII hanno infettato suini (Wang *et al.* 2005).

Ogni genogruppo presenta una ulteriore clusterizzazione in differenti genotipi: 8 genotipi in GI, 17 in GII, 2 in GIII e 1 ciascuno in GIV e GV (Zheng *et al.* 2006).

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Recenti studi hanno dimostrato che l'80% delle epidemie causate da Norovirus sono dovute a Norovirus GII.4 (Siebenga *et al.* 2008) e che questa variante, per via delle continue mutazioni rimane in maniera continua nella popolazione umana (Motomura *et al.* 2010); questa sua variabilità (nelle sequenze) risulta essere maggiore rispetto a quella di altri generi di virus ad RNA, e questo fatto spiegherebbe, in parte, la capacità di eludere i meccanismi di difesa dell'ospite (Zheng *et al.* 2006).

2.3. Modalità di trasmissione

I norovirus sono virus a ciclo oro-fecale e la contaminazione degli alimenti, delle risorse idriche e la diffusione diretta da persona a persona, sono responsabili della maggior parte delle epidemie. La contaminazione degli alimenti può avvenire in ogni punto della filiera alimentare. Per esempio, i molluschi bivalvi possono essere contaminati nell'area di produzione (contaminazione primaria) per la loro caratteristica di essere animali filtratori; mentre altre tipologie di alimento, per esempio i vegetali o gli alimenti pronti all'uso "ready to eat" possono subire una contaminazione durante la loro manipolazione. Insalate di I gamma, frutti di bosco, panini farciti, hanno causato epidemie dopo essere stati contaminati dagli operatori nei locali di produzione (contaminazione secondaria) (Schwab *et al.* 2000). Solo il 20-30% della trasmissione dei Norovirus avviene per contagio interumano, in luoghi chiusi, spesso affollati come le scuole, le caserme e gli ospedali e navi da crociera dando luogo a serie epidemie. L'eradicazione dei virus dalle zone infette, è molto difficoltosa in quanto questi ultimi sono particolarmente resistenti ai processi di disinfezione e le diverse modalità di

trasmissione rendono complessi gli interventi di bonifica. In questi luoghi sono spesso raccomandate alcune prassi igieniche semplici da poter adottare, come per esempio lavarsi spesso le mani con disinfettanti (Cheesbrough *et al.* 2000). Alcuni autori riportano anche una trasmissione per via aerea attraverso fomite in quanto i virioni si possono ritrovare anche nei primi tratti dell'apparato respiratorio, potendosi quindi diffondere nell'ambiente esterno ed essere captati da soggetti sani. Questa modalità è stata osservata nei reparti nosocomiali e tra familiari di persone infette (Sawyer *et al.* 1988; Marks *et al.* 2000). I Norovirus possono resistere a temperature anche superiori ai 60°C come pure a concentrazioni di cloro fino a 100 ppm e ad altri disinfettanti industriali causando per esempio la contaminazione delle acque superficiali in quanto, si è constatato, che i trattamenti dei liquami non sono in grado di eliminare completamente i virus e questo può determinare un contagio degli alimenti a monte durante la loro produzione. La dose infettante risulta essere inferiore a 10 particelle virali e, a causa della loro bassa dose infettante e della adesività e persistenza sulle superfici e della loro resistenza ai prodotti di sanificazione, i Norovirus sono considerati come agenti di bioterrorismo (categoria B) (Koo *et al.* 2010).

Studi precedenti hanno stabilito che la dispersione del virus si aveva solo nei primi quattro giorni dopo l'infezione. Nuovi test molecolari hanno dimostrato che diverse persone infette presentano il virus nelle feci anche per diverse settimane dopo la scomparsa dei sintomi.

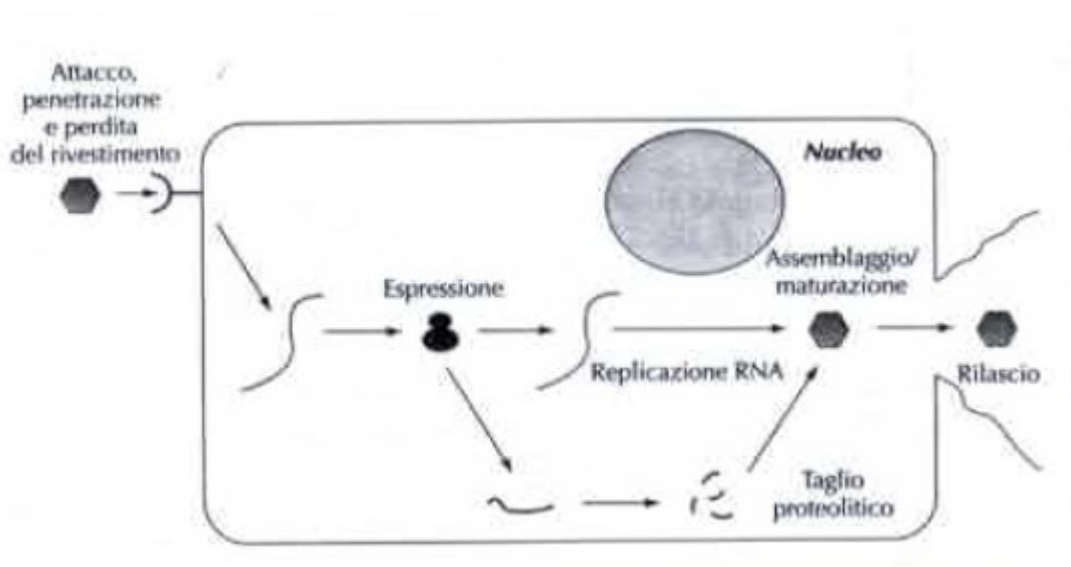
2.4. Infezione virale

I Norovirus sono la principale causa di gastroenterite acuta non batterica in soggetti di tutte le età. Nell'uomo il periodo di incubazione varia tra le 24 e le 48 ore; il sintomo principale che caratterizza l'infezione da Norovirus sono i crampi addominali e il vomito compulsivo accompagnato da diarrea, nausea, febbre, cefalea e dolori muscolari. L'infezione dura dalle 12 alle 72 ore, ma tale stato può prolungarsi in neonati, anziani e individui ospedalizzati; durante l'infezione il rischio di diffusione del virus è piuttosto elevato fino a 48 ore dopo la fine dei sintomi poichè le particelle virali sono eliminate in elevata quantità con le feci. La guarigione è prevista in 1-2 giorni senza complicazioni. Generalmente si ricorre a terapie orali per il trattamento della disidratazione e nei casi più gravi si sono verificate enterocoliti necrotizzanti in neonati, diarrea cronica in individui immunocompromessi e sindromi da intestino irritabile post-infezione. I casi di morte registrati hanno riguardato anziani nei reparti di lunga degenza (Hall *et al.* 2011). L'infezione è a carico delle cellule della mucosa intestinale, che determina l'allargamento ed accorciamento dei microvilli intestinali, modificazioni morfologiche delle cellule epiteliali, vacuolizzazione citoplasmatica (Atmar & Estes, 2006). Il virus viene principalmente espulso tramite le feci, ma le particelle virali si possono ritrovare anche in fomite dei soggetti infetti. Si sono registrate infezioni asintomatiche, e in questi soggetti le particelle virali eliminate erano in dosi minori rispetto ai soggetti sintomatici. La difficoltà di diagnosi in molti casi non permette l'identificazione della malattia, pertanto la diffusione del Norovirus nella popolazione viene sottostimata con conseguente difficoltà nella raccolta ed elaborazione di dati epidemiologici.

2.5. Strategie di replicazione

La strategia replicativa di ogni virus è dettata dal tipo di acido nucleico che costituisce il genoma virale. Per tale motivo tutti i virus possono essere suddivisi in sette classi replicative (da Baltimore, 1971). Per i virus con genoma a RNA la replicazione è intimamente connessa con l'espressione genica. I Norovirus appartengono alla Classe IV: RNA a singola elica a polarità positiva. Possono a loro volta essere suddivisi in due sottoclassi: 1) Virus con mRNA policistronici, dove l'mRNA neoformato è tradotto in una poliproteina che verrà tagliata per formare le proteine mature; 2) Virus con trascrizione complessa (Figura 2.5). Il Norovirus è ancora oggi poco conosciuto poiché è impossibile da coltivare in linee cellulari o da riprodurre mediante l'infezione di animali (Guix *et al.* 2007). Il genoma del Norovirus è un ssRNA a polarità positiva.

Figura 2.5. Rappresentazione schematica della replicazione dei virus della I Classe. In Elementi di Virologia Molecolare, Alan J. Cann, 2006.



Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Entrato nel citoplasma della mucosa intestinale, agisce come un RNA messaggero e sintetizza tutti i componenti biochimici utilizzando il sistema traduzionale della cellula ospite. Come tutti i virus non è in grado di codificare in modo autonomo le strutture necessarie per la traduzione. Le fasi di replicazione prevedono differenti passaggi: ancoraggio del virus con la superficie delle cellule della mucosa intestinale; legame con l'HBGA e rilascio capsidico (uncoating); introduzione del genoma virale nel citoplasma della cellula ospite; perdita della proteina VPg presente all'estremità 5' terminale e riconoscimento e legame dell'RNA virale al ribosoma cellulare. Ha inizio così la traduzione della regione ORF1 (poliproteina) che successivamente verrà suddivisa in proteine non strutturali che andranno a costituire il complesso di replicazione che genera a sua volta una seconda molecola di RNA definito RNA subgenomico (RNAs). L'RNAs slega la proteina VPg, si lega al ribosoma e dà inizio alla trascrizione delle proteine capsidiche VP1 e VP2. Le proteine strutturali VP1 e VP2 vanno a formare il capside all'interno del quale viene incapsulato il genoma virale neosintetizzato. Le particelle virali verranno successivamente rilasciate tramite lisi cellulare e riversate nel lume intestinale. Questo processo determina il rilascio di acqua nell'intestino causando diarrea che trasporterà i virioni neoformati.

2.6. Epidemiologia

I Norovirus ormai sono conosciuti come la principale causa di gastroenteriti nell'uomo; la percentuale di incidenza sembra essere maggiore negli individui giovani, ma si registrano episodi di infezione anche nella popolazione adulta. Sebbene non sempre sia

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

dimostrabile l'origine delle infezioni, nella maggior parte dei casi è il consumo di alimenti o acqua infetti che provoca il diffondersi della malattia (Koopmans *et al.*, 2004). In Europa, fino ad oggi, risultava difficile fornire un quadro epidemiologico completo in quanto non esisteva una metodica comune e standardizzata per i laboratori che effettuavano la ricerca di Norovirus. A Marzo del 2013 è stata pubblicata la Norma *ISO/TS 15216:2013 "Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1 and Part 2*; tale metodica diventerà un valido strumento per una più efficace determinazione dei Norovirus, in quanto saranno uniformate le procedure e la sensibilità del metodo stesso. Tutti i laboratori impiegati nella ricerca del patogeno virale potranno fornire uno strumento diagnostico ed epidemiologico più concreto. Le infezioni gastroenteriche sostenute da Norovirus si manifestano prevalentemente in ambienti comunitari come mense, ristoranti, navi da crociera, case di riposo, scuole e caserme. Per arginare la propagazione del virus una strategia di intervento realizzabile è la tempestività di segnalazione dei presunti casi di gastroenterite sospetta alle autorità sanitarie locali. In Europa negli ultimi anni si è registrato un sostanziale aumento dei focolai di norovirus in quasi tutti i paesi comunitari. Attualmente diversi laboratori di analisi stanno rivolgendo particolare attenzione alla individuazione dei virus enterici con particolare riguardo ai Norovirus e al virus dell'epatite A. Vi è un sostanziale aumento della sensibilità dei metodi acquisiti e sviluppati e il genogruppo maggiormente riscontrato è il GII.4. Grazie alla applicazione di saggi molecolari di RT-PCR si è potuto rilevare un aumento dei casi di positività del 90%.. Nel Centro Europa i dati sulle gastroenteriti provocate da Norovirus sono stati elaborati basandosi sul numero dei casi di focolai rilevati dalla diagnostica di laboratorio. Nello scorso

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

decennio sono stati evidenziati, mediante tecniche di biologia molecolare più di 100 focolai e nel 2002 ne sono stati registrati più di 500, con una percentuale in aumento del 70% in più rispetto alle percentuali registrate nel decennio precedente. Ultimamente, tra il 2002 e il 2005, nei Paesi Scandinavi si è registrato un aumento del numero delle infezioni virali soprattutto dopo il consumo di frutti di bosco raccolti localmente e assunti senza nessun tipo di lavaggio o sanificazione. La Spagna si è rilevata l' unico paese in cui si sono registrati i minor casi di infezione virale. In Europa è stato istituito l'FBVE (Foodborne viruses in Europe) per monitorare l'andamento dei focolai di gastroenterite virale nell'uomo. Il progetto "FBVE" è stato costituito per creare un database tale da permettere, in tempo reale, la divulgazione e la gestione di dati epidemiologici tra i diversi centri di ricerca; ciascun membro affiliato può segnalare eventuali focolai di gastroenteriti virali e condividere le informazioni acquisite. Hanno preso parte 26 Centri di Ricerca di 13 Stati membri (UK, Olanda, Danimarca, Finlandia, Francia, Germania, Ungheria, Irlanda, Italia, Norvegia, Slovenia, Spagna e Svezia). I recenti dati epidemiologici raccolti nell'ambito del progetto "Foodborne viruses in Europe" hanno accertato che in Europa, la maggior parte delle epidemie sono causate da un singolo genotipo di Norovirus, il GII.4. Inizialmente si pensava che questi virus infettassero solo bambini in età pediatrica e adulti, ma recenti studi hanno invece dimostrato che possono essere contagiate persone di tutte le età e sono considerati, dopo i Rotavirus, la seconda causa di ospedalizzazione nei neonati. Ogni anno si contano circa 23 milioni di nuove infezioni da Norovirus negli USA (CDC), e solo questi ultimi costituiscono la maggior percentuale delle malattie causate da patogeni enterici. Inoltre uno studio più recente ha evidenziato che in media circa 5 milioni e mezzo di persone ogni anno contraggono il Norovirus per ingestione di cibo contaminato in ambito

Riccardo Bazzardi – "Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna" – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

domestico e si pensa che possano causare infezioni lungo tutto l'arco dell'anno, sebbene ci sia un picco di incidenza durante i mesi freddi (Mounts *et al.*, 2000). I ceppi dei genogruppi I e II causano infezioni nella comunità anche se la maggior parte delle infezioni ed epidemie sono causate da un singolo ceppo di Norovirus. La ricombinazione può avvenire durante una cross-contaminazione e porta alla generazione di nuovi ceppi virali (Bull *et al.* 2005). In Italia i dati epidemiologici sui Norovirus sono ancora pochi e frammentari. Il Sud d'Italia nel 2006 per esempio è stato colpito da un'epidemia di Norovirus: secondo uno studio pubblicato su *Eurosurveillance* la causa era da attribuire molto probabilmente ad acqua contaminata. Furono registrati più di 2000 casi di infezione (Martinelli *et al.* 2006).

2.7. Bibliografia

Adams W.R. and Kraft L.M., 1963. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*; 141: 359-60.

Adler J.L., Zickl R., 1969. Winter vomiting disease. *J Infect Dis.*;119, 668-673.

Appleton H. and Higgins P.G., 1975. "Letter: Viruses and gastroenteritis in infants." *Lancet*; 1(7919): 1297.

Atmar R.L., Estes M.K., 2006. The epidemiologic and clinical importance of Norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am*; 35, 275-290.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

- Bertolotti-Ciarlet A., Crawford S.E., Hutson A.M., Estes M.K., 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol.*; 77(21): 11603-15.
- Bishop R., Davidson G.P., Holmes I.H., Ruck B.J., 1973. Virus Particles in Epithelial Cells of Duodenal Mucosa from Children with Acute Non-Bacterial Gastroenteritis. *Lancet* 302(7841): 1281-3.
- Bridger J.C., 1980. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. *Vet Rec.* 107(23): 532-3.
- Bridger J.C., 1990. Small viruses associated with gastroenteritis in animals. *Viral diarrheas of man and animals*. L. J. Saif and K. W. Theil. Boca Raton, Fla, CRC Press: 161–82.
- Bridger J.C., Woode G.N., 1975. Neonatal calf diarrhoea: identification of a reovirus like (Rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy. *Br. Vet. J.*; 131(5): 528-35.
- Cheesbrough J.S., Green J., Gallimore G.I., Wright P.A., Brown D.W., 2000. Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. *Epidemiol. Infect.*; 125, 93-98.

- Chen R., Neill D.J., Noel J.S., Hutson A.M., Glass R.I., Estes M.K., 2004. Inter- and intragenus structural variations in Calicivirus and their functional implications. *J. Virol.*; 78(12): 6469-79.
- Chiba S., Nakata S., Numata-Kinoshita K., Honma S., 2000. Sapporo virus: history and recent findings. *J. Infect. Dis.*; 181(Suppl 2): S303-8.
- Dolin R., Blacklow N.R., Du Pont H., Formal S., Buscho R.F., Kasel J.A., Chames R.P., Hornick R., Chanock R.M., 1971. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J. Infect. Dis.*, 123, 307-312.
- Green K.Y., Ando T., Balayan M.S., Berke T., Clarke I.N., Estes M.K., Matson D.O., Nakata S., Neill J.D., Studdert M.J., Thiel H.J., 2000. Taxonomy of the Caliciviruses. *J. Infect. Dis.*; 181 (Suppl. 2), S322-S330.
- Green K.Y., Chanock R.M., Kapikian A.Z., 2001. Human Caliciviruses. *Fields Virology*. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia (USA), Lippincott Williams and Wilkins; 1: 841-74.
- Guix S., Asanaka M., Katayama K., Crawford S.E., Neill F.H., Atmar R.L., Estes M.K., 2007. Norwalk virus RNA is infectious in Mammalian cell. *J Virol*, 81, 12238-12248.
- Hall A.J., Vinjé J., Lopman B., Park G.W., Yen C., Gregoricus N., Parashar U., 2011. Update Norovirus outbreak management and disease prevention guidelines.

Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Recommendations and Reports, 60 (RR03), 1-15.

Green K.Y., Ando T., Balayan M.S., Berke T., Clarke I.N., Estes M.K., Matson D.O.

Nakata S., Neill J.D., Studdert M.J., Thiel H.J., 2000. Taxonomy of the Caliciviruses. *J Infect. Dis.*; 181 (Suppl. 2), S322-S330.

Huelsenbeck J.P., Ronquist F., Nielsen R., Bollback J.P., 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*; 294: 2310-2314.

Kapikian A.Z., Wyatt R.G., Dolin R., Thornhill T.S., Kalica A.R., Chanock R.M., 1972.

Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.*; 10, 1075-1081.

Koo H.L., Ajami N., Atmar R.L., DuPont H.L., 2010. Norovirus: the principal cause of foodborne disease worldwide. *Discov Med.*; 10, 61-70.

Madeley C.R., Cosgrove B.P., 1976. Letter: Caliciviruses in man. *Lancet* 1(7952): 199-200.

Marks P.J., Vipond I.B., Carlisle D., Deakin D., Fey R.E., Caul E.O., 2000. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect*, 124, 481-487.

Martella V., Lorusso E., Decaro N., Elia G., Radogna A., D'Abramo M., 2008.

Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg. Infect. Dis.*; 14(8): 1306-8.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

- Martella V., Campolo M., Lorusso E., Cavicchio P., Camero M., Bellacicco A.L., 2007. Norovirus in captive lion cub (*Pantheraleo*). *Emerg. Infect. Dis.*; 13(7): 1071-3.
- Martin S., Andersson Y., Hedlund K.O., Giesecke J., 2004. New norovirus surveillance system in Sweden. *Euro Surveill*, 8(39):pii=2556. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2556>
- Martinelli D., Prato R., Chironna M., Sallustio A., Caputi G., Conversano M., Ciofi Degli Atti M., D'Ancona F.P., Germinario C.A., Quarto M., 2006. Large outbreak of viral gastroenteritis caused by contaminated drinking water in Apulia, Italy. *Euro Surveill*, 12(16):pii=3176. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3176>.
- Motomura K., Yokoyama M., Ode H., Nakamura H., Mori H., Kanda T., Oka T., Katayama K., Noda M., Tanaka T., Takeda N., Sato H., 2010. The Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol*, 84, 8085-8097.
- Parashar U.D., Dow L., Fankhauser R.L., Humphrey C.D., Miller J., Ando T., 1998. An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiol Infect* 121(3): 615-21.

- Saif L.J., Bohl E.H., Theil K.W., Cross R.F., House J.F., 1980. Rotavirus-like, caliciviruslike, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J. Clin. Microbiol.*; 12(1): 105-11.
- Sawyer L.A., Murphy J.J., Kaplan J.E., Pinsky P.F., Chacon D., Walmsley S., 1988. 25 to 30-nm virus particle associated with a hospital outbreak of acute gastroenteritis with evidence for airborne transmission. *Am. J. Epidemiol.*; 127(6): 1261-71.
- Schwab K.J., Neill F.H., Fankhauser R.L., Daniels N.A., Monroe S.S., Bergmire-Sweet D.A., 2000. Development of methods to detect "Norwalk-like viruses (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLV outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.*; 66: 213-8.
- Siebenga J.J., Vennema H., Zheng D.P., Vinjé J., Lee B.E., Pang X.L., Ho E.C., Lim W., Choudekar A., Broor S., Halperin T., Rasool N.B., Hewitt J., Greening G.E., Jin M., Duan Z.J., Lucero Y., O'Ryan M., Hoehne. Structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, 286, 287-290.
- Siebenga J.J., Vennema H., Renckens B., de Bruin E., van der Veer B., Siezen R.J., 2007. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J. Virol.*; 81(18): 9932-41.
- Sugieda M., Nagaoka H., Kakishima Y., Ohshita T., Nakamura S., Nakajima S., 1998. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch. Virol.*; 143(6): 1215-21.
- Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

- Tan M., Fang P., Chachivo T., Xia M., Huang P., Fang Z., Jiang W., Jiang X., 2008. Noroviral P particle: Structure, function and applications in virus-host interaction. *Virology*, 382, 115-123.
- Wang Q.H., Han M.G., Cheetham S., Souza M., Funk J.A., Saif L.J., 2005. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.*; 11(12): 1874-81.
- Wolf S., Williamson W., Hewitt J., Lin S., Rivera-Aban M., Ball A., 2009. Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Vet. Microbiol.* 133(1-2): 184-9.
- Woode G.N. and Bridger L.C., 1978. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J. Med. Microbiol.*; 11(4): 441-52.
- Zheng D.P., Ando T., Fankhauser R.L., Beard R.S., Glass R.I., Monroe S.S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*; 346(2): 312-23.

CAPITOLO 3

3.1. Infezioni da Norovirus negli alimenti

Gli alimenti più frequentemente coinvolti nella trasmissione all'uomo di infezioni virali quali i Norovirus sono oggi molto numerosi. Acqua, latte, carne, frutta e vegetali (insalate e frutti di bosco) ma soprattutto i molluschi rappresentano le principali fonti di infezione. Negli ultimi anni, le epidemie virali registrate nei Paesi del Nord Europa sono state associate e ricondotte ai frutti di bosco, lamponi, fragole ma anche alle acque ad uso zootecnico ma in particolar modo alle ostriche. La contaminazione virale dei frutti di mare è dovuta essenzialmente alla contaminazione fecale dell'acqua nella quale vengono allevati. Il prodotto può venire contaminato anche nei passaggi che avvengono dopo la raccolta; un esempio può essere la non osservanza dei principali criteri di igiene dei locali e del personale addetto alla preparazione e alla manipolazione dell'alimento, poiché viene a contatto col prodotto e il prodotto entra in contatto anche con superfici contaminate.

I virus enterici eliminati con le feci degli individui infetti attraverso gli scarichi urbani possono arrivare fino alle acque superficiali ed essendo più resistenti dei batteri ai comuni trattamenti di depurazione, compresa la clorazione (riescono a sopravvivere fino a 130 giorni in acqua di mare), possono perdurare più a lungo rispetto ai batteri come *Escherichia coli* o i coliformi che, come è noto, vengono utilizzati come indicatori di contaminazione fecale sia dell'acqua che dei molluschi come indicatore di processo.

I molluschi hanno da sempre ricoperto un ruolo di primaria importanza nella trasmissione di virus enterici. Sono organismi filtratori la cui attività è pressoché ininterrotta e riescono a filtrare diversi litri di acqua: a seconda delle dimensioni e della specie, un mitile riesce a filtrare a 14°C circa 1,5 l di acqua all'ora, l'ostrica europea ne filtra 12 a 15°C, mentre quella americana supera i 18 l/h se tenuta a 20°C. Durante questa intensa ed ininterrotta attività di filtrazione l'animale è in grado di trattenere nell'organismo non solo il plancton necessario al metabolismo e alla sua nutrizione, ma anche batteri e virus eventualmente presenti nell'ambiente in cui vive. I virus vengono trattenuti dai molluschi per diversi giorni anche se posti in acque di stabulazione pulite. E' stato dimostrato che riescono a perdurare anche dopo che questi hanno rilasciato i batteri indici di contaminazione fecale.

I casi di epidemie associate a questa categoria alimentare stanno aumentando. Come è di consuetudine, in Italia, questo prodotto è spesso consumato crudo o poco cotto e questo comportamento favorisce l'insorgere di infezioni alimentari (Alfano-Sobsey *et al.* 2011).

Uno studio condotto nel Regno Unito sulla contaminazione delle ostriche ha dimostrato che la maggior parte dei campioni analizzati sono risultati positivi a NoV GII con livelli più alti di NoV GI e almeno un campione di ostriche positivo per ogni area di allevamento dalla quale provenivano i campioni.

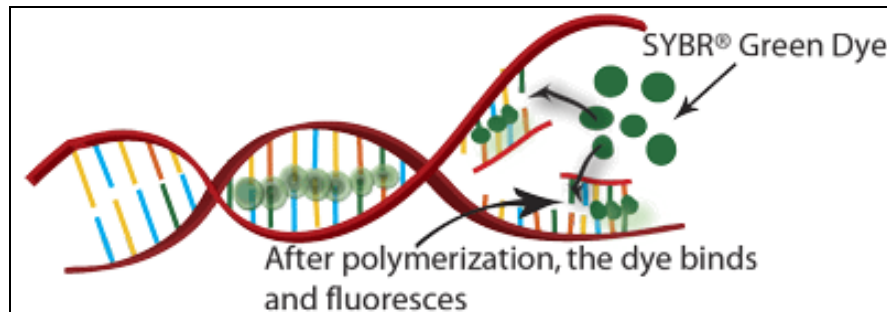
Si è notata inoltre una certa "stagionalità" nella contaminazione dei campioni con un aumento del numero di esemplari positivi nei mesi invernali (Lowther *et al.* 2012). Altre epidemie hanno riguardato, negli ultimi anni, i prodotti vegetali, in particolare i prodotti

“ready to eat” e i frutti di bosco (Ethelberg *et al.* 2010). Questi ultimi erano stati irrigati con acque contaminate. In Germania un’epidemia particolarmente importante di gastroenterite da Norovirus è stata provocata dal consumo di un dessert preparato con fragole surgelate, risultate poi contaminate, causando più di 11000 infezioni tra alunni di diverse scuole. (http://www.rki.de/EN/Home/Outbreak_AV.html).

3.2. Metodi analitici per l’identificazione dei Norovirus: Real time RT-PCR

La tecnica di PCR definita di tipo “classico” (EndPoint-PCR, Hot Start-PCR, Nested-PCR) consente di effettuare solo un’analisi qualitativa dei prodotti di reazione. Solo durante la fase esponenziale di accumulo del prodotto, il numero di molecole per ciclo dipende dal numero di molecole iniziale e l’efficienza della reazione diventa variabile e si raggiunge una fase di “plateau”, per cui non è più possibile correlare la quantità di prodotto finale con la quantità di stampo iniziale. La PCR *Real Time* è una tecnica PCR che consente di seguire l’aumento della quantità di prodotto PCR ad ogni ciclo di amplificazione e quindi di realizzare un’analisi quantitativa dello stampo iniziale. Questa tecnica si basa sull’uso di coloranti fluorescenti che si legano al DNA in modo aspecifico o di sonde marcate complementari a specifiche sequenze. I coloranti sono fluorofori (esempio SYBR Green I) la cui emissione aumenta in conseguenza del legame a filamenti di DNA a doppia elica. La quantità quindi di prodotto amplificato durante la reazione PCR può essere misurata rilevando l’emissione del segnale del fluoroforo al termine della fase di allungamento di ciascun ciclo (Figura 3.2.1).

Figura 3.2.1. SYBR-Green I lega preferenzialmente DNA a doppio filamento e quindi non è molto adatto per quantificazioni di RNA o altro DNA contaminante a singolo filamento



Nelle analisi basate sull'uso di sonde (probe) specifiche il segnale fluorescente viene rilevato solo in conseguenza dell'appaiamento della sonda alla sequenza bersaglio e corrisponde specificamente alla sua amplificazione. Le sonde comunemente utilizzate sono di due tipi: le *sonde idrolitiche* e le *sonde di ibridazione*.

Nelle analisi che utilizzano le *sonde idrolitiche* l'emissione del segnale fluorescente dipende dalla attività esonucleasica della TaqDNA Polimerasi. Alle due estremità della sonda sono legati un fluoroforo ed un inibitore del fluoroforo. Quando la sonda è appaiata alla sequenza bersaglio l'inibitore è sufficientemente vicino al fluoroforo per bloccare l'emissione del segnale. Durante la fase di allungamento di ciascun ciclo di amplificazione, la polimerasi idrolizza la sonda. A questo punto il fluoroforo viene liberato nella miscela di reazione e sfugge all'azione dell'inibitore per cui ci può essere l'emissione del segnale – tecnica TaqMan (Figura 3.2.2).

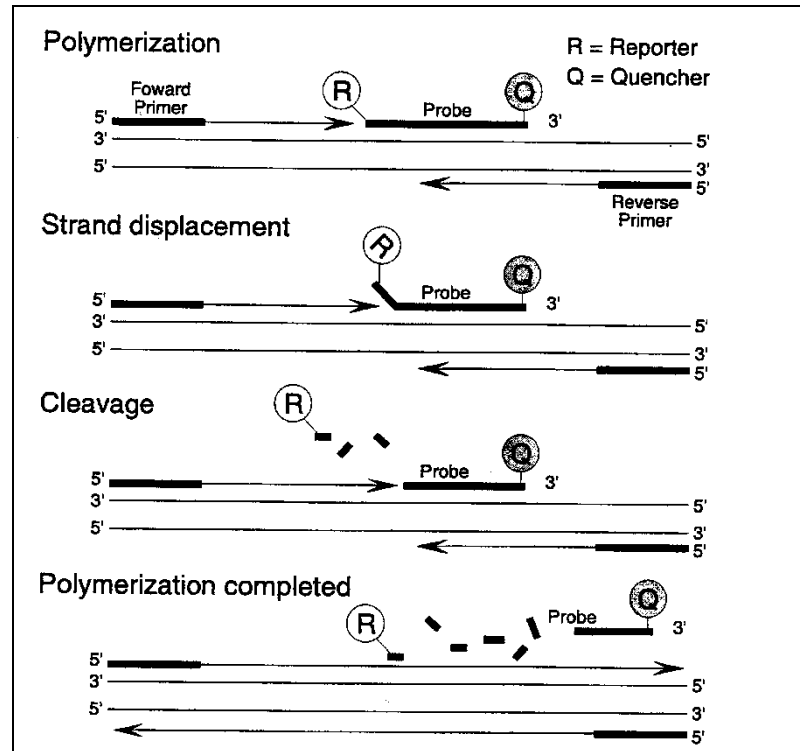


Figura 3.2.2. Tecnica Taqman. Dopo la fase di denaturazione, i primer e la sonda si appaiono alle sequenze complementari. La vicinanza dell'inibitore al fluoroforo blocca l'emissione del segnale. Durante la fase di allungamento la Taq DNA polimerasi idrolizza la sonda, quindi il fluoroforo si allontana dall'inibitore ed emette il segnale fluorescente. R= Reporter; Q= quencher

Le sonde di ibridazione invece consentono di rilevare il segnale nel momento in cui esse si appaiono alla sequenza bersaglio. Questo tipo di sonda sfrutta il trasferimento di energia di risonanza fluorescente (FRET).

Nel presente lavoro sono state utilizzate solo sonde di idrolisi – “Tecnica Taqman”. La sonda Taqman, oligonucleotide complementare ad una determinata sequenza di DNA individuata all'interno della sequenza amplificata dai primers, presenta una molecola

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

“Reporter - R” all’estremità 5’ e una molecola “Quencer – Q” al 3’, che impedisce al Reporter di emettere liberamente il segnale (Figura 3.2.2). Durante la fase di estensione, la polimerasi, che sta sintetizzando sul DNA templatato il secondo filamento a partire da un primer, incontra l’estremità 5’ della sonda, anch’essa legata al templatato ed effettua uno “*strand-displacement*”, stacca ovvero la sonda dal templatato per una lunghezza di alcuni nucleotidi e la taglia. In questo modo la molecola Reporter passa in soluzione, aumentando l’intensità della fluorescenza che sarà direttamente in relazione alla concentrazione di amplificato specifico all’interno della reazione.

I saggi molecolari che sono stati condotti hanno previsto l’uso della metodica in Real time PCR sia di tipo “*qualitativo*” che “*quantitativo*” (Real time qRT-PCR). La specificità del dato qualitativo (presenza/assenza) ottenuto viene confermato in maniera del tutto automatizzata attraverso il calcolo e relativo plot della curva di dissociazione del prodotto di PCR di ogni campione analizzato che consente di migliorare la specificità del sistema con la misura del T_m del DNA target. Questo dato consente di discriminare eventuali segnali di amplificazione derivati da prodotti aspecifici della reazione.

Campo di applicazione: Tutte i saggi molecolari effettuati in questo lavoro sono riportati nei capitoli a seguire, qui di seguito vengono schematizzate solo alcune fasi applicative. Si precisa che le prove molecolari sono state eseguite seguendo la metodica fornita dal Dipartimento di Sanità Pubblica veterinaria e di Sicurezza Alimentare – Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica dell’Istituto Superiore di Sanità. La ricerca dei Norovirus è pertanto basata sui principi dei metodi molecolari sopra descritti. La reazione a catena della polimerasi (PCR) è e rimane la tecnica elettiva per la loro

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

rilevazione. Tutti i campioni di mitili prima di essere sottoposti a tale metodica seguono un processo di estrazione degli acidi nucleici in modo tale da allontanare le sostanze inibenti la RT-PCR, potenzialmente presenti nella matrice alimentare, producendo RNA purificato. Per tale motivo la loro determinazione può essere effettuata tramite RT-PCR in “real time”.

Per l’Estrazione degli acidi nucleici e l’utilizzo dei Primers e Probes TaqMan usate per la rilevazione di Norovirus GI e Norovirus GII si fa riferimento al protocollo dell’Istituto Superiore di Sanità.

Controllo di processo:

Come controllo di processo è stato utilizzato il virus Feline CaliciVirus (FCVF9). Il virus FCV-F9 (ATCC VR-782, ceppo F9) è stato fornito dal Dipartimento di Virologia dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna. È stato preparato seguendo il protocollo analitico suggerito dall’Istituto Superiore di Sanità - Roma (Italia) propagazione su cellule Crandell-Reese Feline Kidney (CRFK) (ATCC CCL-94). Successivamente le cellule CRFK sono state mantenute nel terreno MEM/EBSS (Eagle’s Minimum Essential Medium) con 2 mM di L-glutammina, 0,1 mM di amminoacidi non essenziali e 10% di siero di cavallo ed incubate a 37 °C con il 5% di CO₂. Gli stock dei ceppi virali sono stati preparati attraverso congelamento del monostrato cellulare infettato ed incubato fino a che non è stato evidenziato l’effetto citopatico (sette giorni); lo stock virale è stato mantenuto a -80°C fino al momento del suo utilizzo. Nella tabella 3.2 sono elencati invece i Primers e Probe utilizzati.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Tabella 3.2.1. Primers e Probe FCV

FCV (FW)	ACA AGT CCG TTG GAG CAA TTG A
FCV (REV)	CCC CTG AGG TGT CCT TGT GAT
FCV (PROBE)	CCT ATT GAT CCT GAC TCT GTT GTT TTC TTG AAG AGA AC
Probe labelled 5' 6-carboxyfluorescein (VIC), 3' 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA)	

Efficienza di estrazione:

L'efficienza di estrazione viene calcolata mediante il confronto del Ct ottenuto dal campione contaminato (sospensione FCV) con il Ct del controllo di processo (Feline Calicivirus - FCV). Il controllo di processo è stato estratto a 95.0 ± 2.0 °C per 5 minuti \pm 30 secondi in modo da rilasciare l'RNA. L'RNA estratto è stato sottoposto successivamente ad amplificazione ed è stata valutata l'efficienza di estrazione mediante la seguente formula: $E = 2^{-\Delta Ct} \times d$ [E = efficienza di estrazione; ΔCt = Ct campione – Ct controllo processo; Ct = ciclo soglia; d = fattore di diluizione].

Efficienza di amplificazione:

L'efficienza di amplificazione viene calcolata mediante il confronto del Ct ottenuto dal campione addizionato con il controllo esterno (sospensione RNA di NoVGI / sospensione RNA di NoVGII) con il Ct del controllo esterno (5.0 μ l H₂O per biologia molecolare contaminata con 1.0 μ l di RNA NoV GI / RNA NoV GII). Calcolata poi con la seguente formula: $E = 2^{-\Delta Ct}$ [E = efficienza di amplificazione; ΔCt = Ct campione – Ct controllo esterno; Ct = ciclo soglia].

3.3. Bibliografia

Alfano-Sobsey E., Sweat D., Hall A., Breedlove F., Rodriguez R., Greene S., Pierce A., Sobsey M., Davies M., Ledford S.L., 2011. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiol Infect*, 140, 276-282.

Ethelberg S., Lisby M., Böttiger B., Schultz A.C., Villif A., Jensen T., Olsen K.E., Scheut F., Kjelsø C., Müller L., 2010. Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. *Euro Surveill*, 15(6):pii=19484. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19484>.

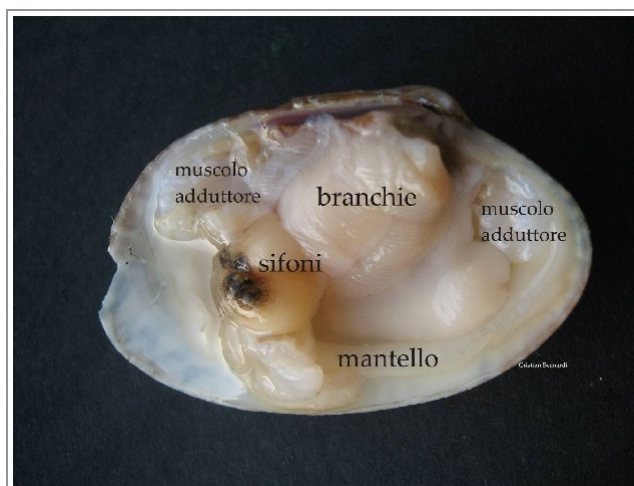
Lowther J.A., Gustar N.E., Powell A.L., Hartnell R.E., Lees D.N., 2012. Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom. *App Environ Microbiol*, 78, 5812-5817.

CAPITOLO 4

4.1. I Molluschi Bivalvi

I Molluschi Bivalvi, animali a simmetria bilaterale, appartengono al Phylum Mollusca che annovera il più alto numero di specie, circa 100.000 secondo gli esperti. Comprende sette Classi: Monoplacophora, Aplacophora, Polyplacophora, Scaphopoda, di cui le ultime tre Cephalopoda, Gastropoda, Bivalvia sono quelle che interessano i prodotti della pesca commercializzati; sono comunemente denominati: Molluschi, Cefalopodi, Molluschi Gasteropodi e Molluschi Bivalvi (o Lamellibranchi Eduli) (Figura 4.1).

Figura 4.1. Esemplare di vongola verace – *Ruditapes decussatus*. In: Collezione di studi sull'ispezione degli alimenti di origine animale – *Food in, Numero 1, 2010*®



Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Il corpo è formato da epidermide e derma. L'epidermide o strato superficiale è composta da cellule piatte o cilindriche con ciglia vibratili. Il derma o strato profondo è costituito da più strati e tipi di cellule: connettive, ghiandolari, muscolari e sensitive. Le cellule ghiandolari producono sostanze impiegate per la difesa o per altre funzioni mentre le cellule connettivali rendono compatta la cute e le cellule muscolari la rendono contrattile, infine le cellule pigmentate ripiene di sostanze cromatiche, sono capaci di mutare il colore del corpo dell'animale.

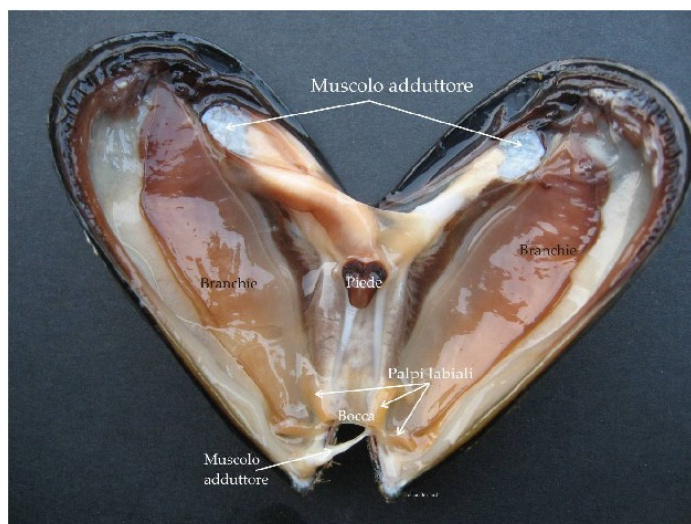
Questi animali sono compressi lateralmente e il corpo molle è parzialmente o completamente racchiuso in una conchiglia (Riedl, 1991). La conchiglia dei bivalvi è composta da due valve generalmente simmetriche, una destra e una sinistra, separate dai relativi lobi del mantello e destinate a proteggere i visceri (Mengoli, 1998). Esse sono unite da un legamento e una cerniera, e sono costituite da una matrice organica formata da proteine, mucopolisaccaridi e cristalli di carbonato di calcio, generalmente sotto forma di calcite (cristalli esagonali) o aragonite (cristalli rombici).

Il legamento, generalmente a forma di fuso, è fissato ai bordi dorsali delle valve e grazie alla sua elasticità e alla sua posizione intercalare consente l'apertura delle valve. È costituito soprattutto da conchiolina (Grégoire, 1961). Il legamento è separato, tramite l'istmo palleale, dal mantello a livello della zona dorsale posta fra i suoi due lobi; quando è localizzato all'esterno delle valve è detto *tensilium*, mentre quando è interno prende il nome di *resilium*. La cerniera, o articolazione delle valve, è un sistema a ingranaggio nel quale i denti di una delle valve penetrano in un incavo dell'altra. La cerniera dei mitili è molto ridotta e le valve sono unite quasi esclusivamente dal legamento, che ha l'aspetto di una banda brunastra che corre lungo la cerniera.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Le valve si aprono e si chiudono grazie all'azione dei muscoli adduttori, normalmente in numero di due (Figura 4.2).

Figura 4.2. Esemplare di cozza atlantica – *Mytilus edulis*. In: Collezione di studi sull'ispezione degli alimenti di origine animale – *Food in, Numero 1, 2010*®



La cavità palleale è delimitata dal mantello, il cui margine rappresenta la sede del contatto con l'ambiente esterno e il cui lobo intermedio contiene gli organi di senso. Presenta un'ampia apertura inalante nella regione ventrale, attraverso cui entra l'acqua, e un orifizio esalante, vicino al muscolo adduttore posteriore, da cui la espelle dopo aver captato l'ossigeno disciolto in essa e le particelle alimentari. Nelle forme fossorie (es. genere *Ruditapes*) i bordi del mantello si prolungano formando dei sifoni: uno di entrata dell'acqua (inalante) e l'altro di uscita (esalante). Il bordo presenta dei prolungamenti che, all'atto di apertura delle valve, s'intrecciano costituendo una sorta di filtro per evitare che penetrino al suo interno delle particelle di grandi dimensioni. La locomozione avviene attraverso un organo, chiamato piede, che si dilata per effetto della

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

pressione sanguigna e attraverso contrazioni ritmiche permette l'infossamento nel terreno.

Il piede raggiunge il suo massimo sviluppo nei bivalvi escavatori, ai quali serve appunto da apparato scavatore e locomotore grazie alle sue spasmodiche contrazioni. Nelle specie che vivono fisse, il piede si riduce o addirittura scompare. In alcuni generi (ad esempio il *Mytilus*), sulla linea medio-ventrale del piede si apre la ghiandola bissogena, la quale produce dei filamenti o bisso che, partendo in fascio divergente dal suo orifizio, si fissano a un supporto mediante la propria estremità allargata a forma di lente. Questi filamenti sono costituiti da un'unica struttura elicoidale principalmente composta da aminoacidi (Tamarin, 1972; Hagenau, 2009) e la loro abbondanza e resistenza dipende dallo stato fisiologico del mollusco.

L'apparato circolatorio è costituito da un cuore dorsale racchiuso in un pericardio che comprende un ventricolo e due atri laterali. La circolazione dei bivalvi è aperta, ossia il sangue inonda i tessuti formando un sistema lagunare in parte del suo percorso. I molluschi sono animali a sangue freddo e quindi la loro temperatura corporea si adatta a quella dell'ambiente. Pertanto, se la temperatura ambientale aumenta rapidamente, possono essere colpiti da embolia gassosa, poiché l'aumento di temperatura fa diminuire la solubilità dei gas nel sangue e di conseguenza si creano delle bolle d'aria nel corso sanguigno. Il loro sangue è altresì incoagulabile.

Alcuni bivalvi sono privi dei pigmenti respiratori per cui l'ossigeno si dissolve direttamente nel plasma. In altri, il pigmento respiratorio contenuto nel plasma

sanguigno è l'emocianina, nella quale il rame svolge lo stesso ruolo del ferro per l'emoglobina.

La concentrazione ionica del sangue dei bivalvi si adatta a quella dell'esterno e quindi alla salinità dell'acqua di mare (Pierce, 1971), per cui le variazioni della salinità esterna fanno variare il volume del corpo del bivalve; tale interscambio osmotico si realizza attraverso le branchie.

I bivalvi presentano due reni (nefridi) a entrambi i lati del cuore, nei quali avviene una filtrazione del sangue il cui filtrato finisce nella cavità del mantello e da lì all'esterno. Espellono principalmente ammoniaca, e anche ossido di trimetilamina e urea (Bayne, 1976; Potts, 1966). Quando si rompe l'equilibrio osmotico in seguito a brusche e consistenti variazioni della salinità, si altera gravemente l'interscambio osmotico dei bivalvi e di conseguenza la loro fisiologia: ciò può addirittura provocare la morte in un breve lasso di tempo.

L'alimentazione e la respirazione dei mitili avviene mediante un processo di filtrazione. Essi si nutrono prevalentemente di fitoplancton nonché di particelle organiche in sospensione. L'acqua viene immessa all'interno della conchiglia attraverso il sifone inalante, ed è filtrata dalle branchie nella cavità del mantello. Le branchie che sono responsabili anche dell'interscambio gassoso, sono formate da due serie di filamenti a forma di W e sono divise in una camera inalante inferiore e una esalante superiore. Le ciglia, disposte sui filamenti branchiali e sull'epitelio palleale, creano una corrente d'acqua che convoglia le particelle alimentari verso la bocca. Il movimento ciliare provvede anche a convogliare i prodotti di rifiuto alla camera esalante e quindi

all'esterno. Questi ultimi, agglutinati dal muco, costituiscono le pseudofeci espulse dal sifone esalante.

Il meccanismo di filtrazione dei bivalvi è molto efficace, essi possono infatti filtrare da trenta a sessanta volte il volume del loro corpo in un'ora e trattenere anche componenti dell'ultra plancton. Il filtrato è trasportato alla bocca dove le particelle sono raccolte dai palpi labiali e passano nello stomaco attraverso un breve esofago. Lo stomaco è un sacco circondato da una grossa ghiandola digestiva; le cellule di quest'ultimo inglobano il materiale che arriva dallo stomaco e lo digeriscono mediante enzimi endocellulari. L'intestino decorre nel piede e dopo una o più circonvoluzioni, attraversa il pericardio e termina nella cavità posteriore del mantello. Una caratteristica peculiare dell'apparato digerente dei bivalvi è la presenza dello stilo cristallino contenuto all'interno di un diverticolo ciliato, la cui funzione è quella di liberare enzimi necessari alla digestione dei glucidi. Per quanto riguarda il sistema nervoso, i bivalvi non possiedono un capo differenziato. Nella parte anteriore dell'animale sono presenti due gangli cerebroidi che costituiscono un anello periesofageo. Da questo partono i cordoni nervosi che innervano il piede e i visceri.

Per quanto riguarda la riproduzione, i mitili sono animali a sessi separati, la fecondazione è esterna, oppure avviene nella cavità del mantello della femmina, e si realizza a caso in mare. Le femmine producono nelle ovaie una sostanza che, diffondendosi nell'acqua di mare, provoca l'eiaculazione nei maschi vicini e, a sua volta, lo sperma eiaculato nell'acqua scatena nelle femmine la deposizione delle uova.

Specie oggetto della ricerca:

Mytilus galloprovincialis

E' il mitile più rappresentativo, caratterizzato da una conchiglia equivalve con forma allungata dall'umbone al margine della curva, che collega il bordo inferiore a quello superiore. L'umbone è a forma di punta e si incurva in avanti, a causa del bordo inferiore leggermente concavo. La cerniera presenta 3-4 dentelli, le valve hanno una parte centrale più o meno allargata, rastremandosi al termine, inoltre sono presenti leggeri solchi concentrici. Il colore esterno può essere blu-nero o violaceo-nero, mentre quello interno madreperlaceo azzurrognolo. La lunghezza di norma varia dai 0,04 ai 0,07 m.



Ostrea edulis

Detta ostrica piatta ha una forma rotondeggiante, con due valve diseguali: quella inferiore leggermente convessa e quella superiore piatta, molto lamellata con strie radiali poco evidenziate. Il colore esterno varia dal grigio, bruno-grigio, al grigio

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

verdastro, mentre quello interno si presenta madreperlaceo. La sua lunghezza media è compresa tra 0,06-0,12 m (lunghezza massima 0,2).

Crassostrea gigas

L'ostrica giapponese od ostrica concava è caratterizzata da una forma allungata, appuntita verso il modesto umbone. Le valve ha differente forma: piatta la superiore e concava quella inferiore. Da entrambi i lati delle valve son molto evidenti le lamelle o strie d'accrescimento, che conferiscono al bordo posteriore un aspetto frastagliato. Il colore esterno può essere grigio o bruno-grigiastro con le costole radiali brune o viola-brunastre, mentre il colore interno è prevalentemente madreperlaceo o bianco lattescente. La lunghezza varia da 0,08-0,15 m (lunghezza massima 0,4 m.)

Tapes decussatus – Ruditapes philippinarum

La vongola verace ha una forma ovoidale, allungata trasversalmente, con la conchiglia equivalve, l'umbone lievemente bombato posto nel lato anteriore, mentre il lato posteriore risulta tronco. Le valve esterne sono caratterizzate da evidenti strie radiali sottili e concentriche, più visibili ai margini della conchiglia. Il margine interno, invece, si presenta liscio.

Il colore esterno si può manifestare in multicolore bianco giallastro, bianco-grigiastro, bruno-verdastro con punteggiature, con linee o strie irregolari spezzate bruno-nerastre.

Il colore interno è biancastro-ocra con riflessi blu-violacei. La lunghezza media varia da 0,035-0,06 m (lunghezza massima 0,08 m).

4.2. La mitilicoltura in Italia e in Sardegna

Con il termine acquacoltura si intende la produzione di specie ittiche (itticoltura), di ostriche (ostricoltura), di crostacei (granchi, gamberi detta crostaceicoltura) e in ultimo di alghe (algicoltura). La mitilicoltura nello specifico si riferisce alle attività di produzione e commercializzazione dei mitili.

L'acquacoltura europea si può classificare in base a varie caratteristiche: acquacoltura estensiva o intensiva, in ambiente naturale o in vasca, in acqua dolce o in acqua di mare, in scorrimento continuo o in ricircolo, tradizionale o moderna, classica o biologica, riparata o esposta (Pesca, 2010). L'acquacoltura estensiva è stata la prima forma di allevamento ad essere praticata e consisteva nel catturare animali acquatici selvaggi nelle lagune, negli stagni o in piccoli laghi. Questa pratica minimalista non esiste più oggi in Europa, poichè tutti gli allevamenti acquicoli implicano almeno un'interazione tecnica con l'ambiente o con l'animale.

L'evoluzione successiva dell'acquacoltura si è concentrata nell'organizzare un ambiente acquatico che favorisse lo sviluppo delle popolazioni di pesci, di molluschi e/o di crostacei.

La molluschicoltura, ovvero l'allevamento dei molluschi, rimane un'attività di allevamento estensivo. Si basa principalmente su individui nati in natura e sulle sostanze nutritive presenti nell'ambiente, senza nessun tipo di intervento esterno. Mediante una sofisticazione molto spinta del processo e delle tecniche è possibile ricavare un rendimento ottimale da quello che è già presente in natura.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

L'allevamento delle ostriche e quello delle cozze rappresentano il 90 % della produzione europea di molluschi (Pesca, 2010). L'ostricoltura è oggi un'attività tradizionale in alcuni paesi dell'UE come la Francia (90% della produzione UE) e i Paesi Bassi.

La mitilicoltura è dedicata principalmente a due specie, in funzione della zona geografica di produzione: la cozza (*Mytilus edulis*), più piccola, nel nord del Mediterraneo, e il mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*), di maggiori dimensioni, detta cozza di Spagna o del Mediterraneo, nel sud del Mediterraneo. La distribuzione mondiale dei principali ecotipi di mitili *Mytilus edulis* (Linneo, 1758) è presente a latitudini temperate e fredde, ed è caratterizzato da una buona capacità di adattamento e una resistenza a condizioni climatiche difficili, talvolta estreme (coste dell'Islanda, Mar Baltico). *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) è presente a medie latitudini tipicamente in acque più calde, lungo le coste del Mediterraneo. *M. trossulus* (Gould, 1850) e *M. californianus* (Conrad, 1837) hanno una distribuzione più ridotta ma continua per un intervallo latitudinale di trenta gradi. I metodi di allevamento variano a seconda delle specie e delle regioni.

In Europa vengono allevate anche altre specie di molluschi, in particolare le vongole. L'allevamento della vongola verace (*Tapes decussatus*) è più recente delle precedenti.

La riproduzione si effettua in modo naturale sui siti di produzione o in modo controllato nelle avannotterie. Il seme è messo a maturare in contenitori in fondo a vasche riempite con acqua di mare o direttamente in recinti d'allevamento. Dopo 3 mesi, le giovani vongole vengono inseminate nella zona intertidale (Normandia, Bretagna, Cantabria,

Galizia) o nelle lagune (Poitou-Charentes, Emilia Romagna, Veneto), e raccolte due anni dopo. Il grosso della produzione europea è realizzato in Italia.

L'Italia presenta realtà locali differenziate a seconda della localizzazione delle marinerie, in relazione alle strutture e ai natanti presenti. Nell'Adriatico è concentrata la maggior parte della produzione ittica nazionale, nonostante rappresenti solo il 20% circa della costa italiana. Questo avviene sia per l'elevata produttività del bacino (attualmente disturbata dall'aumento dell'inquinamento) sia per la maggiore presenza di strutture portuali, natanti ed impianti di acquacoltura.

La mitilicoltura viene tradizionalmente eseguita in diverse regioni d'Italia, gli impianti sono presenti in 11 regioni ma la maggior parte della produzione si concentra in ordine decrescente in: Puglia, Veneto, Emilia Romagna, Friuli Venezia Giulia e Sardegna che coprono l'80% della produzione nazionale.

Tra le principali zone di produzione, di più antica tradizione abbiamo il golfo di Taranto (Puglia), la Spezia (Liguria), la laguna veneta, ai quali, in tempi più recenti, si sono aggiunti il litorale triestino (Friuli-Venezia Giulia) e il golfo di Olbia (Sardegna).

Le zone adibite a molluschicoltura sono classificate dalla normativa vigente e cogente in base ai requisiti microbiologici previsti per i molluschi. Questo tipo di attività è esercitata, nel nostro Paese, attraverso tre sistemi: sul fondale, tipico delle aree lagunari del delta padano, a pali fissi, diffuso in zone lagunari e costiere riparate (esso costituisce il metodo più antico di coltivazione dei mitili) e, il più diffuso, a filari galleggianti o *long line* adatto ad aree più esposte.

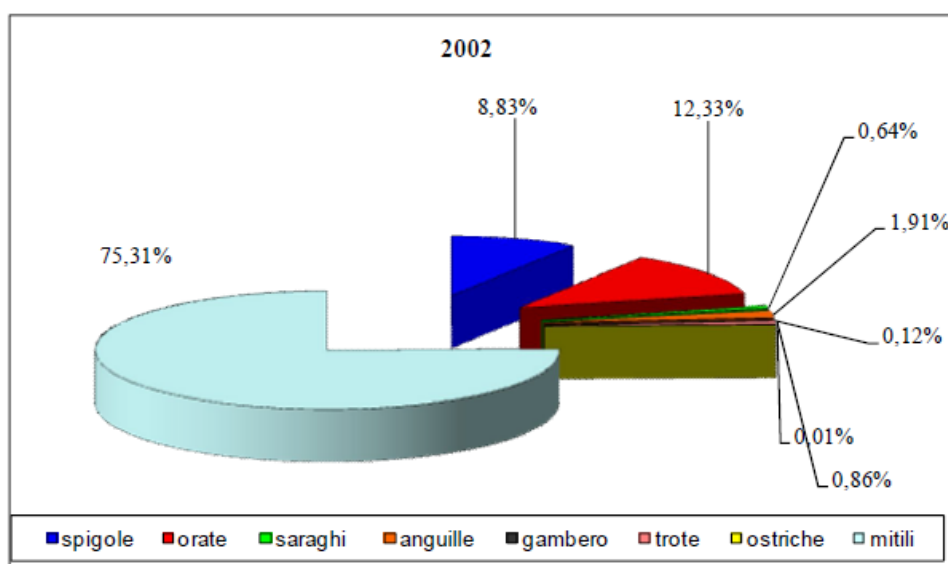
Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Il sistema a pali fissi consiste nella disposizione schematica di pali (in legno, cemento o metallo) collegati tra loro da cavi a cui vengono appese le reste: reti tubolari in materiale plastico contenenti i mitili. Il sistema a filari galleggianti invece è composto da due corpi morti di ancoraggio, posti ad una distanza variabile da 100 a 200 metri, collegati tra loro da uno o più cavi mantenuti in sospensione da una successione di galleggianti. A tali cavi vengono appese le reste di mitili. Ad eccezione del sistema a fondale, di tipo estensivo, gli altri sistemi comportano alcune operazioni di lavorazione come il reperimento dei giovanili e la loro immissione nelle reti a formare le reste. I molluschi bivalvi si nutrono di fitoplancton e particolato organico filtrando elevate quantità d'acqua ed è per questo che gli impianti di molluschicoltura vengono in genere realizzati in zone lagunari, riparate, spesso in corrispondenza della foci di fiumi, dove l'apporto e la presenza di sostanza organica è notevole. D'altra parte la strategia alimentare dei molluschi bivalvi, attraverso la filtrazione di grandi volumi di acqua, comporta il rischio di accumulo di sostanze inquinanti presenti in essa; è dunque molto importante effettuare costanti controlli nelle aree impiegate per la molluschicoltura. Nel corso degli ultimi decenni del secolo scorso si è assistito al passaggio da una coltivazione nell'ambito delle lagune e degli stagni costieri a quello in mare aperto. Il fenomeno è stato determinato principalmente dal peggioramento delle caratteristiche igienico-sanitarie delle acque dei bacini che hanno scambi limitati con il mare. La disponibilità di tecnologie appropriate ha favorito questo passaggio che coniuga la duplice esigenza di ottenere un prodotto igienicamente conforme con performance produttive economicamente rilevanti.

I mitili allevati oggi in Italia provengono soprattutto da allevamenti a mare (long-line), e solo in minima parte da acque lagunari; le modalità operative utilizzate per la pesca dei molluschi sono simili in ambedue le tipologie.

La Sardegna riveste una posizione di rilievo nel comparto dell'acquacoltura italiana. L'Isola si colloca tra i primi posti nella graduatoria regionale con una produzione di circa 1.300 T di specie eurialine, pari a circa 8,5% della produzione complessiva e oltre 7.000 T di molluschi fra cui i mitili rappresentano il 5% della produzione nazionale (Figura 4.3).

Figura 4.3. Indagine conoscitiva sulla produzione ittica nella Regione Sardegna - LAORE, 2009.



La Sardegna produce ogni anno duemila tonnellate di pesce, circa il venti per cento dell'intero pescato nazionale, ma potrebbe agevolmente raddoppiare il volume d'affari, arrivando anche a cinquemila tonnellate annue. La produzione sarda purtroppo ha sofferto nell'ultimo anno le sfavorevoli condizioni meteo-marine, in particolare tra

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

ottobre e novembre, e la transizione in mare aperto di molti impianti di allevamento a terra.

L'allevamento è frequentemente gestito da cooperative di pescatori, è condotto come attività complementare alla pesca e si limita alla costruzione di strumenti di cattura nei canali di scambio idrico stagno-mare.

Questa tipologia acquicola estesa su oltre 9.000 ettari, assume una particolare valenza per il fatto che, attraverso la gestione produttiva di queste zone umide altamente sensibili alle modificazioni ambientali, vengono promosse modalità conservative di interazione tra attività umana e ambiente, ritenute in grado di fondarsi su validi presupposti economici.

4.3. Produzione ed allevamento dei molluschi bivalvi, aspetti normativi

Il Regolamento (CE) 852/2004, ha esteso il controllo igienico-sanitario di alimenti e mangimi anche alla produzione primaria, quindi anche alla molluschicoltura; pertanto, i molluschi bivalvi vivi e per analogia gli echinodermi, i tunicati e i gasteropodi marini vivi, vengono ad essere disciplinati lungo tutta la filiera alimentare fino al consumatore finale. Secondo quanto stabilito dal Regolamento (CE) n. 853/2004, che fissa norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, e dalle Linee Guida Nazionali sui molluschi bivalvi, i produttori possono immettere sul mercato solo quei molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini vivi provenienti da “zone classificate”. In base all'Allegato II del Regolamento (CE) 854/2004, che stabilisce, da

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

una parte, le norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali (dei prodotti di origine animale destinati al consumo umano, capo II, punto A, comma 2) e, dall'altra stabilisce che l'Autorità competente classifichi le zone di produzione in cui essa autorizza la raccolta di molluschi bivalvi vivi in base al livello di contaminazione fecale. Le zone di produzione sono quelle aree marine, lagunari o di estuario dove si trovano banchi naturali di molluschi bivalvi oppure sono quei luoghi utilizzati per la coltivazione di molluschi bivalvi, dove questi ultimi vengono raccolti vivi. La classificazione delle zone di produzione avviene in base all'appartenenza ad una delle seguenti tre categorie in funzione del livello di contaminazione microbiologica (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp.):

1) Zone di Classe A, sono le zone da cui possono essere raccolti molluschi bivalvi vivi da destinare direttamente al consumo umano attraverso un Centro di Spedizione riconosciuto. I molluschi bivalvi vivi raccolti da queste zone devono soddisfare i seguenti requisiti: a) *Escherichia coli*: minore o uguale a 230 MPN/100 g di polpa e liquido intervalvare; b) *Salmonella* spp.: assente in 25 g di polpa

2) Zone di Classe B, sono le zone da cui i molluschi bivalvi vivi possono essere raccolti ed immessi sul mercato ai fini del consumo umano soltanto dopo aver subito un trattamento in un Centro di Depurazione o previa stabulazione al fine di soddisfare i requisiti previsti per la zona A, oppure possono essere inviati ad un Centro di Trasformazione nel rispetto di quanto indicato nella Sezione VII, Capitolo II, lettera A, dell'Allegato III del Regolamento (CE) 853/2004. I molluschi bivalvi vivi raccolti da queste zone devono soddisfare i seguenti requisiti: a) *Escherichia coli*: minore o uguale a 4.600 MPN/100 g di polpa e liquido intervalvare;

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

3) Zone di Classe C, sono le zone da cui i molluschi bivalvi vivi possono essere raccolti ed immessi sul mercato ai fini del consumo umano diretto soltanto previa stabulazione di lunga durata (maggiore o uguale a due mesi) al fine di soddisfare i requisiti previsti per la zona A oppure inviati ad un centro di trasformazione nel rispetto di quanto indicato nella Sezione VII, Capitolo II, lettera A, dell'Allegato III del Regolamento (CE) 853/2004. I molluschi bivalvi vivi raccolti da queste zone devono soddisfare i seguenti requisiti: a) *Escherichia coli*: minore o uguale a 46.000 MPN/100 g di polpa e liquido intervalvare.

Le zone di stabulazione sono invece quelle aree marine, lagunari o di estuario, chiaramente delimitate e segnalate mediante boe, paletti o qualsiasi altro strumento fisso e destinate esclusivamente alla depurazione naturale dei molluschi bivalvi vivi. Le zone di stabulazione dei molluschi bivalvi vivi devono possedere le stesse caratteristiche previste per le zone di classe A, pertanto i molluschi bivalvi vivi raccolti da queste zone devono soddisfare i seguenti requisiti: a) *Escherichia coli*: minore o uguale a 230 MPN/100 g di polpa e liquido intervalvare; b) *Salmonella* spp.: assente in 25 g di polpa.

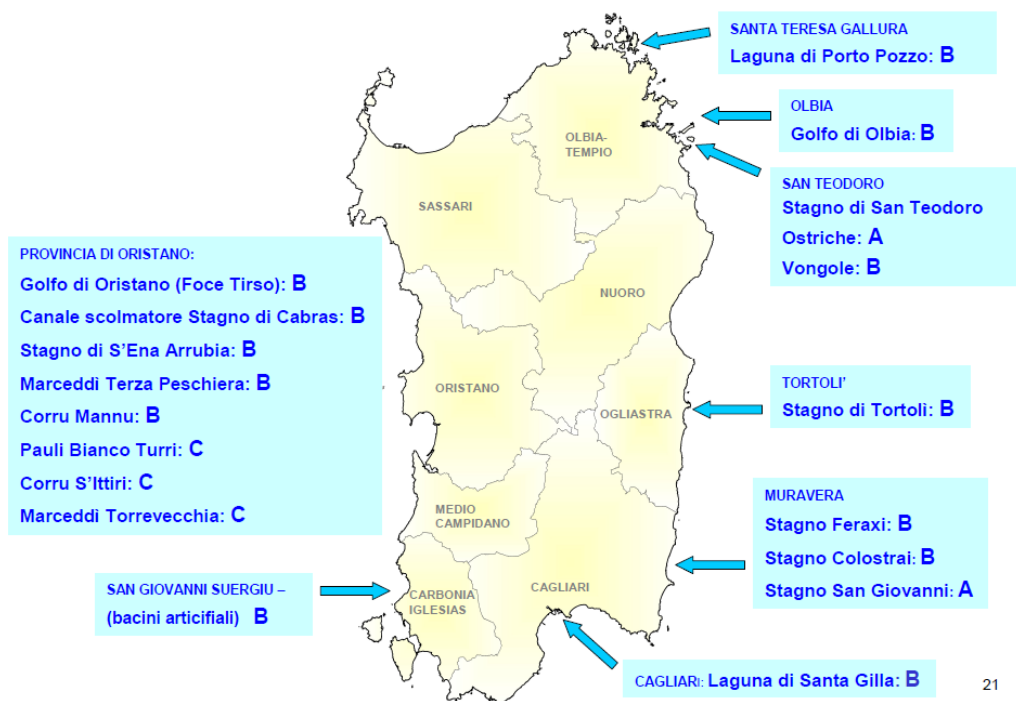
La Tabella 4.1 riporta i valori di *Escherichia coli* e di *Salmonella* spp. caratteristici di ogni singola zona classificata, viene riportato il metodo analitico per la ricerca del parametro microbiologico ed l'eventuale trattamento necessario prima di immettere il prodotto al consumo umano (Tabella 4.1). Nella figura 4.4 sono rappresentate le zone di produzione e stabulazione dei molluschi bivalvi (Figura 4.4.1 e Figura 4.4.2). Tale classificazione, a tutt'oggi è cambiata; a partire dal 2011, tutte le zone sono state classificate come "zona di Classe B" eccetto la zona denominata "Capo San Marco",

che è classificata come zona di stabulazione unicamente per la specie *Mytilus galloprovincialis*.

Tabella 4.1. Analisi microbiologiche per la classificazione delle Zone di produzione, secondo quanto è riportato dal Piano Regionale RAS 2009 – Regione Sardegna.

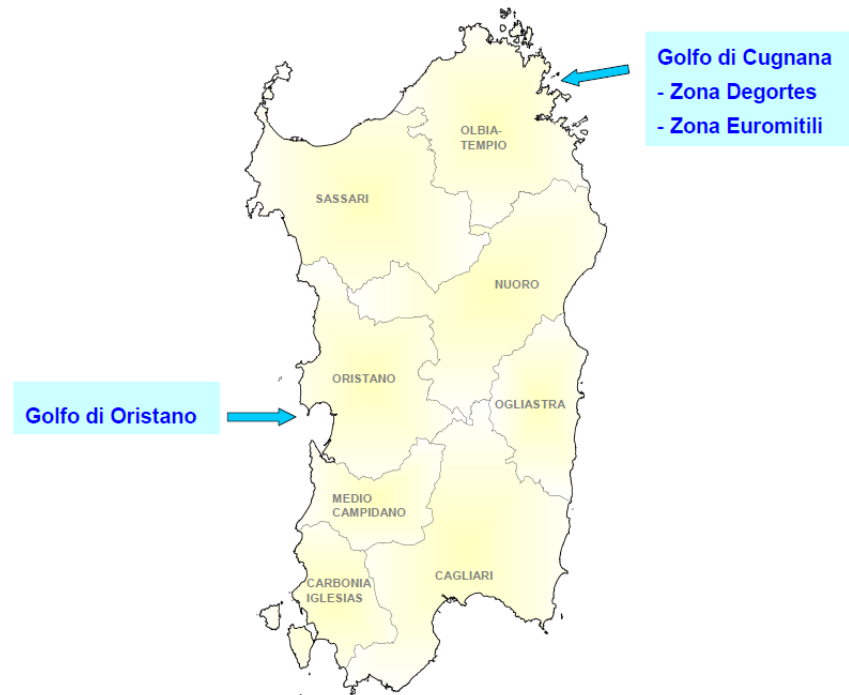
CLASSE	STANDARD MICROBIOLOGICO	TRATTAMENTO RICHIESTO
A	<i>Escherichia coli</i> : ≤ 230 per 100 g di polpa e liquido intervalvare (metodo ISO TS 16649-3). <i>Salmonella spp.</i> : assente	Nessuno
B	<i>Escherichia coli</i> : ≤ 4.600 per 100 g di polpa e liquido intravalvare (metodo ISO TS 16649-3)	1) Depurazione in stabilimenti riconosciuti; 2) Depurazione naturale in zone classificate ai fini della stabulazione 3) Trasformazione in stabilimenti riconosciuti.
C	<i>Escherichia coli</i> : ≤ 46.000 per 100 g di polpa e liquido intravalvare (metodo ISO TS 16649-3)	Stabulazione di lunga durata (≥2 mesi) oppure trasformazione in stabilimenti riconosciuti . L' 'Autorita' competente può stabilire un tempo di depurazione inferiore ai 2 mesi sulla base di un'analisi del rischio effettuata dall'operatore stesso.
Proibita	Qualora i valori riscontrati siano maggiori di 46.000 <i>Escherichia coli</i> per 100 g di polpa e liquido intravalvare (metodo ISO TS 16649-3)	Divieto di raccolta

Figura 4.4.1 Zone di produzione molluschi bivalvi – Regione Sardegna



Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Figura 4.4.2 Zone di stabulazione dei molluschi bivalvi – Regione Sardegna riferimento all’anno 2010.



4.4. Bibliografia

Bayne B.L., 1976. Marine mussels their ecology and physiology. London: Syndics of the Cambridge University Press.

Grégoire C., 1961. Structure of the conchiolin cases of the prisms in *Mytilus edulis* Linne. *The Journal of Cell Biology*; 9(2): p. 395-400.

Hagenau, A., 2009. Structural analysis of proteinaceous components in byssal threads of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Macromolecular Bioscience*, 9(2): p. 162-168.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

- Mengoli, A., Aspetti morfo-funzionali dei mitili, in Laguna. 1998. p. 12-19.
- Pesca, C.E. 2011. Tecniche di acquacoltura.
- Pierce S.K., 1971. A source of solute for volume regulation in marine mussels. Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology,. 38(3): p. 619-635.
- Potts W.T.W., 1966. Excretion in the molluscs, in Biological Reviews, C.P. Society, Editor.;1-41.
- Riedl R., 1991. Fauna e Flora del Mediterraneo -dalle alghe ai mammiferi: una guida sistematica alle specie che vivono nel Mar Mediterraneo; Franco Murzio Editore.
- Tamarin A. and Keller P.J. 1972, An ultrastructural study of the byssal thread forming system in Mytilus. Journal of Ultrastructure Research; 40(3-4): p. 401-416

CAPITOLO 5

Monitoring on the presence of Norovirus, hepatitis A virus and bacterial contamination in edible lamellibranch molluscs in Sardinia

Pubblicato in forma adattata:

Atti Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria – XIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. – Trani (Italia) 2011 – Comunicazione orale

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Monitoring on the presence of Norovirus, hepatitis A virus and bacterial contamination in edible lamellibranch molluscs in Sardinia

5.1. Summary

In compliance with EU regulations, the safety of shellfish products is evaluated according to bacteriological parameters (*Salmonella* spp. and *Escherichia coli*) as provided for by Regulation (EC) No. 2073/2005, biotoxicological parameters, as provided for by Regulation (EC) No. 853/2004, and chemical parameters, as provided for by Regulation (EC) No. 1881/2006. This essay focuses on the evaluation of Norovirus genogroup GI (NoV GI), Norovirus genogroup GII (NoV GII), hepatitis A virus (HAV), *E.coli* and *Salmonella* spp. concentration levels in Edible Bivalve Molluscs (EBM) populations, farmed from 2009 to 2011 in Sardinia Region (Italy).

5.2. Introduction

It has been known for some time that food can transmit pathogens to humans of both viral and bacterial nature, being therefore a severe public health issue. One of the main food categories causing foodborne infection and/or toxic infection is the EBM, that plays an important role in the transmission of several human pathologies (Mesquita *et al.*, 2011; Westrell *et al.*, 2010). Being filtering organisms, during their continuous filtration activity, these animals can retain and concentrate in their body not only the plankton necessary for their metabolism, but also bacteria, parasites, toxic microalgae

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

and the viruses present in the environment where they live in (Oliveira *et al.*, 2011); for this reason, they are regarded as some of the most frequently involved in foodborne events and outbreaks (Patel *et al.*, 2009). Shellfish farming in Sardinia is the main activity connected to the fish species farmed in the aquaculture industry, whose production is based mainly on the breeding of mussels, oysters and clams. To protect the health of consumers, sanitary regulations (standards) have been set to guarantee the healthiness of the products, in addition to the classification of the waters where bivalves live and/or are farmed, and also the obligation of mollusc depuration at specific treatment centers (C.D.M.). The marketing of these products is regulated by European legislation [Regulations (EC) No. 853/2004, 854/2004, 2073/2005, 2074/2005, 1881/2006 and subsequent modifications and integrations] establishing microbiological, chemical hygiene requirements [Regulation (EC) No. 2073/2005 and Regulation (EC) No. 1881/2006] and biotoxicological requirements Regulation (CE) 853/2004). In particular, Regulation (EC) No. 2073/2005 lays down the microbiological criteria based only on the determination of some "bacteriological parameters" (*Salmonella* spp. and *E.coli*). However, the same regulation underlines that the determination of faecal indicators (not linkable to each other but whose limits determine the marketing), is not reliable to prove the absence of viral contamination and to evaluate purification timing and processes, when they are applied. In Italy, the reported cases of infectious gastroenteritis in people of all ages, from hepatitis A virus (HAV) and Norovirus (NoVs) are still many, with an incidence of 2 cases/100,000 inhabitants (Ward R.L. & Akin E.K., 1984). Both viruses are spread fecal-oral route; the infectious dose is very low, usually 1-10 viral units, and have a high environmental stability and, unlike bacteria, do not multiply in food and do not produce toxins; they can only be

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

transmitted upon ingestion (Patel *et al.*, 2009). Since the production and marketing of Live Bivalve Molluscs (LBMs) intended for human consumption or further processing before human consumption, is governed by EU regulations which lay down, as reported above, tolerance limits only for microbiological, chemical and biotoxicological contaminants, this work aims to evaluate this category of food, with regard to the potential presence of enteric viral contaminants, evaluating the data in relation to the presence or absence of bacteria such as *Salmonella* spp. and *E. coli*.

5.3. Materials and Methods

The survey was conducted in accordance with the Regional Plan for surveillance and Health control of the production and marketing of bivalve molluscs, and for the monitoring of production areas of LBMs on 2008, whose plan was integrated into the National Integrated Plan of the Ministry of Health 2011-2014. In the years 2009, 2010 and in the period between January and June 2011 a total of number of 5842 analyses were conducted, 1441 of which for Norovirus (NoV GI, NoVGII) and hepatitis A virus (HAV), 1126 for *E.coli* and 1834 for *Salmonella* spp.. The species of bivalve molluscs belonged to the following species: *Mytilus galloprovincialis* (mussels), *Tapes decussatus/semidecussatus* and *Tapes philippinarum* (clams), *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (oysters) (Table 1). The samples were collected in class A and class B areas in the Region of Sardinia. Microbiological checks for *Salmonella* spp. and the Most Probable Number (MPN) evaluation for *E.coli* were performed using UNI EN ISO 6579: 2004 and ISO TS 16649-3:2005 analytical standard methods. For virological

testing for hepatitis A, NoV GI and NoV GII, the one-step TaqMan Real Time RT-PCR Protocol was implemented, provided by the Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica – Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) for the control of viral contamination in bivalve molluscs of the Istituto Superiore di Sanità –Rome, Italy.

Such Protocol provided for the preparation of all specimens as follows: collection of 2.0 ± 0.2 g of hepatopancreas from each pool of LBMs, to which 2.0 ml of Proteinase K solutions were added (30 U/mg), incubated at $37.0 \pm 1.0^\circ$ C, shook for 60 ± 5 min and then incubated a second time at $60.0 \pm 2.0^\circ$ C \pm for 15 ± 1 min in bain-marie. A 3000g centrifugation was performed for 5 min., then the supernatant was collected and brought to volume of 3 ml with sterile PBS (pH 7.3). The nucleic acid extraction was performed using the mini kit QIAamp® Viral RNA kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions, for samples collected in 2009. Starting from the year 2010 to date, the extraction has been made using the NucliSENS® Magnetic Extraction miniMAG (Biomérieux) protocol, following the manufacturer's instructions. The method used at the NRL (National Reference Laboratory - ISS) for the selection of primers and probes (Croci, 2009) was implemented. Retrotranscription and the one-step Real Time PCR were made with an Applied Biosystems ABI Prism 7700 and 7900. The reverse transcription was carried out at 55° C for 60 min, followed by denaturation at 95° C for 5 min and 45 PCR cycles (denaturation at 95° C for 15s, annealing at 60° C for 1 min, extension at 65° C for 1 min). For each run, two negative controls and a positive control consisting of Norovirus-extracted RNA were carried out. The samples were regarded as positive when $Ct \leq 44.0$ in at least 2 runs.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

5.4. Results and Discussion

The results obtained in this study, referred to a considerable number of analyses, reveal interesting analytical data and therefore require appropriate consideration. The presence of NoV GI was detected in 121 samples (8.4%) while NoV GII in 396 of the total 1441 samples analyzed (27.5%). The hepatitis A virus was not detected in any test. *Salmonella* spp. was present in 17 samples (0.9%) 15 of which in mussels (0.8%) and 2 in clams (0.1%). *E.coli* was detected in 73 (6.5%) samples, 52 of which in mussels (4.6%), 2 in oysters (0.17%) and 19 in clams (1.73%) (Figure 1; Table 2). One sample registered a value of 230 MPN/100gr., at a class A area, while all other samples, collected at a class B area, had values exceeding the maximum 4600 MPN/100gr. value. Their non-compliance was therefore confirmed. All possible actions have been implemented to track back the steps of the process leading to the commercialization of the products and the competent authorities were informed so that the most appropriate measures could be taken with or against the holder of the products and the producers. The analysis of the data concerning the bacteriological checks carried out on samples of mussels sold in the region of Sardinia during the period of time under study, shows that the risk of infection related to the consumption of such products is very low, with particular reference to *Salmonella* spp. The co-presence of *Norovirus* and *E.coli* was confirmed only in the mussel samples collected in 2010, with a positive share amounting to 13 samples. However, several studies show that the use of faecal indicators as *E.coli* is not significant for an indirect assessment of possible contamination by enteric viruses in these fish products. It is interesting to observe that the presence of this pathogen exceeding the legal threshold, was found in products

farmed in high anthropic impact areas (Corrian *et al.*, 2007). Our data suggest that the co-presence of both Norovirus Genogroup GI and GII was detected in 62 samples in 20011 and in 50 June 2011 samples. In conclusion, the Regional Surveillance and Monitoring Plan can ensure the proper level of sanitary control over the production and marketing of LBM on the regional territory. The consumer is protected by the Laboratory, that, in the event of unfavourable results, immediately informs the competent authorities for the purpose of verifying the conditions of the production and in special cases the with drawal of the product from the market. The results of this survey show that the presence of Noroviruses in bivalve molluscs is a critical health issue; foodborne diseases caused by this pathogen are increasing and bivalve mussel farms are badly affected by the contamination of such viruses. Given their pervasiveness and high infectivity, new control measures must be designed to tackle this issue, such as the identification of high-risk areas and the implementation of more sophisticated, innovative and effective technologies to be applied to purification systems.

5.5. Figures

5.5.1. *Figure 1.* Percentage of positive shellfish samples for microbiological parameters tested in 2009 -2010 -2011

5.6. Tables

5.6.1. *Table 1.* Live Bivalve Molluscs test – no. samples analyzed in the year: 2009-2010-2011

5.6.2. *Table 2.* Shellfish positive samples in the 2009 – 2010 – 2011

Figure 1. Percentage of positive shellfish samples for microbiologica parameters tested in 2009 -2010 - 2011

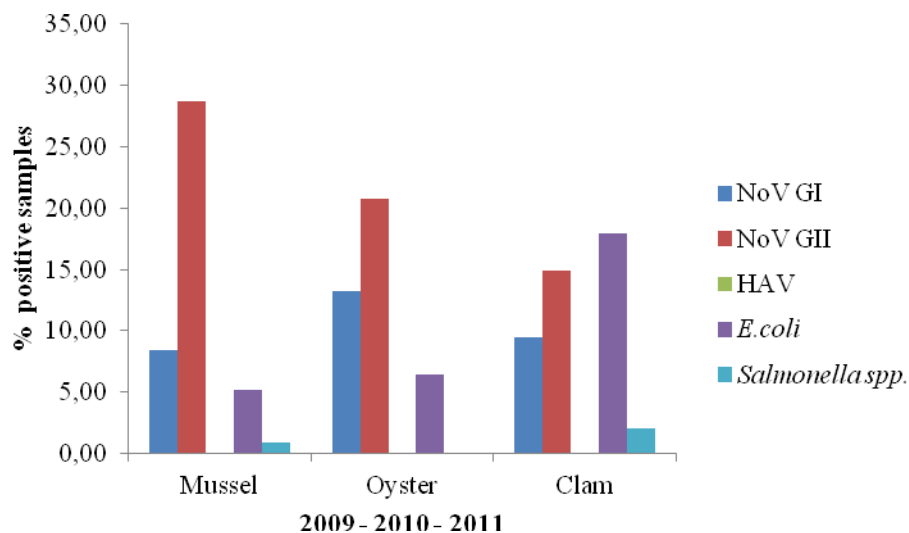


Table 3. Live Bivalve Molluscs test – no. samples analyzed in the year: 2009-2010-2011

Number of surveys	<i>NoVs</i>	<i>HAV</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>
<i>Mussels</i>	1294	1294	989	1713
<i>Oysters</i>	53	53	31	22
<i>Clam</i>	94	94	106	99

Table 4. Shellfish positive samples in the 2009 – 2010 – 2011

Samples	<i>NoV GI</i>	<i>NoV GII</i>	<i>HAV</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>
<i>Mussels</i>	105	371	0	52	15
<i>Oysters</i>	7	11	0	2	0
<i>Clams</i>	9	14	0	19	2

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

5.8. References

- Corrian C., Arcangeli G., Fasolato L., Manfrin A., Rossetti E., Piazzzi E., Mioni R., Pavoni E., Losio N., Sanavio G., Suffredini E., Croci L., 2007. Influenze climatico ambientali sulla presenza di virus enterici in molluschi bivalvi. *Ind. Alim.* XLVI; 277-283.
- Croci L., 2009. Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica – Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali dei molluschi bivalvi. Protocollo operativo: Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante Real Time PCR.
- Mesquita J.R., Vaz L., Cerqueira S., Castilho F., Santos R., Monteiro S., Manso C.F., Romalde J.L., Nascimento M.S.J., 2011. Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. *Food Microbiology*; 28 (5), 936-41.
- Oliveira J., Cunha A., Castilho F., Romalde J.L., Pereira M.J., 2011. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives - A mini-review. *Food Control*; 22, 805-816.
- Patel M.M., Hall A.J., Vinjé J., Parashar U.D., 2009. Noroviruses: Comprehensive review. *Journal of Clinical Virology*; 44, 1-8.
- Terio V., Martella V., Moschidou P., Di Pinto P., Tantillo G., Buonavoglia C., 2010. Norovirus in retail shellfish. *Food Microbiology*; 27, 29-32.
- Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Ward R.L., Akin E.K., 1984. Minimum infectious dose of animal viruses. *CRC Crit. Rev. Environ. Contr.*; 14, 297-310.

Westrell T., Dusch V., Ethelberg S., Harris J., Hjertqvist M., Jourdan-da Silva N., Koller A., Lenglet A., Lisby M., Vold L., 2010. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Rapid Communications* – www.eurosurveillance.org; 1-4.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

CAPITOLO 6

Presence of Norovirus in imported shellfish in Sardinia Region

Publicato in forma adattata:

4th Congress of European Microbiologist – Federation of European Microbiological Societies – F.E.M.S. – Geneva (Switzerland) 2011 – Short communication

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

6.1. Abstract

Norovirus (NoV) of genogroup I (GI) and genogroup II (GII) are a common cause of gastroenteritis outbreaks associated with consumption of raw shellfish (mussels, clams and oysters) and RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) notifications have repeatedly shown the presence of NoV in food products, including mussels. The Sardinia Region is one of the largest Italian Regions involved in molluscs production and marketing, commercialising both local and imported products. The aim of this study was to evaluate the frequency of NoV contamination in shellfish imported from other European Countries. Twenty-eight shellfish samples were collected from July 2009 to December 2010 by the local PIFs (Imported Products Inspection Laboratories) and analysed for NoV presence. Analysis was performed by one-step real time RT-PCR and eleven samples (39%) were found positive for NoV GII showing a considerable frequency of the contamination, especially in comparison with the data obtained in previous studies on local production (approximately 10% of NoV contaminated samples).

6.2. Introduction

Noroviruses belong to the group of enteric viruses and are small, non enveloped viruses possessing a ssRNA(+) genome. The Norovirus genus belongs to the *Caliciviridae* family and is divided into five genogroups (GI to GV) with GI, GII and GIV identified in human infections. The epidemiological information on viral gastroenteritis caused by NoV in Italy are fragmentary and, in Sardinia as in the Country, the reported cases of acute gastroenteritis outbreaks and/or of human infections due to Norovirus are underestimated. The infection is frequently associated, according to the literature and to the data of the Center for Disease Control (CDC) of Atlanta (USA), to the consumption of raw shellfish but infection can also occur by person-to-person contact. Filter-feeding shellfish, in fact, are an important source for transmission of enteric viral disease, since they are able to accumulate and concentrate waterborne pathogens. For this reason the RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) has often reported the presence of NoV in these products. The Sardinia Region is one of the largest trade areas involved in the production and marketing of shellfish and the official control of this product is one of the tasks of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale (Experimental Zooprophyllactic Institute) of Sardinia. During the period from July 2009 to December 2010 an investigation was carried on mollusks imported from other European Countries (Spain, France and Greece). Twenty eight samples were subjected to analysis for NoV, as well as to the detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and algal biotoxins, according to the criteria of suitability for consumption defined in Regulation (EC) No. 2073/05.

6.3. Materials and Methods

Shellfish sampling

A total of twenty-eight shellfish samples, including *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus edulis* and *Tapes decussatus*, were examined. Nine samples originate from Spain, ten from France and nine from Greece. All the samples were collected from two sampling points in the North and Centre of Sardinia (Figure 1). For analysis 2.0 ± 0.2 g digestive gland were dissected from each sample pool and were treated with 2.0 ml of proteinase K (30 U / mg), incubated at $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ in agitation for 60 ± 5 min and then subjected to a second incubation at $60.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ for 15 ± 1 min in a water bath. Samples were therefore centrifuged $3000 \times g$ for 5 min and the supernatant was recovered and brought to a final volume of 3 ml with sterile PBS (pH 7.3).

Viral nucleic acid extraction

The nucleic acid extraction was performed on 500 ml of sample suspension using the Nuclisens® Magnetic Extraction Kit – MiniMag® (BioMérieux) following the manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR was performed according to the NRL (National Reference Laboratory – Istituto Superiore di Sanità) method.

Real-time RT-PCR amplification for NoVs

The reverse transcription and real-time one-step PCR were performed with the ABI Prism 7900 instrument (Applied Biosystems) using the Superscript III Platinum® One-step qRT-PCR kit with ROX (Invitrogen). The reverse transcription was performed at 55°C for 60 minutes, followed by denaturation at 95°C for 5 minutes and 45 cycles of

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

PCR (denaturation at 95°C for 15 seconds, annealing at 60°C for 1 minutes, extension at 65°C for 1 minutes). For each reaction a process control, an amplification control and negative control were used to assess the performance of the analysis. The samples were considered positive when a $Ct \leq 44.0$ was present in at least two replicates.

6.4. Results

Eleven samples (39%) (Figure 2), all imported from Spain (Figure 3), were positive for NoV, whereas no contamination was detected in samples from France and Greece (Figure 4 and 5). All analyzed products were free of *Salmonella* spp. and below the limits established for *Escherichia coli* and algal biotoxins. Consequently, despite the presence of NoVs in 39% of them, the molluscs were suitable for distribution to the market and fit for consumption according to the Regulation (EC) No. 2073/05.

6.5. Discussion

During the research period the Rapid Alert System of the European Commission showed a significant increase in NoV detection in shellfish distributed across Europe. Shellfish marketing is regulated by European Regulations (EC) No.853/04, 854/04, 2073/05, 2074/05, 1881/06; in particular, EC Regulation No. 2073/05 establishes *Salmonella* spp and *E.coli* as the only microbiological criteria for shellfish consumption. The same regulation, however, underlines that the determination of faecal indicators can not reliably demonstrate the absence of viral contamination. On the basis of the results

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

of the monitoring on imported shellfish and of the official control in the period during which these products were marketed, there was a correlation between detection of NoV and samples belonging to companies that purchased the Spanish shellfish. The results highlight, not only the need to integrate the existing European Regulations on food safety Regulation (EC) No. 2073/05, with adequate virological controls, but also that business operators should pay particular attention to virus contamination in imported products, improving their self-control programs.

6.6. Figures

6.6.1. *Figure 1.* – Collection site: Gulf of Olbia in the northeast of the region; Gulf of Oristano south west of the region.

6.6.2. *Figure 2.* – Percentage of shellfish analyzed during the study

6.6.3. *Figure 3.* – Number of Spanish shellfish tested in the study

6.6.4. *Figure 4.* – Number of French shellfish tested in the study

6.6.5. *Figure 5.* – Number of Greeks shellfish tested in the study

Figure 1. Sampling site: Gulf of Olbia in the northeast of the Sardinia region; Gulf of Oristano in the center west of the Sardinia region

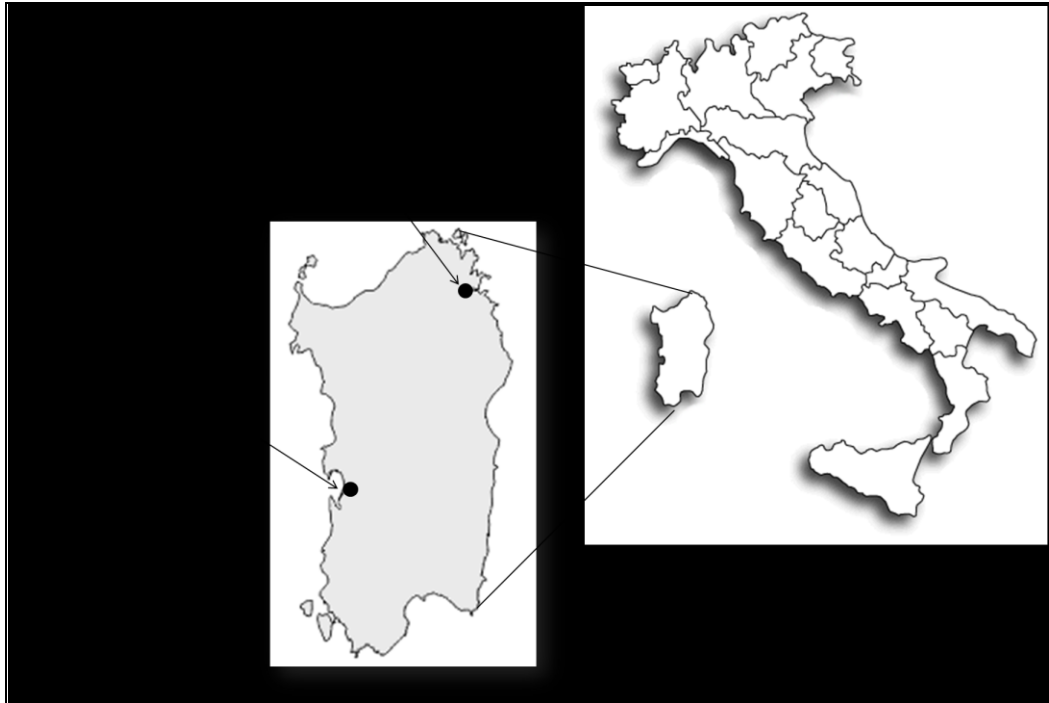
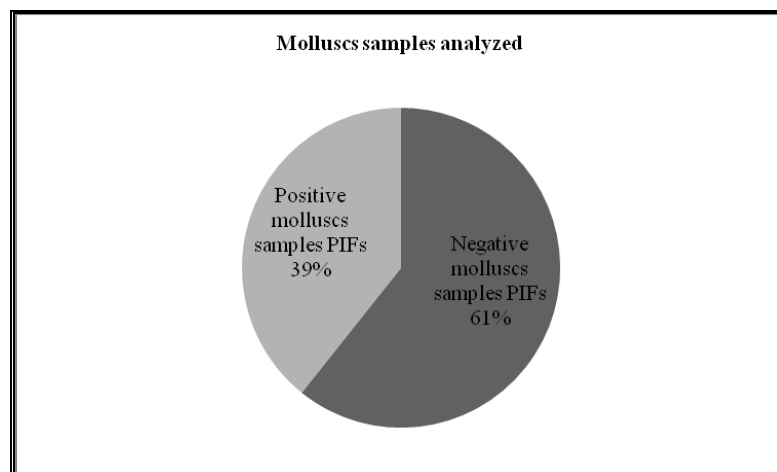


Figure 2. Percentage of shellfish analyzed during the study



Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Figure 3. Number of Spanish shellfish tested in the study

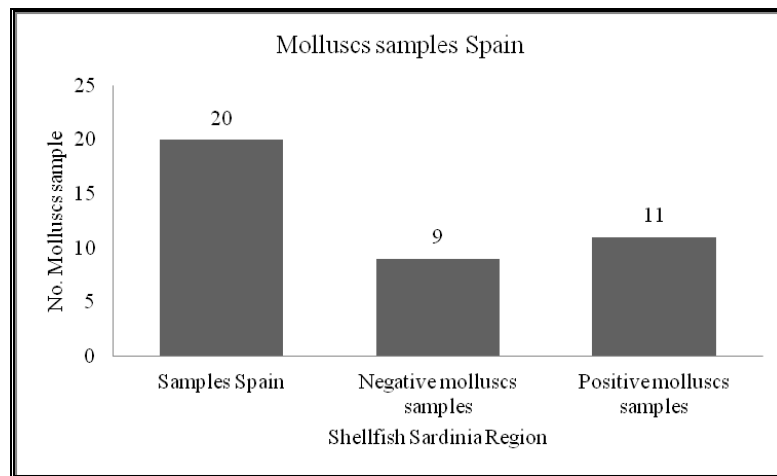


Figure 4. Number of French shellfish tested in the study

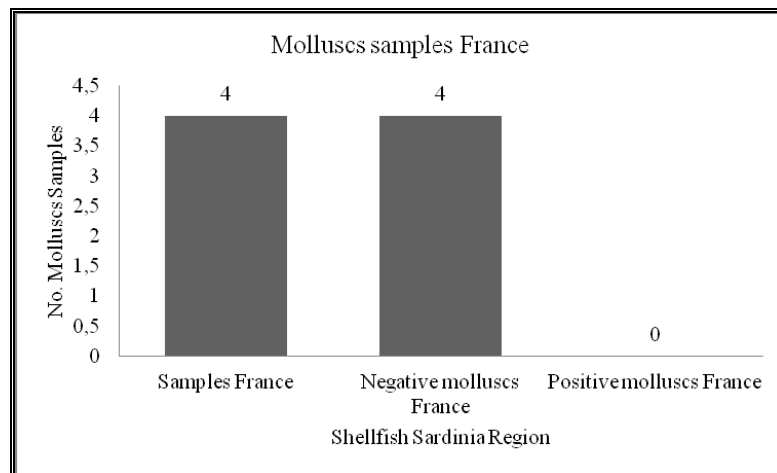
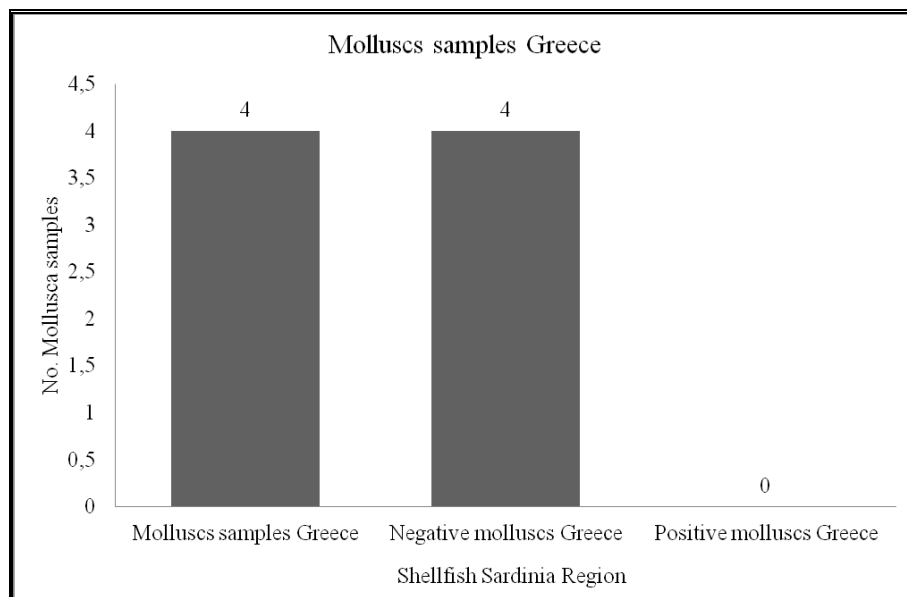


Figure 5. Number of Greeks shellfish tested in the study



6.7. References

Abad F.X., Pinto R.M., Bosch A., 1997. Disinfection of human enteric viruses on fomites. FEMS, Microbiol. Lett.; 156, 107-111.

Cliver D.O., 1988. Virus transmission via foods technology.

Gerba C.P., 2000. Assessment of enteric pathogen shedding during recreational activities and its impact on water quality. Quant. Microbiol.; 2, 55-68.

Suffredini E., Pepe T., Ventrone I., Croci L., 2011. Norovirus detection in shellfish using two Real-Time RT-PCR methods. New Microbiologica; 34, 9-16.

CAPITOLO 7

Study on the Norovirus presence in *Mytilus galloprovincialis* subjected to depuration in two C.D.Ms. in the Sardinia region

Pubblicato in:

Italian Journal of Food Safety, Vol. 1 N. 4 Giugno 2012

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Study on the Norovirus presence in *Mytilus galloprovincialis* subjected to depuration in two C.D.Ms. in the Sardinia region

7.1. Summary

Noroviruses (NoVs), known as Norwalk-Like Viruses (NLV) or Small-Round-Structured-Viruses (SRVS), are among the most frequent causes of acute viral gastroenteritis in human beings, often associated with food poisoning, if raw or poorly cooked bivalve molluscs (mussels, clams and oysters) are ingested. In compliance with EU regulations, the safety of these products is evaluated according to bacteriological parameters (*Salmonella* and *E.coli*) as provided for by Regulation (EC) No. 2073/2005, biotoxicological parameters, as provided for by Regulation (EC) No. 853/2004, and chemical parameters, as provided for by Regulation (EC) No. 1881/06. This essay focuses on the evaluation of NoV concentration levels in *Mytilus galloprovincialis* populations, farmed in 2009 in two different Mussels Depuration Centers (CDMs) in Sardinia (Italy). During the assessment procedures, Noroviruses were detected for the first time on the regional territory with one-step TaqMan real-time RT-PCR.

7.2. Introduction

Noroviruses (NoVs) are the main cause of epidemic non-bacterial gastroenteritis in the world affecting adults and children (Patel *et al.*, 2009). Epidemiological information on

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

viral gastroenteritis caused by NoVs in our country are scarce and fragmented, and particularly, in Sardinia, acute gastroenteritis and/or human infection Norovirus reported cases are underestimated (<http://www.izs-sardegna.it>). According to reported data and the Centre of Disease Control (CDC) of Atlanta (USA), the infection is frequently associated to the consumption of raw shellfish (Terio *et al.*, 2010). The NoVs belong to the group of enteric viruses and are small viruses with RNA genome consisting of a single positive polarity filament (Scipioni *et al.*, 2008). It takes just a few particles of virus (viral infectious dose 10-100 units) to cause an infection. The viral transmission is most commonly transmitted through ingestion of contaminated food. The infection can also occur by air, through the transmission of aerosol particles (Scipioni *et al.*, 2008). The Norovirus Genus belongs to the Caliciviridae family; they are highly heterogeneous viruses in genetic terms, but their global ecology is not yet known. On the basis of the differences in the amino acid sequences of the capsid-protein, the Norovirus are divided into 5 genogroups: I, II and IV that cause infection in humans and III and V that determine infection in animals (Scipioni *et al.*, 2008). The lamellibranch molluscs, as filtering organisms, during their continuous and intense filtration, have the ability to retain and concentrate in their organism not only plankton, necessary for their metabolism, but also bacteria, parasites, biotoxin algae and viruses (Schwab *et al.*, 1998; Prato *et al.*, 2004; Le Guyader *et al.*, 2006; , Ueki *et al.*, 2007; Watzinger *et al.*, 2006). For this reason, animals are considered at high risk of infection. This work was conducted in 2009. At that time, the marketing of these animals was regulated by various European regulations (Council Regulations EC n.853/04, 854/04, 2073/05, 2074/05, No 1881/06 and subsequent amendments and additions) establishing the microbiological and chemical hygiene requirements (Reg. EC 2073/05 and Reg. EC

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

1881/2006). In particular, Reg. EC 2073/2005 laid down the microbiological criteria based only on the determination of some "bacteriological parameters" (*Salmonella* spp. and *E.coli*). The same regulation underlined however, that the determination of faecal indicators could not be reliable to demonstrate the absence of viral contamination and to assess the times of purification processes. The purpose of this research is to evaluate the presence of NoVs in *Mytilus galloprovincialis* produced and marketed in two Centres of Shellfish depuration (CDM) of the region of Sardinia, following the occurrence of some cases of viral contamination (NoVs) in bivalve molluscs coming from Class B areas (undergoing purification as provided for by EU regulations) which were already present on the local market. A total of 46 aliquots were analysed and 9 (19.56%) of them were positive to NoVs. For the identification of the target pathogen the following Protocol was implemented: one-step TaqMan Real Time RT-PCR (Watzinger *et al.*, 2006; Uhrbranda *et al.*, 2010; Chironna *et al.*, 2005).

7.3. Materials and Methods

The study was conducted simultaneously in two centers of Shellfish Purification (CDM A and CDM B) of the region of Sardinia, between the months of June and September 2009, for a period of 10 weeks in the CDM A and 13 weeks in the CDM B. In each plant a weekly collection of mollusc sample was made from a random batch to search for NoVs. Then each sample was divided into 2 parts: the first, not subjected to the purification process, was analyzed at time zero, while the second was analyzed after a purification of 48 hrs of duration. The analysis was not performed on sample collected

between time zero and the post purification. Sampling was performed exclusively for the search of NoVs on a total of 46 sample parts, in order to evaluate the effect of the treatment on the product before marketing. A total of 10 samples was collected in CDM 1 and 13 samples in the CDM B. The only species analysed was *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). All the molluscs came from class B areas. Of the 20 sample parts collected at CDM A, 10 were analyzed before purification at time zero, and the remaining 10 were analyzed after the process of 48 hr purification (Table 1); likewise, of the 26 sample parts collected at CDM B, 13 were analyzed at time zero and 13 after 48 h of treatment (Table 2). For the purification cycle both CDMs close circuit tanks were used, equipped with mechanical and chemical filtration systems and bins (Savini *et al.*, 2009). The seawater used in the circuit was treated with UV lamps (λ 254 nm, capable of eliminating enteric organisms) and chemically with ozone to prevent microbial contaminations. Based on the timing of purification applied by both companies (12 - 24h) for the control of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. and considering that the release time of enteric viruses are longer than those required for faecal bacteria or pathogenic bacteria, it was decided to bring in the maximum time of treatment to 48 hrs (Barile *et al.*, 2009). Such action was necessary since, for the period under study, purification times were not established to reduce the risk of viral infection, as a guarantee for the consumer and the producer. During each sampling, temperature, salinity and pH of the water used for purification were checked. The preparation of all samples consisted of the removal of 2.0 ± 0.2 g hepatopanceras by each pool to which 2.0 ml of proteinase K (30U/mg) were added, incubated at 37.0 ± 1.0 °C with 60 ± 5 min shaking and then in incubated a second time at 60.0 ± 2.0 °C for 15 ± 1 min in a water bath. A centrifugation was performed at 3000 g for 5 min. Then the supernatant

was recovered and brought to a volume of 3 ml with sterile Phosphate Buffered Saline (PBS) at pH 7.3 (Croci, 2009). The nucleic acid extraction was performed using the mini QIAamp ® Viral RNA kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The method in use at the NRL (National Reference Laboratory - ISS) for the selection of primers and probes (Croci, 2009) was implemented. The reverse transcription and the Real Time one-step PCR were performed with the ABI Prism 7700 instrument (Applied Biosystems) through the use of Superscript III Platinum ® one-step qRT-PCR kit with ROX (Invitrogen). The reverse transcription was carried out at 55 °C for 60 min, followed by denaturation at 95 °C for 5 min and 45 cycles of PCR (denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 1 min, extension at 65 °C for 1 min). For each run, two negative controls and a positive control consisting of Norovirus-extracted RNA were carried out. The samples were considered as positive when the CT \leq 44.0 in at least two different runs (Croci, 2009).

7.4. Results

The one-step Real Time RT-PCR protocol allowed the detection of the presence of Norovirus in the CDM A 4 sample parts (40%) analyzed before treatment and 1 part (10%) analyzed after purification, with a total of 20 parts (Table 1). In CDM B, results showed 4 positive parts (30.77%) analyzed before purification, and no positive part after the purification process, with a total of 26 parts (Table 2). The results refer to the number of samples taken at two different purification centers (CDM A and B). Since the number of the samples appeared to be small, due to the fact that the characteristics of

the purification process were not identical in the two systems and that the waters used had similar physical-chemical parameters, all samples were considered as coming from a single treatment plant (Table 3). We compared the percentages obtained from the calculations of both centres to see if their difference was due to chance: one referred to the total number of sample parts which were negative after purification, and the other to the total of the sample parts which were negative before treatment (Table 3). The statistical test that was adopted, considering the small number of samples and the insufficient extension of the experimental design was the Yates adjusted (Yates 1934) chi-square tests (χ^2). This non-parametric statistical test allowed to verify if the frequency values obtained through detection, were significantly different from the frequencies obtained with a theoretical distribution (Table 4). Out of a total of 46 parts, 23 were purified, and 22 of those (95.65%) were negative. Of the remaining 23 test samples analysed before treatment, 15 (65.21%) were negative (Table 3). This suggests this the purification cycle was effective for the marketing of the product and that the purification cycle was effective in 80, 4% of the cases (Table 3). However, there is a chance that there were no differences between the pre- and post-depuration stages. therefore, in a study of a similar size, we were asked about the likelihood to detect differences equal to or higher than those observed. Our data show that regardless of the pre/post-depuration stage, the depuration cycle was effective in 80, 4% of cases. Indeed, negative results were obtained regardless of the purification cycle in $22+15 = 37$ sample parts (80.4%). This percentage of success was applied in each of the two groups of mussels under consideration and we have obtained the expected data (Table 5). The statistical analysis, with the comparison of the groups, performed using the Yates adjusted chi-square test gave the following result: $\chi^2 = 4.97$ (with 1 degree of freedom)

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

suggesting that there had been a significant difference amounting to 5% and rejecting the hypothesis above (H_0) with a probability greater than 95% ($P < 0.05$) (Table 6).

7.5. Conclusion

The results of this study, although preliminary, and referred to a low number of samples, showed that the isolation of the viral RNA in the *Mytilus galloprovincialis* farmed and marketed by the companies concerned, shows the presence of Norovirus. We chose to study the function of the experimental 48h purification process to protect the territory in order to monitor and reduce to acceptable levels the potential contamination by NoVs in MBV, even if available data reports that sewage treatment plants in the national territory have no effect on the purification by NoVs in contaminated mussels (Schwab *et al.*, 1998; Ueki *et al.*, 2007; Barile *et al.*, 2009; Savini *et al.* 2009). However, this work was intended as a preliminary study and shows that the purification cycle performed could be effective for the purpose of purification from *Mytilus galloprovincialis* ($P < 0.05$).

7.6. Tables

7.6.1. *Table 1.* Rates analysed in the CDM A

7.6.2. *Table 2.* Rates analysed in the CDM B

7.6.3. *Table 3.* Total number and percentage samples analyzed in CDM A and CDM B

7.6.4. *Table 4.* Chi-square test, number of samples observed

7.6.5. *Table 5.* Chi-square test, number of samples expected

7.6.6. *Table 6.* χ^2 and degree of freedom

Table 1. – Rates analysed in the CDM A

CDM A	Negative sample rate	Positive sample rate	Total.
Before depuration (Time h ₀)	6 (60%)	4 (40%)	10
Post depurazione (Time 48h)	9 (90%)	1 (10%)	10
Total.	15 (75%)	5 (25%)	20

Table 2. – Rates analysed in the CDM B

CDM B	Negative sample rate	Positive sample rate	Total.
Before depuration (Time h ₀)	9 (69,23%)	4 (30,77%)	13
Post depurazione (Time 48h)	13 (100%)	0 (0%)	13
Total.	22 (84,6%)	4 (15,4%)	26

Table 3. – Total number and percentage samples analyzed in CDM A and CDM B

CDM A / CDM B	Negative sample rate	Positive sample rate	Total.
Before depuration (Time h ₀)	15 (65,21%)	8 (34,79%)	23
Post depurazione (Time 48h)	22 (95,65%)	1 (4,35 %)	23
Total.	37 (80,4%)	9 (19,6%)	46

Table 4. – Chi-square test, number of samples observed

χ^2	Negative sample rate	Positive sample rate	Total.
Before depuration (Time h0)	a = 22	b = 1	23
Post depurazione (Time 48h)	c = 15	d = 8	23
Total.	37	9	46

Table 5. – Chi-square test, number of samples expected

χ^2	Negative sample rate	Positive sample rate	Total.
Before depuration (Time h0)	a = 18	b = 5	23
Post depurazione (Time 48h)	c = 18	d = 5	23
Total.	36	10	46

Table 6. – χ^2 and degree of freedom

Degree of freedom	Probability		
1	10%	5%	1%
	2,71	3,84	6,63

7.7. Bibliography

Barile N.B., Scopa M., Nerone E., Mascilongo G., Recchi S., Cappabianca S., Antonetti L., 2009. Study of the efficacy of a closed cycle depuration system on bivalve mollusks. *Veterinaria Italiana*; 45 (4), 555-566.

Burkhardt W. & Calci K.R., 2000. Selective accumulation may account for shellfish associated viral illness. *Appl. Environ. Microbiol.*; 66, 1375-1378.

Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), 2009. Noroviruses. CDC, Atlanta.

Chironna M., Sallustio A., Barbuti S., Quarto M.; 2005. Tipizzazione molecolare di ceppi di HAV in molluschi bivalvi analizzati mediante Real Time PCR.; Atti del V Workshop Nazionale Enter-net Italia, 28.

Corrain C., Arcangeli G., Fasolato L., Manfrin A., Rossetti E., Piazzini E., Mioni R., Pavoni E., Losio N., Sanavio G., Suffredini E., Croci L., 2007. Influenze climatico ambientali sulla presenza di virus enterici in molluschi bivalvi. *Ind. Alim.*; XLVI, 277-283.

Croci L., 2009 – Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica – Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali dei molluschi bivalvi. Protocollo operativo: Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante Real Time PCR.

<http://www.izs-2.sardegna.it/primopiano.cfm?id=307>.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

- Le Guyader F.S., Loisy F., Atmar R.L., Huston A.M., Estes M.K., Ruvoën-Clouet N., Pommeypuy M., Le Pendu J., 2006. Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis.*; 12, 931-936.
- Patel M.M., Hall A.J., Vinjé J., Parashar U.D., 2009. Noroviruses: A Comprehensive review. *Journal of Clinical Virology*; 44, 1-8.
- Prato R., Lopalco P.L., Chironna M., Barbuti G., Germinaro C., Quarto M., 2004. Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in south Italy. *BMC Infect Dis.*; 4, 37.
- Rizzo C., Di Bartolo I., Santantonio M., Coscia M.F., Manno R., De Vito D., Ruggeri F.M., Rizzo G., 2007. Epidemiological and virological investigation of a Norovirus out-break in a resort in Puglia, Italy. *BMC Infectious Dis.*; 7, 135.
- Savini G., Casaccia C., Barile B.N., Paoletti M., Pinoni C., 2009. Presenza di Norovirus in molluschi bivalvi e verifica dell'efficacia dei sistemi di depurazione. *Veterinaria Italiana*; 45 (4), 529-533.
- Schwab K.J., Neill F.H., Estes M.K., Metcalf T.G., Atmar R.L., 1998. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J Food Prot.*; 61 (12), 1674-1680.
- Scipioni A., Mauroy A., Vinjé J., Thiry E., 2008. Animal noroviruses. *The Veterinary Journal*; 178, 32-45.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Terio V., Martella V., Moschidou P., Di Pinto P., Tantillo G., Buonavoglia C., 2010).

Norovirus in retail shellfish. *Food Microbiology*; 27, 29-32.

Ueki Y., Shoji M., Suto A., Tanabe T., Okimura Y., Kikuchi Y., Saito N., Sano D.,

Omura T., 2007. Persistence of caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. *Appl Environ Microbiol.*; 73 (17), 5618-5701.

Uhrbranda K., Myrnelb M., Maunulac L., Vainiod K., Trebbiena R., Nørrunga B.,

Schultza A.C., 2010. Evaluation of a rapid method for recovery of norovirus and hepatitis A virus from oysters and blue mussels. *Journal of Virological Methods.*; 169, 70–78.

Watzinger F., Ebner K., Lion T., 2006. Detection and monitoring of virus infections by

real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine*; 27, 254–298.

CAPITOLO 8

Preliminary study on Norovirus, hepatitis A virus, *Escherichia coli* and their potential seasonality in shellfish from different growing and harvesting areas in Sardinia region

Publicato in:

Italian Journal of Food Safety – reviewing

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Preliminary study on Norovirus, hepatitis A virus, *Escherichia coli* and their potential seasonality in shellfish from different growing and harvesting areas in Sardinia region

8.1. Abstract

Edible Lamellibranch Molluscs (MEL) can be involved in foodborne disease and infections of varying severity. They are filter feeding animals able to retain and concentrate in their organism bacteria, parasites, viruses and biotoxins marine algae present in their external environment. Major shellfish harvesting and relaying areas from different place in the Sardinia region were defined and studied by analyzing different physicochemical parameters in the water and the levels of *Escherichia coli* (*E.coli*), *Norovirus* GI (NoVGI), *Norovirus* GII (NoVGII) and Hepatitis A viruses (HAV) in the shellfish cultured and farmed from 2009 to 2011. During the above period the identification of the viral agents was carried out by one step real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (rRT-PCR). A total of 1,266 shellfish samples were tested for NoVGI, NoVGII, HAV and *E.coli* according to ISO TS 16649-3:2005 standard method. *Norovirus* (NoVs) contamination was found in 337 samples (26.6%). Only one sample of mussels was positive for HAV (0.08%); *E.coli* prevalence was 3.8% in shellfish. The probability of observing shellfish samples positive for NoVs, HAV and *E.coli* presence was associated with harvesting, growing and relaying areas, period of sampling, environmental parameters, animal species ($P < 0.05$). Although the higher prevalence rate of human enteropathogenic viruses was found in the winter period, in the length of time of the study, we not observed a significant relationship

between the effect of seawater temperature (seasonality) and the *Norovirus*'s presence, in fact, according to statistical analysis, the presence of human enteric viruses does not appear to be related to the water temperature.

8.2. Introduction

The Sardinian shellfish farming is a relevant and traditional economical aspect within the local economy. The most of animal production is carried out above all in marine coastal areas with typical and geomorphic features, involving numerous human and manufacturing activities. Therefore this marine environment becomes a potential source of seawater's pollution and contamination for shellfish production. Sewage become bacteria and fecal-oral cycle viruses carriers favoring the occurrence of situations of human health risk transmitted by the MEL consumption (Vilariño *et al.*, 2009; Maalouf *et al.*, 2010). The percentage of outbreak associated with shellfish is approximately 20% in countries such us United States but this percentage increases up to 80% in countries in which seafood consumption is greater like the Eastern or wherever seafood is raw eaten (Lees, 2000). The foodborne disease linked to the consumption of bivalve molluscs are mainly caused by enteric viruses, especially from enteric human Calicivirus (*Norovirus*) and hepatitis A virus (Davies *et al.*, 2001; Corrain *et al.*, 2007); indeed epidemiological indications suggests that human enteric viruses are the most common pathogens transmitted by bivalve shellfish (Lees, 2000). These viruses have the capability to persist in shellfish for several days (as far as 130 days in sea water), even if when this animals are placed in "clean" seawater used for growing or farming or

depuration cycles (Crocchi *et al.*, 2003). NoVGI and NoVGII have been detected in bivalve molluscan shellfish especially in oyster samples harvested and marketed from farm-pond and bays worldwide (Beuret *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2005; Gallimore *et al.*, 2005). In respect to shellfish market, the health controls for consumer's protection is regulated by European Union (EU) legislations (Regulations EC No.852/04, No.853/04, No.854/04, No.2073/05, No.2074/05, No.1881/06 and No.1441/07). Specifically, Regulation of the European Commission (EC) No.2073/05 lays down the microbiological criteria based only on the determination of some "bacteriological parameters" (*Salmonella* spp., and *E.coli*). However, the same regulation makes it clear that the determination of faecal indicators are unreliable for demonstrating the presence or absence of viral contamination. The present work was carried out in accordance with the "Regional Plan of surveillance, vigilance and sanitary control of production and marketing of molluscs, and of periodic monitoring of shellfish farming areas", in force in Sardinia region, during the periods 2008 – 2011 (Regione Sardegna, 2008). The aims of this work were to detect fecal indicators (*E.coli*) and NoVGI, NoVGII, HAV contamination in shellfish samples collected from harvesting, growing, relaying areas in five production zones in sardinian region and to evaluate a correlation between the presence of these contaminants and the seasonality. Physicochemical parameters of all shellfish harvesting and relaying areas were measured. The data analysis obtained in this study is highly valuable for improving microbiological and viral contamination control of shellfish and increasing the level of understanding and safety for consumers and help aquaculture farming.

8.3. Materials and Methods

Site selection and shellfish collection. In order that this study was representative of the regional country 1,266 bivalve molluscan samples consisting of mussels (*Mytilus galloprovincialis*), oysters (*Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*), clams (*Tapes decussatus*, *Tapes philippinarum* and *Ruditapes philippinarum* – this last “autochthonous” native species in north sardinian aquaculture) and *Cerastoderma* sp. or *Cardium* spp. were collected and tested for human enteric viruses and *E.coli* from five geographically separate harvesting, growing and relaying areas, classified from A (product suitable for direct consumption) to C (product suitable for consumption after long depuration treatment) (EU, 2004), in Sardinia region. Every areas were in marine coasts and ponds locations with considerable urban populations (>50,000) (Figure 1). Shellfish were harvested by local authority sampling officers in matching with the collection of samples for the statutory classification and monitoring program, in compliance with Shellfish Regional Plan (Regione Sardegna, 2008). Sampling officers collected shellfish per week/month from each selected site between January 2009 and December 2011 inclusively. Each sample consisted of a variable number of individuals (20-30), based on the size and species. Samples were shipped directly to laboratory via cold storage in 12h and tested for *E.coli* immediately, whereas, in different days for viral contamination (HAV, NoVs). Processed shellfish were stored at $-80 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ and later used for enteric virus detection by rRT-PCR as described by Croci (Istituto Superiore di Sanità – Italy – research working group – Croci *et al.* 2009) and at a later time by Lee (Lee, 2010). When workable, environmental parameters, in particular water temperatures, at the

sampling site were determined by using a mobile equipment always approved by the competent authority at the time of sampling.

E.coli analysis. *Escherichia coli* were isolated using MPN standard methods as describes in ISO TS 16649-3:2005 (ISO 2005). Calculation of the number of *E.coli* was performed using the ISO 7251 MPN table (ISO 7251).

Shellfish processing for virus detection and viral RNA extraction. Shellfish samples were washed under clean running water and opened with sterile equipment. For each sample, the digestive glands, hepatopancreas, of 10/20 shellfish were excised, pooled, and then blended by using T 25 basic Ultra-Turrax®. From the original homogenate 2.0 ± 0.1 g of chopped glands was transferred into a clean tube, and inoculated with 1×10^6 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀) feline calicivirus (FCV) (10µl). FCV was chosen as the sample process control virus (Mattison *et al.*, 2007; Di Pasquale *et al.*, 2010). Homogenates were prepared by treating the glands with 100g/ml proteinase K solution (30 U/mg; Promega) (2.0 ± 0.1 ml for each sample). The samples were then incubated at $37 \pm 1.0^\circ\text{C}$ with shaking at 300 rpm for a duration of 1h and next incubated at $60 \pm 1.0^\circ\text{C}$ for 15 ± 1 min in a water bath. Finally, the sample was centrifuged at 3000g for 5 min, the soluble portion (homogenate) was retained for testing, and the pellet was discarded. Homogenates were stored at $-80 \pm 1.0^\circ\text{C}$ prior to testing. Total RNA was extracted from 140 µl of shellfish homogenate by using mini-kits QIAamp® Viral RNeasy (Qiagen, Italy) following the manufacturer's instructions (RNA was eluted in 60µl and was stored at $-80 \pm 1.0^\circ\text{C}$ until testing).

Detection of Norovirus (GI, GII) and hepatitis A virus by Real-time TaqMan RT-PCR. For NoVGI, primers QNIF4 (da Silva *et al.*, 2007) and NV1LCR (Svraka *et al.*, 2007) and probe NVGG1 (Svraka *et al.*, 2007) were used. For NoVGII primers QNIF2 (Loisy *et al.*, 2005) and COG2R (Kageyama *et al.*, 2003) and probe QNIFS (Loisy *et al.*, 2005) were used. The two probes for NoVs GI and GII were labeled 5' 6-carboxyfluorescein (FAM) and 3' 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA). HAV assay was performed with primers HAV68, HAV240 and probes HAV150 (Costafreda *et al.*, 2006). Probe labeled 5' 6-carboxyfluorescein (FAM) and 3' MGB (minor groove binder). FCV primers and probes were described by Mattison and Ward (Mattison *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2009). In the same Real-time RT PCR reaction viral nucleic acid of FCV was also amplified. Retrotranscription and one step PCR were performed on ABI Prism 7900 and 7700 Sequence Detector System (SDS – Applied Biosystems). All amplification reactions were carried out using the Ultrasense® One-step qRT-PCR System (Invitrogen, Italy), in a total volume of 25µl in 96-wells plates (MicroAmp; Applied BioSystems). For all targets the concentrations of forward primer, reverse primer and TaqMan probe were 500, 900 and 250 nM, respectively, and 1×Ultrasense reaction mix, 1×ROX reference dye, 1.25µl of Ultrasense enzyme mix. The cycling conditions were reverse transcription for 60 min at 55°C followed by 5 min at 95°C and 45 cycles of 15s at 95°C, 1 min at 60°C and 1 min at 65°C. Each run included extracted RNA from NoVGI, NoVGII, HAV and FCV as positive RT-PCR controls and water as negative controls. Fluorescence was measured at the end of each cycle. Each sample was amplified in duplicate in each run and considered positive when Ct was ≤ 44.0 in at least two replicas (Crocì, 2009).

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Physicochemical parameters. At the sampling times, when possible, the physicochemical parameters were monitored every month in each shellfish harvesting or growing sites by public veterinary service or by the help of companies staff using portable weather instrument. All the seawaters parameters considered were Temperature (°C), Salinity g/l (‰), Dissolved Oxygen (DO) content (% saturation) and pH (unit). The temperature and the pH were measured at the depth at which shellfish were collected (Hanna instruments® HI 9024C pH meter kit). Salinity and dissolved oxygen were measured with a conductivity meter and a mobile potency meter (Hanna instruments® HI 9143 Microprocessor dissolved oxygen meter); as an alternative with multiparameter probe (Idrolab – with pH, temperature, salinity and O₂ sensors).

Statistical analysis. In order to perform the statistical analysis the data set was opportunely transformed in logit function. The link function $F (F^{-1})$ is used for modeling the relationship between the probability of observing a 1 (0) with the covariates through $P(Y=1|\beta,X)=F(X\beta)$. The hypothesis of interest was to see if the environmental parameter, in particular, seawater temperature, was the cause of the "microorganisms presence" in shellfish, and if this presence has been occurred regardless of the impact of anthropogenic and geomorphologic coastal waters used for the molluscs production. To verify the existence of a risk factor associated with the presence of microorganisms (hepatitis A viruses, NoVGI, NoVGII and *E.coli*) was developed a multivariate logistic regression model in which the dependent variable "result" (presence/absence $Y = 1$; $Y = 0$) was placed in relation to the independent variables classified as: Year (2009 – 2011), Month (January to December), production area (Site 1 to Site 5), Classification areas, samples (Clams, Mussels, Oysters),

microbiological analysis (NoVs, HAV, *E.coli* determination) and environmental parameters (seawater temperature, pH, salinity, dissolved oxygen). All data analysis were carried out with Statgraphic Centurion (StatPoint Technologies, Inc.-Warrenton, VA - USA) software, in a Intelcore i5 machine running MS Windows7 Professional for only laboratory use.

8.4. Results

The results of the environmental monitoring showed that the sardinian seawater had a stable salinity in all areas investigated. Salinity fluctuated between 27.0 ± 1.0 and 36.0 ± 1.0 ‰ (average 32.26‰). The seawater temperature during all monitoring varied between $12.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ and $26.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ in August (Table 2 report the data of the averages \pm standard deviation for pooled data). Other parameters were substantially equivalent in the five areas under observation during the same monitoring time, and previous studies showed none significant variation during all three years of analysis (Rohayem, 2009). Shellfish from category A classification sites can be taken for direct human consumption. Shellfish from these sites must contain <230 *E.coli* bacteria per 100 g of flesh. The category B classification ($<4,600$ *E.coli* bacteria per 100 g of flesh for 90% of samples and $<46,000$ *E.coli* bacteria per 100 g of flesh for all samples), shellfish from these sites must be purified by relaying or depuration prior to consumption. Shellfish from category C classification sites (all samples with $<46,000$ *E.coli* bacteria per 100 g of flesh) must be subjected to protracted relaying (>2 months) or commercial heat treatment prior to consumption (EU, 2004). In this study, 112

samples were taken from sites with a category A classification at the time of sampling, 1,139 were taken from sites with a category B classification, and 15 were taken from sites with a category C classification. From a comparison of average *E.coli* and average *Norovirus* levels in samples collected from the same site showed 30% of a correlation in B Class areas. The presence of *E.coli* during the study was 3.8% (49 samples positive / 1,266 samples analyzed) and, its most frequently 3.7% (22 positive samples / 588 samples analyzed), has occurred in the spring season of the year 2011 (Tables 1 and 2). The studied A Class areas showed levels of *E.coli* higher than 230 MPN/100 g FIL in 6 clams samples. In the studied B Class areas 40 shellfish samples showed all values well above of 4,600 MPN/100 g FIL with a mussel sample with 30,000 MPN/100 g FIL. Interesting 11 (1.8%) mussels sampled in Site 5 showed *E.coli* levels far above the European legislation limit (4,600 MPN/100 g FIL) (data not shown). With respect to the water temperature a correlation analyses has been performed. At temperatures between $10.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ and $20.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ *E.coli* presence not showed significant correlation with seawater temperatures during the three years study. Whereas in 2011 *E.coli* at temperatures $< 19.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ showed highest counts (Table 2). In respect to sampling shellfish monitoring plan 1,266 samples were tested for human enteric viruses and all provided valid results (acceptable extraction and amplification efficiencies). Of these samples, 337 (26.6%) tested positive for *Norovirus*, with 19 (1.5%) being positive for both genogroups, 29 (2.2%) being positive for GI only, and 289 (22.8%) being positive for GII only. The *Norovirus* prevalence showed a high seasonal variability, with a maximum level of positive samples between January and March in 2009, 2010 and 2011 and a minimum of 0.15% positive samples (2/1266) in August 2009 (Table 2; Figure 1). Prevalence *Norovirus* levels varied markedly by season, with annual peaks

occurring between January and March and the lowest levels being recorded between July and August (Table 2). Levels of *Norovirus* GII were on average higher than those of GI. For each month of the study, the percentage of samples with total *Norovirus* (GI plus GII summed) in different animal species is shown in Table 1 in which is relevant to the consideration of the impact of possible control limits on *Norovirus* levels in production areas at different times of the year. All five sites sampled during the research returned at least one positive result. Year-by-year *Norovirus* prevalence varied between 20% and 27.9% positive samples in 2010. Site-by-site *Norovirus* prevalence varied from a minimum of 1.2% (6/473 samples tested) up to 16.9% positive samples (80/473 samples tested) in 2010. We observed higher frequency of *Norovirus* in B Class areas (Table 1). The results obtained in relation to a large number of analysis showed interesting analytical data, in fact, hepatitis A virus was found only in a mussel sample collected from the Site 5, during the winter season in 2009 (Tables 1 and Table 2). Among the NoVs positive samples 2 (0.9%) were collected from a relaying water production area in Site 1 (oysters) in 2009, 4 (0.8%) were collected from a class A water production areas in Site 1 (oysters) and 4 (0.8%) in Site 3 (mussels) in 2010. Only one clam sample was positive for NoVGII from a class C water production area in Site 3 in 2010.

8.5. Discussion and Conclusions

In Sardinia region, one of the most important producer in Italy, shellfish production is an significant economic activity, with producing areas distributed along different coasts.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Marine areas evaluated in this study support active commercial and recreational shellfish growing and harvesting activities. Most of the shellfish produced are consumed in local trade, especially in the western coastal area, and in the north Italy (Sardegna agricoltura, 2008). Shellfish farmers sell their produce directly from the farms or at markets to supermarkets. We observed, indeed, like in other countries, shellfish consumers have been infected by NoVs (even if, in Sardinia region, at present, have not been recorded clinical cases). Our study sought to evaluate the contamination throughout the three year and the sampling was done all the seasons. This choice was made for several reasons, one of these, was to observe the probability of NoVs levels in shellfish during winter and summer period comparing this data to the environmental parameters (Figure 1; Table 2). The results of our research have shown none correlation between *E. coli* concentration and NoVs presence and in this study most of the shellfish samples positive for NoVs were negative for *E.coli*. The result clearly showed the absence of correlation between bacterial and viral faecal contaminants. In 2010 and 2011 the frequencies of NoVs positive samples were 26% and 23% in mussels respectively; this leads that years are two most affected during the winter, as the data confirm even though we detected both NoVs genogroups in shellfish that were collected both in summer and in winter. The occurrence of frequencies NoVs positive samples in shellfish lead to think on importance of regional or local conditions, particularly fecal contamination sources. Levels NoVs contamination were observed at all sampling locations (except in the Site 2 and Site 4 in 2009 and in 2010) in the winter, specially in Site 2, but this is not a real seasonality. The measures of the environmental parameters in the five harvesting, growing and relaying areas showed regular fluctuations related to seasonal variations, in particular the temperature (Figure 1). Most of *Norovirus*

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

contamination from Site 1 to Site 5 were detected during the winter season and not samples resulted positive during the 2010 for *E.coli* contamination. we observed the high coexistence of two genogroups (GI, GII) in mussels (10%) in the Site 1 showing that, along with all the other data, this area was especially *Norovirus* sensitive. Logistic regression showed that, as regards the independent variable "Site", there is a statistically significant risk of having successfully 3.37 times higher than in Site 1 respectively to Site 5. For other areas have not achieved significant results. The risk of finding positive for *Norovirus* in the year 2011 compared to the year 2010 was significantly higher (Table 3), while there is no statistically significant difference in the type of samples (Clams, Mussels, Oysters). The analysis of the variable "Month" confirms the above data with high risks, statistically significant, a positive outcome in the months between November and March, with a peak between January and February. As regards the temperature the greater risk is evident in the range between 11.0 ± 1.0 and $15.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ but was not statistically significant. The data analysis showed that the concentration of *Norovirus* is greater in winter highlighting accordingly that the presence of this organism shows a certain "seasonal" (Table 2 and 3), in agreement with one study conducted in the year 2002 in Northern Italy from human cases in children (Medici et al, 2006). This seasonality, according to our data, wouldn't seem related to the temperature of sea water. Finally this study showed comprehensible winter seasonality for norovirus contamination in all areas and in all shellfish species investigated, but specifically, this observation is not supported by statistical data analysis in relationship with seawater temperatures. Epidemiological data have reported that the major norovirus illness occur precisely during the winter, often, after shellfish consumption in many countries. Several reports in fact have been published describing outbreaks of

acute gastroenteritis in human related to the consumption of raw shellfish (oysters). One reason could be that the shellfish metabolism changes from winter to summer and in this season there are more fecal animal contamination in shellfish growing areas. The data obtained in this study could contribute to the introduction of explicit shellfish monitoring programs, which could be improved with acquisition of all environmental parameters data and real time qRT-PCR tests on cultured areas. Optimization of monitoring plans could lead to better management of the shellfish harvest and market.

8.6. Figures

8.6.1. *Figure 1* – Collection sites (from 1 to 5) and sampling stations of shellfish tested for microbiological and environmental parameters in Sardinia region (a). Monthly distribution of NoVs positive samples, average seawater temperature corresponding each sites and month from 2009 to 2011 (b).

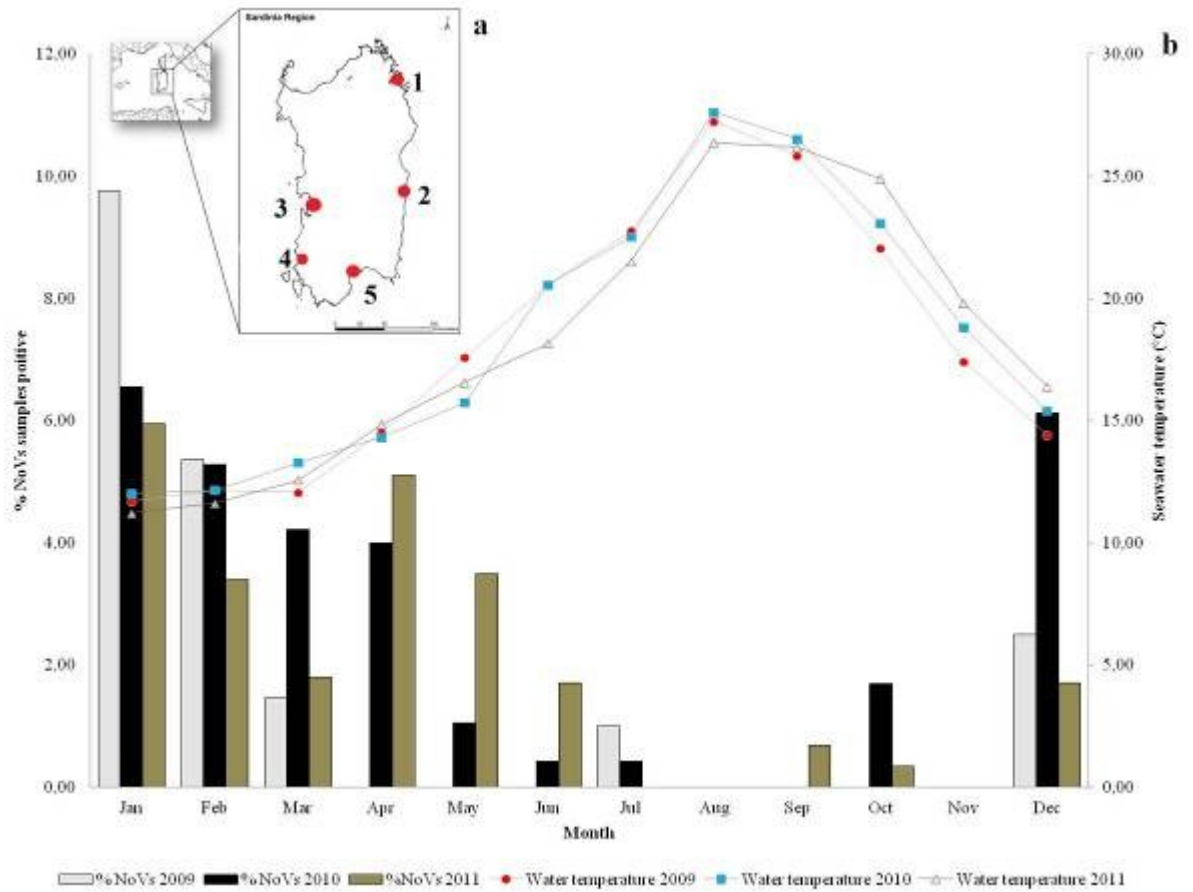
8.7. Tables

8.7.1. *Table 1* – Percentage of positive shellfish samples for microbiological parameters tested in Sardinia region.

8.7.2. *Table 2* – Physicochemical parameters measured in sites production areas and monthly frequency of positive NoVs and *E.coli* samples during the study.

8.7.3. *Table 3* – Odds ratios (OR) values and their confidence intervals (95% CI) defined by logistic regression.

Figure 1. Collection sites (from 1 to 5) and sampling stations of shellfish tested for microbiological and environmental parameters in Sardinia region (a). Monthly distribution of NoVs positive samples, average seawater temperature corresponding each sites and month from 2009 to 2011 (b)



Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Table 1. Percentage of positive shellfish samples for microbiological parameters tested in Sardinia region

Period ¹	Areas	Samples ²	Classification ³	No. <i>E.coli</i> ⁴	HAV ⁵	NoVGI ⁶	NoVGII ⁷	NoVGI+NoVGII ⁸
2009 (205)	Site 1	Mussel (92)	B			7 (8)	15 (16)	5 (5)
		Oyster (12)	A/Relaying			2 (17)	2 (17)	1 (8)
	Site 3	Mussel (35)	B			1 (3)	4 (11)	1 (3)
		Clam (30)	A/B	6 (20)		1 (3)	1 (3)	1 (3)
Site 5	Mussel (11)	B			1 (9)			
2010 (473)	Site 1	Mussel (175)	B			11 (6)	76 (43)	5 (3)
		Oyster (21)	A/B			1 (5)	4 (19)	1 (5)
	Site 3	Mussel (50)	A/B				4 (8)	
		Clam (20)	A/B/C				2 (10)	
Site 5	Mussel (181)	B			6 (3)	17 (9)	5 (3)	
2011 (588)	Site 1	Mussel (161)	B	6 (4)			59 (37)	
		Oyster (20)	A/B	2 (10)			10 (50)	
		Clam (15)	B	1 (7)			8 (53)	
	Site 2	Mussel (40)	B	6 (15)			8 (20)	
	Site 3	Mussel (45)	A/B	1 (2)			5 (11)	
		Clam (43)	A/B/C	15 (35)			8 (17)	
	Site 5	Mussel (224)	B	11 (5)			62 (28)	
Clam (40)	B	1 (3)			4 (10)			

¹ Period of study, values in parentheses are no. samples tested

² value in parentheses are no. samples tested in which we observed positive targets

³ According to European Union guidelines

⁴ No. of samples positive for *E.coli* MPN (CFU / 100g shellfish flesh), total (%)

⁵ HAV contamination, values in parentheses are percent of shellfish samples tested

⁶ *Norovirus* GI contamination, values in parentheses are percent of shellfish samples tested

⁷ *Norovirus* GII contamination, values in parentheses are percent of shellfish samples tested

⁸ Number of samples showing the presence of *Norovirus* genogroup I and genogroup II, values in parentheses are percent of shellfish samples tested

Table 2. Physicochemical parameters measured in sites production areas and monthly frequency of positive NoVs and *E.coli* samples during the study

	Month	Temperature ¹ (°C)	pH ²	Salinity ³ (‰)	Dissolved oxygen ⁴ (% saturation)	<i>E.coli</i> ⁵	NoVs ⁶	HAV ⁷
2009	Jan – Mar	11,18 ± 0,50	7.39 ± 0.11	31.11 ± 2.73	96.08 ± 9.39	1 (0.5)	34 (16.5)	
	Apr – Jun	16,10 ± 2,00	7.98 ± 0.42	29.98 ± 2.15	109.00 ± 6.33	3 (1.5)		
	Jul – Sep	26,11 ± 0,77	8.13 ± 0.31	32.04 ± 0.67	104.43 ± 0.70	1 (0.5)	2 (1)	
	Oct – Dec	18,91 ± 2,93	8.24 ± 0.16	30.95 ± 3.33	NT	1 (0.5)	5 (2.5)	1 (0.5)
2010	Jan – Mar	12,96 ± 0,97	NT	30.91 ± 2.92	NT		61 (13)	
	Apr – Jun	18,63 ± 2,31	8.05 ± 0.11	29.85 ± 0.59	108.36 ± 6.37		52 (11)	
	Jul – Sep	24,82 ± 1,28	7.96 ± 0.26	NT	105.53 ± 1.18		10 (2)	
	Oct – Dec	17,31 ± 2,40	7.55 ± 0.04	33.17 ± 1.66	99.00 ± 14.03		29 (6)	
2011	Jan – Mar	13,23 ± 0,76	7.93 ± 0.06	30.55 ± 2.03	94.30 ± 11.42	13 (2.2)	66 (11)	
	Apr – Jun	19,73 ± 2,21	7.82 ± 0.20	28.97 ± 0.84	102.72 ± 3.99	22 (3.7)	62 (10)	
	Jul – Sep	24,99 ± 0,60	8.14 ± 0.16	31.80 ± 2.75	NT	4 (0.7)	4 (0.7)	
	Oct – Dec	19,86 ± 2,45	7.59 ± 0.24	33.53 ± 1.68	1005.05 ± 9.23	4 (0.7)	12 (2)	

¹ Mean ± sd (standard deviation) of the seawater temperatures (T°C) in harvesting and growing areas collected for each sampling regional site

² Mean ± sd (standard deviation) of the pH in harvesting and growing areas collected for each sampling regional site

³ Mean ± sd (standard deviation) of the salinity (‰) in harvesting and growing areas collected for each sampling regional site

⁴ Mean ± sd (standard deviation) of the Dissolved oxygen (% saturation) in harvesting and growing areas collected for each sampling regional site

⁵ *Escherichia coli* positive samples, value in parentheses are percent of positive samples analyzed

⁶ *Norovirus* positive samples, value in parentheses are percent of positive samples analyzed for NoVGI, NoVGII and NoVGI + NoVGII

⁷ Hepatitis A Virus (HAV) positive samples, value in parentheses are percent of positive samples analyzed

NT, not tested

Table 3. Odds ratios (OR) values and their confidence intervals (95% CI) defined by logistic regression.

Variable	Standard Error	OR	95% CI Lower limit	95% CI Upper limit
Year 2009	0.29909	0.447854	-0.13836	1.03407
Year 2010	0.171356	0.396681	0.060823	0.732539
Site 1	0.196746	3.37382	2.988198	3.759442
Site 2	0.356512	0.963479	0.264715	1.662243
Site 3	0.270447	0.939788	0.409712	1.469864
Site 4	123.389	1.1877E-05	-241.842	241.8425
<i>E.coli</i>	0.193196	0.322087	-0.05658	0.700751
January	1.1615	294.58	292.3035	296.8565
February	1.16329	864.347	862.067	866.627
March	1.14057	324.475	322.2395	326.7105
April	1.08608	113.121	110.9923	115.2497
May	1.03065	60.0302	58.01013	62.05027
June	0.987417	52.7993	50.86396	54.73464
July	0.61474	1.11993	-0.08496	2.32482
August	0.728953	0.554168	-0.87458	1.982916
October	0.952403	10.9379	9.07119	12.80461
November	1.09492	53.13441	50.98806	55.28014
December	1.11818	103.255	101.0634	105.4466
11.00 – 14.90°C	1.3498	0.0097962	-2.63581	2.655404
15.00 – 18.90°C	1.32932	0.0342304	-2.57124	2.639698
19.00 – 22.90°C	1.26068	0.0224851	-2.44845	2.493418
23.00 – 26.90°C	0.857982	0.154801	-1.52684	1.836446
Clam	197.9	0.000107933	-387.884	387.8841
Mussel	0.267597	0.622397	0.097907	1.146887
Oyster	0.437898	0.313003	-0.54528	1.171283

8.8. References

- Beuret C., Baumgartner A., Schlupe J., 2003. Virus-contaminated oysters: a 3-month monitoring of oysters imported to Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.*; 69, 2292-2297.
- Cheng P.K.C., Wong D.K.K., Chung T.W.H., Lim W.W.L., 2005. Norovirus contamination found in oysters worldwide. *J. Med. Virol.*; 76, 593-597.
- Corrain C., Arcangeli G., Fasolato L., Manfrin A., Rossetti E., Piazzini E., Mioni R., Pavoni E., Losio N., Sanavio G., Suffredini E., Croci L., 2007. Influenze climatico ambientali sulla presenza di virus enterici in molluschi bivalvi. *Ind. Aliment. Italy XLVI*, 277-283.
- Costafreda M.I., Bosch A., Pintó R.M., 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology*; 72, 3846-3855.
- Croci L., Suffredini E., 2003. Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici. *Annual Report Istituto Superiore di Sanità*; 39 (1), 35-45.
- Croci L., 2009. Procedure: Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante Real Time PCR. Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali dei molluschi bivalvi.
- Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

- da Silva A.K., Le Saux J.C., Parnaudeau S., Pommepuy M., Elimelech M., Le Guyader F.S., 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.*; 73:7891–7897.
- Davies A.R., Capell C., Jehanno D., Nychas G.J.E., 2001. Incidence of foodborne pathogens on European fish. *Food Control*; 12, 67-71.
- Di Pasquale S., Paniconi M., De Medici D., Suffredini E., Croci L., 2010. Duplex Real Time PCR for the detection of hepatitis A virus in shellfish using Feline Calicivirus as a process control. *J. Virol. Method*; 163, 96-100.
- EU, 2004. Commission regulation (EC) No 854/2004 of 29 April 2004 laying down specific rules for the organization of official controls on products of animal origin intended for human consumption, *Official Journal*; L139, 83-127.
- Gallimore C.I., Cheesbrough J.S., Lamden K., Bingham C., Gray J.J., 2005. Multiple norovirus genotypes characterised from an oyster-associated outbreak of gastroenteritis. *Int. J. Food Microbiol.*; 103, 323-330.
- ISO, 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* – ISO 7251:2005 Most probable number technique.
- ISO, 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 3: most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D
- Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

glucuronide – ISO 16649:2005 – International Organisation for Standardisation, London.

Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B., Takeda N., Katayama K., 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*; 41(4), 1548-1557.

Lees D.N., 2000. Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.*; 59, 117-126.

Lees D.N., CENWG6 TAG4, 2010. International standardization of a method for detection of human pathogenic viruses in molluscan shellfish. *Food Environ. Virol.* 2:146-155.

Loisy F., Atmar R.L., Guillon P., Le Cann P., Pommeuy M., Le Guyader F.S., 2005. Real time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Methods*; 123(1), 1-7.

Maalouf H., Zakhour M., Le Pendu J., Le Saux J.C., Atmar R.L., Le Guyader F.S., 2010. Distribution in Tissue and Seasonal Variation of Norovirus Genogroup I and II Ligands in Oysters. *Appl. Environ Microb.*; 76, 5621-5630.

Mattison K., Brassard J., Houde A., Simard C., Pagotto F., Jones T., Trottier Y., Octobre L., 2007. The Feline Calicivirus (FCV) As an Internal Control for the Detection RNA Viruses from Foods. Federal Food Safety and Nutrition Research Meeting. Winnipeg, Manitoba, Canada.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Medici M.C., Martinelli M., Abelli L.A., Ruggeri F.M., Di Bartolo I., Arcangeli M.C.,
2006. Molecular epidemiology of Norovirus infections in sporadic cases of
viral gastroenteritis among children in northern Italy. *Journal of medical
Virology*; 78 (11), 1486-1492.

Regione Sardegna, 2008. Piano regionale per la vigilanza ed il controllo sanitario della
produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi e per il
monitoraggio periodico delle zone di produzione e di stabulazione di molluschi
bivalvi vivi, anno 2008-2011.

Rohayem J., 2009. Norovirus seasonality and the potential impact of climate change.
Clin. Microbiol Infect.; 15, 524–527.

Sardegna Agricoltura/Laore, 2009. “Il comparto dell’acquacoltura in Sardegna alla luce
dei risultati dell’indagine conoscitiva”.
www.sardegnaagricoltura.it/assistentatecnica/laore.

Svraka S., Duizer E., Vennema H., de Bruni E., van der Veer B., Dorresteyn B.,
Koopmans M., 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute
gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol.*;
45(5), 1389-1394.

Vilariño M.L., Le Guyader F.S., Polo D., Schaeffer J., Kröl J., Romaldel J.L., 2009.
Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. *Int.
Microbiol.*; 12, 145-151.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e
commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di
Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Ward P., Poitras E., Leblanc D., Letellier A., Brassard J., Plante D., Houde A., 2009.

Comparative analysis of different TaqMan real-time RT-PCR assays for the detection of swine Hepatitis E virus and integration of Feline calicivirus as internal control. *J. Appl. Microbiol.*; 106, 1360–1369.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

CAPITOLO 9

Assessment of Norovirus in *Mytilus galloprovincialis* harvested in Sardinia region: quantitative data

Draft in preparation for submission

Assessment of Norovirus in *Mytilus galloprovincialis* harvested in Sardinia region: quantitative data

9.1. Abstract

Enteric viruses generally are transmitted by the fecal-oral route and constitute a risk for the public health. They can be usually transmitted from the marine environment through the consumption of bivalve molluscs and in according to European Regulations, only bacteriological parameters (*Salmonella* spp and *Escherichia coli*) are used to establish their microbiological quality. In this study we wanted to evaluate Norovirus GI (NoV GI) and Norovirus GII (NoV GII) contamination in *Mytilus galloprovincialis* harvested in Class B areas in Sardinia region. Mussels were harvested from shellfish growing areas in the period of three years, 2011, 2012 and 2013. Considering the low levels of virus contamination, the difficulty of efficient virus extraction, the presence of interfering substances that inhibit molecular detection; aim of the present study, for the first time, was to assess the mussel samples contamination by Real time qRT-PCR and compare the NoVs levels between the years.

9.2. Introduction

Noroviruses are the most common viral agents of acute gastroenteritis in humans (Atman *et al.*, 2006). Epidemiological information on viral gastroenteritis in our country are scarce and fragmented and this could lead to an underestimation of the number of real annual foodborne disease. Norovirus were subdivided into five different genogroups (GI , GII , GIII , GIV , GV) each of which includes several genotypes and the genogroup GII is to be connected to the majority of cases of gastroenteritis Norovirus recorded (92%) (Lopam *et al.*, 2008; Metcalf *et al.*, 1979; Cheng *et al.*, 2005). Bivalve shellfish, in fact, are filter-feeding animals that can filter several litres of seawater daily and, if pathogenic microorganisms are present in the water, the pathogens may accumulate to considerable levels. (Metcalf *et al.*, 1979; Rippey, 1994; Burkhardt and Calci, 2000).

In the shellfish harvesting sardinian areas *Mytilus galloprovincialis* growing only in marine coastal areas; In this areas human and industrial sewage may contaminate seafood and due to their filter-feeding nature, bivalve molluscs tend to concentrate human viruses pathogens and therefore constitute an important vector in the transmission of enteric diseases (Cheng *et al.*, 2005; Metcalf *et al.*, 1995). Viral pathogens have been detected throughout the world in bivalve molluscs from areas with intensive shellfish production or consumption (Pintò & Bosh, 2008; Cheng *et al.*, 2005; Croci *et al.*, 2000). Moreover, viruses persist in molluscs for extended periods and depuration system can not eliminate viral suspension (Loisy *et al.*, 2005; Metcalf *et al.*, 1995; Schwab *et al.*, 1998). These fact can be a contribute to understand the human

health risk, especially when bivalve molluscs are consumed raw or under-cooked (Butt;Rippey, 1994).

For this reason we considered a molecular approach: the increasing availability of real-time qRT-PCR analysis for Norovirus in shellfish and the ability to collect analytical data for mussels bioaccumulation (quantity, number copies / unit volume in animal tissues), in this study means that this molecular technology has the potential to act as an important risk management tool for producers and regulators alike. We would like evaluate and contribute a new analytical improved risk management strategies based on Ct values (the raw data of real-time PCR). International scientific in the shellfish field has expressed results in terms of genome copies/g digestive tissues, and this unit of quantity is stipulated in the forthcoming CEN/ISO Technical Specification for Detection of Viruses in Foodstuffs (including bivalve shellfish).

9.3. Materials and Methods

Sampling was performed from January to December 2011, 2012 and 2013 (until June 2013), in harvesting and growing areas (all Class B areas from 2011) of Sardinia region (Italy), concurrently with the shellfish official sampling program carried out by competent authorities. Harvesting areas were classified according to Regulation (EC) No. 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004, laying down specific rules for the organization of official controls of the products of animal origin for human consumption as B (230–4600 *Escherichia coli* / 100 g mollusc tissue), for cultured mussels, and C (>4600 *Escherichia coli* / 100 g mollusc tissue) for wild

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

molluscs. Each sample consisted of at least 20 mussels or 30 mussels of *Mytilus galloprovincialis*.

We analyzed a total of 880 shellfish samples. A total of 464 mussels in the year 2011; a total of 289 mussels in the year 2012 and a total of 127 mussels in the year 2013 (until October). Mussels samples were selected randomly by five harvesting areas geographically very distant from each other.

For the preparation of all specimens as follows: collection of 2.0 ± 0.2 g of hepatopancreas from each pool of shellfish, to which 2.0 ml of Proteinase K solutions were added (30U/mg), incubated at $37.0 \pm 1.0^\circ$ C, shook for 60 ± 5 min and then incubated at $60.0 \pm 2.0^\circ$ C \pm for 15 ± 1 min in water bath. A 3000 g centrifugation was performed for 5 min., then the supernatant was collected and brought to volume of 3 ml with sterile PBS (pH 7.3).

Viral nucleic acid was extracted and purified from the suspended polyethylene glycol pellet using Nuclisens MiniMAG (BioMérieux, France), a semi-automated extraction procedure involving the use of magnetic particles, and then suspended in 100 μ l of final elution buffer and kept frozen (-80° C) (Le Guyader *et al.*, 2009).

For NoVs a one step Real time qRT-PCR was carried out using Ultrasense® One-step qRT-PCR System (Invitrogen, Italy). Table 1 lists the sequences of primers and probes used. The Real time was performed with an ABI Prism 7700 SDS detector (Applied Biosystems) in a 96-well format under the following conditions (Costafreda *et al.*, 2006): reverse transcription at 55° C for 1 h, denaturation at 95° C for 5 min, followed by 45 cycles of amplification with a denaturation at 95° C for 15 s, annealing at 60° C for 1

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

min, and extension at 65°C for 1 min. Samples showing cycle thresholds (Ct) values ≤ 44 were considered as positive. with no amplification the negative controls.

9.4. Results

The results showed that the presence of NoV GII was more prevalent than NoV GI (5.3%). Of the 464 samples exanimate in 2011, 3.8% contained NoVs infection, in 2012 6.5% and in 2013 and 23% contained NoVs in shellfish samples. Overall NoV GII was the most prevalent virus, detected in 47 samples (5.3%). In some samples two different genogroup types of Norovirus were detected (2%). In harvested molluscs, under the research the number of positive samples of Norovirus is very low.

9.5. Discussion

The purpose of the present study was to test the possibility of new research approaches, specifically, qRT-PCR, in determining the prevalence of the Norovirus in harvesting areas. The results obtained showed that 5% of the samples were contaminated. We must considered some PCR and extraction troubleshooting. Samples were collected from all the harvesting areas in Sardinia region, one of the most important Mediterranean production area, during three year period. Importance of this country for mollusc production, few studies have been carried out at this site and none of them included all the quantitative data. The results obtained showed that, potentially 30% of the samples were contaminated with Norovirus. Certainly, this percentage increased to 60% if we

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

considered scientific literature. The quantitative data analysis showed in Tables no.3, no.4 and no.5. In the present study the Norovirus detected at lower frequencies.

9.7. Tables

9.7.1. *Table 1* – Primers and Probes used in this research for viral detection (Real-time qRT-PCR).

9.7.2. *Table 2.* – Number of positive samples for Norovirus / No. samples tested (selected for research), in parenthesis percentage positive samples, in the 2011-2012-2013.

9.7.3. *Table 3* – Quantification of NoV GI and NoV GII in the DT (digestive tissue) of *Mytilus galloprovincialis* determined by Real time rRT-PCR – 2011.

9.7.4. *Table 4* – Quantification of NoV GI and NoV GII in the DT (digestive tissue) of *Mytilus galloprovincialis* determined by Real time rRT-PCR – 2012.

9.7.5. *Table 5* – Quantification of NoV GI and NoV GII in the DT (digestive tissue) of *Mytilus galloprovincialis* determined by Real time rRT-PCR – 2013.

Table 1. Primers and probes used in this research for viral detection (real-time qRT-PCR)

Primer Probe	Sequence 5' – 3'	Reference
<i>Norovirus GI</i>		
QNIF4 (forward)	CGC TGG ATG CGN TTC CAT	<i>da Silva, 2007</i>
NVILCR (reverse)	CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC	<i>Svraka et al., 1994</i>
NVGG1p (probe)	TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT	<i>Svraka et al., 1994</i>
Probe labelled 5' 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA)		
<i>Norovirus GII</i>		
QNIF2 (forward)	ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA	<i>Loisy et al., 2005</i>
COG2R (reverse)	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	<i>Katayama et al., 2003</i>
QNIFS (probe)	AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG	<i>Loisy et al., 2005</i>
Probe labelled 5' 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA)		
<i>Feline Calicivirus</i>		
FCV (forward)	ACAAGTCCGTTGGAGCAATTGA	<i>Di Pasquale et al., 2010</i>
FCV (reverse)	CCCCTGAGGTGTCCTTGTGAT	<i>Di Pasquale et al., 2010</i>
FCV (probe)	CCTATTGATCCTGACTCTGTTGTTTTCTTGAAGAGAAC	<i>Di Pasquale et al., 2010</i>
Probe labelled 5' 6-carboxyfluorescein (VIC), 3' 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA)		

Table 2. Number of positive samples for Norovirus / No. samples tested (selected for research), in parenthesis percentage positive samples, in the 2011-2012-2013.

Virus	No. positive samples / No. samples tested in <i>2011</i>	No. positive samples / No. samples tested in <i>2012</i>	No. positive samples / No. samples tested in <i>2013</i>
NoVGI	6/464 (1.3)	4/289 (1.3)	10/127 (7.8)
NoVGII	12/464 (2.6)	15/289 (5.2)	20/127 (15)

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Table 3. Quantification of NoV GI and NoV GII in the digestive tissue of bivalve molluscs determined by Real time qRT-PCR – 2011.

	ID	Ct	% extraction efficiency	% qRT-PCR efficiency	RNA copies/g tissue		
					NoV GI	NoV GII	
2011	January	2	39,20	9,23	93,30%	1,44E+01	
		3	38,62	13,80	116,47%	6,29E+03	
		4	38,98	10,75	80,11%	7,79E+02	
	February	5	37,24	5,76	97,94%	3,48E+01	2,32E+04
		6	38,85	1,89	84,67%	1,50E+02	
		8	38,05	3,29	90,13%	1,32E+02	2,18E+04
	March	10	37,22	8,04	97,94%	4,81E+02	1,14E+04
		13	36,49	13,33	108,67%	1,31E+02	
	May	22	38,40	10,39	96,59%		1,83E+03
	June	23	39,03	9,76	97,94%		1,19E+02
		24	39,86	5,49	101,40%	4,94E+02	7,70E+02
		25	38,15	17,96	97,27%		1,55E+03
	August	27	38,21	14,90	83,51%		1,21E+03
	September	28	39,21	13,90	96,59%		6,26E+02

Table 4. Quantification of NoV GI and NoV GII in the digestive tissue of bivalve molluscs determined by Real time qRT-PCR – 2012.

	ID	Ct	% extraction efficiency	% qRT-PCR efficiency	RNA copies/g tissue		
					NoV GI	NoV GII	
2012	January	32	39,70	3,75	101,40%	2,52E+02	
		35	37,56	5,12	103,53%	1,04E+03	
	February	36	36,37	11,69	88,27%	1,03E+04	
		37	39,41	1,42	86,45%	1,31E+03	
		38	37,78	4,40	104,97%	2,03E+03	
		39	36,06	14,49	88,27%	3,24E+02	9,91E+04
	March	40	39,60	17,84	92,66%	1,11E+04	
		41	39,90	14,49	107,18%	4,53E+03	
	April	43	39,11	3,52	104,25%	8,31E+03	8,00E+02
	June	47	39,88	2,07	86,45%	2,94E+02	4,05E+04
		48	39,92	5,57	95,26%	1,07E+04	
		49	40,96	2,71	88,27%	1,30E+04	
	November	52	39,27	7,29	86,45%	1,17E+03	
	December	55	39,91	4,68	98,62%	3,38E+02	5,66E+02
		58	36,45	10,98			1,00E+04

Table 5. Quantification of NoV GI and NoV GII in the digestive tissue of bivalve molluscs determined by Real time qRT-PCR – 2013

	ID	Ct	% extraction efficiency	% qRT-PCR efficiency	RNA copies/g tissue		
					NoV GI	NoV GII	
2013	January	59	38,88	4,88	88,27%	8,76E+01	
		60	38,69	5,57	79,00%		2,67E+03
		61	39,86	2,47	80,66%	1,57E+03	2,83E+03
		63	38,78	5,23	111,73%		3,37E+03
		64	39,15	4,05	88,27%	1,55E+03	6,44E+02
		65	38,90	4,81	93,95%		2,22E+04
	February	66	39,95	6,67	92,66%	7,13E+03	5,01E+04
		67	41,02	3,18	97,27%	1,38E+04	5,36E+05
		68	40,10	6,01	95,26%	1,83E+03	1,45E+03
		69	39,89	6,95	87,66%		4,88E+03
		70	39,98	6,53	108,67%	7,50E+02	3,65E+04
	March	71	38,02	8,38	118,10%	1,14E+03	1,51E+04
		72	39,37	3,29	96,59%	1,05E+03	3,28E+04
		73	39,14	3,86	101,40%		5,08E+02
		74	38,73	5,12	102,10%	1,14E+02	5,04E+01
	April	75	37,41	7,45	80,66%	3,83E+03	8,30E+03
		77	40,37	0,96	89,50%		2,16E+01
	May	79	39,77	6,09	84,09%		2,39E+03
		80	42,49	0,92	87,66%		1,31E+02
	June	81	39,29	12,18	92,66%		2,81E+03

9.6. References

- Atmar R.L., and Estes M.K., 2006. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol. Clin. N. Am.*; 35:275–290.
- Burkhardt W., Calci KR., 2000. Selective accumulation may account for shellfish associated viral illness. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1375–1378.
- Cheng P.K., Wong D.K., Chung T.W., Lim W.W., 2005. Norovirus contamination found in oysters worldwide. *J Med Virol* 76:593-597.
- Costafreda M. I., Bosch A., Pintò R.M., 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription–PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.*; 72:3846–3855.
- Croci L., De Medici D., Scalfaro C., *et al.*, 2000. Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in adriatic sea mussels. *J. Appl. Microbiol.*; 88:293-298.
- da Silva A., Le Saux J.C., Parnaudeau S., Pommepuy M., Elimelech M., Le Guyader F.S., 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription–PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7891–7897.

- Di Pasquale S., Paniconi, M., Auricchio, B., Orefice, L., Schultz, A.C. and De Medici D. 2010. Duplex real time PCR for the detection of hepatitis A virus in shellfish using Feline Calicivirus as a process control. *J. Virol. Meth.*; 163: 96–100.
- Fuhrman J.A., Liang X., Noble R.T., 2005. Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4523–4530.
- Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B., Takeda N., Katayama K., 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*; 41(4), 1548-1557.
- Le Guyader F.S., Parnaudeau S., Schaeffer J., Bosch A., Loisy F., Pommepuy M., Atmar R.L., 2009. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Appl. Environ Microbiol.*; 75:618-624
- Loisy F., Atmar R.L., Guillon P., Le Cann P., Pommepuy M., Le Guyader F.S., 2005. Real time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Methods*; 123(1), 1-7.
- Lopman B., Zambon M., Brown D.V., 2008. The evolution of norovirus, the ‘gastric flu.’ *PloS Med.*; 5:e42–e45.
- Metcalf T.G., Melnick J.L., Estes M.K., 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology a trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol* 49:461-487.
- Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

- Metcalf T.G., Mullin B., Eckerson D., Moulton E., Larkin E.P., 1979. Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by the soft-shelled clam, *Mya arenaria*. *Appl. Environ. Microbiol.*; 38:275–282.
- Pintó R.M., Bosch A., 2008. Rethinking virus detection in food. In Koopmans MPG, et al. (eds) *Food-borne viruses: progress and challenges*. ASM Press, Washington, DC, USA;171-188.
- Rippey SR., 1994. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Reviews* 7, 419–425.
- Svraka S., Duizer E., Vennema H., de Bruin E., van der Veer B., Dorresteijn B. *et al.*, 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through. *J.Clin. Microbiol.*; 45, 1389-1394.

CAPITOLO 10

Conclusioni generali

Gli studi hanno confermato un'alta prevalenza di Norovirus genogruppo I ma con maggior frequenza Norovirus genogruppo II in tutte le aree adibite alla mitilicoltura e sottoposte ad analisi in questo studio. Il virus dell'epatite A è stato rivelato una sola volta, nel 2009; ciò ci porta a riflettere sulla sensibilità e specificità del metodo analitico utilizzato. Alcuni ricercatori riportano che la determinazione del virus dell'epatite A è maggiormente rilevabile impiegando, come metodo molecolare, una Nested RT-PCR. A tutt'oggi la tecnica molecolare elettiva è e rimane la Real time RT-PCR ma come anche i nostri dati confermano, la determinazione del patogeno oggetto di studio risulta essere difficoltosa a causa della possibilità di riscontrare falsi negativi. Il quadro generale che emerge è in accordo con la maggior parte degli studi che sono stati effettuati su questa matrice alimentare, i molluschi bivalvi, sia quelli allevati nelle aziende locali che quelli importati da Paesi Terzi, essi sono fonte d'infezione da Norovirus (Le Guayader *et al.*, 2006). Per tale motivo si è deciso di applicare, una metodica sensibile ed automatizzabile per l'esame di un elevato numero di campioni. I limiti di applicabilità di questa metodica nei molluschi bivalvi, come la presenza di inibitori nel campione, che possono interferire con la reazione di amplificazione, implicano però la messa a punto di protocolli di estrazione adeguati per evitare la presenza di falsi negativi. Il primo obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare l'applicabilità del metodo per la determinazione di Norovirus (e del virus dell'epatite A) mediante Real Time PCR. Il

secondo obiettivo, poiché è stato dimostrato che per causare l'infezione da Norovirus è sufficiente una dose di 10-100 particelle, e per la valutazione dell'esposizione al consumo dei mitili è necessaria la determinazione quantitativa di virus presente nel veicolo di trasmissione, è stato quello di adattare e sviluppare quindi un metodo quantitativo in "Real time RT qPCR". Tale metodo ha permesso di acquisire nuove conoscenze vincolate alla trasmissione del virus oggetto della ricerca. Questa metodica utilizzata per la prima volta nel presente lavoro sembra rendere possibile il passaggio, dopo screening iniziale, al metodo quantitativo, utilizzando il procedimento sviluppato da un gruppo di esperti che contribuiscono alla standardizzazione dei metodi di rilevazione dei virus nei prodotti alimentari (CEN TC275/WG6/TAG4). Questa procedura descrive la purificazione, la concentrazione e la quantificazione di Norovirus genogruppo I (GI) e II (GII) dalla matrice alimentare come i molluschi bivalvi. L'RNA virale viene estratto dalla lisi con guanidina tiocianato e con adsorbimento a silice magnetica. L'RNA virale estratto viene poi amplificato con rilevazione mediante real-time qRT-PCR come descritto nel metodo: ISO/TS 15216-1:2013 - Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification. Inoltre questo studio ha voluto valutare i parametri ambientali dei siti di produzione affinché come prospettiva futura, si possa stabilire una correlazione tra presenza di Norovirus (copie/g) e loro stagionalità. Il quadro generale che emerge è di facile interpretazione: la presenza di Norovirus è consolidata in più del 30% dei campioni sottoposti a prova e la loro maggior frequenza viene rilevata, come anche la letteratura conferma, durante i mesi invernali. Questo aspetto, almeno prendendo in considerazione lo studio eseguito in questa ricerca, è da approfondire in quanto non sono stati, fino ad ora, correlati casi

Riccardo Bazzardi – "Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna" – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

umani. La “quantificazione” in copie/g del virus sembrerebbe aprire nuovi scenari in quanto potrebbe dare la possibilità di individuare in maniera più selettiva le zone di produzione dei molluschi ed armonizzare così anche i punti, modalità e tempi dei campionamenti. Questo lavoro di tesi vuole essere un contributo per una miglior comprensione del fenomeno “Norovirus” nei molluschi bivalvi e capire le dinamiche e i comportamenti nell’ambiente di allevamento e proporre future procedure di depurazione.

Infine un ulteriore obiettivo è stato quello di documentare i requisiti biotossicologici per le tossine del tipo P.S.P. previsti dalla normativa vigente (Reg. CE n. 853/04). Come descritto nel lavoro l’assenza di un livello critico di densità cellulare indica la necessità di un alto grado di attenzione anche in presenza di abbondanze modeste di *A. minutum* e di *A. catenella*. Le uniche misure di prevenzione sanitaria sono il monitoraggio continuo delle zone di produzione acquee adibite alla molluschicoltura, il monitoraggio continuo dei molluschi bivalvi in allevamento e la vigilanza mediante controlli biotossicologici sul prodotto alla commercializzazione.

ALLEGATO 1

Appendice – a

il “*Piano regionale per la vigilanza ed il controllo sanitario della produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi e per il monitoraggio periodico delle zone di produzione e di stabulazione di molluschi bivalvi vivi*”, in vigore nella regione Sardegna, è volto inoltre a verificare che i livelli delle biotossine marine non superino i limiti di sicurezza costituendo di fatto un ulteriore rischio per la salute del consumatore. Le problematiche sanitarie associate alla produzione ed al consumo di molluschi bivalvi quindi non sono solo determinate dalla presenza o assenza e il relativo bioaccumulo di microrganismi batterici, virali o di inquinanti chimici, ma riguardano anche la presenza di tossine di origine algale in quegli animali prodotti e commercializzati su territorio regionale e di quelli di importazione comunitaria.

Lo scopo del presente manoscritto è stato quello di documentare questa specifica attività (prevista nel Piano Regionale Molluschi) valutandone nel contempo l’appropriatezza e l’efficacia delle azioni a tutela della salute dei consumatori e di verificare il rispetto, da parte degli operatori del settore della molluschicoltura locale, dei requisiti biotossicologici previsti dalla normativa vigente su campioni rappresentativi di molluschi bivalvi vivi prelevati dalle diverse aree di produzione e allevamento regionali. La legislazione comunitaria, Regolamento (CE) n. 853/2004 prevede un limite di tolleranza per le tossine P.S.P. nei molluschi bivalvi di 800 µg di saxitossina equivalente/kg di parte edibile.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Le sostanze tossiche non sono prodotte direttamente dai molluschi marini eduli, ma vengono da questi assunte da una fonte esterna ed accumulate in parti specializzate del proprio organismo. Responsabili della contaminazione di questi animali sono i metaboliti secondari la cui origine è rintracciabile nelle classiche vie biogenetiche. In generale i metaboliti secondari, prodotti da organismi marini, contribuiscono all'equilibrio ecologico del mare nel mediare le comunicazioni di tipo chimico tra individui non solo della stessa specie, ma anche di specie diversa. I molluschi eduli, incapaci di sintetizzare sostanze in grado di difenderli, riescono quindi a procurarsele tramite l'alimentazione e ad accumularle in parti specializzate del proprio corpo. E' proprio in questo processo di trasferimento di molecole da un organismo all'altro che va ricercata una delle principali cause della periodica o occasionale tossicità dei molluschi marini eduli.

La gravità del fenomeno e l'attualità del problema da un punto di vista sia sanitario che economico è la ragione per cui, questa parte della ricerca ha riguardato, anche se in piccola misura, l'aspetto biotossicologico dei molluschi con la determinazione delle tossine algali del tipo P.S.P. mediante metodo ufficiale (mouse test).

Appendice – b: Le Biotossine Marine

b.1. Introduzione

Nelle zone marine costiere la presenza di fitoplancton tossico rappresenta uno dei rischi più importanti per la salute umana. In occasione di fioriture, infatti, questi organismi possono produrre tossine molto potenti.

Le fioriture di specie di dinoflagellate appartenenti ai generi *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Dinophysis* e di diatomee del genere *Nitzschia* producono tossine che si accumulano nella catena alimentare e che possono causare effetti vari nei consumatori secondari (uomo e animali superiori).

Le tossine prodotte dai dinoflagellati sono, nell'ambito delle tossine di natura non proteica, tra le più potenti sino ad oggi conosciute. A seconda della loro solubilità, possono essere divise in due grandi gruppi: tossine idrosolubili e liposolubili.

L'uomo può essere esposto all'effetto delle tossine con il consumo di organismi ittici, che le accumulano, e attraverso lo svolgimento di attività ricreative.

Non sono noti casi di intossicazione umana riconducibili ad attività ricreative, mentre importanti intossicazioni umane si verificano a seguito dell'ingestione di molluschi bivalvi. Questi ultimi sono organismi filtratori che si nutrono di plancton e che, pur accumulando le tossine, ne subiscono marginalmente gli effetti.

Tuttavia, in un singolo mollusco, in determinate circostanze possono essere raggiunte concentrazioni tali da risultare letali per l'uomo (Anderson, 1994). I molluschi bivalvi

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

maggiormente interessati da questo tipo di intossicazione appartengono ai generi *Argopecten*, *Cardium*, *Mya*, *Mytilus*, *Pecten*, *Saxidomus* e *Spisula*. Anche le ostriche accumulano le tossine algali, sebbene in misura minore (Shipway *et al.*, 1990).

Gli organismi capaci di accumulare tossine presentano una diversa sensibilità: alcuni le accumulano ad alti livelli, come i mitili, mentre altri le convertono in composti meno tossici o addirittura privi di tossicità, come la vongola del Pacifico *Protothaca staminea* e le vongole giapponesi *Peronidia Venulosa* e *Macra chinensis* (Oshima *et al.*; 1995; Bricelj *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 1983). La maggior parte delle tossine si accumula nell'epatopancreas del mollusco ed in minor misura nei muscoli (Schantz *et al.*, 1984; Taylor *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1997).

Anche la capacità di eliminare le tossine presenta delle differenze nei vari organismi: i mitili sono in grado di eliminarle entro 1 – 3 settimane (Shumway, 1990; Shumway *et al.*, 1990), mentre le vongole e i pettini di mare possono mantenere livelli di tossine per un periodo di tempo più lungo (Shumway *et al.*, 1993). La vongola *Saxidomus gigantea*, per esempio, non viene mai consumata perché trattiene la tossina anche per anni (Bricelj *et al.*, 1998). Il pettine marino *Placopecten magellanicus*, che vive nel fondale del mare e ingerisce le cisti dei dinoflagellati, può diventare tossico anche durante i periodi in cui le fioriture non sono evidenti. Tuttavia i pettini di mare sono considerati ugualmente sicuri per il consumatore, in quanto l'unica parte edibile è rappresentata dai muscoli adduttori, nei quali difficilmente le tossine si accumulano (Shumway *et al.*, 1993).

Si è visto inoltre che il rischio legato alla tossicità dei molluschi è strettamente correlato alla specie di dinoflagellati coinvolta nella fioritura.

I molluschi bivalvi esposti alla proliferazione di *Alexandrium tamarense*, *A. catenella* e *A. minutum* accumulano elevati livelli di tossine prodotte da queste alghe, mentre alle fioriture di *Pyrodinium bahamense* e *Gimnodium catenatum* seguono concentrazioni di tossine molto più basse (Landsberg, 1996)

Anche se i molluschi bivalvi sono gli animali marini principalmente responsabili della sindrome causata da tossine, occasionalmente vettori non tradizionali come gasteropodi, crostacei e pesci possono essere coinvolti nei fenomeni di intossicazione (Deeds *et al.*, 2008). Anche gli echinodermi accumulano tossine, ma finora nessuna specie è stata implicata in focolai di intossicazione (Jonas-Davies *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1998).

I gasteropodi accumulano tossine principalmente attraverso la predazione (es. molluschi bivalvi tossici) e possono rappresentare un rischio significativo per la salute del consumatore, come dimostrano i casi letali verificatisi in Medio Oriente (Landsberg, 1996).

Per quanto riguarda i crostacei, nell'accumulo di tossine sono inclusi i granchi, aragoste e gamberi. Le tossine algali marine possono provocare morie di pesci sia direttamente che in seguito ad ingestione di piccoli molluschi planctonici contaminati. I pesci sono in genere molto sensibili a queste tossine e muoiono prima che vengano raggiunte nelle loro carni concentrazioni pericolose per l'uomo (Anderson, 1994).

Tuttavia alcune tossine liposolubili, come le ciguatossine e idrosolubili come la tetrodotossina, non hanno effetti importanti sui pesci ma tendono ad accumularsi lungo la catena alimentare fino a raggiungere elevate concentrazioni nei grossi pesci predatori che risultano quindi tossici per l'uomo.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Le principali sindromi da intossicazione umana associate al consumo di molluschi sono state descritte, in base alla tipologia dei sintomi, come paralitiche, diarroiche, neurotossiche ed amnesiche, rispettivamente abbreviate in: P.S.P. (*paralytic shellfish poisoning*), DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*), NSP (*neurotoxic shellfish poisoning*), ASP (*amnesic shellfish poisoning*).

Nei paesi industrializzati, i programmi di controllo degli allevamenti di molluschi permettono un contenimento del rischio di intossicazione da biotossine algali, vietando la commercializzazione dei molluschi quando vengono raggiunte, nei loro tessuti, concentrazioni che superino il limite previsto dalla legge.

Negli altri paesi, dove i controlli non sono programmati e dove le popolazioni ricavano risorse soprattutto dalla pesca, i danni alla salute provocati dalle tossine algali sono molto più frequenti (Ade *et al.*, 2003).

b.2. Tossine P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*)

La sindrome paralitica da molluschi bivalvi è una sindrome neurotossica che si manifesta a seguito del consumo di molluschi bivalvi che hanno accumulato saxitossina. Il ruolo del fitoplancton nel causare l'intossicazione da P.S.P. nell'uomo fu evidenziato con l'isolamento della saxitossina da *Mytilus californianus* e da *Saxidomus giganteus* (Schantz, 1957).

b.3. Specie algali tossiche e loro distribuzione

Nelle acque temperate, le tossine idrosolubili del tipo P.S.P. sono prodotte da specie algali appartenenti al genere *Alexandrium* quali *A. tamarense*, *A. catenella*, *A. acatenella*, *A. fundyense* e *A. minutum* (Taylor *et al.*, 1984). Un'altra specie che produce tossine P.S.P. è *Gymnodinium catenatum*, che ha un'ampia distribuzione geografica, che va dalla costa atlantica e mediterranea della Spagna alla costa pacifica dell'America, al Giappone, all'Australia.

Nel Mediterraneo producono P.S.P. specie del genere *Alexandrium* e ceppi di *G. catenatum*.

Nel Golfo di Trieste sono state identificate *A. fundyense*, *A. pseudogonyaulax*, *A. lusitanicum* ed *A. catenella* (Cabrini *et al.*, 1998). Nel 1993, in mitili provenienti dalle coste dell'Emilia Romagna furono rilevate goniautossine (tossine P.S.P.) a livelli molto bassi, ma che indicavano la presenza di alghe (non identificate in quell'occasione) produttrici di tossine P.S.P. nel mare Adriatico. Nel maggio del 1994, in occasione dell'identificazione di tossine del tipo P.S.P. nei mitili provenienti dalle coste dell'Emilia-Romagna, fu osservata nella stessa area la presenza di *A. minutum* (Ciminiello *et al.*, 1995). Bassi livelli di tossine P.S.P. associati alla presenza di *A. minutum* sono stati evidenziati nel medio Adriatico nella baia di Kastela (Marasovic *et al.*, 1998). *A. tamarense* è stata rilevata nel Tirreno settentrionale e in Adriatico (Innamorati *et al.*, 1989, Boni *et al.*, 1986). Nei golfi di Napoli e Salerno sono state identificate *A. tamarense*, *A. minutum* e *A. balechi* (Montresor *et al.*, 1990). *Gymnodinium*

catenatum è stata evidenziata nel Tirreno (Carrada *et al.*, 1991), nell'Adriatico (Honsell *et al.*, 1992) e nel mare Egeo (Pagou *et al.*, 1990).

Nella Regione Sardegna, tossine del tipo P.S.P. associate al bloom di *Alexandrium minutum* (Figura 1) e *Alexandrium catenella* (Figura 1) verificatosi nel maggio 2002 e nei mesi di aprile e giugno del 2003, hanno determinato il divieto di raccolta e commercializzazione dei mitili nel Golfo di Olbia (Virgilio *et al.*, 2003).

La presenza di *Alexandrium catenella* nel Golfo di Olbia è stata segnalata per la prima volta nel 1999, con successive conferme nel 2000 e nel 2001, sempre nei mesi primaverili ed estivi (Lugliè *et al.*, 2002; Lugliè *et al.*, 2003). Nel golfo di Cugnana (Olbia), i fenomeni di fioritura algale e di accumulo di tossine nei molluschi bivalvi si sono verificati invece nei mesi invernali del 2005, dovuti probabilmente a meccanismi di adattamento e sopravvivenza di *Alexandrium catenella*, quali la formazione di cisti accumulate nel sedimento marino (Virgilio *et al.*, 2006).

Sempre nell'anno 2006, è stata rilevata la presenza di mitili contenenti le tossine P.S.P., in concentrazioni superiori ai limiti previsti dalla normativa vigente, lungo le coste di Oristano (Santa Giusta), associata alla proliferazione di *Alexandrium catenella* e *A. minutum* (Virgilio *et al.*, 2007). Nel mese di dicembre dell'anno 2008 e nei mesi gennaio e febbraio 2009, è stata rilevata la presenza di tossine P.S.P. in mitili prelevati nel golfo di Cugnana e Porto Pozzo (S. Teresa di Gallura), associata alla proliferazione di *Alexandrium catenella* e *A. minutum* (Virgilio *et al.*, 2009). Nei mesi di febbraio e marzo 2010 è stata riscontrata presenza di tossine algali del tipo P.S.P. in mitili prelevati in località Laguna di Porto Pozzo e il problema si è ripresentato nel dicembre 2010 e si

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

è concluso a fine Gennaio 2011, nel 2012 la presenza di tossine algali del tipo P.S.P. è stata riscontrata in mitili allevati nel golfo di Oristano (Lorenzoni *et al.*, 2012). Il riscontro di queste tossine nei molluschi bivalvi, a livelli superiori ai limiti stabiliti dalla normativa sanitaria vigente, comporta il divieto di raccolta e commercializzazione per ovvi motivi di tutela della salute pubblica.

E' noto inoltre che alcune tossine del tipo P.S.P. possano anche essere prodotte da batteri appartenenti a generi *Moraxella*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Pseudomonas* (Tamplin *et al.*, 1990).

b.4. Struttura chimica delle tossine P.S.P.

Le tossine P.S.P. sono rappresentate dalla saxitossina e dai suoi analoghi; si conoscono circa 30 analoghi strutturali. Questa tossina fu isolata per la prima volta dal mollusco *Saxidomus giganteus*, raccolto in zone costiere dell'Alaska (Schantz *et al.*, 1957). La sua struttura chimica è rappresentata da una tetroidropurina con due gruppi guanidinici; uno di questi (inserito nel cerchietto della Figura 2), è responsabile del blocco dei canali del Na⁺ (Figura 2).

I 30 analoghi strutturali della saxitossina, che costituiscono nell'insieme il gruppo delle tossine P.S.P., si dividono in: carbammati, composti N- sulfocarbamilici e decarbamilici (Figura. 2).

I tre gruppi hanno proprietà chimiche simili ma tossicità differente:

- alta nei composti carbammati
- media nei decarbamilici
- bassa nei composti N- sulfocarbamilici

I carbammati sono i principali costituenti presenti nei molluschi bivalvi, mentre i composti N-sulfocarbamilici rappresentano il gruppo predominante nei dinoflagellati.

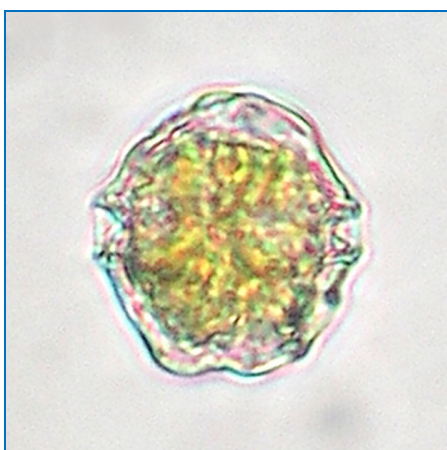
Tutti gli appartenenti ai tre gruppi sono composti idrosolubili, resistenti al calore, stabili in ambiente acido ma non in quello alcalino (Kao, 1972).

b.5. Meccanismo d'azione e sintomatologia clinica

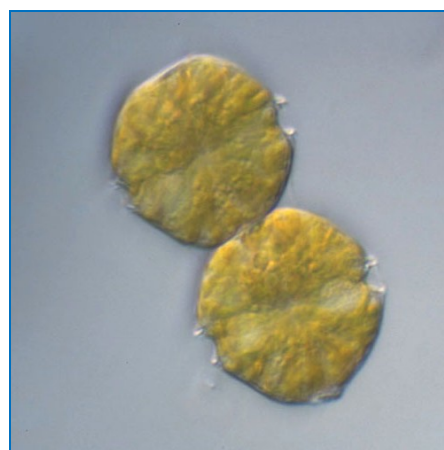
Le tossine del gruppo P.S.P. agiscono fondamentalmente sui canali del sodio, bloccando il trasporto di questi ioni attraverso la membrana (Figura 3). In questo modo possono bloccare la trasmissione dell'impulso nervoso nei nervi periferici e nei muscoli scheletrici, con conseguente paralisi respiratoria e nei casi più gravi morte (Steidinger *et al.*, 1984). La saxitossina è una tossina che ha una elevatissima tossicità acuta per l'uomo, con una dose letale di 1-2 mg; i suoi effetti sono simili a quelli della tossina botulinica (Viviani *et al.*, 1981; Steidinger *et al.*, 1984). I primi sintomi compaiono entro 30 minuti dall'ingestione di molluschi contaminati e consistono in: parestesia delle labbra, lingua ed estremità delle dita, profonda astenia muscolare, incapacità a mantenere la stazione eretta, perdita dell'equilibrio. Nei casi più gravi, l'evoluzione è molto rapida e la morte sopraggiunge per arresto respiratorio o cardiocircolatorio entro

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

2-12 ore, a seconda della quantità di tossina ingerita. La prognosi è favorevole nei casi di sopravvivenza nelle prime 12-24 ore. In circa il 50% dei pazienti che sopravvivono all'intossicazione permangono per circa tre settimane astenia e parziale perdita di memoria. Poiché attualmente non sono disponibili antisieri efficaci contro tutte le tossine P.S.P., la terapia è essenzialmente sintomatica e si basa sul lavaggio gastrico. Poiché la tossina è instabile in ambiente alcalino, può essere utile la somministrazione di bicarbonato di sodio. Nei casi più gravi, si fa ricorso all'intubazione e alla ventilazione meccanica (Auerbach *et al.*, 1988).



Alexandrium minutum



Alexandrium catenella

Figura 1. Alghe produttrici di tossine del tipo P.S.P.

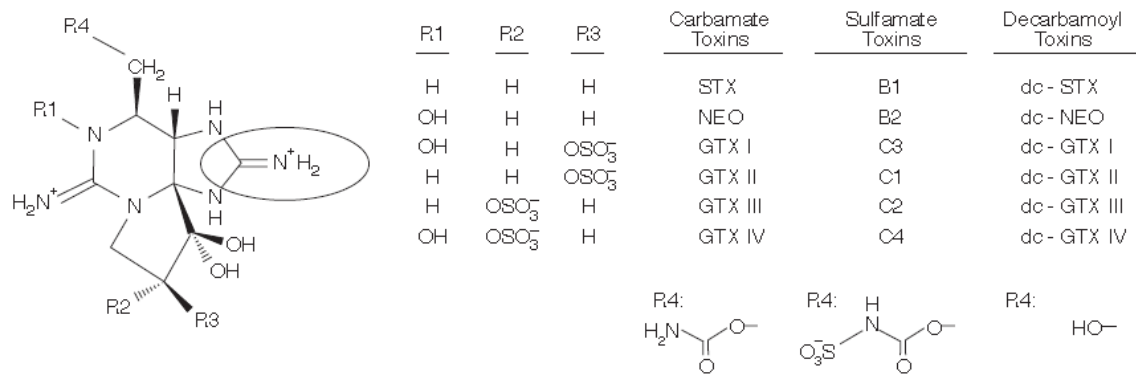


Figura. 2. Struttura chimica delle saxitossine; Paola Ade, Enzo Funari e Roberto Poletti in Il rischio sanitario associato alle tossine di alghe marine – Ann. Ist. Super Sanità 2003;39(1):53-68

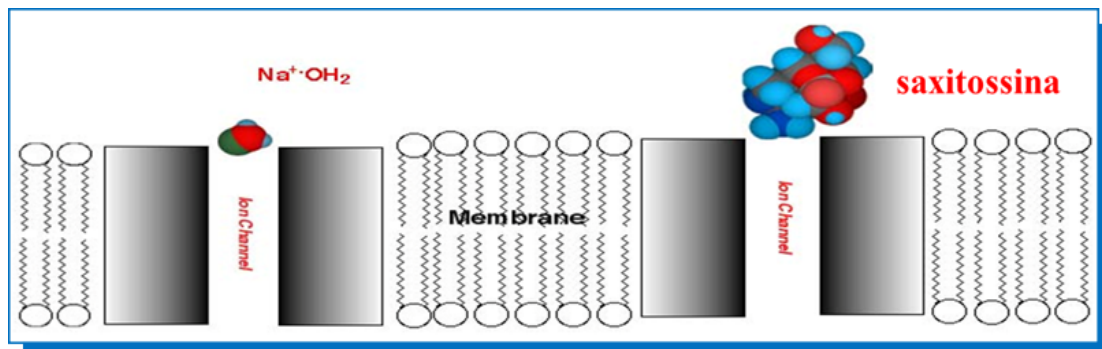


Figura 3. Azione della saxitossina sui canali del sodio

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

b .6. Epidemiologia

Il pericolo di intossicazione è associato al consumo di molluschi bivalvi che filtrano acqua contenente fitoplancton tossico, accumulando, in questo modo, tossine nei loro tessuti. I molluschi bivalvi maggiormente responsabili di questa intossicazione nell'uomo sono *Mytilus edulis* e *Saxidomus giganteus*.

Le tossine P.S.P. vengono trasferite lungo la catena alimentare anche nei pesci, che però sono più sensibili alla tossina e muoiono prima di arrivare nel piatto del consumatore. Il problema della intossicazione attraverso il consumo di prodotti ittici si pone nel caso in cui possano essere consumati crudi e con le interiora (Viviani *et al.* 1992). Una volta ingerite, le tossine P.S.P. subiscono processi di trasformazione che possono influire sulla loro tossicità. Ad esempio, le tossine del tipo sulfocarbammato, che rappresentano il gruppo con tossicità più bassa, si possono trasformare nei composti carbammati, con tossicità molto più alta. Quindi può accadere che molluschi con bassa tossicità possano causare, una volta ingeriti, intossicazioni sproporzionatamente importanti. La maggior parte degli episodi di intossicazioni da P.S.P. sono dovuti a fioriture di dinoflagellati.

In Canada, dal 1973 sono stati riportati oltre 300 casi di intossicazioni P.S.P. con 35 decessi (White, 1984). In Portogallo, Spagna, Inghilterra, Norvegia sono riportati casi di P.S.P. dal 1960. La presenza di tossine P.S.P. è stata rilevata in Inghilterra dal Maggio 1968, quando 78 persone si intossicarono dopo aver consumato mitili provenienti dalla costa nordorientale dell'Inghilterra. Nel 1976 un'epidemia di P.S.P. è stata riportata in Europa occidentale a seguito del consumo di mitili provenienti dalla costa atlantica della

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Spagna, con intossicazioni in Spagna (63 casi), Francia (33 casi), Italia (38 casi) Svizzera (23 casi) e Germania (19 casi) (Luthy *et al.*, 1979). Successivamente la presenza di tossine P.S.P. in mitili è stata rilevata anche lungo le coste spagnole del Mediterraneo (Bravo *et al.*, 1990; Delgado *et al.*, 1991). Nel 1994 una fioritura di *A.minutum* è stata rilevata lungo le coste del Marocco, in quell'occasione sono stati riportati circa 64 casi di intossicazione, di cui 4 mortali (Tagmouti *et al.*, 1995).

Dal 1970 sono stati riportati diversi casi di intossicazione anche in sud America in Venezuela; nel 1987 in Guatemala dove l'intossicazione richiese il ricovero in ospedale di 186 persone, 26 delle quali poi morirono (Rosales-Loessener *et al.*, 1989).

Nella Patagonia cilena nel 2002 sono morti due pescatori circa quattro ore dopo aver mangiato 7 – 8 molluschi bivalvi (*Aulacomyaater*). La concentrazione di STX equivalente era di 8575 µg/100 g di p.e. (García *et al.*, 2004). Tutti gli episodi riportati sono dovuti al consumo di mitili. E' stato evidenziato un caso di morte in Indonesia dovuto al consumo di pesci contaminati da tossine P.S.P., ingeriti con le interiora (Viviani *et al.*, 1992).

Nell'estate del 2004 in Cina, sono stati segnalati 55 casi di P.S.P., con un caso di morte, dovuti al consumo di gasteropodi (*Nassarius spp*) contaminati. Nell'aprile e maggio del 2002 nella provincia cinese dello Fujian lo stesso vettore ha causato la morte di tre persone e 50 ospedalizzazioni (Deeds *et al.*, 2008).

I bambini, perché più sensibili, sono molto più esposti degli adulti al pericolo della STX. In Guatemala nel 1987, durante il grave episodio di intossicazione da P.S.P., la

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

mortalità dei bambini con età inferiore ai sei anni è risultata del 50%, rispetto a quella degli adulti che è risultata essere del 7% (Rosales-Loessener *et al.*, 1989).

La mortalità varia notevolmente nei diversi paesi. In America settentrionale e in Europa il tasso di mortalità è molto basso, mentre episodi analoghi in Asia ed America meridionale presentano valori del 2-14%, probabilmente per una maggiore difficoltà di accesso alle strutture ospedaliere.

Durante gli ultimi vent'anni, i casi di intossicazione da tossine P.S.P. sono aumentati in tutto il mondo (Ade *et al.*, 2003).

b.7. Limiti di legge per le tossine del tipo P.S.P.

La legislazione comunitaria (Reg. CE n. 853/04) prevede un limite di tolleranza per le tossine P.S.P. nei molluschi bivalvi di 800 µg di saxitossina equivalente/kg di parte edibile.

b.8. Bibliografia

Ade P., Funari E., Poletti R., 2003. Il Rischio sanitario associato alle tossine di alghe marine. *Ann Ist Sup Sanità*; (39) (1): 53-68.

Anderson D.M., 1994. Le maree rosse. *Le Scienze*; 314 (10):74-81.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

- Auerbach P.S., 1988. Clinical therapy of marine envenomation and poisoning. In: Tu AT (Ed.). Handbook of natural toxins-marine toxins and venoms. New York and Basel: M Dekker Inc.; p. 493-565.
- Boni L., Pompei M., Reti M., 1986. Maree colorate e fioriture algali lungo le coste dell'Emilia Romagna dal 1982 al 1985 con particolare riguardo alla comparsa di *protogoniaulax tamarensis*. *Nova Thalassia*; 3:237-45.
- Bravo I., Reguera B., Martinez A., Fraga S., 1990. First report of *Gymnodinium catenatum* graham in the Mediterranean coast. In: Granéli E, Sundstrom B, Edler L, Anderson D.M. (Ed.). Toxic marine phytoplankton. New York: Elsevier Science Publisher. Co: 449-52.
- Bricelj V.M., Cembella A.D., Laby D., Shumway S.E., Cucci C.L., 1996. Comparative physiological and behavioral responses to P.S.P. toxins in two bivalve molluscs, the softshell clam, *Mya arenaria*, and surfclam, *Spisula solidissima*. *Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO: Paris*; 405-406.
- Bricelj V.M., Shumway S.E., 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.*; 6, 315-383.
- Cabrini M., Mozetic P., Chiurco R., Cok S., Predonzani S., 1997. P.S.P. toxicity and the distribution of *Alexandrium spp* in the gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). *Proceedings of the VIII International Conference on Harmful algae (abstract and poster classification)*. Paris: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO; 48.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

- Carrada G.C, Casotti R., Modich M., Saggiomo V., 1991. Presence of *gymnodinium catenatum* (dinophyceae) in a coastal Mediterranean lagoon. *J Plankton Res.*;13:229-38.
- Ciminiello P., Fattorusso E., Magno S., Oshima Y., Poletti R., Viviani R., Yasumoto T., 1995. Determination of P.S.P. toxins in mussels from the Adriatic sea. *Mar Pollut Bull*; 30, 7335.
- Deeds J.R., Landsberg H.J., Etheridge S.M., Grant C., Pitcher & Sara Watt Longan., 2008. Non Traditional Vectors for Paralytic Shellfish Poisoning, *Mar. Drugs*; 6, 308-348.
- Delgado M., Estrada M., Camp J., Fernandez J.V., Santmarti M., Lleti C., 1990. Development of toxic *Alexandrium minutum* halim (Dinophyceae) bloom in the harbour of Sant Carles de la Rapita (Ebro Delta, northwestern Mediterranean). *Sci. Mar.*;54:1-7.
- Garcia C., del Carmen Bravo M., Lagos M., Lagos N., 2004. Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicon.*; 43(2): 149-158.
- EU, 2004. Commission regulation (EC) No. 853/2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs.
- Honsell G., Boni L., Cabrini M., Pompei M., 1992. Toxic or potentially toxic dinoflagellates from the Northern Adriatic Sea. In: Vollenweider RA, Marchetti
- Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

- R, Viviani R (Ed.). Marine coastal eutrophication. New York: Elsevier Science Publishers; 107-14.
- Innamorati M., Lazzara L., Nuccio C., De Pol M., Mannucci M., Mori G., 1989. Popolamenti fitoplanctonici e condizioni ideologiche nell'arcipelago toscano. Resoconti dei rilevamenti in mare. Firenze; n. 6. p. 1-115.
- Jonas-Davies M., Liston J., 1985. The occurrence of P.S.P. toxins in intertidal organisms. In Toxic dinoflagellates; 467-472.
- Kao C.Y., 1972. Pharmacology of tetrodotoxin and saxitoxin. Fed Procb. 31:1117-23.
- Landsberg J.H., 1996. Neoplasia and biotoxins in bivalves: is there a connection? J. Shellfish. Res.; 15, 205-233.
- Lin S.J., Tsai Y.H., Lin H.P., Hwang D.F., 1998. Paralytic toxins in Taiwanese starfish *Astropecten scoparius*. Toxin; 36,799-803.
- Lorenzoni G., Arras I., Bazzardi R., Sanna G., Muzzigoni C., Pes A.M., Marongiu E., Virgilio S., 2012. Riscontri di positività da biotossine algali del tipo p.s.p. (*Paralytic Shellfish Poison*) in mitili allevati nelle zone di Olbia e di Oristano (Sardegna) e fioriture di *Alexandrium minutum* ed *Alexandrium catenella* negli anni 2002-2012 Atti XIV Congresso Nazionale S. I. Di. L. V.
- Lugliè A., Giacobbe M., Fiocca F., Sannio A., Sechi N., 2002. The geographical distribution of *Alexandrium catenella* is extending to Italy. First evidences from

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

the Tyrrhenian Sea. X International Conference on Harmful Algae, S. Pete Beach, Florida; 177.

Lugliè A., Giacobbe M.N., Penna A., Milandri A., Poletti R., Sannio A., Fiocca F. Ruiu R., Sechi N., 2003. Conoscenza e gestione della fascia costiera. Presenza e significato di specie di *Alexandrium* in aree portuali della Sardegna. 98° Congr. Soc. di Botanica Italiana, Catania, 24-26 settembre 2003:58.

Luthy J., 1979. Epidemic paralytic shellfish poisoning in western Europe, 1976. In: Taylor DL, Seliger HH (Ed.). Toxic dinoflagellate blooms. North Holland, New York: Elsevier; 1979. p. 15-22.

Marasovic I., Nincevic Z., Orhanovic S., Pavela-Vrancic M., 1990. DSP and P.S.P. toxicity in the coastal waters of the middle Adriatic (Kastela Bay). In: Reguera B., Blanco J., Fernandez M.L., Montresor M, Marino D, Zingone A, Dafnis G. Three alexandrium species from coastal Tyrrhenian waters (Mediterranean Sea). In: Granéli E, Sundstroem B, Edler L, Anderson DM (Ed.). Toxic marine phytoplankton. New York: Elsevier Science Publishing Co.; p. 82-7.

Oshima Y., 1995. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier: Paris; 475-480

Pagou K. Eutrophication problems in Greece. In: Eutrophication- related phenomena in the Adriatic Sea and in other Mediterranean coastal zones. Commission of the European Communities; 1990. (Water Pollution Research, Report 16). p. 97-114.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

- Rosales-Loessener F., De Porras E., Dix M.W., 1989. Toxic shellfish poisoning in Guatemala. In :Okaichi T., Anderson D.M., Nemoto T. (Ed.). Red tides: biology, environmental science and toxicology. New York: Elsevier; 113-6.
- Schantz E.J., Mold J.D., Stanger D.W., Shavel J., Riel F.J., Bowden J.P., Lynch J.M., Wyler R.S., Riegel B.R., Sommer H., 1957. Paralytic shellfish poisoning. VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clams and mussel tissues. *J. Am. Chem. Soc.*; 72, 5230-35.
- Schantz E.J., 1984. Historical perspective on paralytical shellfish poisoning in Seafood Toxins; American Chemical Society Symposium Series: Washington D.C.; 99 111.
- Shipway S.E., Barter J., Sherman-Caswell S., 1990. Auditing the impact of toxic algal blooms on oyster. *Environ Auditor*, 2: 41-56.
- Shumway S.E., Barter J., Sherman-Caswell S., 1990. Auditing the impact of toxic algal bloomson oyster. *Environ Auditor*; 2: 41-56.
- Shumway S.E., 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *J. World Aquacult. Soc.*; 21, 65-104.
- Shumway S.E., Cembella A.D., 1993. The impact of toxic algae on scallop culture and fishries. *Rev. Fish. Sci.*; 1, 21-150.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

- Steidinger K.A, Baden D.G., 1984. Toxic marine dinoflagellates. In: Spector DL (Ed.).
Dinoflagellates Orlando, Florida: Academic Press Inc.; 201-49.
- Sullivan J., Iwaoka W.T., Liston J., 1983. Enzymatic transformation of P.S.P. toxins in
the littleneck clam (*Protothaca staminea*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*;
114: 465-472.
- Tagmouti F., Chafak H., Fellat-Zarrouk R., Talbi M., Blaghen M., Mikou A., Guittet E.,
1995. Detection of toxins in bivalves of Moroccan coasts. In: Yasumoto T,
Oshima Y, Fukuyo Y (Ed.). Harmful and toxic algal blooms. Sendai:
Intergovernmental Oceanographic.
- Tamplin M.L., 1990. A bacterial source of tetrodotoxins and saxitoxins. *Marine Toxins.*
Origin, Structure and Molecular Pharmacology. ACS Symposium Series 418.
Am.Chem. Soc., Washington; 78-84.
- Taylor S.L., 1988. Marine toxins of microbial origin. *Food Technology*; 42 (3):94-98.
- Virgilio S., Marongiu E., Pisanu M., Mancuso R., Piras A., Viridis F., Saba A.,
Lorenzoni G., Rosa M.N., Carusillo F., Arras I., Sias S., Poletti R., 2003.
Riscontro di biotossine algali del tipo P.S.P. (Paralytic Shellfish Poisoning) in
mitili allevati nel Golfo di Olbia, Sardegna. *Atti XIII Congr. Naz. A.I.V.I.*
- Virgilio S., Pisanu M., Lorenzoni G., Carusillo F., Tedde T., Pes A., Terrosu G., Rosa
M.N., Canu A., Poletti R., 2006. Rischio Sanitario da biotossine algali del tipo
P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) in molluschi bivalvi oggetto di scambi
intracomunitari. *Atti XVI Convegno Naz. A.I.V.I.*

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Virgilio S., Marongiu E., Lorenzoni G., Canu A., Tedde T., Terrosu G., Uda M.T., Rosa M.N., Congiu S., Poletti R., 2007. Rischio Sanitario da biotossine algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) in mitili di produzione locale e di importazione: la gestione delle emergenze nella Regione Sardegna. Convegno Naz. A.I.V.I.

Virgilio S., Lorenzoni G., Tedde T., Terrosu G., Campus G., Rosa M.N., Mura A., Delogu P., Piras M., 2009. Riscontri di Tossine Algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poisoning*) in mitili allevati nella Regione Sardegna e gestione delle non conformità. Atti del XIX Convegno Nazionale Associazione Italiana Veterinari Igienisti A.I.V.I.

Viviani R., 1981. The veterinarian in the control of aquatic biotoxins. Bologna: Grasso; p. 1151.

Viviani R., 1992. Eutrophication, marine biotoxins, human health. In: Vollenweider R.A., Marchetti R., Viviani R. (Ed.). Marine coastal eutrophication. Proc. Inter. Conf. Bologna; Sci Total Environ; (suppl.):631-62.

White A.W., 1984. Paralytic shellfish toxins and finfish. In: Ragelis EP (Ed.). Seafood toxins ACS Symposium Series 269. Washington DC: American Chemical Society; 171-80.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Appendice – c: Manoscritto

Riscontri di positività da biotossine algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) in mitili allevati nelle zone di Olbia e di Oristano (Sardegna) e fioriture di *Alexandrium minutum* ed *Alexandrium catenella* negli anni 2002 – 2012

Publicato in forma adattata:

Atti Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria – XIV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. – Sorrento (Italia) 2012

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Riscontri di positività da biotossine algali del tipo P.S.P. (Paralytic shellfish poison) in mitili allevati nelle zone di Olbia e di Oristano (Sardegna) e fioriture di *Alexandrium minutum* ed *Alexandrium catenella* negli anni 2002 – 2012

c.1. Summary

The progressive diffusion of dinoflagellates belonging to *Alexandrium* genus (*A. catenella* and *A. minutum*) and the contamination of the mussels used usually as food with marine toxins represents an high risk for the human health and for business mussels farms. In this study, the authors reported results of analysis from 2002 to 2012 for detection of P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) toxins in mussels bred in Olbia and Oristano areas and the flowering of *A. minutum* and *A. catenella*.

c.2. Introduzione

La sindrome paralitica da molluschi bivalvi (*Paralytic Shellfish Poisoning*) costituisce in molte aree del mondo un rilevante problema di sanità pubblica, oltre che una importante causa di perdite economiche per gli operatori del settore ittico e della molluschicoltura in particolare.

Il riscontro di queste tossine nei molluschi bivalvi a livelli superiori ai limiti stabiliti dalla normativa sanitaria vigente (800 µg/Kg di parte edibile, Reg. CE n. 853/04)

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

comporta infatti il divieto di raccolta e commercializzazione dei prodotti per ovvi motivi di tutela della salute pubblica (Virgilio *et al.*, 2003).

Come è noto, alcune specie tossiche di microalghe dinoflagellate dei generi *Alexandrium* (in particolare *A.minutum* e *A.catenella*) sono in grado, in adatte condizioni ambientali, di moltiplicarsi rapidamente e di produrre tossine che possono accumularsi nelle parti edibili dei molluschi bivalvi, insensibili all'azione patogena delle tossine, rendendoli pericolosi per la salute del consumatore (Lugliè, 2009).

c.3. Materiale e Metodi

In attuazione del Piano Regione Sardegna per la vigilanza ed il controllo sanitario della produzione e commercializzazione e per il monitoraggio periodico delle zone di produzione e di stabulazione dei molluschi bivalvi vivi, dal 2002 ad Agosto del 2012 è stata effettuata, presso il Dipartimento di Igiene degli Alimenti dell'I.Z.S. della Sardegna, la ricerca delle tossine algali di tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*), mediante prova biologica su topo (*mouse test* AOAC 958.08), su un totale di 6608 campioni di molluschi bivalvi provenienti dalle diverse aree di allevamento della Sardegna. La ricerca del fitoplancton è stata effettuata dal Dipartimento di Botanica e Ecologia Vegetale dell'Università di Sassari; i conteggi sono stati effettuati con il metodo di Utermöhl (1931).

c.4. Risultati e Discussioni

In considerazione dei numerosi casi di positività per P.S.P. riscontrati in Sardegna in mitili allevati nel golfo di Olbia e nel golfo di Oristano e dell'elevato rischio sanitario derivante dal consumo di questi prodotti, abbiamo ritenuto utile portare all'attenzione della comunità scientifica i risultati degli accertamenti biotossicologici effettuati nel decennio 2002 – 2012.

Nella Regione Sardegna sono state individuate due aree di allevamento a rischio elevato: il golfo di Olbia con le zone di Cugnana e Porto Pozzo e il golfo di Oristano con foce del Tirso; in entrambe si sono verificati fenomeni di fioritura di *Alexandrium minutum* e *Alexandrium catenella*, contemporaneamente o singolarmente ritenute responsabili della produzione delle tossine P.S.P..

Nella tabella n. 1 (Virgilio *et al.*, 2003; Virgilio *et al.*, 2007; Virgilio *et al.*, 2009; Lorenzoni *et al.*, 2011) sono riportati i dati relativi alle positività rispetto ai campioni totali e la percentuale di positivi. Nella tabella n. 2 (Virgilio *et al.*, 2003; Virgilio *et al.*, 2007; Virgilio *et al.*, 2009; Lorenzoni *et al.*, 2011) sono riportati i riferimenti temporali in cui è stata riscontrata la presenza di P.S.P., il n. di campioni prelevati e le zone di provenienza. Nella tabella n. 3 (Virgilio *et al.*, 2003; Virgilio *et al.*, 2007; Lugliè *et al.*, 2009; Virgilio *et al.*, 2009; Lorenzoni *et al.*, 2011) è riportata la sintesi delle caratteristiche relative agli eventi di positività per P.S.P. nelle zone di Olbia e di Oristano: distretto, area, anno, periodo durante il quale si è avuto il blocco della commercializzazione, massima concentrazione cellule/litro di *A. catenella* e *A. minutum*,

massima concentrazione di tossine P.S.P. calcolata in $\mu\text{g di STX eq/Kg p.e.}$, e durata in giorni del periodo di tossicità.

Gli eventi si sono verificati nei distretti di Olbia ed Oristano, interessando rispettivamente il Golfo di Olbia, Cugnana e Porto Pozzo, e il Golfo di Oristano e la Foce Tirso, mostrando una certa stagionalità nelle diverse aree (inverno-primavera, nel distretto di Olbia; autunno-inverno, nel distretto di Oristano). La massima densità cellulare, pari a 3738 cellule/litro, è stata riscontrata nel periodo Aprile-Maggio del 2002 in corrispondenza della massima concentrazione per P.S.P. pari a 2510 $\mu\text{g STX eq/kg p.e.}$ La durata massima degli eventi di tossicità è stata di 50 giorni. L'evento più lungo si è verificato nell'inverno 2008 – 2009 a Porto Pozzo, con una dinamica caratterizzata da due distinti periodi di tossicità, uno in prosecuzione dell'altro, simile a quello contemporaneamente presente nel Golfo di Cugnana (Tabella n. 3; Figura n.1).

L'assenza di un livello critico di densità cellulare indica la necessità di un alto grado di attenzione anche in presenza di abbondanze modeste di *A. minutum* e di *A. catenella*.

c.5. Figure

c.5.1. *Figura 1.* Densità cellulare (cellule/litro) di *A. minutum* e *A. catenella*. Concentrazione tossine P.S.P. in µg STX eq/Kg p.e., Anni 2002 – 2012.

c.6. Tabelle

c.6.1. *Tabella 1.* Determinazioni biotossicologiche per ricerca di tossine del tipo P.S.P (*Paralytic Shellfish Poison*) in molluschi bivalvi prelevati dalle AA.SS.LL. della Sardegna nel decennio 2002-2012.

c.6.2. *Tabella 2.* Riscontri di positività da tossine algali P.S.P in molluschi bivalvi nella regione Sardegna rapportati ai mesi degli anni presi in considerazione, al numero di campioni prelevati e alle zone di provenienza.

c.6.3. *Tabella 3.* Caratteristiche relative agli eventi di positività per P.S.P. nelle zone di Olbia ed di Oristano: distretto, area, anno del prelievo, periodo del blocco della commercializzazione, massima concentrazione cellule/litro di *A. catenella* e *A. minutum*, massima concentrazione di tossine P.S.P. calcolate in µg di STX eq/Kg p.e., durata del periodo di tossicità.

Figura 1. Densità cellulare (cellule/litro) di *A. minutum* e *A. catenella*. Concentrazione tossine P.S.P. in $\mu\text{g STX eq/Kg p.e.}$. Anni 2002-2012.

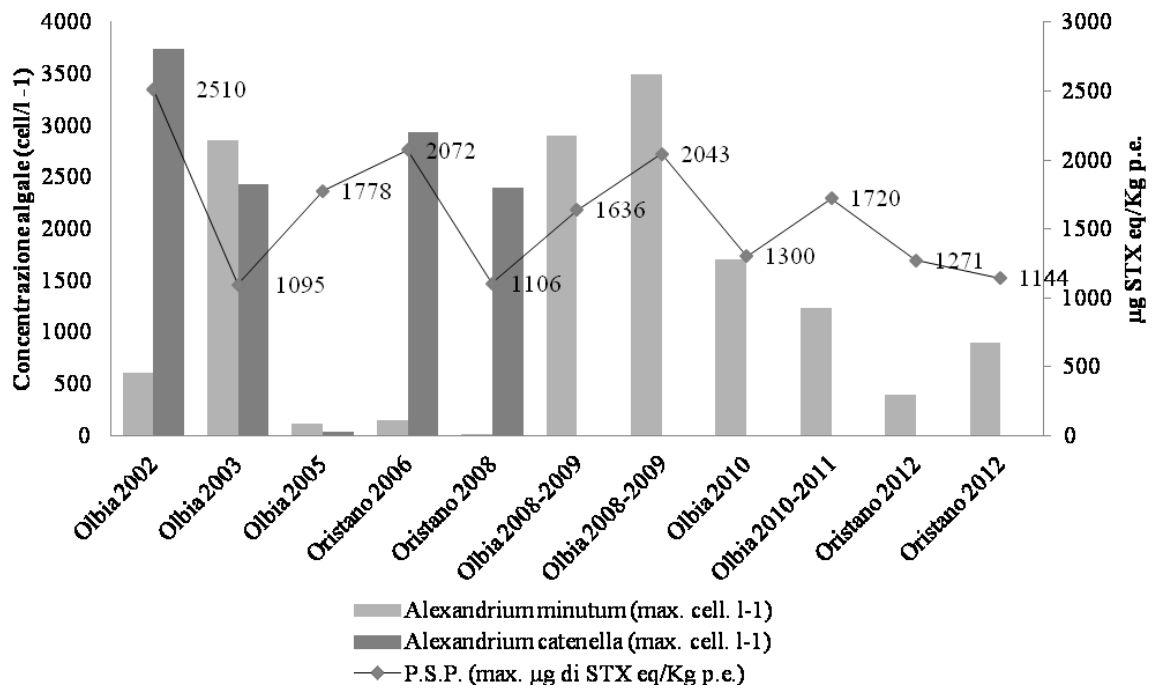


Tabella 1. Determinazioni biotossicologiche per la ricerca di tossine del tipo P.S.P (*Paralytic Shellfish Poison*) in molluschi bivalvi prelevati dalle AA.SS.LL. della Sardegna nel decennio 2002-2012

Anno	n. Campioni	n. Positivi	% Positivi
2002	776	16	2%
2003	754	12	1.6%
2005	762	15	2%
2006	913	5	0.5%
2008	834	16	1.9%
2009	628	14	2.2%
2010	671	5	0.7%
2011	723	2	1.4%
2012 (Agosto)	547	2	0.4%

Tabella 2. Riscontri di positività da tossine algali P.S.P in molluschi bivalvi nella Regione Sardegna rapportati ai mesi degli anni presi in considerazione, al numero di campioni prelevati e alle zone di provenienza

Mese-anno	No.Campioni	No.Positivi	Zona
Maggio 2002	74	16	G. di Olbia
Aprile-Maggio 2003	181	12	G. di Olbia
Gennaio-Febrero 2005	25	15	G. di Cugnana
Novembre 2006	18	5	Oristano
Novembre 2008	5	5	Oristano
Dicembre 2008	20	11	G. di Cugnana e P.Pozzo
Gennaio-Febrero 2009	25	14	G. di Cugnana e P. Pozzo
Febbraio-Marzo-Dicembre 2010	69	5	P. Pozzo
Gennaio 2011	7	2	P. Pozzo
Febbraio 2012	6	2	Oristano

No. Numero campioni
G. Golfo

Tabella 3. Caratteristiche relative agli eventi di positività per P.S.P. nelle zone di Olbia ed di Oristano: distretto, area, anno del prelievo, periodo del blocco della commercializzazione, massima concentrazione cellule/litro di *A. catenella* e *A. minutum*, massima concentrazione di tossine P.S.P. calcolate in μg di STX eq/Kg p.e., durata del periodo di tossicità

Distretto	Area	Anno	Periodo blocco commercializzazione	Alexandrium Catenella (max.cellule/litro)	Alexandrium minutum (max.cellule/litro)	Concentrazione tossine P.S.P. (max. μg di STX eq/Kg p.e.)	Durata Tossicità (giorni)
Olbia	Golfo Olbia	2002	Maggio	3738	613	2510	18
Olbia	Golfo Olbia	2003	Aprile- Maggio	2434	2857	1095	14
Olbia	Cugnana	2005	Gennaio-Febbraio	40	120	1778	26
Oristano	Foce Tirso	2006	Novembre	2940	146	2072	9
Oristano	Golfo Oristano	2008	Novembre	2400	20	1106	11
Olbia	Cugnana	2008-2009	Dicembre-Gennaio-Febbraio	0	2900	1636	47
Olbia	Porto Pozzo	2008-2009	Dicembre-Gennaio	0	3500	2043	50
Olbia	Porto Pozzo	2010	Febbraio-Marzo-	0	1700	1300	23
Olbia	Porto Pozzo	2010-2011	Dicembre-Gennaio	0	1240	1720	22
Oristano	Foce Tirso	2012	Febbraio	0	400	1271	7
Oristano	Golfo Oristano	2012	Febbraio	0	900	1144	7

c.7. Bibliografia

Lorenzoni G., Tedde T., Terrosu G., Fattaccio C., Salza S., Arras I., Sanna G., Canu A., Uda M.T., Marongiu E., Virgilio S., 2011. La gestione delle non conformità da biotossine algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) in mitili allevati e commercializzati nella regione Sardegna. Atti del XXI Convegno nazionale A.I.V.I.; Signa (FI) 8- 9-10 Giugno, 80.

Lugliè A., Buzzoni A. M., Satta C. T., Virgilio S., Lorenzoni G., Sechi N., 2009. Eventi di *Paralytic Shellfish Poisoning* (P.S.P.) in Aree di Molluschicoltura lungo le Coste della Sardegna. XIX Congresso della Associazione Italiana di Oceanologia e Limnologia; Venezia, Isola di S. Servolo 23-25 Settembre.

Virgilio S., Lorenzoni G., Tedde T., Terrosu G., Campus G., Rosa M.N., Mura A., Delogu P., Piras M., 2009. Riscontri di tossine algali del tipo P.S.P. in mitili allevati nella regione Sardegna e gestione delle non conformità. Atti del XIX Convegno nazionale A.I.V.I.; Perugia 24-25-26 Giugno.

Virgilio S., Marongiu E., Lorenzoni G., Canu A., Tedde T., Terrosu G., Uda M.T., Rosa M.N., Congiu S., Poletti R., 2007. Rischio sanitario da biotossine algali del tipo P.S.P. in mitili di produzione locale e di importazione: la gestione delle emergenze nella Regione Sardegna. Atti XVII Convegno nazionale A.I.V.I.; Cesenatico, 14-16 Giugno.

Virgilio S., Marongiu E., Pisanu M., Mancuso R., Piras A., Viridis F., Saba A., Lorenzoni G., Rosa M.N., Carusillo F., Arras I., Sias S., Poletti R., 2003.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari

Riscontro di biotossine algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poisoning*) in mitili allevati nel golfo di Olbia, Sardegna. Atti XIII Congr. Naz. A.I.V.I.; Montesilvano (Pescara), 6-7-8 Giugno, 209 – 213.

Riccardo Bazzardi – “Indagine sulla presenza di Norovirus in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna” – Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università degli Studi di Sassari