mipaaf
Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

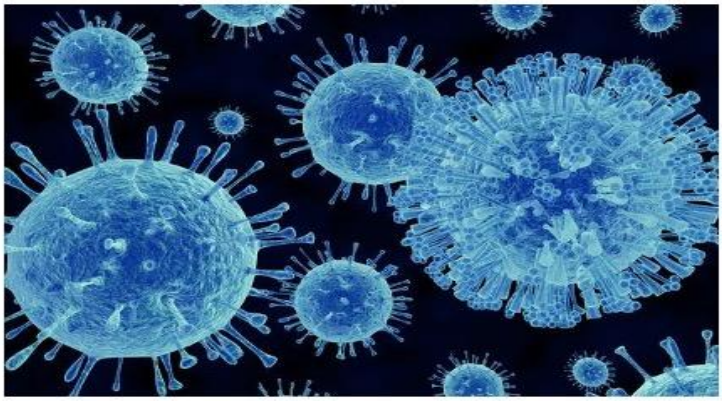
FEAMP
2014 | 2020

REGIONE LIGURIA

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta
J. Allara

Progetto FEAMP 2014-2020 mis. 2.51

Convenzione DRGL n. 1015 del 29/11/2019 e ss.mm.ii. per studi volti all'aumento del potenziale dei siti di acquacoltura



Relazione Finale IZS - SEZIONE 3

Analisi dei parametri microbiologici e chimici e valutazioni sulla possibilità di utilizzare le aree "Bocca di Magra Esterna" e "Diga Foranea Esterna", come zone utili ad interventi post raccolta per ridurre la presenza dei contaminanti virali nei molluschi bivalvi.

Sommario

1. Introduzione 3
2. Elenco dei collaboratori 5
3. Materiali e metodi 6
3.1 Analisi dei parametri microbiologici e chimici dei bivalvi relativi al monitoraggio 6
3.2 Depurazione naturale a tempi prolungati 7
4. Risultati e discussione 14
4.1 Analisi dei parametri microbiologici e chimici dei bivalvi relativi al monitoraggio 14
4.2 Valutazione della depurazione naturale a tempi prolungati 18
5. Conclusioni 26
6. Bibliografia 27

1. Introduzione

Nell'ambito del progetto sugli studi volti all'aumento del potenziale dei siti di acquacoltura FEAMP 2014-2020, mis. 2.5.1, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta (IZS PLV) ha partecipato come supporto tecnico stabilito dalla convenzione istituita con la Regione Liguria in collaborazione con Arpal, Asl 5 e IZS PLV.

L'attività dell'IZS PLV si è svolta principalmente nella terza fase del progetto (F3.2), che ha previsto l'esecuzione delle analisi di laboratorio sulle diverse specie di molluschi bivalvi campionati nei vivai sperimentali, allocati nelle zone marine oggetto di studio e nell'ultima fase (F5), attraverso l'interpretazione dei dati per il giudizio complessivo delle Aree marine studiate (Figura 1).

Allegato 6
Timesheet del Progetto di individuazione delle Aree marine e Suddivisione competenze - anno 2021

		gen-21	feb-21	mar-21	apr-21	mag-21	giu-21	lug-21	ago-21	set-21	ott-21	nov-21	dic-21	Partner coinvolti
Attività	mesi	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
F3	Piano di campionamenti sulle matrici "acqua di mare" e "molluschi bivalvi"													
F3.1	Programmazione, preparazione ed esecuzione dei campionamenti con raccolta dei dati relativi alle caratteristiche chimico-fisiche delle aree marine						Archiviazione ed elaborazione dei dati analitici relativi alle acque di mare ed ai molluschi bivalvi							ARPAL - ASL 5
F3.2	Esecuzione delle analisi di laboratorio													ARPAL - IZS PLV
F3.3	Archiviazione dei risultati delle analisi di laboratorio e delle caratteristiche chimico-fisiche delle acque marine													ARPAL - ASL 5
F3.4	Raccolta di dati relativi alle caratteristiche fisiologiche dei molluschi bivalvi per la valutazione dell'attitudine all'accrescimento													ASL 5
F4	Desk study per la qualificazione ambientale e trofica delle aree marine													
F4.1	Raccolta, elaborazione e valutazione dei risultati analitici condotti sulle matrici "acqua di mare" e "sedimento"						Relazione intermedia: valutazione trofica delle Aree marine							ARPAL
F5	Interpretazione dei dati per il giudizio complessivo delle Aree marine in oggetto													
										Relazione finale relativa all'individuazione delle Aree marine				ARPAL - ASL 5 - IZS PLV

Figura 1: Parte del cronoprogramma relativo alle fasi in cui ha partecipato L'IZS PLV

In particolare, la fase del progetto (F3.2) si è articolata in due parti: una fase principale della durata di un anno, durante il quale sono state eseguite le analisi batteriologiche, virologiche e chimiche sulle varie specie di molluschi bivalvi campionati nei vivai sperimentali, necessarie alla caratterizzazione dei siti oggetto di studio, ed una fase secondaria, in cui è stata indagata la possibilità di utilizzare le aree oggetto di studio come aree utili ad interventi post raccolta per ridurre la presenza dei contaminanti virali nei molluschi bivalvi provenienti da aree più contaminate. L'esigenza di approfondire questa ultima tematica deriva dal fatto che le ostriche sono tra i bivalvi più spesso implicati in focolai di gastroenteriti sostenute dal

patogeno Norovirus (NoV) in quanto consumate crude o poco cotte. Nel 2020 questo virus ha causato 130 focolai in Europa (EFSA and ECDC, 2021). In base ai dati dell'EFSA 2021 è stata misurata la contaminazione da NoV nelle ostriche crude, risulta che un terzo dei mitili in Europa risulta contaminato. Il virus è stato trovato nel 34,5% dei mitili prelevati presso i siti di produzione e nel 10,8% di quelli in vendita. Il rapporto dell'Efsa è stato condotto su un totale di 2.180 campioni prelevati dalle aree di produzione e 2.129 dai centri di spedizione: l'indagine è durata due anni. Le analisi mostrano un forte effetto stagionale, con una maggiore contaminazione nel periodo da novembre ad aprile, nonché una minore contaminazione per le aree di classe A rispetto ad altre classi. Nella prima zona, infatti, le leggi non prevedono particolari trattamenti prima della commercializzazione, cosa necessaria invece nelle ostriche provenienti dalla classe B. Il livello medio di contaminazione è stato di 337 copie di materiale genetico per grammo (cpg) nelle zone di produzione, e di 168 cpg nelle altre. Inoltre, la metà circa delle ostriche (il 17,5% di quelle dei siti di produzione e il 5,59% delle altre) aveva una media di 200 cpg, mentre le percentuali di quelle con valori superiori a 500 (indice considerato ad alto rischio di infezioni e di epidemie) sono state rispettivamente, 8,71% e 1,17% (EFSA, 2019). Il virus è altamente infettivo e bastano 10 particelle virali per dare vita a un'infezione. Data la loro persistenza nell'ambiente, che ne permette la replicazione e diffusione anche per due settimane dopo l'infezione iniziale, i NoV sono difficili da controllare ed è quindi necessario applicare rigorose misure sanitarie per prevenirli e contenerli. La trasmissione avviene direttamente da persona a persona, per via oro-fecale o via aerosol, oppure tramite acqua o cibo infetti, ma anche per contatto con superfici contaminate. Nella maggior parte dei casi documentati la trasmissione è avvenuta mediante il consumo di acqua o alimenti contaminati. L'EFSA ha quindi evidenziato la necessità di stabilire dei limiti quantitativi per i contaminanti virali nei molluschi e in particolare per la combinazione ostriche-NoV, in relazione all'elevata prevalenza di questo virus e al rischio che le ostriche pongono per la sua trasmissione (EFSA, 2012). Nel biennio 2017-2018, è stato condotto un monitoraggio europeo ("EU baseline survey of NoV in oysters", EFSA 2016) per la raccolta armonizzata dei dati necessari a delineare eventuali criteri microbiologici per questa combinazione.

Il Centro per l'ambiente, la pesca e l'acquacoltura ha inoltre sottolineato l'importanza di validare le diverse strategie di intervento per la riduzione dei contaminanti virali nelle diverse fasi di produzione (inclusa la depurazione post-harvest dei molluschi bivalvi) (CEFAS 2016). L'approccio convenzionale alla depurazione delle ostriche, previsto dalla normativa vigente nei confronti del microrganismo "target" *E. coli,* non è efficace nell'abbattere la

contaminazione da parte di tutti i microrganismi patogeni, come dimostrano gli episodi di gastroenterite virale che si verificano ogni anno in tutto il mondo in relazione al consumo di molluschi bivalvi conformi per il suddetto parametro (McLeod et al., 2017). Risulta pertanto importante individuare diverse strategie di intervento post-raccolta per ridurre questi patogeni nelle ostriche al fine di aumentarne la sicurezza per i consumatori. Alcuni studi suggeriscono la possibilità di abbinare una stabulazione a mare prolungata in acque non contaminate con una depurazione classica in vasca per migliorare l'abbattimento della carica dei microrganismi più resistenti.

Durante il progetto, quindi, è stata indagata l'efficacia di una depurazione naturale prolungata per la riduzione quantitativa di NoV nelle ostriche della specie *Crassostrea gigas* in queste nuove zone che sono risultate meno contaminate per il parametro NoV.

2. Elenco dei collaboratori

Operatore	Ente	Qualifica	Attività
Carlo Ercolini	IZS PLV La Spezia	Dirigente Veterinario S.C.	Responsabile scientifico U.O. Supervisione e coordinamento
Laura Serracca	IZS PLV La Spezia	Dirigente Biologo S.S. Levante Ligure	Coordinamento dei campioni, valutazione ed elaborazione dei risultati
Roberta Battistini	IZS PLV La Spezia	Ricercatore Sanitario S.S. Levante Ligure	Esecuzione analisi virologiche
Chiara Masotti	IZS PLV La Spezia	Ricercatore Sanitario S.S. Levante Ligure	Esecuzione analisi virologiche
Alessandra Terarrolli	IZS PLV La Spezia	Tecnico di Laboratorio S.S. Levante Ligure	Esecuzione analisi microbiologiche
Monica Corsi	IZS PLV La Spezia	Tecnico di Laboratorio S.S. Levante Ligure	Esecuzione analisi microbiologiche
Gabriella De Montis	IZS PLV La Spezia	Perito Chimico S.S. Levante Ligure	Esecuzione analisi
Barbara Vivaldi	IZS PLV Genova	Dirigente Chimico	Esecuzione analisi biotossicologiche

3. Materiali e Metodi

3.1. Analisi dei parametri microbiologici e chimici dei bivalvi relativi al monitoraggio

L'IZS PLVA si è occupato dell'esecuzione delle analisi microbiologiche, virologiche e chimiche di molluschi bivalvi appartenenti alle specie: *Crassostrea gigas, Ostrea edulis, Mytilus galloprovincialis*, e *Ruditapes philippinarum* provenienti dalle tre aree oggetto di studio: Bocca di magra Esterna (BME), Bocca di Magra Interna (BMI) e Diga Foranea Esterna (DFE). In particolare, dalla zona BME sono stati analizzati 12 campioni di mitili, 11 campioni di ostriche concave e di 6 campioni di ostriche piatte, mentre dalla zona DFE sono stati analizzati 12 campioni di mitili, 11 campioni di ostriche concave e 5 campioni di ostriche piatte. Infine, dalla zona BMI è stato effettuato un solo campione di vongole ed analizzato unicamente per i criteri microbiologici a causa dell'esiguità del campione.

Le analisi microbiologiche sono state effettuate tramite prove accreditate dal Laboratorio della S.S Levante Ligure. I parametri ricercati sono stati:

- *Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus,* metodo ISO 21872-1:2017
- *E.coli metodo* MUST PROBABLE NUMBER - ISO 16649-3:2015
- *Salmonella* spp. - metodo ELFA - AFNOR BIO 12/32 - 10/11- ISO 6579-1:2017

Le analisi virologiche sono state effettuate tramite prove non accreditate dal Laboratorio della S.S Levante Ligure. I parametri ricercati sono stati:

- Norovirus
- HAV

Le analisi per la ricerca delle biotossine algali sono state effettuate tramite prove accreditate dal Laboratorio di chimica della S.S Genova - Portualità. I parametri ricercati sono stati:

- DSP – metodo LC-MS/MS AESAN EU-RL-MB Lipophilic toxins Version 5:2015
- PSP, metodo HPLC-FLD - MI 10CH207 rev 1/0 2020.
- ASP Acido domoico metodo HPLC-UV - AESAN EU-RL-MB: SOP for Domoic Acid version 1:2008

Durante il progetto sono state eseguite un totale di 539 analisi come riportato in tabella 1:

Parametro	**Num. analisi**
E.coli	61
Salmonella spp.	61
Vibrio cholerae	58
Vibrio parahaemolyticus	58
Vibrio vulnificus	58
Norovirus GI	57
Norovirus GII	57
HAV	57
PSP,	24
DSP	24
ASP	24
Totale	**539**

Tabella 1*: Numero e tipologia di esami effettuati durante il monitoraggio sulle matrici molluschi bivalvi*

3.2. Depurazione naturale in mare a tempi prolungati

Questa fase del progetto è stata effettuata nel periodo invernale quando la concentrazione di NoV nei campioni di ostriche (*Crassostrea gigas*) risulta maggiore. Da Novembre 2021 a Marzo 2022 è stato effettuato un piano di campionamento (Figure da 2 a 6), in cui campioni di ostriche (costituiti da 60 individui) sono stati prelevati a mare con cadenza mensile presso una delle zone di produzione di classe B dell'allevamento nel Golfo della Spezia denominata "diga foranea interna di ponente" (DFPI) (Figura 7), dove la carica di NoV risulta tra le più elevate durante i mesi invernali. Un'aliquota del campione (c.a. 20 individui) è stata analizzata subito per la ricerca di NoV (T0), mentre altre 2 aliquote da 20 individui ciascuna sono state posizionate a mare rispettivamente in due differenti zone denominate "diga foranea esterna" (DFE) e "bocca di magra interna" (BME) (Figura 1). Trascorsi circa 30 giorni i campioni sono stati prelevati da queste aree e portati al Centro di depurazione e smistamento di Santa Teresa di Lerici (SP) e lasciati a depurare nei bins per 24h. L'impianto di depurazione prevede l'immissione dei molluschi in contenitori isotermici chiamati bins in cui viene immessa acqua marina purificata attraverso filtri a sabbia quarzifera, filtri biologici e uno schiumatoio che ha il compito di rimuovere le macromolecole disciolte, e

successivamente sterilizzata tramite raggi UVC. L'acqua inoltre viene arricchita di ossigeno e climatizzata per regolarne la temperatura e poterla mantenere tutto l'anno tra i 15°C e i 20 °C. L'impianto è inoltre dotato di uno sterilizzatore ad Ozono per aumentare l'efficacia di disinfezione. Trascorse le 24 h le ostriche sono state prelevate dalla vasca di depurazione e consegnate all'IZS PLV per l'analisi dei parametri virali
I campioni sono stati preparati ed analizzati per la ricerca dei NoV genogruppi I (GGI) e II (GGII) mediante: Real Time RT-PCR in accordo al metodo ISO 15216-1:2017, come descritto successivamente. In totale sono stati analizzati 48 campioni: 24 per il parametro NoV GI e 24 per NoV GII.

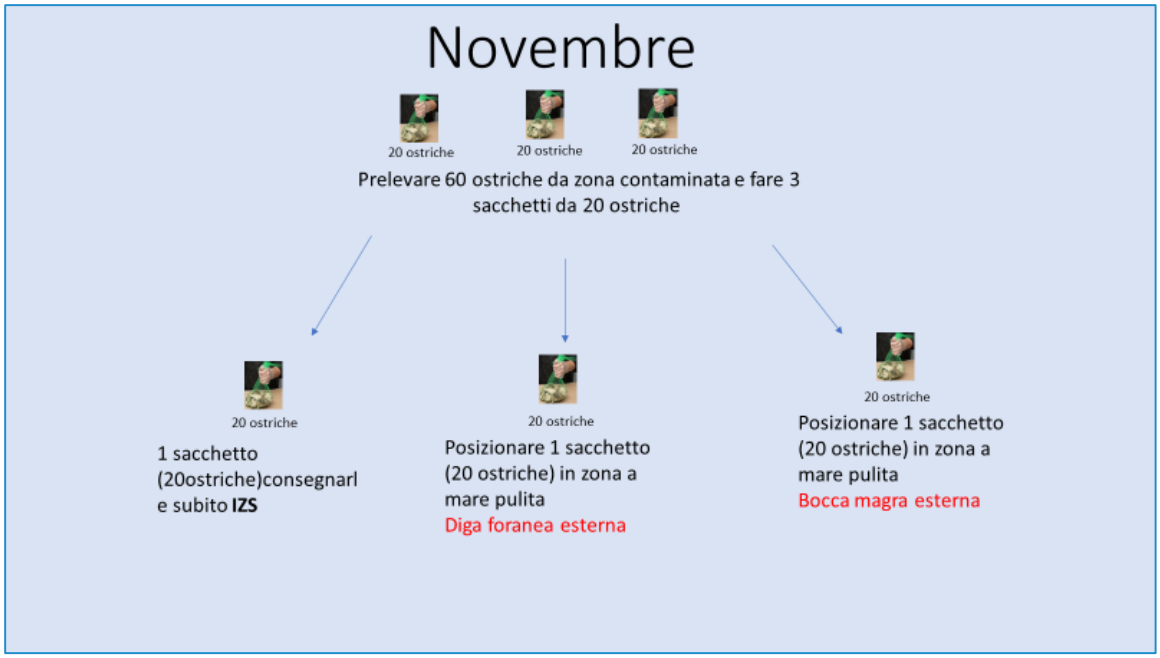


Figura 2: *Schema campionamento I° prelievo (mese di Novembre)*

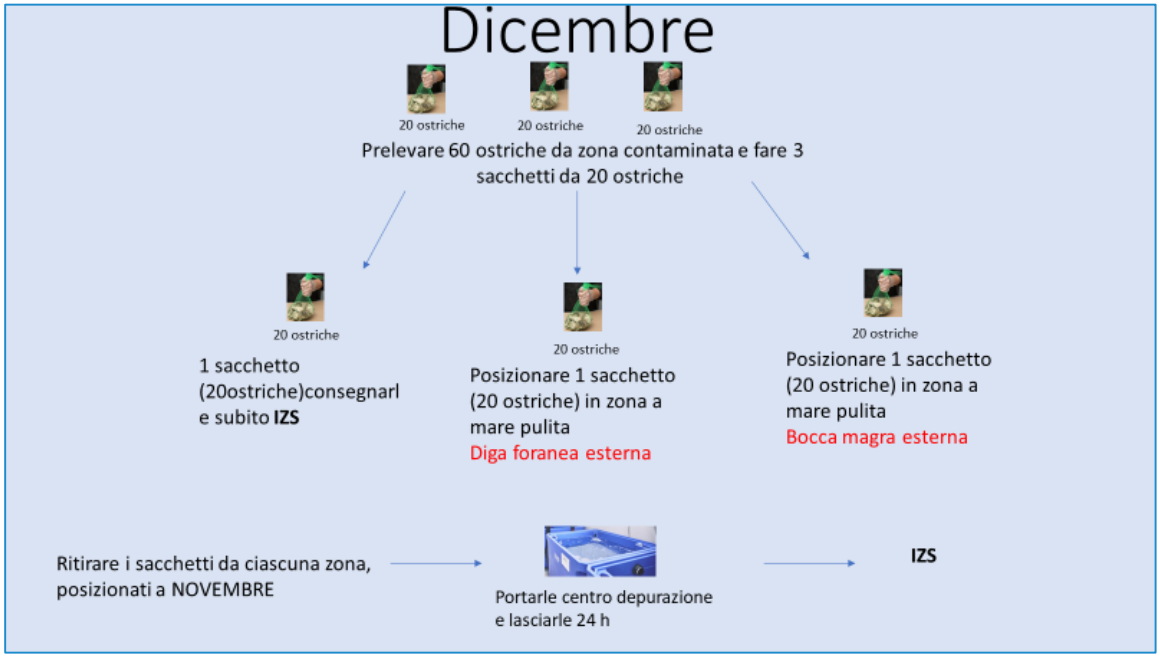


Figura 3: *Schema campionamento II° prelievo (mese di Dicembre)*

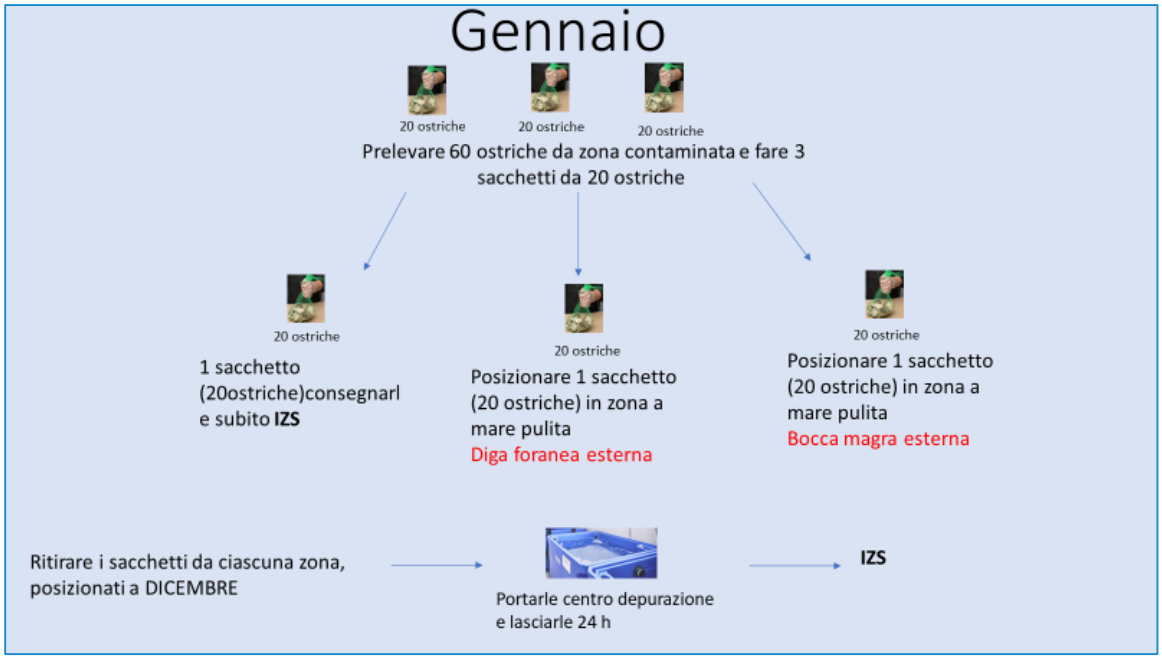


Figura 4: *Schema campionamento III° prelievo (mese di Gennaio)*

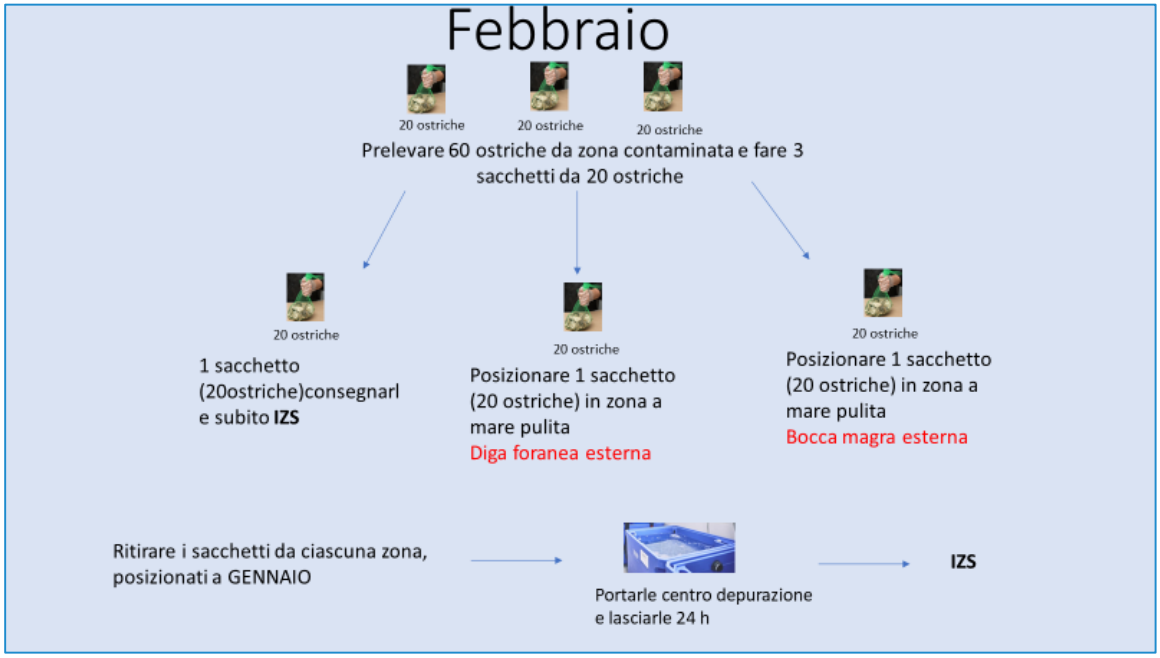


Figura 5: *Schema campionamento IV° prelievo (mese di Febbraio)*

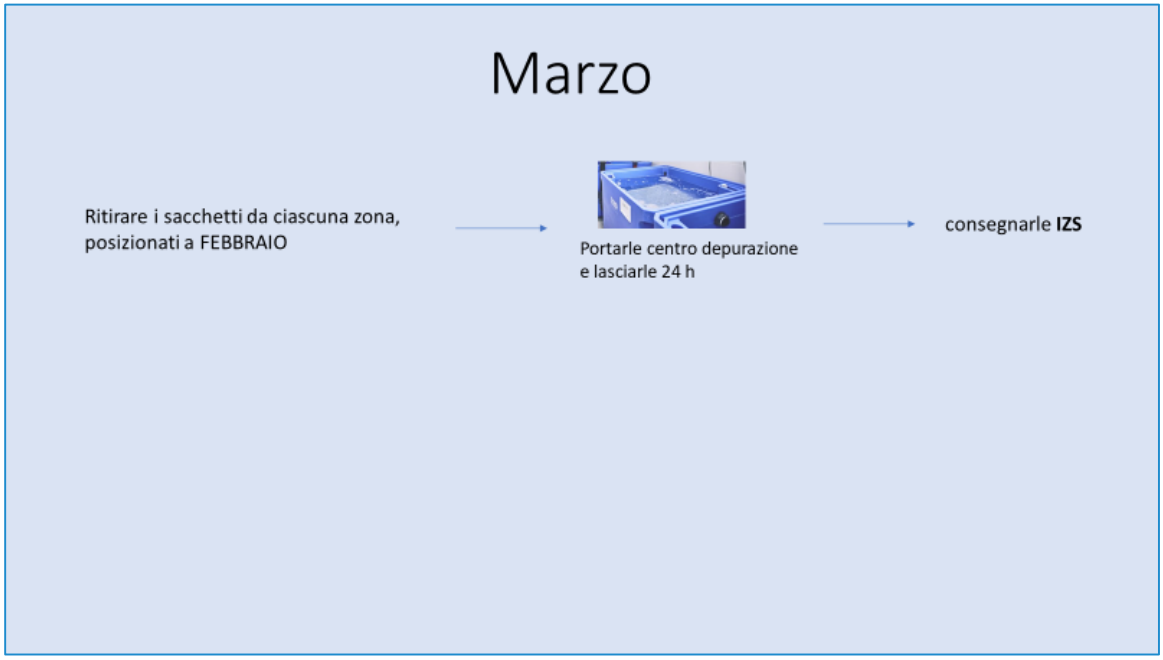


Figura 6: *Schema campionamento IV° prelievo (mese di Marzo)*

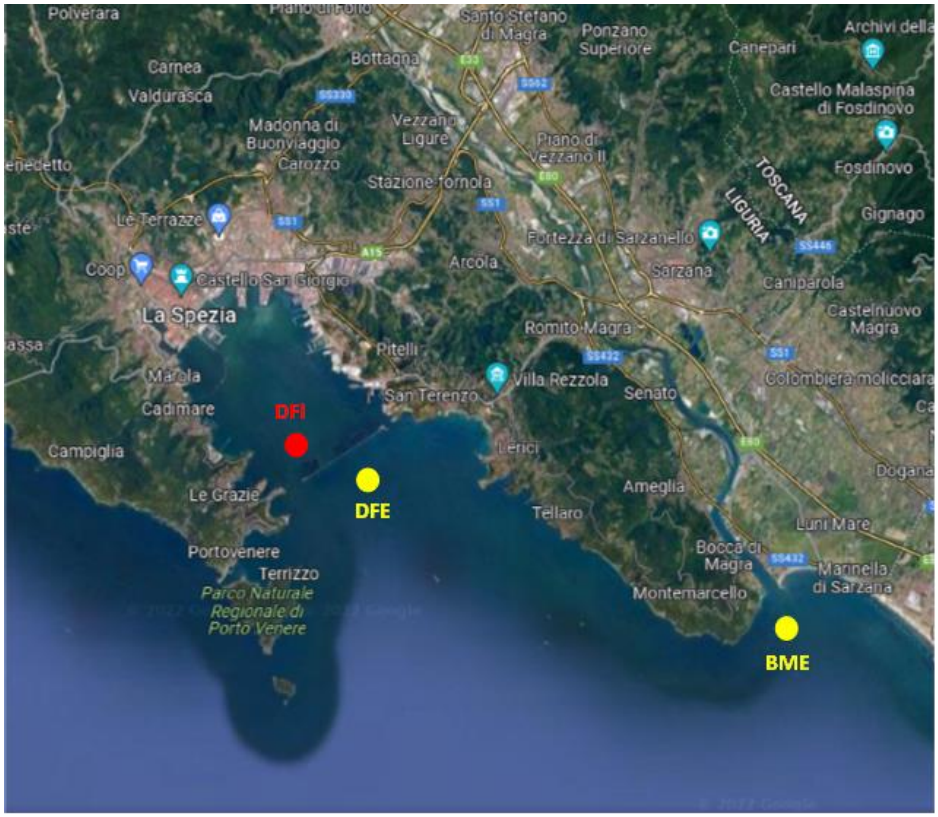


***Figura 7**: Sito di campionamento delle ostriche (in rosso) e aree di stabulazione a mare (in giallo). DFI: Diga Foranea Ponente Interna, DFE: Diga Foranea Esterna, BME: Bocca di Magra Esterna.*

<u>Preparazione dei campioni di ostriche</u>

Per ogni campione di ostriche sono stati prelevati gli epatopancreas di un minimo di 10 molluschi (Figura 8 e 9), sminuzzati finemente fino ad ottenere una consistenza pastosa, prelevati 2 gr a cui sono stati aggiunti 10 µl di mengovirus (MV) come controllo di estrazione e 2 ml di soluzione di proteinasi K (0,1 mg/ml). Dopo aver miscelato energicamente le provette, in modo da distribuirne uniformemente il contenuto, i campioni sono stati sottoposti ad una prima incubazione a 37 °C in agitazione costante per 60 minuti, seguita da una seconda a bagnomaria a 60 °C per 15 minuti. Dopodichè i campioni sono stati centrifugati a 3000 x g per 5 minuti e i surnatanti trasferiti in nuove provette e registrato il volume finale. Si è quindi proceduto con l'estrazione dell'RNA virale mediante un kit commerciale che utilizza silice magnetica tramite la piattaforma MiniMag NucliSens (Biomerieux) seguita da

RT-Real Time PCR in accordo alla ISO 15216-1:2017. Gli estratti sono stati stoccati a -80°C prima dell'esecuzione delle prove.

Figura 8: *Esemplare di ostrica concava*

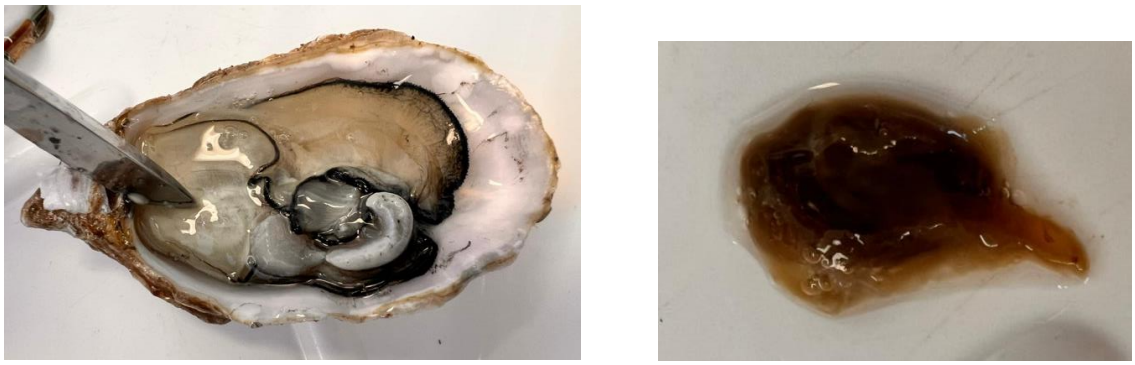


Figura 9: *Localizzazione dell'epatopancreas nelle ostriche concave e prelievo per la successiva analisi*

RT- Real time- PCR per la ricerca quantitativa di Norovirus genogruppi I e II

Per NoV GGI e GGII la reazione di retrotrascrizione Real time- PCR (rRT-PCR) è stata effettuata in base alla ISO/TS 15216-1:2017 utilizzando un C1000 Thermal Cycler (Biorad) e il kit RNA Ultrasense one-step qRT-PCR (Invitrogen). Per la determinazione di NoV GGI, GGII e MV sono state preparate mix di 20 µl per ciascun campione più i controlli per ciascun target contenente: 1 X di Ultrasense reaction mix, 500 nM del primer forward e 900 nM del primer reverse, 250 nM della sonda, 1,25 µl di RNA Ultrasense enzyme mix e acqua

ultrapura a volume. Le mix sono state aliquotate nei vari pozzetti della piastra a cui sono stati poi aggiunti 5 µl di RNA. I primer e le sonde utilizzate sono riportati in Tabella 2. La retrotrascrizione è stata effettuata a 55 °C per 60 min, seguita da preriscaldamento a 95 °C per 5 min, e da 45 cicli di PCR (denaturazione a 95 °C per 15 secondi, annealing a 60 °C per 60 secondi ed estensione a 65 °C per 60 secondi).

Per monitorare la correttezza delle prove, sono stati utilizzati RNA plasmidici dei vari target come controllo positivo per verificare l'efficienza di amplificazione e l'RNA del MV dopo estrazione del virus come controllo dell'efficienza di estrazione. Tutti i controlli sono stati forniti dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS). Il limite di quantificazione (LOQ), per NoV GI è stato 140 g.c./g e 130 g.c./g per NoV GII.

Nome	**SEQUENZA (5' – 3')**	**Rif. biblio**
QNIF4 (FW)	CGC TGG ATG CGN TTC CAT	da Silva *et al.*, 2007; Svraka *et al.*, 2007
NV1LCR (REV)	CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC	
NVGG1p	FAM- TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT -TAMRA	
QNIF2 (FW)	ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA	Loisy *et al.*, 2005; Kageyama *et al.*, 2003
COG2R (REV)	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	
QNIFS	FAM-AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG-TAMRA	
MENGO 110 (FW)	GCG GGT CCT GCC GAA AGT	Pinto *et al.*, 2009
MENGO 209 (REV)	GAA GTA ACA TAT AGA CAG ACG CAC AC	
MENGO 147 (PROBE)	FAM-ATC ACA TTA CTG GCC GAA GC–MGB	

***Tabella 2**: Primers e sonde utilizzati per la ricerca di Norovirus e MV tramite RT- Real Time PCR*

Analisi Statistica

I dati sono stati analizzati per la normalità utilizzando il test di Shapiro-Wilk; per confrontare i campioni tra le due aree di allevamento di ostriche al tempo T0 è stato utilizzato il test Wilcoxon rank-sum. Per confrontare l'uguaglianza delle coppie di osservazioni appaiate (T0 vs T30) è stato utilizzato il test del rango con segno delle coppie appaiate di Wilcoxon.

4. Risultati e discussione

4.1. Analisi dei parametri microbiologici virologici e chimici dei bivalvi relativi al monitoraggio

I risultati dei parametri microbiologici, virologici e chimici sono stati inviati all'autorità competente (ASL5 La Spezia) per la successiva elaborazione. Di seguito si riportano in breve i risultati ottenuti.

Le indagini microbiologiche (*E.coli, Salmonella* spp., *Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus)* effettuate sui campioni di mitili, ostriche concave ed ostriche piatte nelle zone BME, DFE e sull'unico campione di vongole nella zona BMI non hanno rilevato la presenza di microrganismi patogeni. Per quanto riguarda l'indicatore di contaminazione fecale *E. coli*, tutti i campioni hanno dato valori pari a 0 MPN/100gr tranne un campione di *Mytilus galloprovincialis* effettuato a Marzo 2022 nella zona BME nel quale è stata riscontrata una quantità di *E. coli* in concentrazione di 360 MPN/100 gr.

Tutti i campioni sono risultati negativi per la presenza del genoma del virus HAV, mentre NoV è risultato positivo solo nei mesi invernali (Grafici 1 –6). Le specie analizzate sono risultate tutte positive per NoV sia nella zona BME sia DFE, in particolare la specie *C. gigas* è quella in cui sono state ritrovate le concentrazioni più elevate di NoV (nell'ordine di grandezza di 10^4) ed il maggior numero di campioni positivi: 45,5% nella zona DFE e 27,3% nella zona BME. *O. edulis* è risultata positiva nel 40% dei campioni della zona DFE e nel 16% dei campioni della Zona BME, mentre *M. galloprovincialis* è risultato positivo al NoV nel 33% dei campioni provenienti dalla DFE e nel 25% dei campioni provenienti da BME. In generale, la zona DFE è risultata più spesso positiva rispetto alla BME per tutte le specie analizzate ed il genogruppo maggiormente ritrovato è stato il GII.

Infine, tutti i campioni analizzati per biotossine hanno mantenuto valori inferiori al limite di quantificazione.

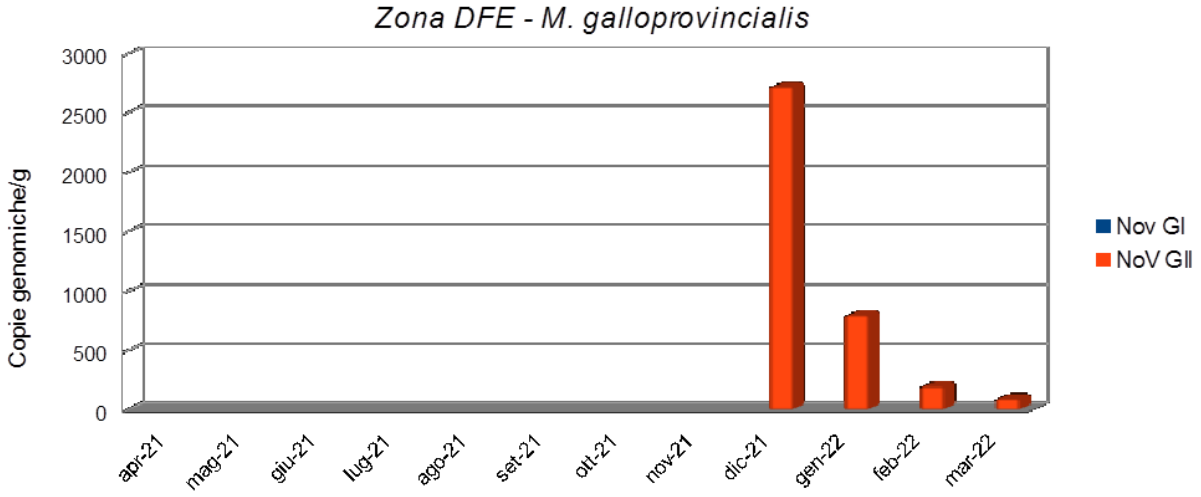


Grafico 1: Risultati quantitativi relativi alla presenza di NoV GI e GII nei campioni di *M. galloprovincialis* presenti nella zona DFE

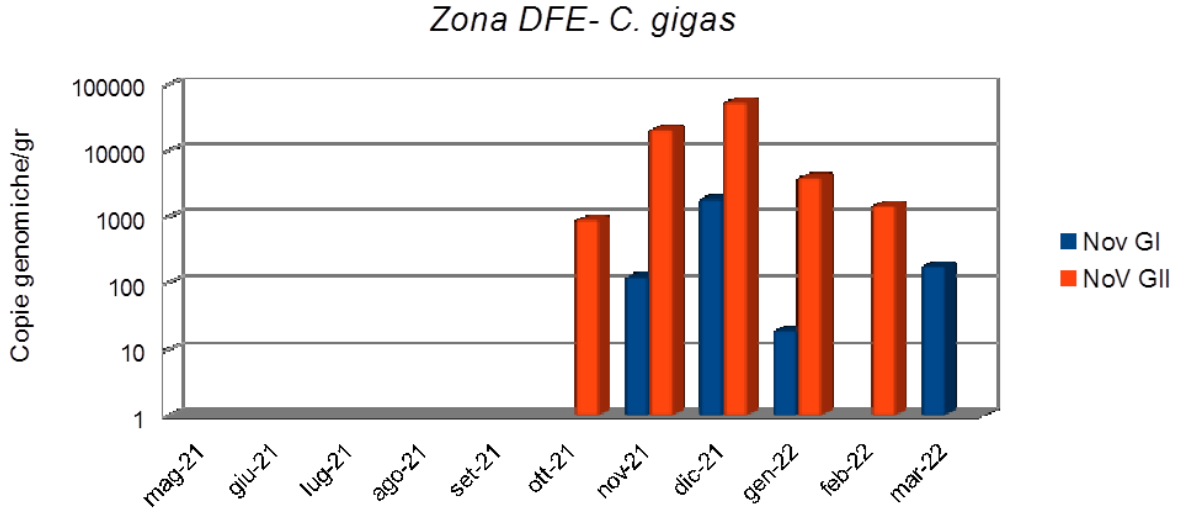


Grafico 2: Risultati quantitativi relativi alla presenza di NoV GI e GII nei campioni di *C. gigas* presenti nella zona DFE

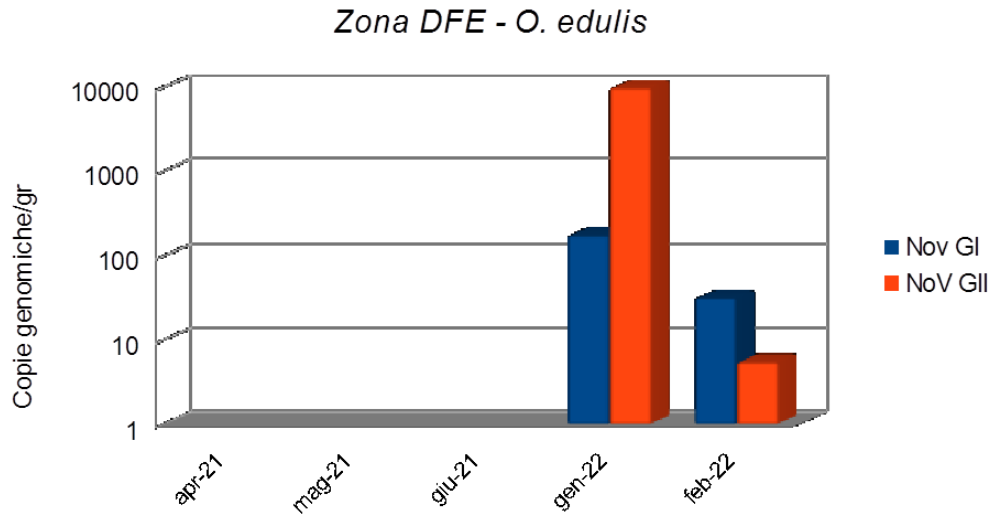


Grafico 3: Risultati quantitativi relativi alla presenza di NoV GI e GII nei campioni di *O. edulis* presenti nella zona DFE

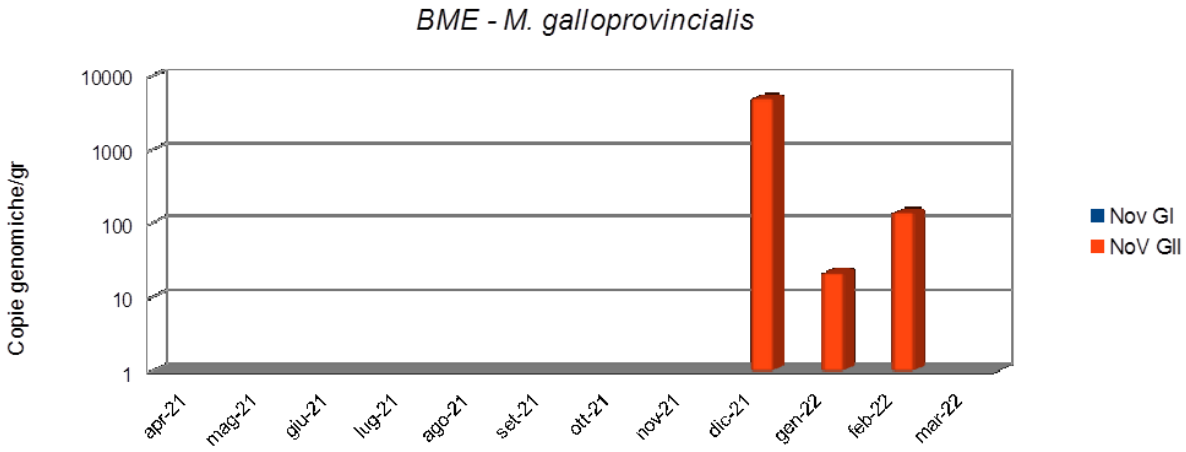


Grafico 4: Risultati quantitativi relativi alla presenza di NoV GI e GII nei campioni di *M. galloprovincialis* presenti nella zona BME

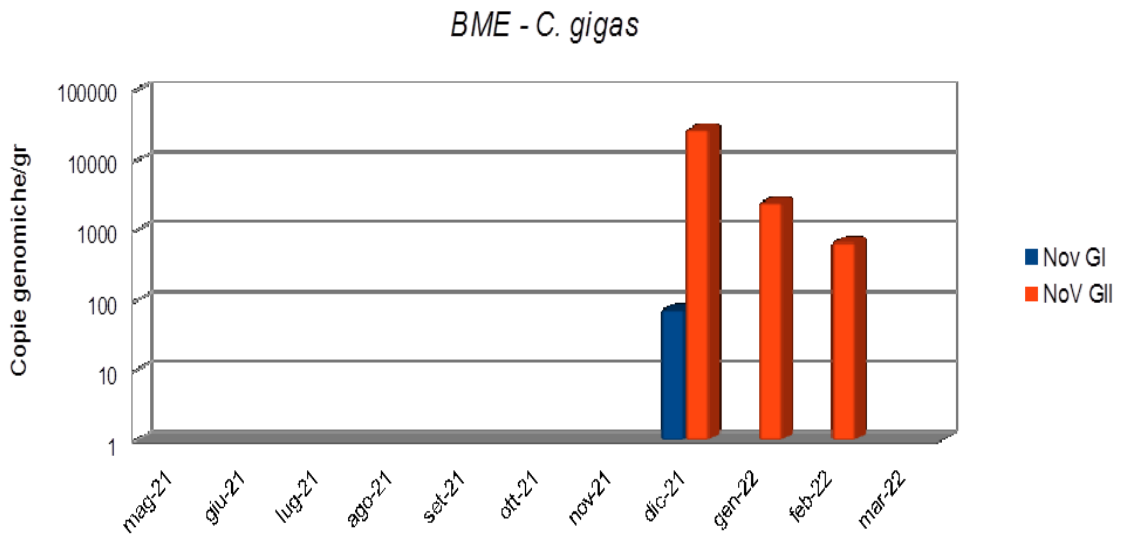


Grafico 5: Risultati quantitativi relativi alla presenza di NoV GI e GII nei campioni di *C. gigas* presenti nella zona BME

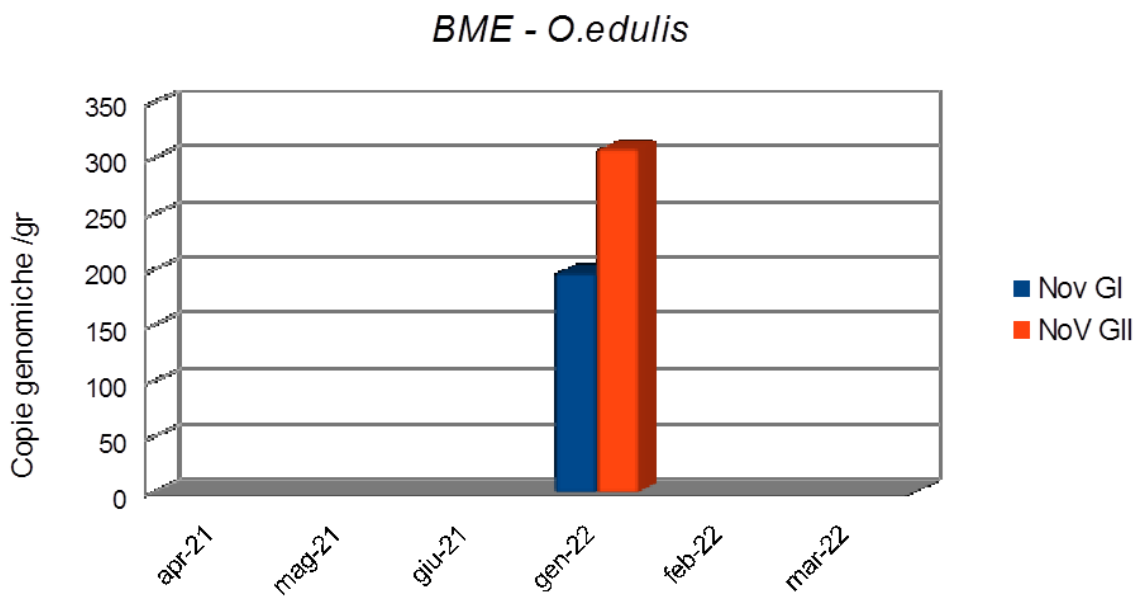


Grafico 6: Risultati quantitativi relativi alla presenza di NoV GI e GII nei campioni di *O. edulis* presenti nella zona BME

4.2. Valutazione della depurazione naturale in mare a tempi prolungati.

In tabella 3 vengono riportati i valori di NoV GI e GII rilevati da dicembre a marzo nelle ostriche *C. gigas,* presenti dall'inizio del progetto nei vivai sperimentali BME e DFE. I campioni per valutare tale carica sono stati prelevati durante il periodo in cui è stata studiata la depurazione prolungata.

Zona immissione ostriche	Data prelievo T30	Valori di NoV GI	Valori di NoV GII
DFE	Dicembre	1918,00	55440,00
BME		74,24	27477,5
DFE	Gennaio	19,52	3984
BME		0	2493,4
DFE	Febbraio	0	1508,75
BME		0	671,6
DFE	Marzo	183,33	0
BME		0	0

Tabella 3 *– Valori di NoV nelle ostriche presenti nelle zone BME e DFE da Dicembre a Marzo*

I risultati relativi al processo di depurazione in mare per tempi prolungati (30 giorni c.a) sono riportati in Tabella 4.

Sebbene le zone scelte per la stabulazione a mare prolungata, BME e DFE, non risultino prive di NoV, hanno mantenuto concentrazioni inferiori rispetto alla zona di prelievo (DFPI) (Tabelle 3 e 4). Unica eccezione nel mese di dicembre quando, la zona BME ha registrato concntrazioni simili a quelle della zona DFPI (Tabelle 3 e 4).

Purtroppo, non è stato possibile valutare i campioni posizionati nella zona BME a novembre, poiché il campione non è stato ritrovato dopo i 30 giorni a causa di un furto da parte di ignoti. In tutti gli altri mesi le cariche di NoV GII sono risultate inferiori in entrambe le zone indagate dopo 30 gg di stazionamento, rispetto alla concentrazione del campione iniziale, inoltre la concentrazione finale di NoV GII si è ridotta in media di 1,8 Log in DFE e di 2,2 Log in BME (Tabella 4).

Data prelievo	Tipo campione	Zona Prelievo	NoV GI Media Copie genomiche/g ± dev.stand	NoV GII Media Copie genomiche/g ± dev.stand.	Log Reduction
18/11/21	T0	DFPI	325,28 ± 252,76	38437,50 ± 13735,55	-
	T30	DFE	86,88±122,87	58564,00 ± 2551,24	-0,18
		BME	n.e.*	n.e.*	-
17/12/21	T0	DFPI	512,69 ±383,27	306627,50 ± 114229,56	-
	T30	DFE	0	1375,56 ± 200,54	3,48
		BME	0	101,14 ± 9,00	2,35
20/01/22	T0	DFPI	432,90 ± 327,04	46689,00 ± 25839,10	--
	T30	DFE	19,18±27,12	1402,45 ± 246,00	2,86
		BME	0	716,92 ± 409,53	3,147
02/03/22	T0	DFPI	39,93±56,47	2483,00 ± 1174,08	-
	T30	BME	0	124,95± 168,20	1,3
		DFE	0	124,59±148,12	1,3

*n.e.= non effettuato.

Tabella 4 *– Risultati delle prove per valutare la depurazione naturale in mare seguita da depurazione classica in vasca.*

Sebbene la concentrazione finale di NoV non si sia mai azzerata, in alcuni casi è risultata inferiore al LOQ (limite di quantificazione che è la minima concentrazione di genoma di un campione che può essere rilevata e quantificata con un definito grado di precisione e accuratezza) (Grafici 9 e 12). Per quanto riguarda invece NoV GI dai risultati ottenuti è emerso che dopo 30 giorni di stazionamento in mare in entrambe le zone testate i valori sono risultati negativi o comunque al di sotto del limite di quantificazione (Tabella 4 e Grafici 7 e 10).

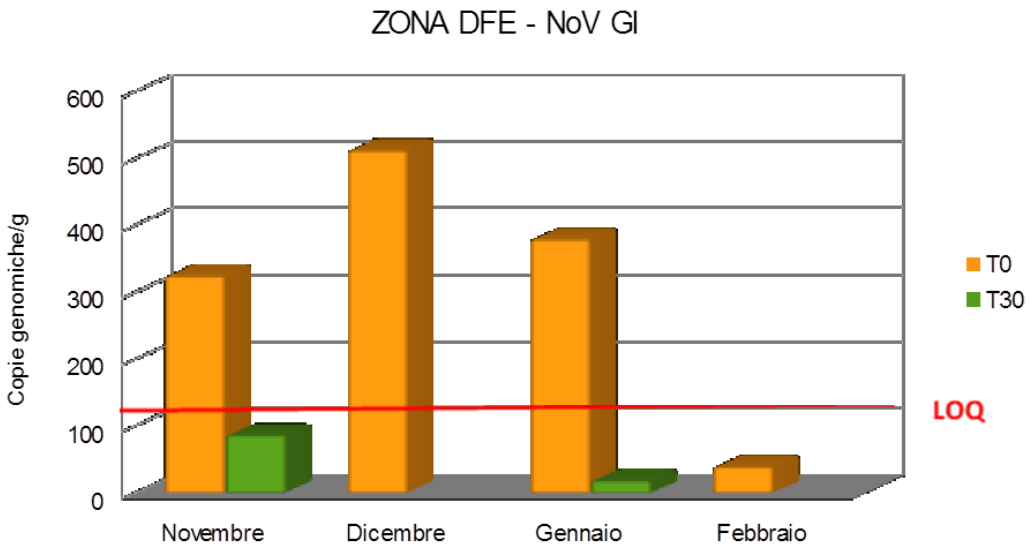


***Grafico 7**: Confronto tra le cariche di NoV GI presenti nelle ostriche prima (T0) e dopo 30 giorni (T30) dall'immissione nella zona Diga Foranea Esterna (DFE)*

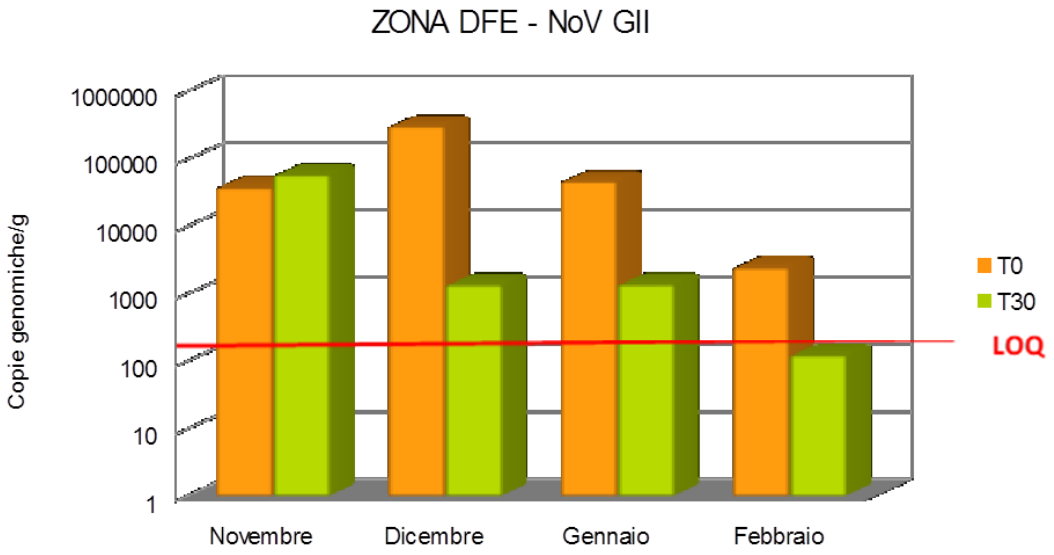


***Grafico 8**: Confronto tra le cariche di NoV GII presenti nelle ostriche prima (T0) e dopo 30 giorni (T30) dall'immissione nella zona Diga Foranea Esterna (DFE)*

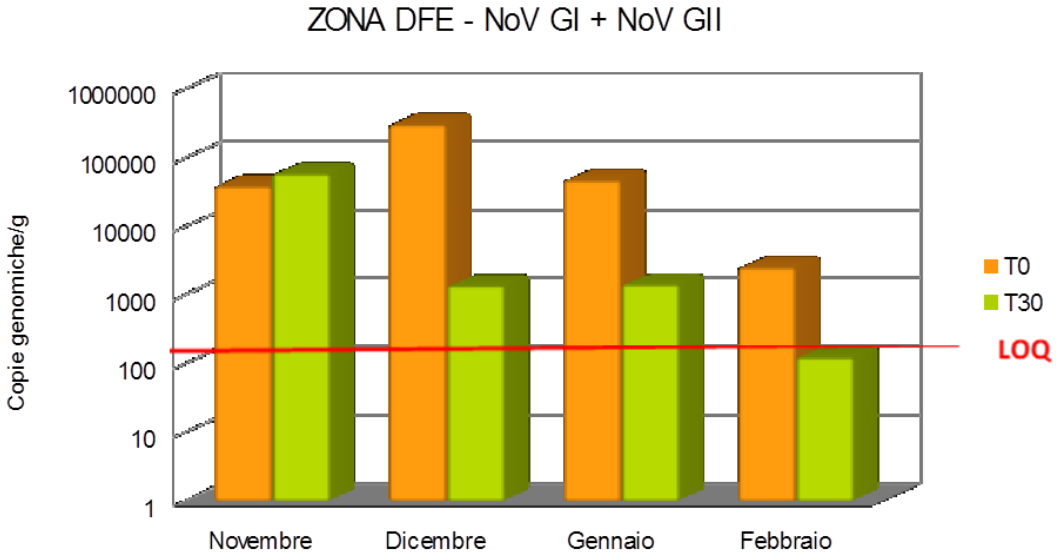


***Grafico 9**: Confronto tra le cariche di NoV totale (GI+GII) presenti nelle ostriche prima (T0) e dopo 30 giorni (T30) dall'immissione nella zona Diga Foranea Esterna (DFE)*

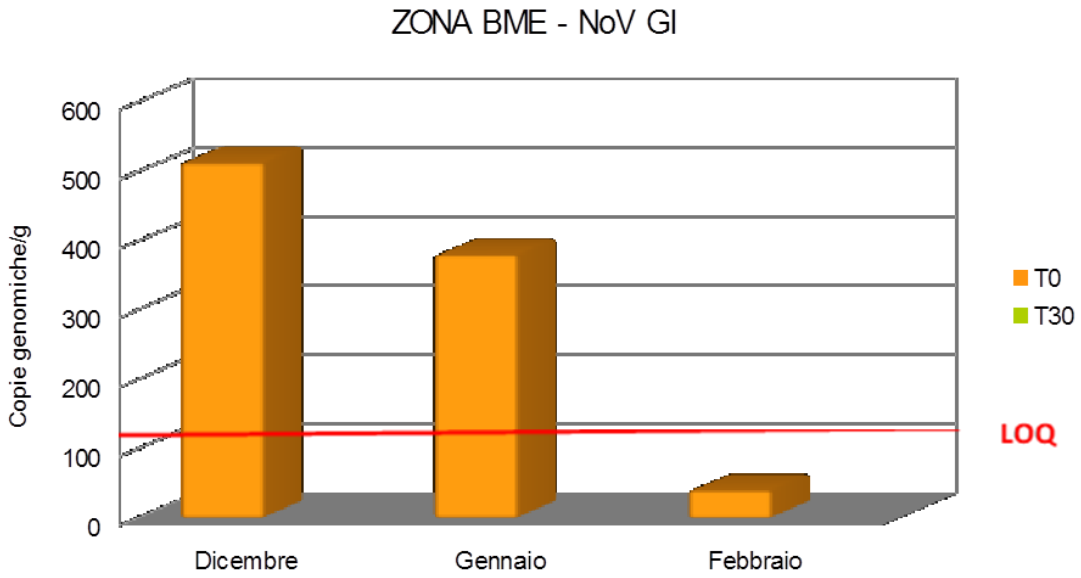


***Grafico 10**: Confronto tra le cariche di NoV GI presenti nelle ostriche prima (T0) e dopo 30 giorni (T30) dall'immissione nella zona Bocca di Magra Esterna (BME)*

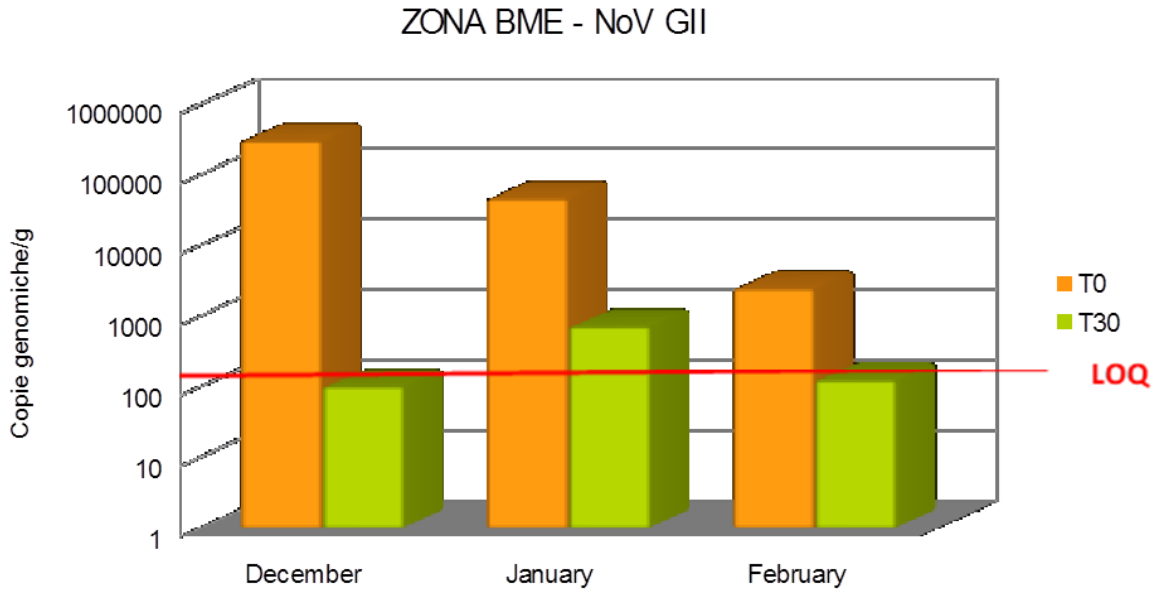


***Grafico 11**: Confronto tra le cariche di NoV GII presenti nelle ostriche (T0) e dopo 30 giorni (T30) dall'immissione nella zona Bocca di Magra Esterna (BME)*

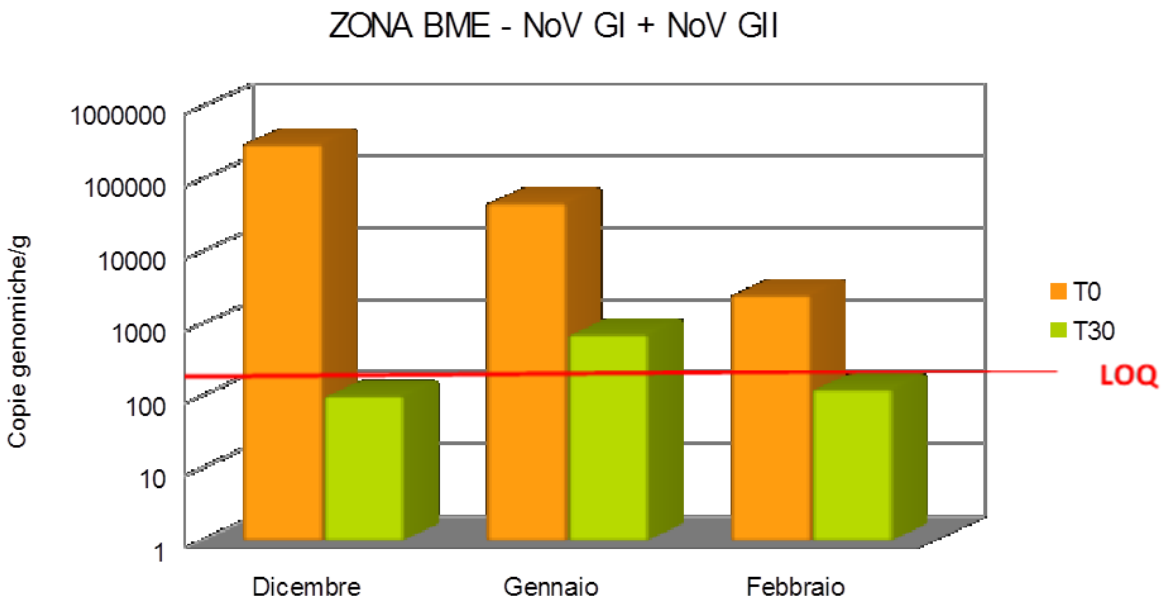


***Grafico 12**: Confronto tra le cariche di NoV totale (GI+GII) presenti nelle ostriche prima (T0) e dopo 30 giorni (T30) dall'immissione nella zona Bocca di Magra Esterna (BME)*

In base all'analisi statistica, il calo riscontrato del Norovirus totale risulta statisticamente significativo (p=0,01) così come il calo dei singoli genogruppi NoV GI (p=0,04) e Nov GII (p=0,009). Una differenza statisticamente significativa è stata inoltre trovata confrontando i dati appaiati tra il tempo T0 e il tempo T30 sia per NoV GI (p=0,001) che per Nov GII (p=0,01). L'analisi stratificata per area di allevamento ha dato inoltre i seguenti risultati: nel sito DFE solamente la riduzione di NoV GI è risultata significativa p=0.031 mentre nel sito BME è risultata significativa sia la riduzione di NoV GII (p=0.031) che di NoV totale (p=0.031).

I parametri chimico fisici dell'acqua di mare durante i periodi di stabulazione delle ostriche sono riassunti nella Tabella 5. La temperatura e la salinità non hanno mostrato variazioni significative tra i due siti negli stessi mesi.

Sito	nov-21		dic-21		gen-22		feb-22		mar-22	
	Temp. °C	**Salinità** PSU	**Temp.** °C	**Salinità** PSU	**Temp.** °C	**Salinità** PSU	**Temp.** °C	**Salinità** PSU	**Temp.** °C	**Salinità** PSU
BME	17,16	36,72	12,67	36,17	12,36	36,69	12,91	37,55	13,52	37,63
DFE	16,95	37,51	13,63	37,26	13,83	37,81	12,84	37,84	13,46	38,04

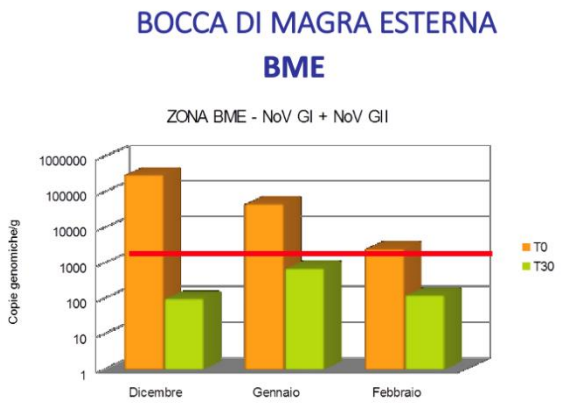
Table 5. *Parametri chimico fisici dell'acqua di mare misurati durante il periodo di stabulazione delle ostriche nei siti BME e DFE.*

In generale, il monitoraggio di NoV, presso il sito DFPI e presso i siti di stabulazione DFE e BME, ha confermato che in media le ostriche nel sito di provenienza (DFPI) contenevano concentrazioni di NoV più elevate rispetto ai siti di reimmissione. I dati ottenuti indicano pertanto come il trasferimento delle ostriche per 30 giorni nei due siti DFE e BME con una concentrazione inferiore di NoV, abbia permesso di ottenere una riduzione significativa della concentrazione di NoV nei campioni mantenuti in queste zone rispetto alla stazione situata dentro la diga del golfo della Spezia. Inoltre, dopo il periodo di stabulazione, la concentrazione di NoV ha generalmente raggiunto gli stessi livelli presenti nelle aree in cui venivano spostati i campioni. La migliore riduzione di NoV è stata ottenuta nei campioni di ostriche dopo 30 giorni nel sito BME, che ha mantenuto cariche di NoV inferiori durante il periodo invernale. In dettaglio, nel sito

BME il 67% dei campioni di ostriche ha registrato una concentrazione di NoV inferiore al limite di quantificazione (LOQ), mentre nel sito DFE solo il 25% dei campioni è risultato al di sotto del LOQ. In entrambi i siti NoV GI è stato ridotto in tutti i campioni al di sotto del LOQ, mentre il GII è stato ridotto maggiormente nel sito BME con il 50% dei campioni <LOQ dopo 30 giorni di stabulazione in accordo alla situazione presente nelle aree di stabulazione.

La stabulazione a lungo termine, quindi, sembra rappresentare una possibile soluzione alla riduzione di NoV nelle ostriche. Il trasferimento di molluschi da aree contaminate da NoV ad aree con contaminazione minore ne provoca la riduzione del parametro virale. Dal momento che anche le acque classificate in classe A sono contaminate da NoV, una delle possibili strategie potrebbe quindi essere quella di spostare le ostriche da aree con alti livelli di NoV ad aree a bassa concentrazione virale per poter ridurre il rischio a un livello che è considerato accettabile, anche in vista della possibilità da parte della commissione europea di porre un valore soglia per Norovirus. Tale limite è ancora oggetto di discussione a livello della Commisione europea in quanto i vari Paesi hanno livelli di contaminazione del prodotto differenti. In alcuni studi è stato osservato che la probabilità di contrarre l'infezione di NoV aumenta all'aumentare della dose (ter Waarbeek et al., 2010; Teunis et al., 2015; Teunis et al., 2020; Visser et al., 2009). Inoltre, è stata trovata una correlazione tra il numero di copie del genoma NoV nelle ostriche e un più alto tasso di malattie segnalate, suggerendo un legame tra i livelli di RNA del virus e rischi per la salute (Lowther et al., 2010; Lowther et al., 2012).

Ipotizzando che venga fissato dalla Commissione Europea un limite di 1000 copie genomiche su grammo di mollusco, e confrontando tale limite con i risultati ottenuti dal nostro studio si puo' dire che la depurazione prolungata a 30 giorni incrementerebbe il numero di lotti di prodotto avente una carica virale che ne permetterebbe la commercializzazione (Grafico 13). Se invece il limite fosse fissato a 100 copie genomiche anche la depurazione di trenta giorni non sarebbe esaustiva nella riduzione dei virus (Grafico 14).



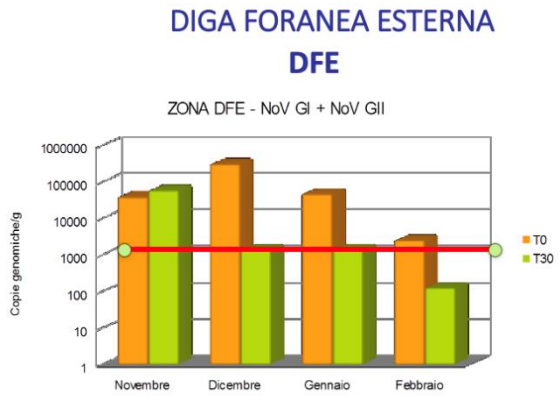
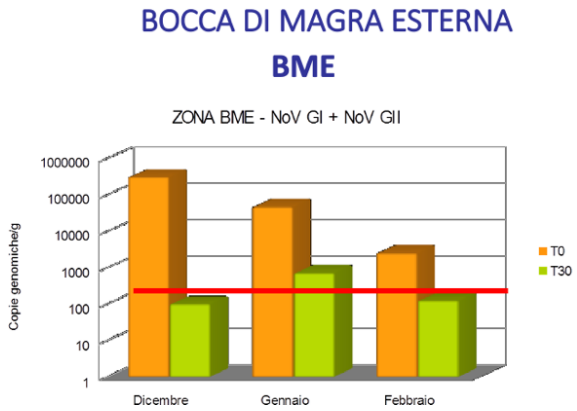


***Grafico 13**: Confronto tra le cariche di NoV totale (GI+GII) presenti nelle ostriche (T0), 30 giorni (T30) e valore soglia presunti (1000 copie genomiche/grammo)*



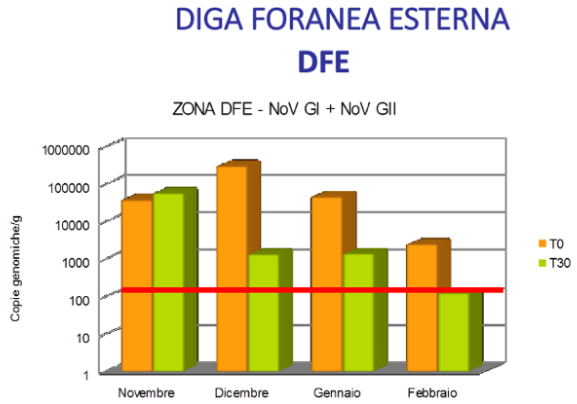


***Grafico 14**: Confronto tra le cariche di NoV totale (GI+GII) presenti nelle ostriche (T0), 30 giorni (T30) e valore soglia presunti (100 copie genomiche/grammo)*

5. Conclusioni

In conclusione, le analisi batteriologiche, virologiche e chimiche effettuate hanno permesso di caratterizzare le nuove zone marine studiate. Lo studio relativo alla depurazione prolungata sebbene sia limitato nel numero di campioni e repliche effettuate, tuttavia fornisce differenze statisticamente significative tra i diversi siti studiati e tra i diversi genogruppi, fornendo quindi una prima indicazione delle tendenze e degli effetti di questo trattamento. Dai dati ottenuti possiamo quindi concludere che entrambe le nuove aree di Bocca di Magra Esterna e Diga Foranea Esterna potrebbero essere utilizzate sia come nuovi siti produttivi sia come aree utili ad interventi post raccolta per ridurre la concentrazione di NoV nelle ostriche provenienti da aree più contaminate. Ciò potrebbe comportare una diminuzione del rischio di gastroenteriti da NoV dovute al consumo di ostriche durante i mesi più freddi, quando il NoV è presente in concentrazione maggiore. Questo studio preliminare può pertanto aiutare i produttori a migliorare sia la commerciabilità che la sicurezza delle ostriche, oltre a fornire informazioni aggiuntive rilevanti per le decisioni di gestione del rischio per le agenzie di regolamentazione alla luce della potenziale introduzione di un limite legale per NoV. Tuttavia, ulteriori studi potrebbero essere utili per aumentare il numero dei campioni testati in funzione delle variabilità stagionali al fine di poter affermare la ripetibilità dei risultati ottenuti in questo progetto.

6. Bibliografia:

- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre forDisease Prevention and Control), 2021. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. EFSA Journal 2021;19(12):6971, 324 pp.
- EFSA 2012. EFSA Panel on Biological Hazards 2012. Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. EFSA Journal 2012;10 (1):2500.
- EFSA 2016. Technical specifications for a European baseline survey of norovirus in oysters. EFSA Journal 2016;14(3):4414
- EFSA 2019. Analysis of the European baseline survey of norovirus in oysters. EFSA Journal 2019;17(7):5762
- CEFAS, 2016. Report of the Joint FSA/EFSA Workshop on Foodborne Viruses. EFSA supporting publication 2016: 13(10): EN-1103. 47 pp.
- McLeod, C., Le Saux, D.P.J.C., Le Guyader, S.F., 2017. Depuration and relaying: a review on potential removal of norovirus from oysters. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 17,692–706.
- EURLMB–EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR MARINE BIOTOXINS. EU-harmonised standard operating procedure for determination of domoic acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using UV detection. 2008.
- AOAC official method 2005.06, 2006. Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish. AOAC.
- AOAC official method 959.08, 2000. Paralytic Shellfish Poison Biological Method. AOAC. Battistini, R., V
- EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR MARINE BIOTOXINS. EU-harmonised standard operating procedure for determination of lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS. 2015.
- ISO 21872-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the determination of Vibrio spp. — Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus, Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2017; pp. 1–33.
- ISO 16649-3:2015. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* — Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-glucuronide. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2017; pp. 1–10.

- ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
- ISO15216-1:2017. 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; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2017; pp. 1–48.
- ter Waarbeek, H.L.; Dukers-Muijrers, N.H.; Vennema, H.; Hoebe, C.J. Waterborne gastroenteritis outbreak at a scouting camp caused by two norovirus genogroups: GI and GII. J. Clin Virol. 2010, 47, 268-272.
- Teunis, P.F.; Sukhrie, F.H.; Vennema, H.; Bogerman, J.; Beersma, M.F.; Koopmans, M.P. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. Epidemiol Infect. 2015, 143, 1710-1717.
- Teunis, P.F.M.; Le Guyader, F.S.; Liu, P.; Ollivier, J.; Moe, C.L. Noroviruses are highly infectious but there is strong variation in host susceptibility and virus pathogenicity. Epidemics. 2020, 32, 100401.
- Visser, H.; Verhoef, L.; Schop, W.; Götz, H.M. Outbreak investigation in two groups of coach passengers with gastroenteritis returning from Germany to the Netherlands in February 2009. Euro Surveill. 2010, 15, 19615.
- Lowther, J.A.; Avant, J.M.; Gizynski, K.; Rangdale, R.E.; Lees, D.N. Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers. J. Food Prot. 2010, 73, 305-311.
- Lowther, J.A.; Gustar, N.E.; Hartnell, R.E.; Lees, D.N. Comparison of norovirus RNA levels in outbreak-related oysters with background environmental levels. J. Food Prot. 2012, 75, 389-393.