IZSAM G.CAPORALE TERAMO

I risultati della ricerca corrente condotta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G.Caporale". Anno 2014

Studio sull'efficacia dei processi di depurazione nei molluschi bivalvi

Teramo, 9 Giugno 2015

Obiettivi

- perfezionare i protocolli attualmente in uso per la depurazione microbiologica di *Venus gallina*, focalizzando l'attenzione su patogeni ambientali, quali vibrioni e virus enterici;
- mettere a punto sistemi di depurazione più efficaci rispetto a quelli solitamente in uso;
- confrontare tecniche classiche (numerazione MPN) e tecniche innovative .Per la determinazione dei vibrioni è stata utilizzata la "*Colony Hybridisation method for the enumeration of total and pathogenic Vibrio parahaemolyticus*". Nelle prove di contaminazione e depurazione virale la ricerca e quantificazione del *Norovirus murino* è stata effettuata con tecnica RT-PCR real time ed è stato eseguito l'isolamento virale su tessuto coltura per la conferma della vitalità del ceppo.

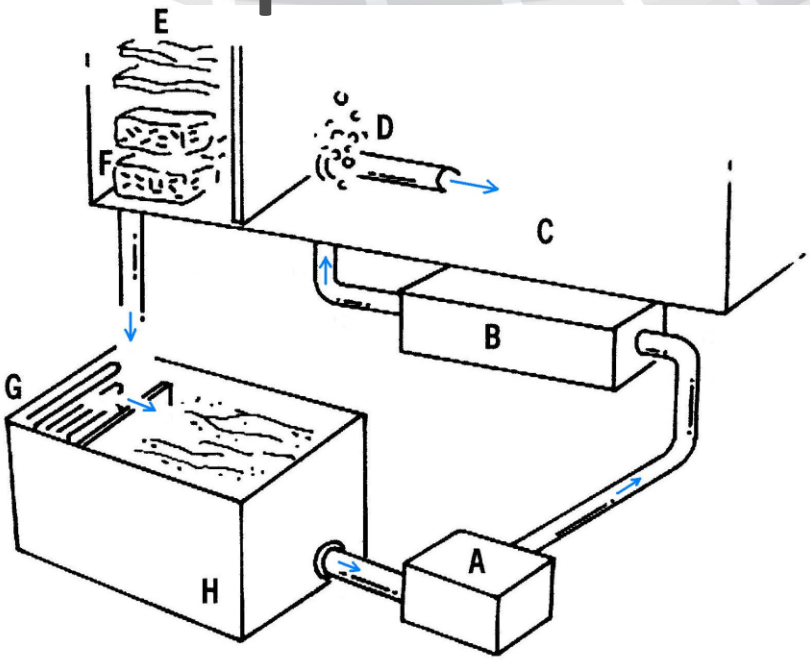
Sistema di depurazione

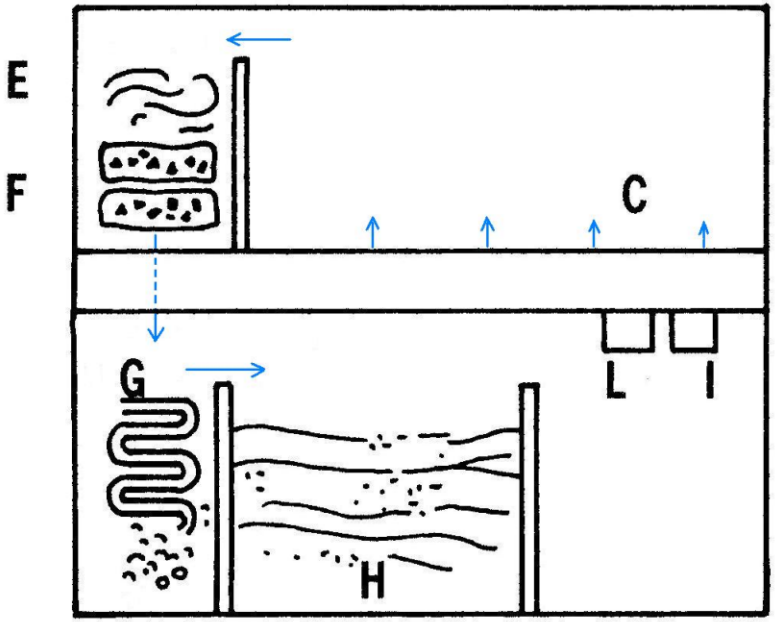
- Gli impianti di depurazione utilizzati sono costituiti da vasche di dimensioni 197x72x45 cm, dotate di pre-filtro in lana/Perlon e filtro carbone iperattivo, filtro biologico a filtrante attivo con alga *Lithothamnium calcareum* ed impianto di sterilizzazione a raggi ultravioletti.

(sistema chiuso dotato di meccanismi chimici e fisici per il trattamento dell'acqua)

Funzionamento dell'impianto

La pompa (A) aspira l'acqua dalla vasca del filtro biologico e la spinge all'unità di sterilizzazione a raggi UV (B) per poi raggiungere la vasca (C) passando attraverso la bocchetta di ossigenazione (D). La vasca comunica con il vano dotato di filtro in lana-perlon e di filtro carbone (E). Da qui l'acqua passa alla vasca con filtro biologico (alga *Lithothamnium calcareum*, H) con cui entra a contatto dopo aver attraversato l'alloggio della serpentina di raffreddamento (G). L'ozonizzazione avviene nel medesimo alloggio (I,L). Quindi l'acqua viene aspirata dalla pompa e rimessa in circolo.





Allestimento prove sperimentali

I campioni di vongole sono stati prelevati in aree classificate del litorale molisano a 250 e 500m dalla costa mediante imbarcazioni della marineria locale munite di draghe con turbosoffiante.

Gli organismi di taglia media tra 25 e 32 mm sono stati trasportati in laboratorio in contenitori refrigerati (4° C) e sottoposti ad ispezione.

Gli organismi morti o danneggiati sono stati eliminati, mentre i rimanenti sono stati suddivisi in aliquote di 100 vongole.
Prima della sperimentazione, gli organismi sono stati acclimatati in acquari con acqua di mare artificiale (salinità 35‰) per confermare la vitalità e la capacità di filtrazione.

Contaminazione dei molluschi

Alcuni esemplari sono stati sottoposti ad analisi batteriologiche e virologiche (*V. parahaemolyticus* , *V. vulnificus, Norovirus*) per valutare lo stato igienico-sanitario e la carica iniziale di ciascun patogeno, in modo da definire le cariche per la contaminazione.

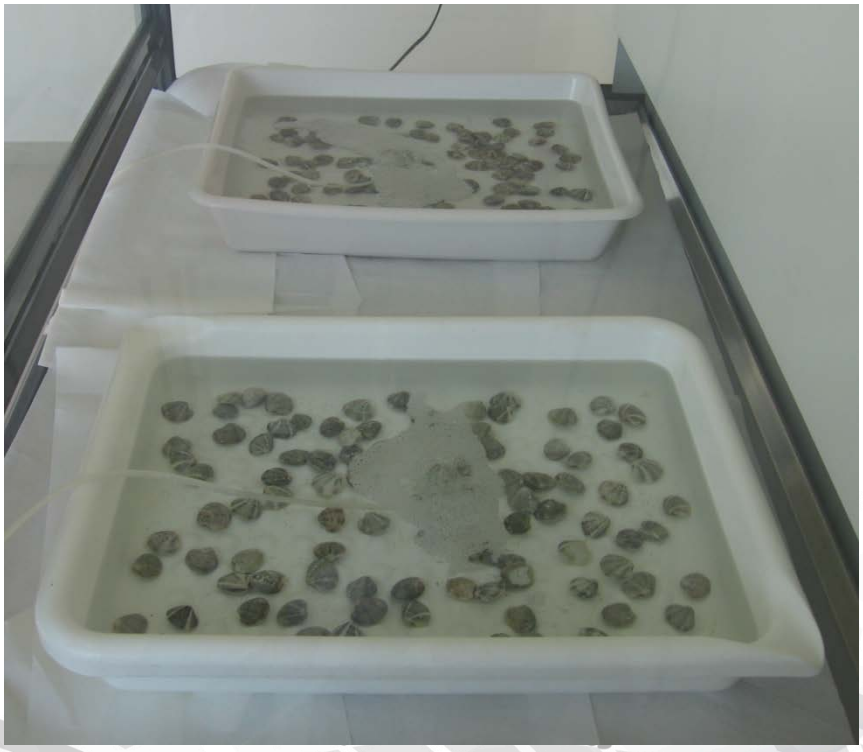
I ceppi batterici utilizzati sono stati *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 e *V. vulnificus* ATCC 27562.
Il ceppo virale virale utilizzato è stato il *Norovirus* murino (MNV-1)

Contaminazione batterica dei molluschi

La contaminazione è stata effettuata in vasche della capacità di 8 litri e volume di circa 0.12 m^3 con acqua di mare artificiale (35‰ di salinità) contaminata con sospensioni batteriche specifiche in modo da raggiungere le seguenti concentrazioni in acqua:

- $2.30*10^3$; $3.75*10^4$; $9.37*10^4$; $1.12*10^6$ *V. parahaemolyticus*/ml.
- $7.5*10^4$; $1.12*10^6$ *V. vulnificus*/ml.

Le vasche sono state mantenute ad una temperatura di 22°C.
Le vongole, suddivise in aliquote di 100 organismi ciascuna, sono state esposte alla contaminazione per 72 ore.



Contaminazione batterica dei molluschi

Per evidenziare possibili variazioni dell'accumulo di *V. vulnificus* nelle vongole in funzione della temperatura e della salinità, due gruppi di 100 organismi ciascuno sono stati sottoposti a contaminazione con carica nell'acqua pari a $7.5*10^4$ *V. vulnificus*/ml e mantenuti per le successive 72 ore alle seguenti condizioni ambientali:

- salinità 35‰ e temperatura 22° C;
- salinità 30‰ e temperatura 25° C.

Depurazione dei molluschi

Gli organismi sono stati trasferiti nei sistemi di depurazione e posizionati su una griglia di materiale plastico, disposti su monostrato, in modo da evitare il contatto con il fondo della vasca e quindi minimizzare la ricontaminazione.

I parametri chimico-fisici (T, sal, pH, O_2) sono stati routinariamente controllati. I valori di temperatura impostati nel sistema sono stati compresi tra 15° C ±1 ° C.

Campioni di molluschi sono stati prelevati prima dell'immissione in vasca e ogni 12 ore fino alle 72 ore di depurazione.

Metodi

Metodica MPN per il conteggio di *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* nei molluschi

- omogeneizzazione in acqua peptonata alcalina (APW);
- inoculo di tre provette contenente APW per ciascuna diluizione;
- incubazione a 37°C per 16-18h;
- semina di ciascuna provetta torbida su piastre di terreno selettivo (TCBS) e incubazione a 37°C per 18-24h per *V. parahaemolyticus;*
- semina di ciascuna provetta torbida su piastre di terreno selettivo (m-CPC) e incubazione a 40°C per 18-24h per *V. vulnificus.*

Le colonie tipiche sono state sottoposte a conferme biochimiche singole e con sistemi miniaturizzati (API 20E/API 20NE).

Metodi

Metodica Colony hybridisation per il conteggio di *V. parahaemolyticus* totale nei molluschi.

E' stato applicato il metodo Colony hybridisation per il riconoscimento del marker genetico toxR attraverso specifica sonda marcata con digossigenina e ibridizzata direttamente in omogeneizzato di molluschi dopo incubazione su terreno nutritivo.

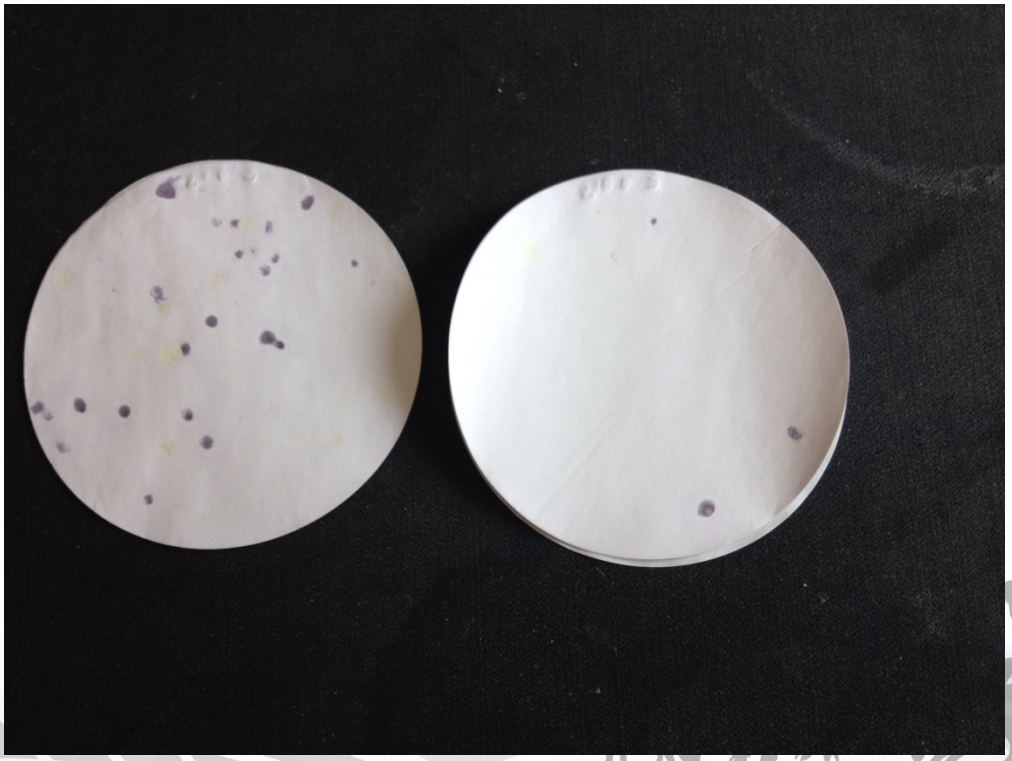
La procedura ha previsto tre fasi :

1. preparazione del campione;
2. preparazione delle membrane;
3. ibridazione e numerazione di *V. parahaemolyticus* totale.

Metodi

La numerazione del patogeno avviene attraverso l'utilizzo di un substrato colorante.

Al termine dell'ibridazione le colonie positive appaiono di colore viola, quelle negative gialle o marrone chiaro. Il risultato si esprime come ufc/g e il limite di rilevazione del metodo é 10 ufc/g.



Risultati

Prove di contaminazione con *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (metodo MPN).

1. Le capacità di accumulo variano rispetto alla carica iniziale in acqua (10^3/ml, 10^4/ml, 10^6/ml). Non sempre con cariche maggiori nell'acqua si riscontrano maggiori quantità di vibrioni nei molluschi.

2. Considerando prove con cariche di contaminazione simili si riscontra una minore capacità di accumulo di *Vibrio vulnificus*. Tale dato è particolarmente marcato se si considerano le prove con livelli di contaminazione alta (10^6/ml): le vongole hanno mostrato un accumulo molto basso (10^2MPN/100g) di *V. vulnificus*.

	Carica nell'acqua di contaminazione: 1,12 *10^6/ml	
ORE DI CONTAMINAZIONE	***Vibrio parahaemolyticus* (MPN/100 g)**	***Vibrio vulnificus* (MPN/100 g)**
72	2700	<30
72	15000	430
72	9300	360
72	23000	150
72	43000	<30
72	360000	230
72	4300	230
72	15000	230
72	43000	74
72	1500	74
Media	**51680**	**222**
Mediana	**15000**	**230**

Risultati

Prove di contaminazione con *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (metodo MPN).

3. I dati relativi alle prove di contaminazione con *V. vulnificus* condotte a differenti condizioni ambientali (salinità 35‰ e temp. 22° C - prova 1, salinità 30‰ e temp. 25° C - prova 1 bis) permettono di identificare intervalli confrontabili.

V. vulnificus: prove di contaminazione		
	PROVA 1	*PROVA 1 bis*
	carica nell' acqua di contaminazione: 7,5 *10 ^{4}/ ml	carica nell' acqua di contaminazione: 7,5 *10 ^{4}/ml
ore di contaminazione (h)	MPN/100g	MPN/100g
72	74	<30
72	74	36
72	290	9200
72	430	92
72	15000	2800
72	6000	92
72	9300	36
72	1500	36
72	930	290
72	7500	350
media	4110	1437
mediana	1215	92

Considerazioni sulla contaminazione

1. La variabilità nelle capacità di filtrazione da parte di differenti organismi bivalvi, anche appartenenti alla stessa specie, trova un marcato riscontro nelle prove di contaminazione batterica condotte in questo studio.

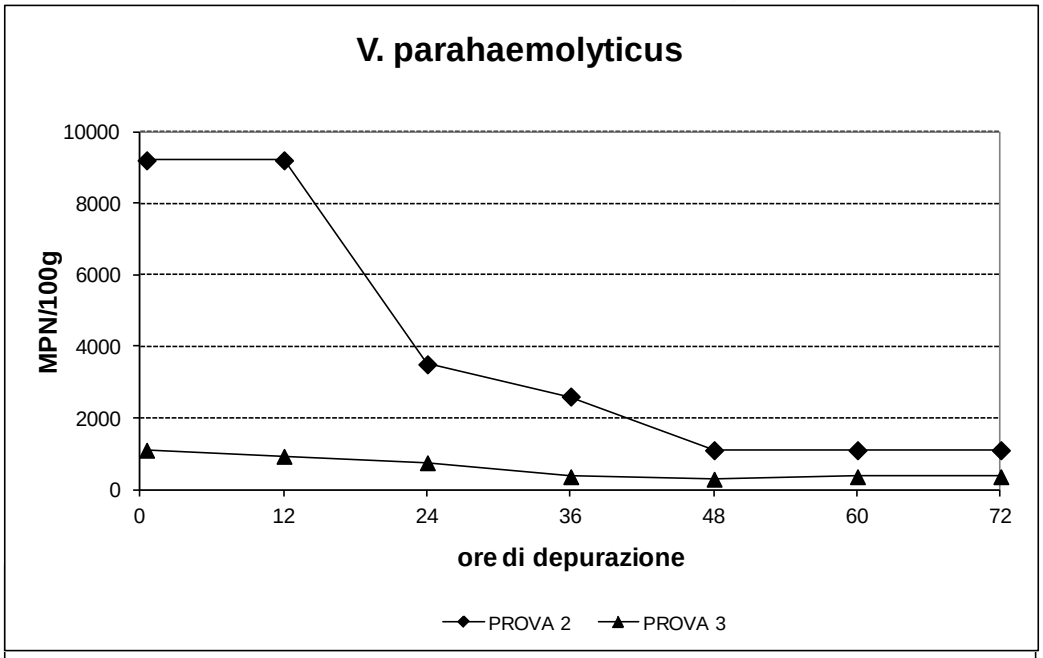
2. La presenza di tale disomogeneità nei risultati fornisce indicazioni utili per la messa a punto di future prove di contaminazione e di depurazione in termini di quantità di organismi da sottoporre a sperimentazione nonché numero di esemplari e di repliche da esaminare nei diversi intervalli di tempo considerati.

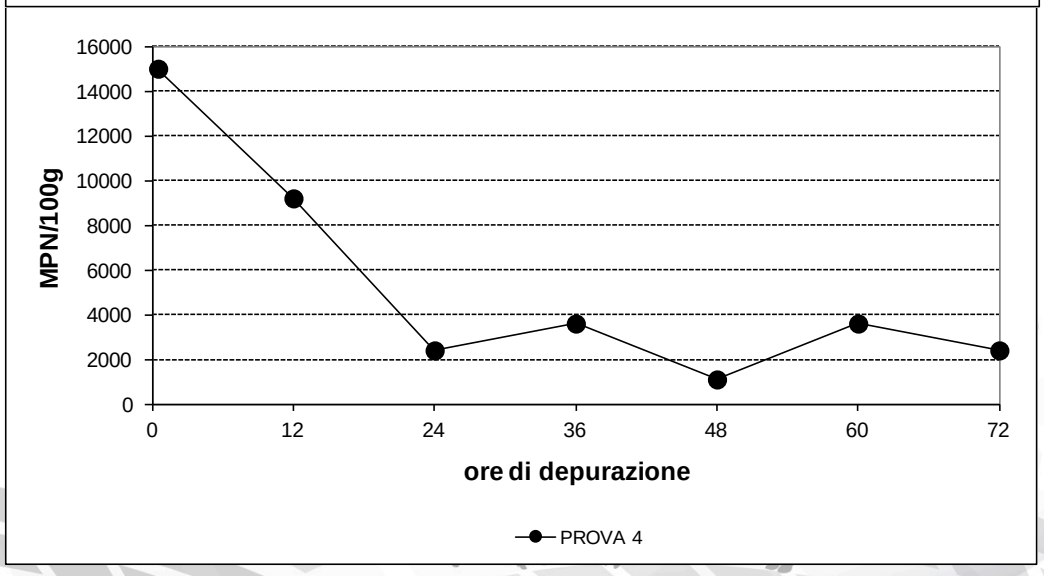
3. Tale variabilità, sebbene determini una maggiore difficoltà nell'elaborazione dei dati, costituisce un punto cruciale ed imprescindibile per la discussione delle prove di depurazione di seguito riportate.

Risultati

Prove di depurazione con *V. parahaemolyticus* (metodo MPN).

Confrontando prove con cariche di partenza medio-alte (da 10^3 a 10^4 MPN/100g), si evidenzia una diminuzione della carica di partenza (valori 4-5 volte inferiori) dopo 24-36 ore, tuttavia nei tempi successivi la situazione rimane stazionaria. Tale dato fa supporre che nonostante le vongole siano dotate di capacità depurativa, dopo una prima fase di eliminazione del patogeno segua una fase di "plateau".

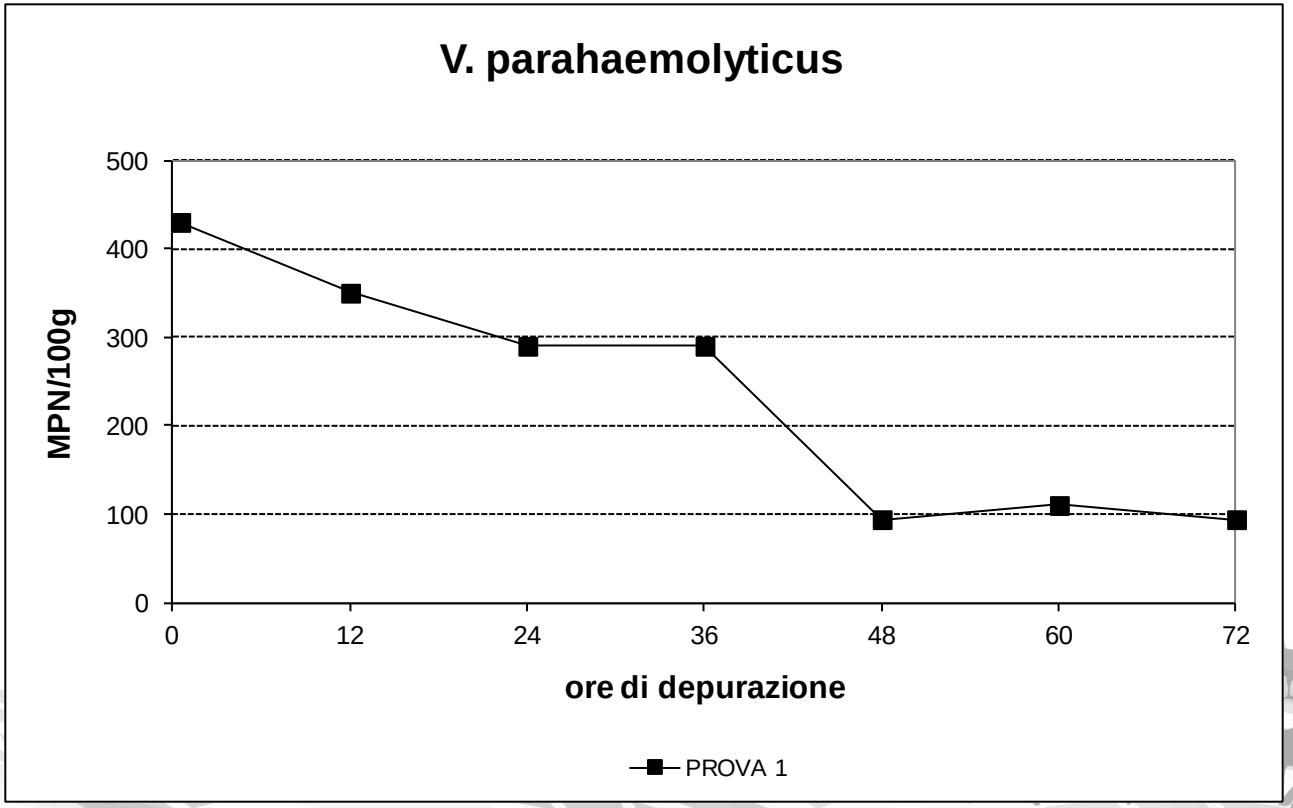




Risultati

Prove di depurazione con *V. parahaemolyticus* (metodo MPN).

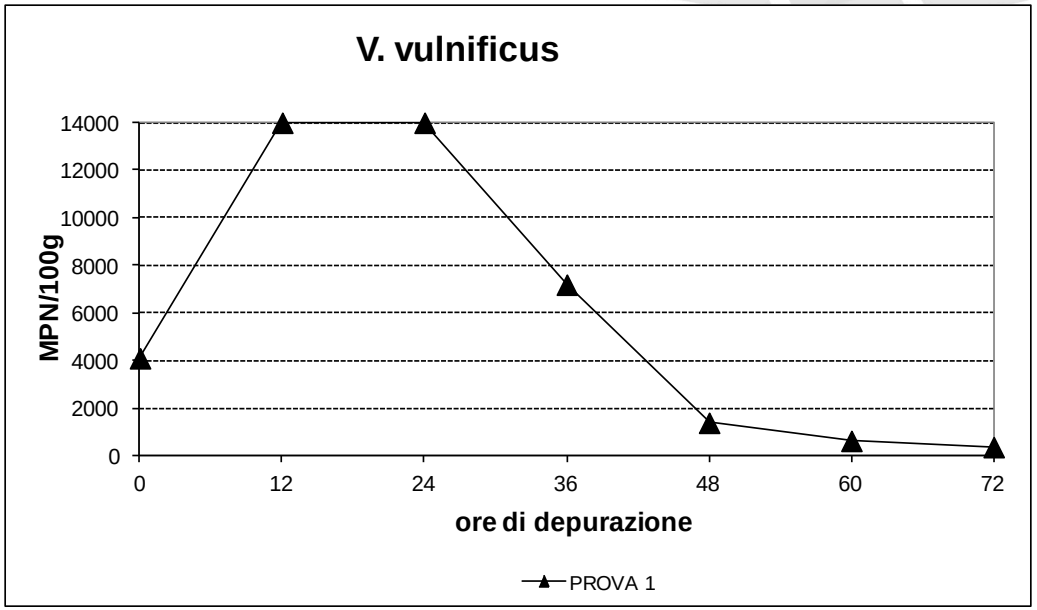
Nella prova condotta con livelli di contaminazione bassi (10^2 MPN/100g) dopo 48 ore di depurazione si riscontrano valori prossimi a 100 MPN/100g, tuttavia tale apparente rilascio del patogeno potrebbe essere imputabile alla variabilità della carica di contaminazione iniziale e non ad una effettiva depurazione.

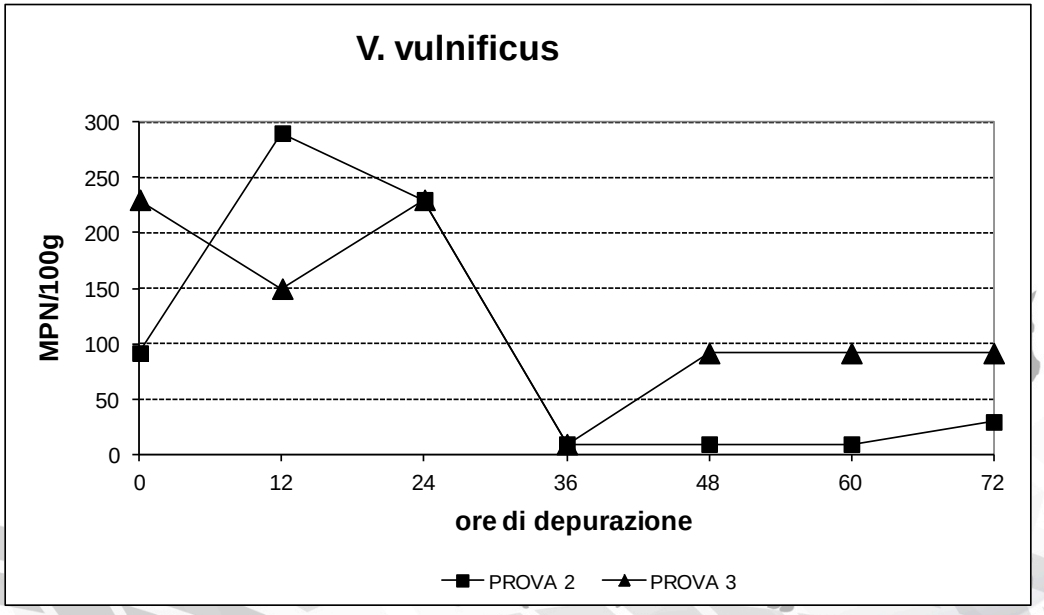


Risultati

Prove di depurazione con *V. vulnificus* (metodo MPN)

In tutte e tre le prove di depurazione con *V. vulnificus*, le cariche batteriche ricadono nell'intervallo definito dai valori di contaminazione iniziale (prova 1: 74-15000 MPN/100g; prova 2: 30-230 MPN/100g; prova 3: 30-430 MPN/100g). Di conseguenza, le vongole sembrerebbero avere scarsa capacità di depurazione.





Considerazioni sulla depurazione

1. Le ottime condizioni di permanenza degli organismi all'interno dei sistemi di depurazione sono rimarcate dai bassi valori di mortalità riscontrati.

2. Questo studio sottolinea la scarsa capacità di *Venus gallina* di rilasciare i vibrioni presumibilmente a causa di una maggiore ritenzione di specie microbiche ad habitat acquatico, confermando che i tempi di depurazione sono molto variabili in funzione del patogeno considerato.

Risultati

Prove di contaminazione con *V. parahaemolyticus* (metodo CH).

Tutte le prove di contaminazione effettuate hanno rilevato dopo 72 ore concentrazioni molto basse (comprese tra <10 e 90 ufc/g) nei campioni di molluschi processati con metodica molecolare.

Prove di depurazione con *V. parahaemolyticus* (metodo CH).

Nelle prove di depurazione sono stati riscontrati valori prossimi al limite di rilevazione del metodo (<10 ufc/g) ad eccezione di una sola prova con valori compresi tra <10 e 2400 ufc/g.

Confronto tecniche classiche ed innovative

Metodica MPN

- problemi tecnici (notevole tempo lavoro, semina di provette con sviluppo di torbidità legata alla crescita di microrganismi diversi da quello in esame, risultato ottenuto dopo diversi giorni, impiego di materiali costosi per la conferma e l'identificazione biochimica della specie);
- problemi di interpretazione (precisione bassa, stima della carica batterica in funzione del numero di tubi utilizzati, espressione del risultato come stima statistica delle densità del microrganismo nel campione).

Colony hybridisation

- permette di esaminare più campioni contemporaneamente;
- risulta molto più rapida;
- porta alla quantificazione dei vibrioni patogeni già dopo 48h;
- minor tempo lavoro da parte dell'operatore;
- materiale di consumo meno costoso;
- alta sensibilità e specificità.

APPENDICI

Mortalità degli organismi durante le sperimentazioni

Nel corso di tutte le prove effettuate è sta riscontrata una mortalità nulla o prossima allo zero.

Funzionamento del circuito

I valori relativi a salinità, temperatura ed ossigeno hanno mostrato variazioni minime:

- salinità pari a 35±1‰
- temperatura pari a 15±1° C
- ossigeno disciolto pari a 9 ppm
- pH pari a 8,25±0.05

Tutti i campioni di acqua prelevati nel circuito di depurazione hanno rilevato l'assenza di patogeni. Tale dato ha evidenziato un elevato grado di efficienza nella depurazione dell'acqua messa in ricircolo.

Colony hybridisation

1) preparazione del campione: omogeneizzazione del mollusco, allestimento di diluizioni decimali seriali, spatolamento su piastra di TSA-S (Saline Tryptone Soya Agar) e incubazione a 37 ± 1C per 18-24 h;

2) preparazione delle membrane: trasferimento delle colonie su membrane di nylon, lavaggio con soluzioni per lisi cellulare, rilascio e denaturazione del DNA, crosslinking alle membrane mediante esposizione a raggi UV, trattamento con proteinasi K per eliminazione del residuo organico;

3) ibridazione e numerazione di V. parahaemolyticus totale: pre-ibridazione con buffer per rimozione del materiale residuo; lavaggi di stringenza con buffer di ibridazione con sonda marcata per la rilevazione di toxR in V. parahaemolyticus alla temperatura di 54±1° C; trattamento con washing buffers e rimozione della sonda legata in maniera non specifica; trattamento con antibody solution e detection buffer.

Considerazione sulle tecniche

1. I limiti evidenziati per le metodiche utilizzate (MPN e colony hybridization) rimarcano la necessità di disporre di protocolli analitici standard, per la definizione dei criteri microbiologici specifici, basati sull'approccio molecolare.
2. Nei nuovi Regolamenti la mancata introduzione di standard per *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* viene giustificata dal legislatore con la mancanza di metodi di indagine sufficientemente affidabili e validati. Tuttavia per la determinazione qualitativa di tali vibrioni in prodotti destinati al consumo umano il Ministero della Salute (note DVGA-III. IX/32799/P-I-11 del 15/09/2005 e DVGA-III/35312/P-I del 05/10/2006) raccomanda dopo l'isolamento con il metodo colturale la conferma mediante PCR della presenza dei geni correlati alla capacità di produrre tossine.