

# Escherichia coli, Salmonella spp., Virus dell'Epatite A e Norovirus in Molluschi Bivalvi nel 2011-12 in Sud Italia

Giovanna Fusco, Giuseppe Aprea, Giorgio Galiero, Achille Guarino, Maurizio Viscardi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Sanità Animale,  
Via Salute 2, 80055 Portici (NA), Italia  
aprea\_giuseppe@libero.it

## Parole chiave

*Escherichia coli*,  
Molluschi Bivalvi,  
Norovirus,  
*Salmonella* spp.,  
Sud Italia,  
Virus dell'Epatite A.

## Riassunto

La legislazione europea ha fissato limiti microbiologici, chimici e biotossicologici per i molluschi ma non ha dato indicazioni sulla contaminazione da virus a trasmissione alimentare. In questo studio sono riportati i risultati sulla contaminazione da *Salmonella* spp., *Escherichia coli* (*E. coli*), Virus dell'Epatite A (HAV) e *Norovirus* (NoV) di campioni di molluschi raccolti, nel biennio 2011-2012, in Sud Italia. Tutte le matrici analizzate di *Mytilus galloprovincialis* e di *Solen marginatus* sono risultate negative all'HAV, il 6,8% positiva a *Norovirus* GI (NoVGI) e l'11,9% positiva a *Norovirus* GII (NoVGII). Inoltre esse sono risultate negative alla contaminazione da *Salmonella* spp. mentre il 27% è risultata positiva a *E. coli*. I dati ottenuti, inoltre, hanno dimostrato l'assenza di correlazione tra la contaminazione batterica dei Molluschi Bivalvi eduli testati e quella virale. Si suggerisce alle Autorità Competenti la valutazione urgente di misure normative aggiuntive al fine di garantire la sicurezza al consumatore.

Veterinaria Italiana 2013, 49 (1), 51-54

## Introduzione

In Italia non esiste una specifica normativa sulla ricerca di virus enterici a trasmissione alimentare ad esclusione dell'art. 11 comma 5, lett. B del Reg. CE 853/2004 e del Decreto Legislativo n. 191 del 2006. Il primo lascia la possibilità di stabilire i "requisiti igienico sanitari supplementari in collaborazione con il laboratorio di riferimento comunitario per i molluschi bivalve vivi comprese le analisi virologiche e le relative norme virologiche". Il secondo obbliga le Regioni del territorio nazionale e le Province Autonome ad applicare un piano di sorveglianza in funzione della situazione epidemiologica di ciascun territorio nei confronti di agenti responsabili di zoonosi previsti nell'allegato I parte B del regolamento, tra i quali sono annoverati *Calicivirus* e il virus dell'epatite A (HAV).

In Italia, i casi registrati di insorgenza di gastroenterite da Virus dell'Epatite A sono ancora numerosi. Molti di questi, segnalati in regione Campania, sono stati attribuiti al consumo di molluschi bivalve. Entrambi i virus, NoV e HAV, si diffondono per via oro-fecale. Pertanto i molluschi si contaminano indirettamente con acqua inquinata da feci di individui infetti. Inoltre, NoV e HAV, per la loro capacità di dare infezioni a basse dosi (1-10/UFP) e sopravvivere a lungo nell'ambiente esterno, sono considerati tra le principali cause di gastroenterite nell'uomo (7, 11, 18). In Italia i casi segnalati di malattia di origine alimentare da *Norovirus* sono ancora pochi, ma in ambito inter-

nazionale si continua a registrare un numero considerevole di episodi. Nel 2006, nel sistema di allerta comunitario per alimenti e mangimi (RASFF), è pervenuta la segnalazione di 9 casi correlati ad alimenti contaminati tra cui ostriche crude (12). Nel 2008 sono stati notificati un caso in Francia, uno in Olanda e 6 in Norvegia, tutti correlati a ostriche provenienti da Spagna, Francia e Gran Bretagna. In particolare, il caso francese è stato relazionato al genogruppo I rilevato in *Crassostrea gigas*. Nello stesso anno sono stati notificati in Spagna anche 5 casi correlati al consumo di telline (13). Nel 2009, in Norvegia, sono stati riportati 19 casi derivanti dal consumo di *Gigas oyster* di origini svedesi. Trentadue persone della Repubblica Ceca hanno anche contratto l'HAV da pomodori semi-secchi importati dalla Turchia (14). Nel 2010 sono stati notificati complessivamente 13 casi da *Norovirus* in Danimarca, Norvegia, Irlanda, Francia e Svezia ascrivibili al consumo di lattughe, lamponi e molluschi bivalve (15). Nel 2011 sono stati segnalati 16 episodi in Danimarca in seguito al consumo di frutti di mare e lamponi (16).

Il ruolo di potenziale vettore di patologie virali riconosciuto ad alcune specie di Molluschi Bivalvi è legato alla loro peculiarità di essere organismi filtratori, potendo concentrare nei loro tessuti non solo contaminanti chimici ma anche batteri e virus quando allevati o raccolti in acque contaminate da scarichi fognari. Alla luce di quanto riferito, poiché il

possesto dei corretti requisiti igienico sanitari per la produzione e successiva immissione sul mercato dei molluschi viene stabilito sulla base dei criteri microbiologici e biotossicologici indicati dal Reg. (CE) n. 2073/2005, si ritiene interessante valutare in questa tipologia di alimento, oltre alla presenza di *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., anche la presenza di HAV e NoV, ritenuti a livello internazionale tra i principali agenti causa di gastroenterite nell'uomo.

## Materiali e metodi

### Campionamento

L'indagine è stata effettuata su 59 campioni: 51 cozze (*Mytilus galloprovincialis*), provenienti da zone classificate A e B delle province di Napoli e Caserta e 8 cannolicchi (*Solen marginatus*), provenienti da banchi naturali delle province di Caserta e Salerno.

### Controlli microbiologici

Le metodiche utilizzate, per la ricerca di *Salmonella* spp. e il conteggio di *Escherichia coli* mediante MPN, sono state rispettivamente UNI EN ISO 6579:2004 e ISO TS 16649-3:2005.

### Controlli virologici

Per la ricerca del Virus dell'Epatite A (genogruppi GI e GII) è stato utilizzato un protocollo fornito dal Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali nei Molluschi Bivalvi (Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica dell'Istituto Superiore di Sanità) (3, 6, 8, 18).

Il protocollo prevede l'utilizzo di 2 ml di una soluzione di proteinasi K (0,1 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) alla quale sono stati aggiunti 2 g di epatopancreas sminuzzato. Il preparato è stato incubato prima a 37°C in agitazione per 60 min e successivamente in bagnomaria a 65°C per 15 min. I campioni sono stati centrifugati a 3.000 x g per 5 min e il surnatante è stato prelevato e conservato a -20°C. L'estrazione dell'RNA è stata eseguita con il Kit Nucleospin RNA II (Macherey - Nagel GmbH & Co., Düren, Germany) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'estrazione è stata condotta su 500 µl di campione e l'RNA è stato eluito con 100 µl di buffer. La miscela di retrotrascrizione e la PCR (one step) è stata preparata utilizzando i materiali presenti nel kit Platinum qRT PCR Thermoscript one step system (Invitrogen, Karlsruhe, Germany).

I primer e le sonde utilizzate per il Virus dell'Epatite A sono stati i seguenti: (FW) HAV68 5'-TCA CCG CCG TTT GCC TAG-3'; (REV) HAV240 5'-GGA GAG

CCC TGG AAG AAA G-3'; probe HAV 150 FAM-CCT GAA CCT GCA GGA ATT AA-MGB (3). Per *Norovirus* GI: (FW) QNIF4 5'-CGC TGG ATG CGN TTC CAT-3' (4), (REV) NV1LCR 5'-CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC-3', probe NGI FAM-TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT-TAMRA (18). Per *Norovirus* GII: QNIF2 (FW) 5'-ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA-3' (8), (REV) COG2R 5'-TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA-3' (6), probe NGII FAM-AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG-TAMRA (8).

La retrotrascrizione e l'amplificazione sono state effettuate con il seguente profilo termico: 55°C per 60 min, 95°C per 5 min e 45 cicli a 95°C per 15 sec, 60°C per 1 min e 65°C per 1 min.

Il campione è stato considerato positivo quando ha presentato un Ct ≤ 44.

## Risultati

*Salmonella* spp. è risultata assente in tutti i campioni così come il Virus dell'Epatite A. Sedici campioni di molluschi (27%) sono risultati positivi per *Escherichia coli*.

Riguardo quest'ultimo dato è utile precisare che la presenza di *Escherichia coli* è stata rilevata in 10 campioni di cozze e in 6 campioni di cannolicchi. Nove dei campioni positivi a *Escherichia coli* (56%) hanno superato i limiti di legge di 230 MPN/100g. Di essi uno è risultato provenire da acque di classe A, gli altri da acque di classe B. La presenza di RNA virale appartenente al genere *Norovirus* genogruppo GI è stata rilevata in 4 campioni, il genogruppo GII è stato rilevato in 7 campioni. I dettagli delle positività sono riportate in Tabella I. In merito alla copresenza di *Norovirus* ed *Escherichia coli*, i risultati ottenuti hanno evidenziato: 4 campioni positivi per NoVGI, solo in un campione di cannolicchio con presenza di *Escherichia coli* (78 MPN/100g), 7 campioni positivi per NoVGII, solo 2 campioni di cannolicchi con presenza di *Escherichia coli* (230 MPN/g e 78 MPN/100g), (Tabella II). Infine sono risultati positivi alla copresenza di entrambi i genogruppi di *Norovirus* un campione di cozza, conforme ai requisiti di legge per assenza di *Escherichia coli*, e un campione di cannolicchio, positivo a *Escherichia coli* (78 MPN /100g).

**Tabella I.** Presenza di NoV, HAV, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. in campioni di molluschi bivalve esaminati, nel biennio 2011-2012, in Sud Italia.

Campioni	N	NoV GI	NoV GII	HAV	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	51	3	5	0	10	0
<i>Solen marginatus</i>	8	1	2	0	6	0
Totale	59	4	7	0	16	0

**Tabella II.** Correlazione tra campioni positivi per NoV e numero di *Escherichia coli* (MPN/100g).

Campioni positivi per NoV/ <i>Escherichia coli</i>	NoV GI	NoV GII	<i>Escherichia coli</i>
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	+	-	-
	+	-	-
	-	+	-
	-	+	-
	-	+	-
	-	+	-
	+	+	-
<i>Solen marginatus</i>	+	+	78 MPN/100g
	-	+	230 MPN/100g

## Discussione

Alcuni dei risultati ottenuti nel presente studio sono stati presentati in occasione del 2<sup>nd</sup> Annual World Congress of Virus and Infection (WCVI) tenutosi, nel 2011, a Pechino, Cina (1).

I dati ottenuti anche se riferibili a un numero non elevato di campioni, risultano interessanti e richiedono attente considerazioni.

La quasi totalità dei campioni esaminati, eccetto gli 8 campioni di cannolicchi, sono stati prelevati dai servizi veterinari da zone di classe A e B, secondo quanto stabilito dal Reg. 854/2004 CE. Nell'attuale normativa, *Escherichia coli* è ritenuto un utile marker biologico per la valutazione indiretta di fecalizzazione dell'acqua. Alla luce dei risultati ottenuti che indicano un'assenza di correlazione tra *Escherichia coli* e *Norovirus*, si ritiene che l'utilizzo del solo agente patogeno *Escherichia coli* come indicatore biologico indiretto della qualità dell'acqua e dell'alimento sia insufficiente. Si ritiene, pertanto, necessario integrare l'attuale normativa con una disposizione che preveda anche l'impiego di un marker virale adeguato mediante l'impiego di una tecnica ad elevata sensibilità e di facile impiego. Si ricorda che un indicatore per essere definito tale e adatto allo scopo deve presentare caratteristiche biologiche e biochimiche simili agli agenti patogeni. Inoltre le metodiche utilizzate per rilevarne la presenza devono essere sensibili, possibilmente rapide, validate e standardizzate. Si comprende, pertanto, come nel caso di virus, organismi incapaci di replicarsi nell'alimento e con caratteristiche biologiche e biochimiche peculiari, la presenza in un alimento possa essere rilevata solo utilizzando marker biologici a loro molto simili (2, 9, 17).

Nel presente studio, la quasi totalità dei campioni positivi per *Norovirus* sono risultati negativi per *Escherichia coli* se si considerano i limiti di legge stabiliti per i mitili raccolti nelle zone A e B. È interessante evidenziare come *Escherichia coli* sia risultata presente in 6 degli 8 campioni di cannolicchi esaminati e che 2 di essi superavano i limiti di legge consentiti. Questa specie di mollusco merita una particolare attenzione poiché vivendo insabbiata in aree marine naturali e non essendo sottoposta ad alcuna attività di depurazione, presenta valori igienico-sanitari differenti rispetto a specie che si allevano in filari in aree marine controllate. È utile evidenziare che gli indicatori batterici presentano una maggiore sensibilità ai fattori ambientali ostili e ai processi di depurazione delle acque rispetto ai virus, pertanto nei loro confronti il processo di depurazione risulta molto più efficace (5, 19). Per il Virus dell'Epatite A e per i *Norovirus* tale effetto non sussiste.

## Conclusioni

Le attuali normative non prevedono limiti per la presenza di contaminanti virali nei molluschi bivalve vivi. La mancanza di correlazione tra virus a trasmissione alimentare e batteri da contaminazione fecale rende vana la possibilità di valutare indirettamente la presenza di HAV e NoV attraverso la conta batterica di *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli*. Per tali motivi e per i risultati presentati si ritiene utile proporre alle Autorità Competenti di valutare con urgenza misure aggiuntive alle attuali norme al fine di sorvegliare e quindi garantire la sicurezza del consumatore di molluschi bivalve con particolare riguardo a quelli provenienti da zone di classe A. Tale suggerimento è dettato dalla consapevolezza che l'idoneità dei controlli sanitari deve obbligatoriamente interessare l'Autorità Sanitaria di ogni Paese per garantire al consumatore un alimento salubre. La politica internazionale sulla sicurezza alimentare si basa essenzialmente sull'analisi del rischio, individuazione del pericolo e applicazione di strategie idonee per ridurre la contaminazione dell'alimento e conseguentemente la successiva esposizione dell'uomo al contaminante. Controllare microbiologicamente le acque attraverso i bioindicatori per destinarle in seguito all'allevamento dei mitili rappresenta l'unica misura di sicuro successo. A tal fine, per l'individuazione di contaminanti virali, i Laboratori Ufficiali si potranno avvalere di metodiche biomolecolari standardizzate, di rapida esecuzione e di sicura efficacia, come ad esempio la metodica real-time PCR.

## Bibliografia

1. Aprea G. 2011. Norovirus and Epatitis A Virus: Foodborne Pathogens Responsible of Human Viral Gastroenteritis. 2<sup>nd</sup> Annual World Congress of Virus and Infection (WCVI), July 30 - August 1, Beijing, China.
2. Caballero S., Abad F.X., Loisy F., La Guyader F.S., Cohen J., Pintò R.M. & Bosh A. 2004. Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 3904-3909.
3. 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.
4. 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.
5. Franco E., Toti L., Gabrieli R., Croci L., De Medici D. & Pana A. 1990. Depuration of *Mytilus galloprovincialis* experimentally contaminated with hepatitis A virus. *Int J Food Microbiol*, **11**, 321-328.
6. Kageyama T., Koijima 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**, 1548-1557.
7. 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.
8. Loisy F., Atmar R.L., Le Saux J.C., Cohen J., Caprais M.P., Pommepuy M. & Le Guyader F.S. 2005. Use of Rotavirus virus-like particles as surrogates to evaluate virus persistence in shellfish. *Appl Environ Microbiol*, **17**, 6049-6053.
9. Loisy F., Atmar R.L., Guillon P., Le Cann P., Pommepuy M. & Le Guyader F.S. 2005. Real time RT-PCR for noroviruses screening in shellfish. *J Virol Methods*, **123**, 1-7.
10. Ministero della Salute - Direzione Generale per la sicurezza degli alimenti e della nutrizione, Ufficio VIII ex VI. Raccomandazione Prot. DGSAN/VII (ex VI) 3734 del 20.04.2007.
11. Pinto R.M., Costafreda M.I. & Bosh A. 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl Environ Microbiol*, **75**, 7350-7355.
12. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). 2007. Annual Report 2006, European Communities, Luxembourg, 72 pp. ([http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2006\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2006_en.pdf), ultimo accesso 20 febbraio 2013).
13. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). 2009. Annual Report 2008, European Communities, Luxembourg, 56 pp. ([http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2008\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2008_en.pdf), ultimo accesso 20 febbraio 2013).
14. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). 2010. Annual Report 2009, European Communities, Luxembourg, 76 pp. ([http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/report2009\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/report2009_en.pdf), ultimo accesso 20 febbraio 2013).
15. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). 2011. Annual Report 2010, European Communities, Luxembourg, 64 pp. ([http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff\\_annual\\_report\\_2010\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2010_en.pdf), ultimo accesso 20 febbraio 2013).
16. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). 2012. Annual Report 2011, European Communities, Luxembourg, 52 pp. ([http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff\\_annual\\_report\\_2011\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2011_en.pdf), ultimo accesso 20 febbraio 2013).
17. Skraber S., Gassiloud B. & Gantzer C. 2004. Comparison of coliforms and coliphages as tools for assessment of viral contamination in river water. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 3644-3649.
18. Svraka S., Duizer E., Vennema H., de Bruin E., van der Veer B., Dorresteijn B. & Koopmans M. 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in the Netherlands from 1994 through 2005. *J Clin Microbiol*, **45**, 1389-1394.
19. 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*, **77**, 5618-5701.