



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Influenza dei fattori stressogeni sulla depurazione dei molluschi bivalvi. Valutazioni dell'impatto sulle produzioni locali.

Luigi Lanni
DO Alimenti

“Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali; Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti”





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

U.O. coinvolte: DO Alimenti; LNR virus; LNR batteri; UNI TE

Aspetti generali e peculiarità

Materiali e metodi

Risultati

Diffusione

Conclusioni



ciò che può influire direttamente sul metabolismo o sul comportamento di un organismo ...



100% Ingestione



Assorbimento 82 %

Pseudofeci 13%

Feci (5%)

AMBIENTE MARINO


AMBIENTE TERRESTRE (costiero e non)

AGRICOLTURA

NAVIGAZIONE E TRASPORTO

TUTELA DELLE RISORSE

RICERCA

	°C	lt/h
Mussel	14	1,5
European Oyster <i>(O. edulis)</i>	15	12
American Oyster <i>(C. virginica)</i>	20	18

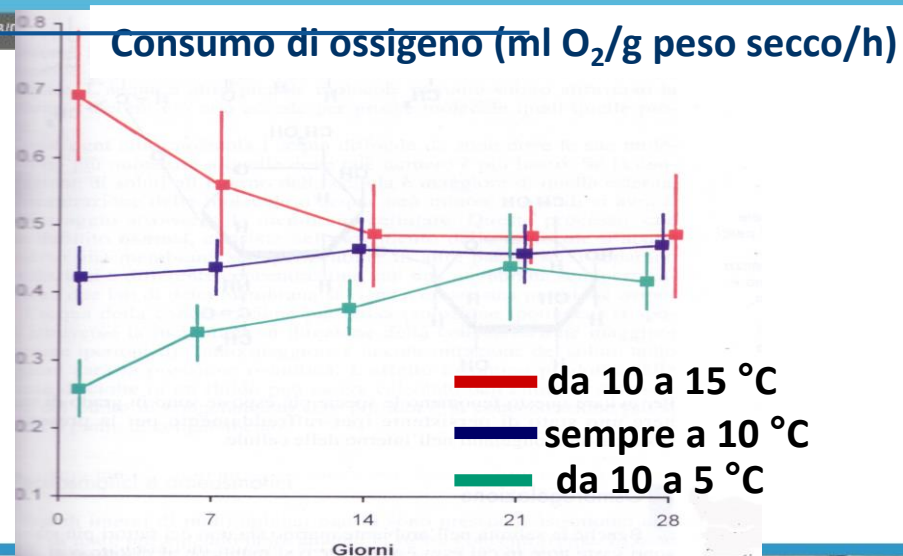
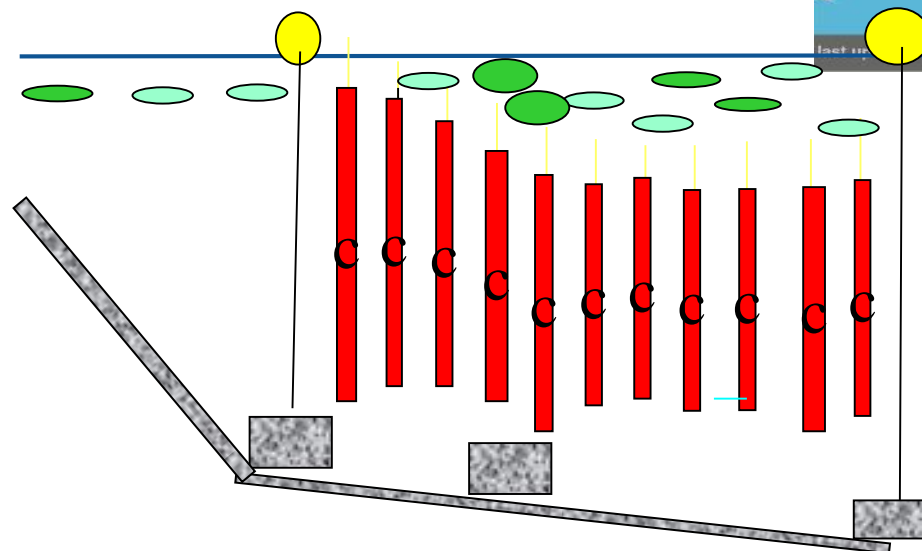
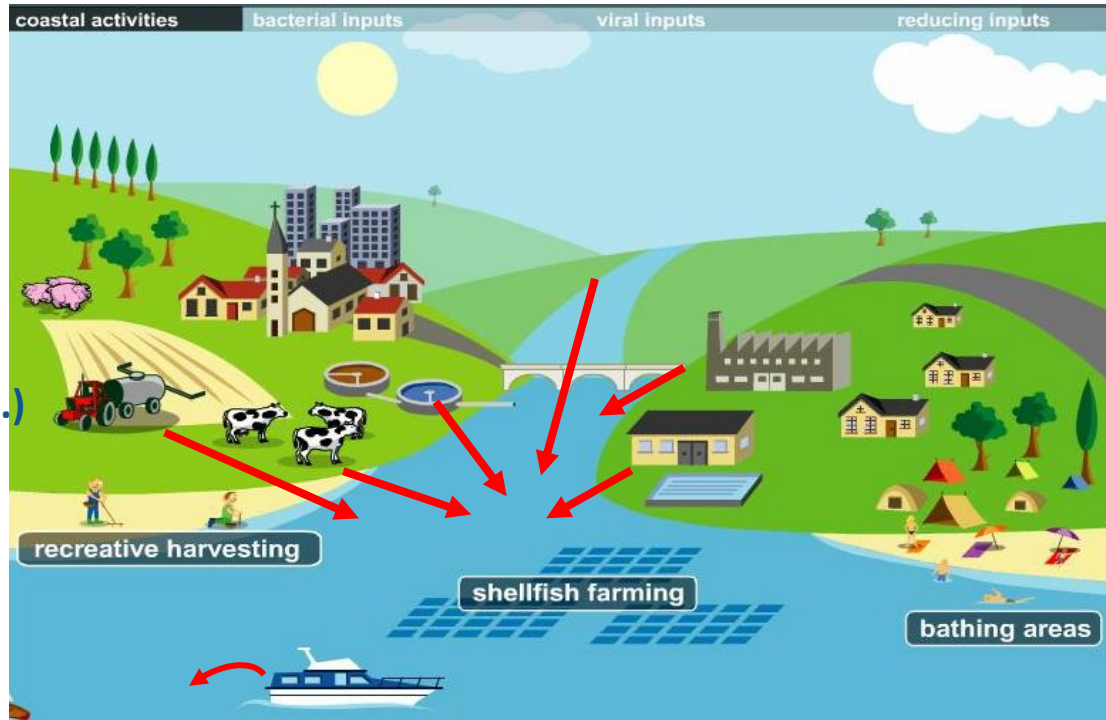




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Fattori biotici (batteri, virus, alghe, ecc.)

Fattori abiotici (idrocarburi, metalli, diox, ecc.)



Asservite o meno a stabilimenti



Raccolta mediante attrezzi da pesca



Analisi e valutazione del sistema da parte terza!
Report 2012-6542

Annex I, part A, point II
Hygiene provisions

additional

Section VII, Chapter II, Letter B
Protect LBM against contamination

Take into account....

- ✓ Point 2) the processing that they will subsequently undergo!
- ✓ Point 3a) control of hazards in primary production and associated operation!

Purification centre Dispatch centre

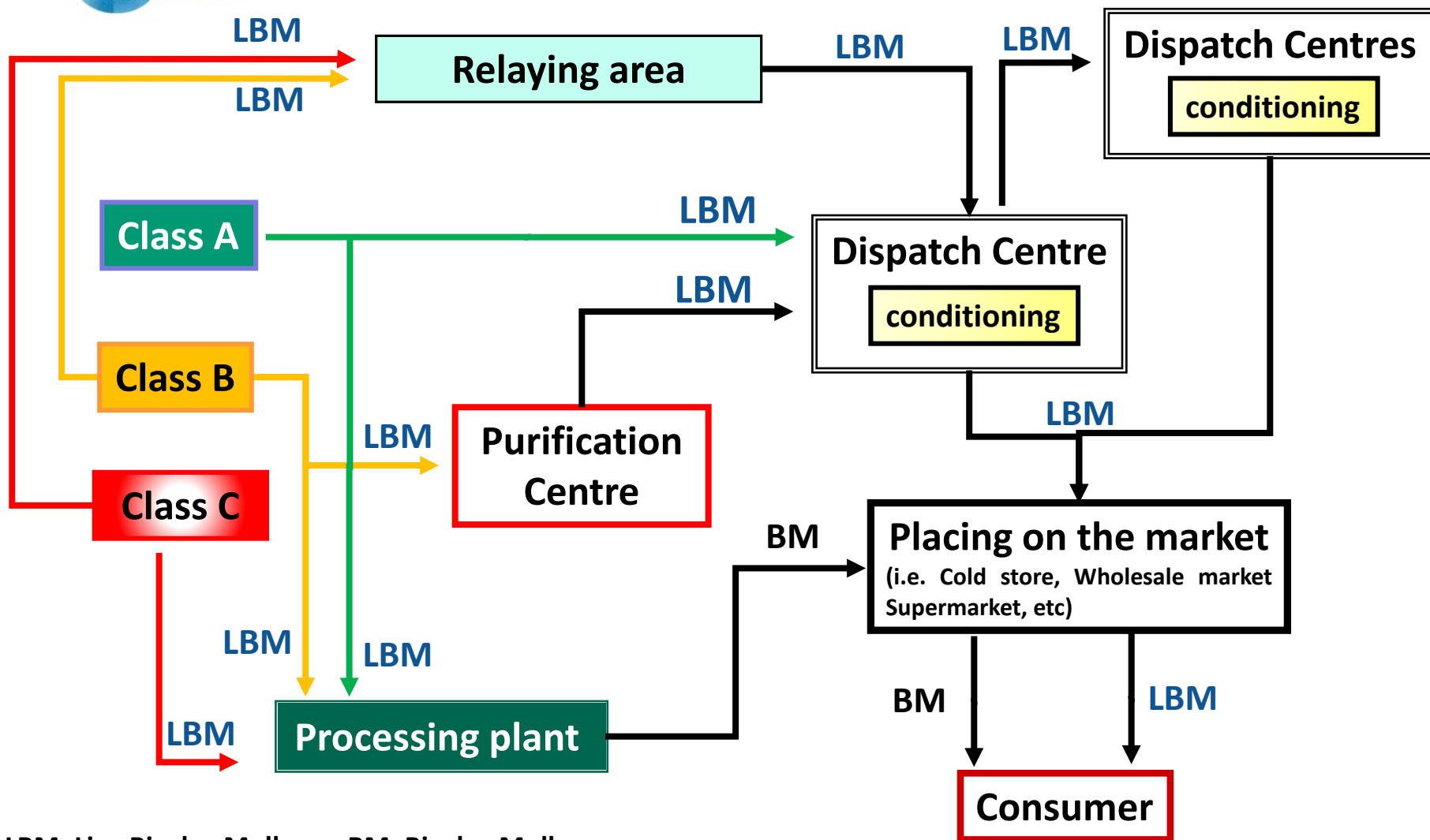
Auction hall

Transformed products means other establishment

Many pathogenic bacteria are naturally present in aquatic environments

Potential sources of contamination from the environment should be considered





LBM: Live Bivalve Mollusc – BM: Bivalve Mollusc





- ✓ Definizione di un **piano di campionamento** per il controllo microbiologico di un'area di produzione di molluschi bivalvi, **funzionale al controllo anche di parametri (Vibrio, Norovirus) non ancora considerati nella normativa.**
- ✓ Definizione di una **metodica automatizzata per la valutazione dello stato fisiologico** dei molluschi attraverso la misura di parametri immunologici e sua formalizzazioni in una procedura operativa standard.
- ✓ Documentazione informativa con **indicazioni tecniche** per l'Operatore del Settore Alimentare e per l'Autorità Competente relativamente **alla gestione della produzione primaria e degli impianti di depurazione** (indicazioni per la valutazione e validazione del processo di depurazione).
- ✓ Documentazione informativa con **indicazioni tecniche** per l'Operatore del Settore Alimentare e per l'Autorità Competente **relative al decremento di batteri e virus** non contemplati in ambito legislativo.
- ✓ Verifica dell'**applicabilità tecnica e commerciale del sistema di misura dei parametri emocitari** come modalità di controllo rapido dello stato dell'animale e come sistema predittivo del comportamento nella depurazione.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

SITO SPERIMENTALE

Laguna – Lago costiero

Superficie di circa 3,75 km²

Lunghezza di circa 5 km

Larghezza di compresa tra 150 e 500m

Profondità media di 4,5 m. Max 10m

6 “rias” paralleli

Collegamenti con il mare



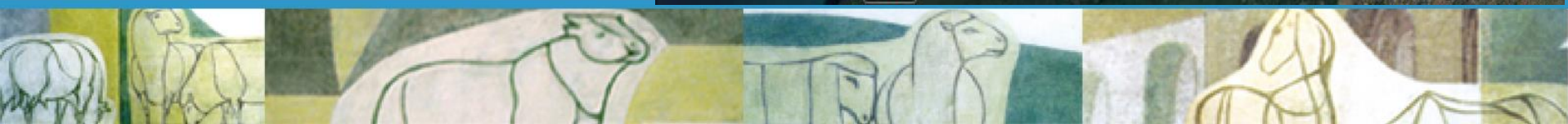


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

1 L.C.A.

1 F.B.O.

- ✓ Primary production
- ✓ Reimmersion area
- ✓ More L.B.M. species
- ✓ Purification Centre
- ✓ Dispatch Centre
- ✓ Storage area
- ✓ Own transport







	20 mare	20 monte	23 mare	24 mare	25 mare	25 monte	
dev std log	0,33125	0,40386	not appl	not appl	0,76203	0,72677	
dev std Geometric mean	2,14412	2,53432	not appl	not appl	5,78137	5,33050	
Log Geometric mean	1,22	1,43	1,00	1,00	1,58	1,58	
Geometric mean	18	30	10	10	51	38	

settore A: E lato monte

Settore B: 25 lato mare

settore B1: 51 sx

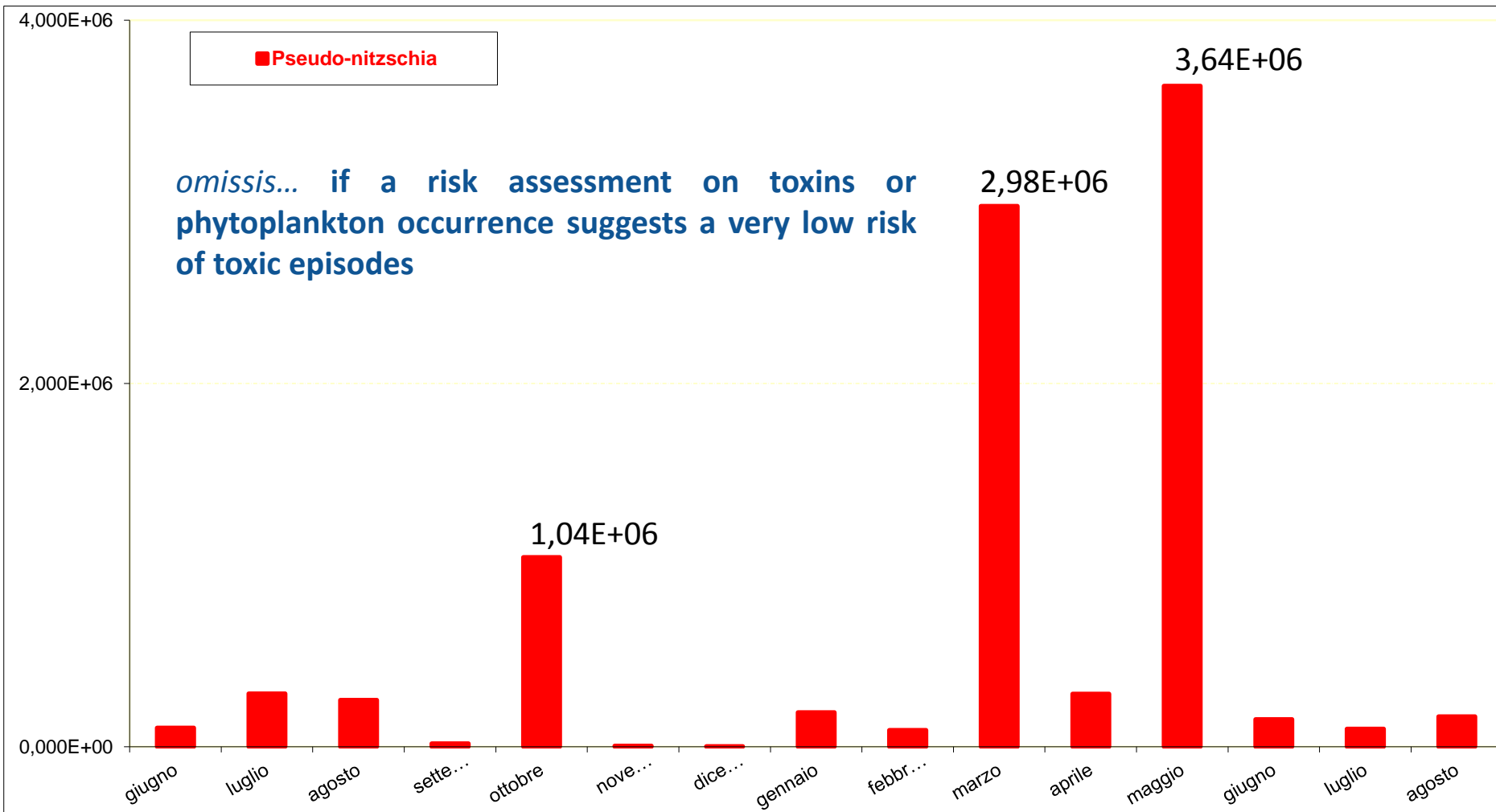
Geometric mean

36

51

47

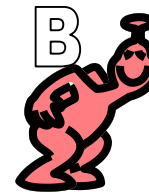
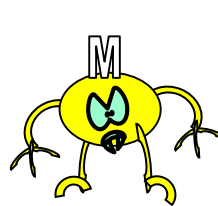






Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Sistema immunitario



Emociti

- ✓ trasporto dei nutrienti
- ✓ rimozione dei cataboliti
- ✓ riparazione cicatriziale delle lesioni tessutali
- ✓ risposta allo stress

Mytilus galloprovincialis: differenti tipologie di emociti

Microscopia ottica (Hemacolor stain, 1000x)



Ialinocita

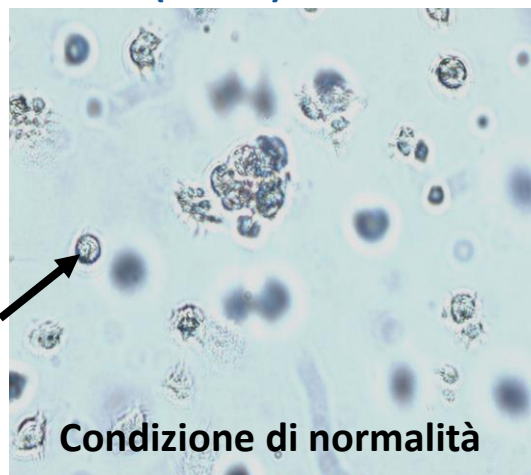


Granulocita

Mytilus galloprovincialis: attività ameboide di emociti
microscopia ottica a fresco (1000x)



Stimolazione fagocitaria



Condizione di normalità





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Campionamenti: 8 su base stagionale

Campione: \approx 120 soggetti

Sbarco

20 soggetti

**depurazione_{18h} : $T15^{\circ}\text{C} \pm 0.8$;
salinità $32.7 \text{ ppt} \pm 0.2$;
 O_2 $6.4 \text{ mg/L} \pm 0.3$**

20 soggetti

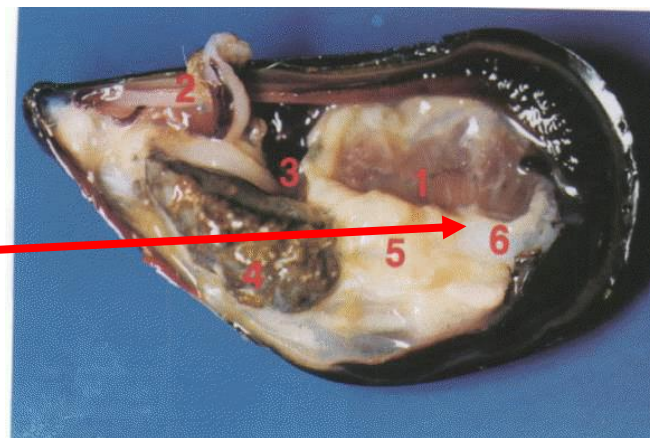
Stoccaggio $\text{H}_2\text{O}_{32.7 \text{ ppt}}$: 24h

20 soggetti

Stoccaggio cella frigo: 24h

20 soggetti

prelievo emolinfa muscolo adduttore posteriore





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Parametri emolinfatici

Concentrazione

Emolina + soluzione antiaggregante Alsever [$\approx 10^6$ cell/ml]

% Vitalità

tripan blu, mescolato automaticamente dallo strumento alla sospensione cellulare

Diametro

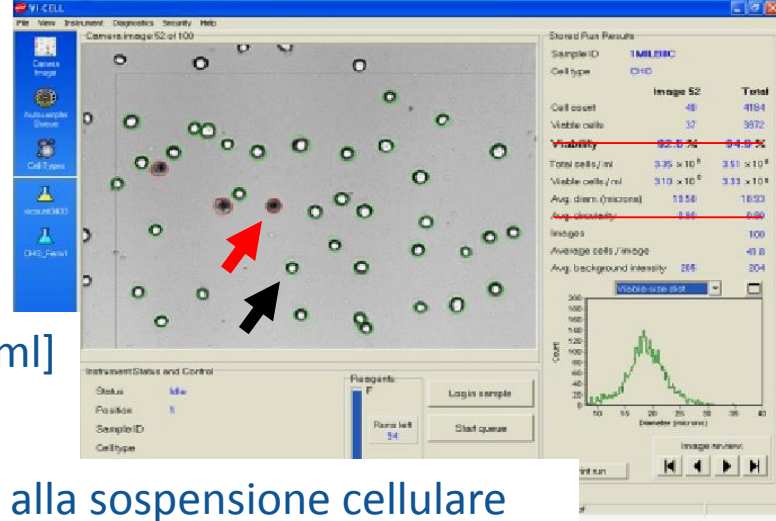
grandezza e complessità strutturale, mediante l'angolo di rifrazione frontale (Forward Scatter, FS) e laterale (Side Scatter, SS)

Circolarità

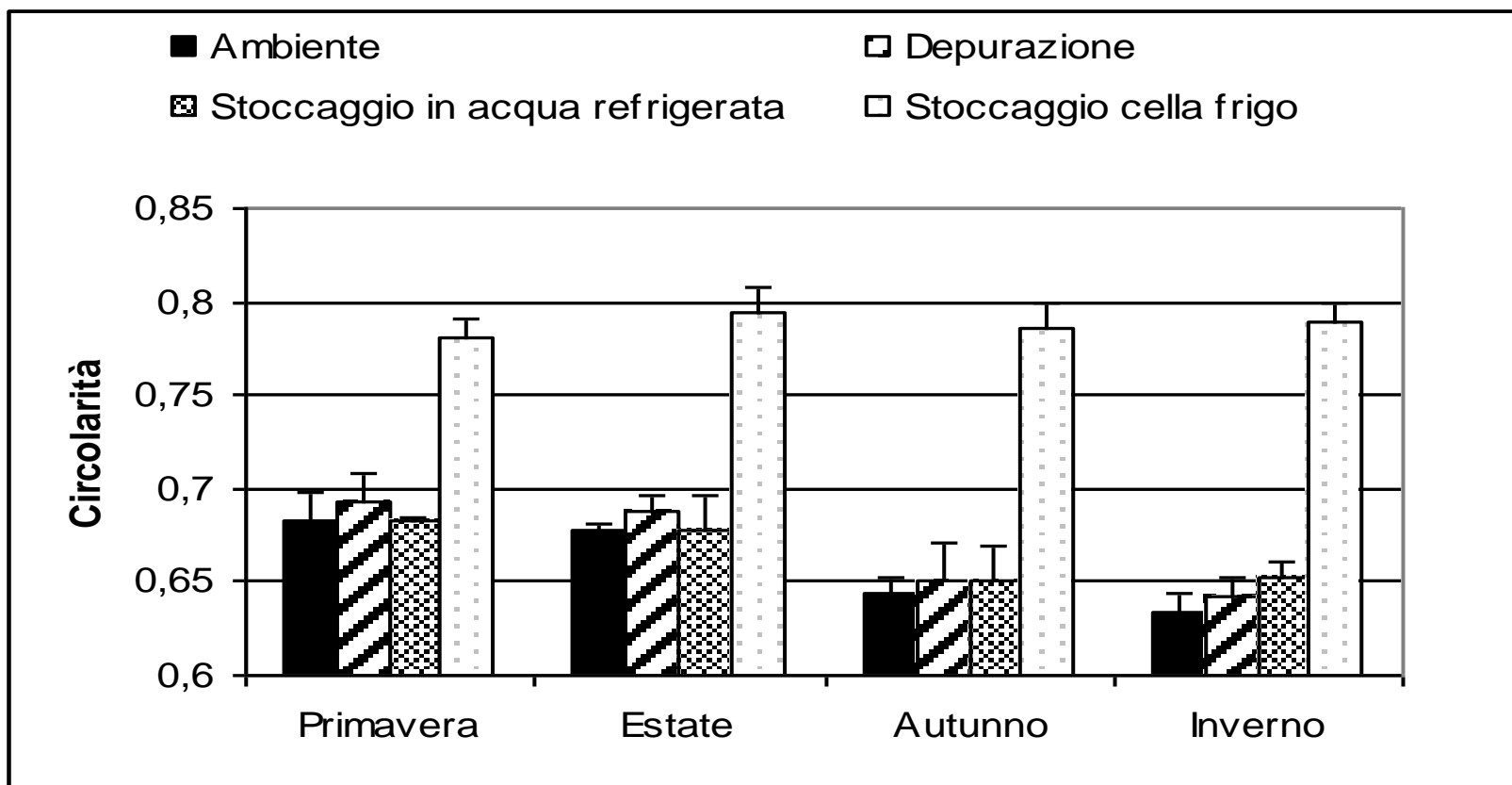
Analisi computerizzata delle immagini per la misurazione del perimetro, dell'area cellulare con restituzione dei parametri morfologici di circolarità cellulare

Valutazione attivazione attività ameboide: attivazione pseudopodica con *Vibrio algynoliticus* [10^6] incubazione 15'

Burst respiratorio: capacità ossidativa emocitaria, mediante produzione di specie reattive dell'ossigeno. Luminolo 10^{-3} M x 15' - *Saccharomyces cerevisiae* → stimolo fagocitario → ossidazione del luminolo (luminescenza URL)



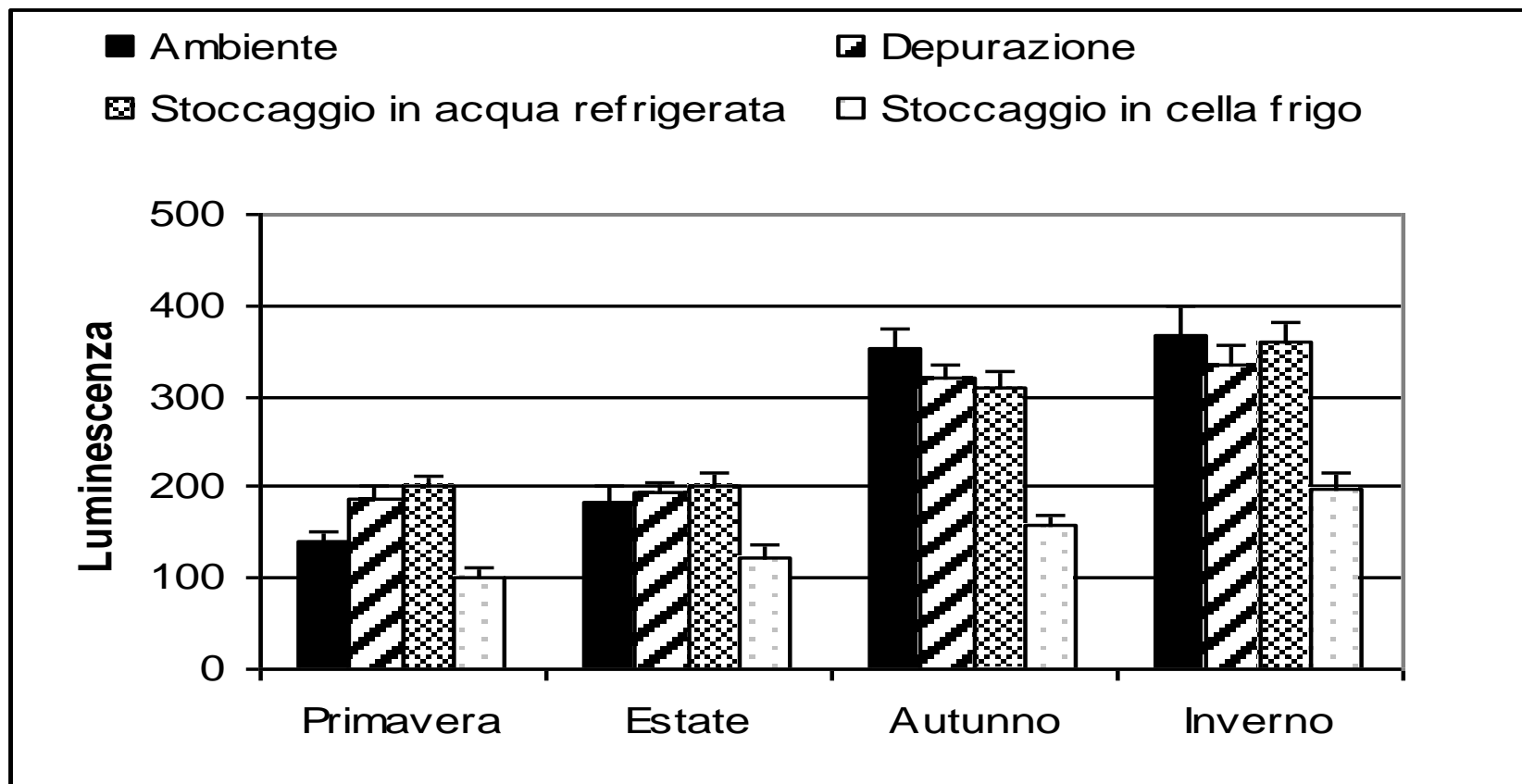
Attivazione ameboide di emociti di mitili stimolati *in vitro*



Valori medi stagionali



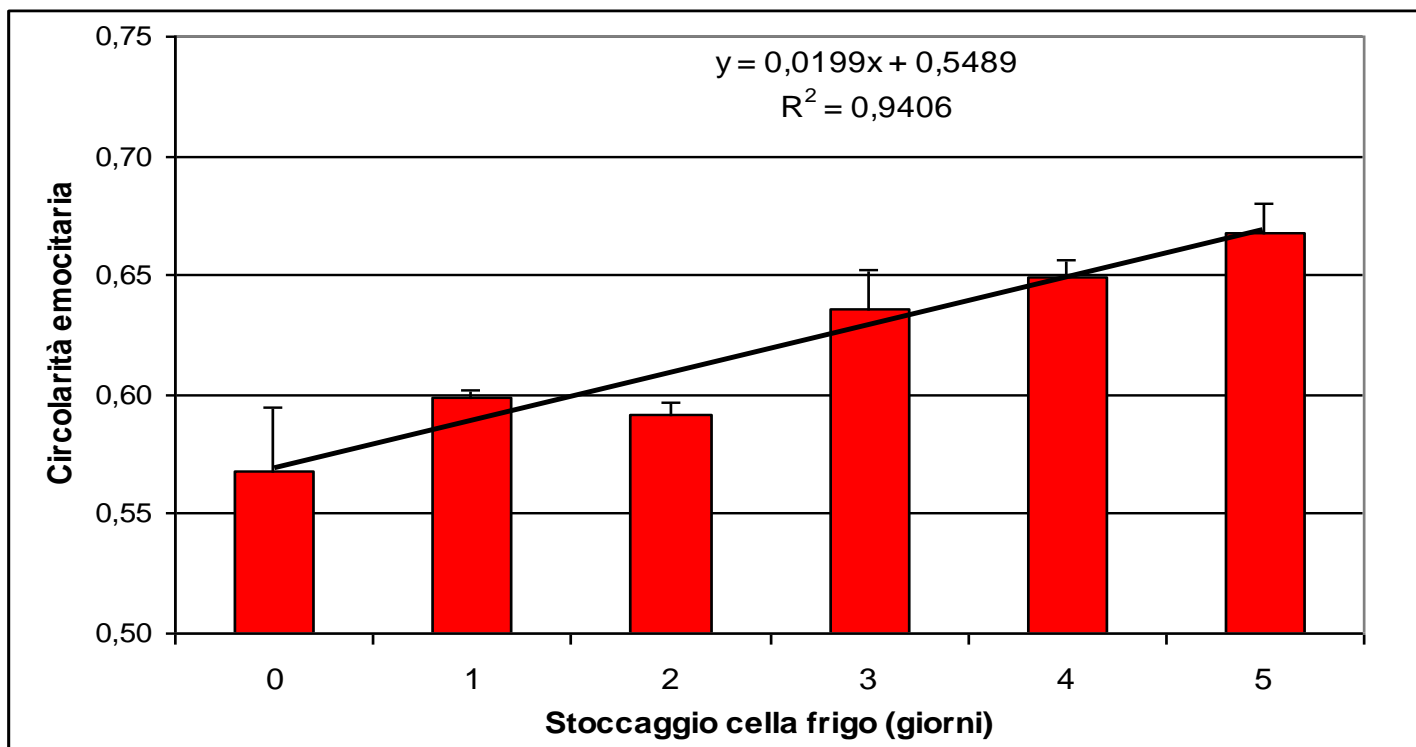
Attività ossidativa di emociti di mitili stimolati *in vitro* alla fagocitosi



Valori medi stagionali



Attività ameboide di emociti di ostrica, valutata *in vitro* dopo lo sbarco (0) e durante lo stoccaggio in cella frigo per 5 giorni



Valori medi 10 soggetti



Development of a colony hybridization method for the enumeration of total and potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish

Preparazione del campione (sospensione madre e diluizioni)

Semina su TSA-S (37°C x 18h)

Raffreddamento (4°C x 30')

Trasferimento colonie su membrana e lisi

Fissazione DNA su membrana tramite UV

Proteinasi K (37°C x 1h)

Ibridazione con sonda specifica

Anticorpi

Colorazione

Conta

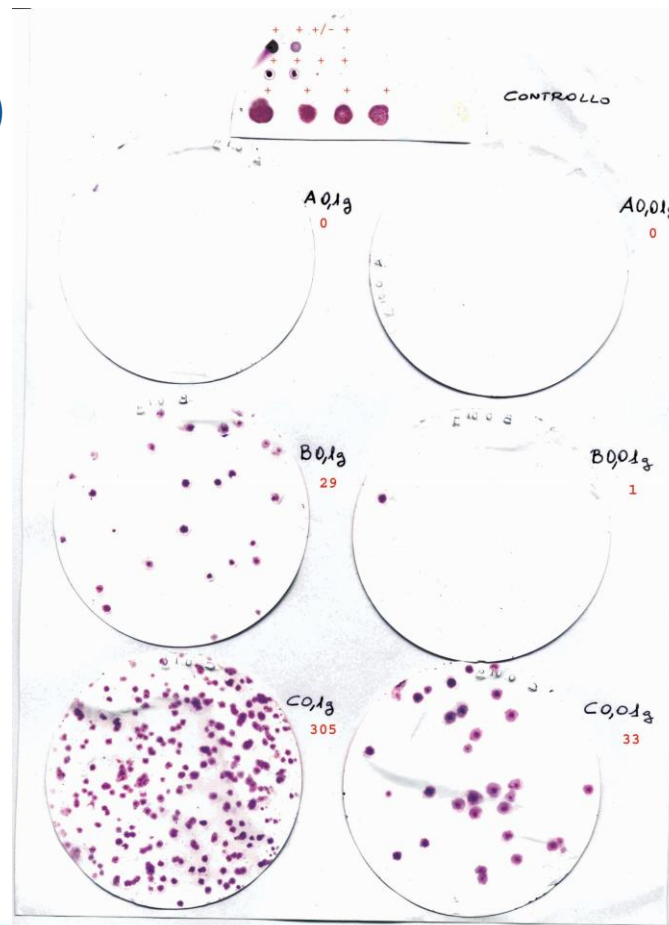
RISULTATI

Not detectec: Autunno - Inverno

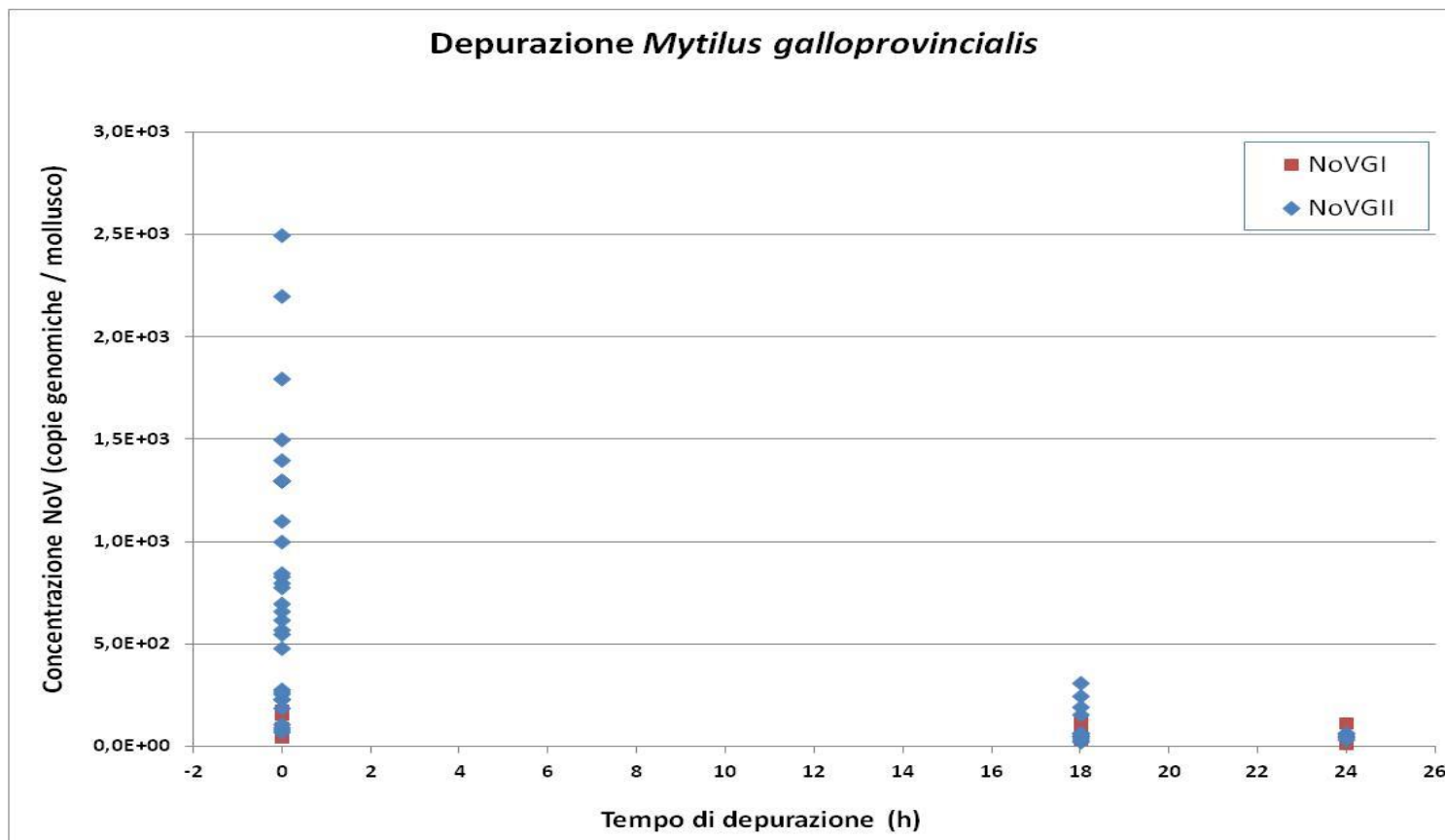
Primavera – Estate: riduzione 1 Log ÷ 30%

Chiusura sito inizio estate: limitazione favorevole

Trial interlab: CEN method



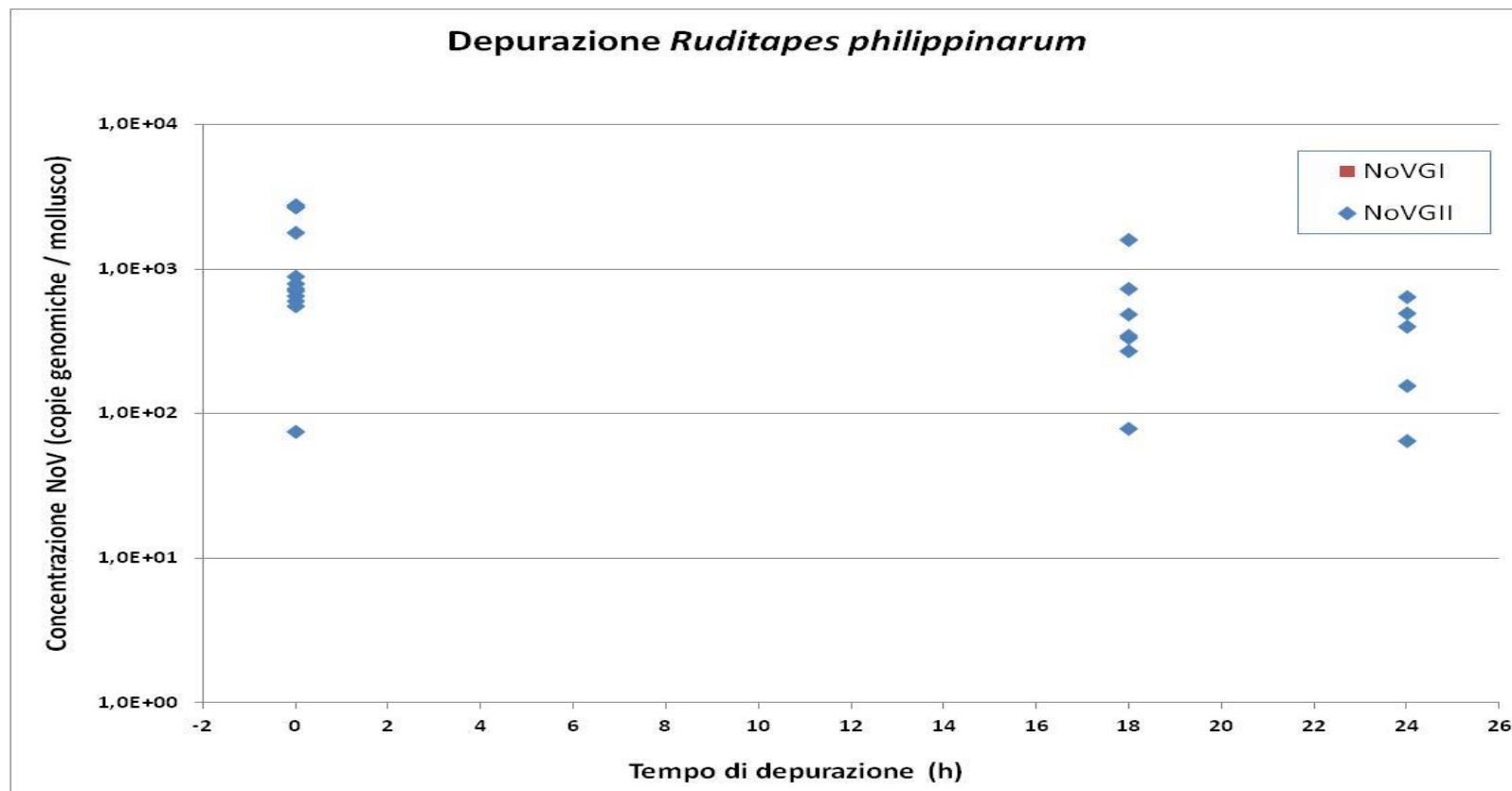
Campioni naturalmente contaminati



Trend della depurazione di Norovirus (genogruppo I e genogruppo II), valutata nel corso del processo di depurazione di *Mytilus galloprovincialis* a 18 e 24 ore.



Campioni naturalmente contaminati



Trend della depurazione di Norovirus (genogruppo I e genogruppo II), valutata nel corso del processo di depurazione di *Ruditapes philippinarum* a 18 e 24 ore





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Disseminazione

Protocol for the baseline survey of NoV contamination in oysters in the EU

SCIENTIFIC REPORT



APPROVED: 10 February 2016

doi:10.2903/j.efsa.2016.4414

PUBLISHED: 4 March 2016

EFSA Staff

Jane Richardson, José Cortiñas Abrahantes,
Frank Boelaert and Federica Barrucci

Technical specifications for a European baseline survey of norovirus in oysters

European Food Safety Authority (EFSA)

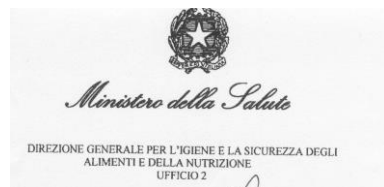
EFSA W.G. (Management)

David Lees, Micheal O' Mahony, Liesbeth Bruckers, Covadonga Salgado Blanco, **Luigi Lanni**, Ainhoa Pare, Françoise S. Le Guyader

EFSA W.G. (Technical Analytical Subgroup)

James Lowther, Françoise S. Le Guyader, Reimar Johne, Sinead Keaveney, Anna Charlotte Schultz and **Elisabetta Suffredini**

Baseline Survey in Italy



- **Giuseppe Lediani** – Ministry of Health (Project Manager)
- **Luigi Lanni** – IZSLT (Deputy Project Manager)
- **Elisabetta Suffredini** – ISS (Data Provider; *LNR designated Lab.*)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

ISO/TC 034/SC 09/WG 19 "Guidelines for conducting challenge test"

Meeting: Losanne – Rome - Minneapolis

ISO 20976 Microbiology of the food chain - Guidelines for conducting challenge tests

Part 1: Challenge tests to study the growth potential, lag time and the maximum growth rate"

Part 2: Inactivation

Task Force Regione Lazio LBM

11th International Conference on Molluscan Shellfish Safety (Galway, 14-18 May 2017)

- Communication
 - "European baseline survey of norovirus in oysters."
- Poster
 - Prevalence and characterization of Aichiviruses in bivalve molluscs produced and marketed in Southern Italy

Sustained training mission in Thailand- Bivalve Molluscs' safety maneagment

**Thailand - EU Policy Dialogues Support Facility (PDSF) – Technical Assistance Service Contract
EuropeAid/132360/CSER/TH**



- I parametri emocitari non rispondono variazioni esterne di grado minimo (processi di depurazione e stoccaggio in acqua marina refrigerata)
Sembrano invece rispondere in maniera piuttosto rapida a importanti variazioni esterne, imputabili in particolar modo alle condizioni di ipossia/anossia, (stoccaggio in cella frigo)
- Indici di attivazione ameboide (circolarità) di emociti in mitili ed ostriche nelle differenti fasi della filiera produttiva (produzione primaria, depurazione, rifinitura e stoccaggio in cella) → pre-requisito di uno stato ottimale di benessere dell'animale da sottoporre a processo depurativo
- La variabilità della contaminazione virale nei singoli individui → analisi di un adeguato numero di individui onde fornire una determinazione rappresentativa della popolazione
- La depurazione sperimentale di mitili, vongole e ostriche in condizioni standard ed in sistemi a circuito chiuso per 24 ore → un'efficacia ridotta del processo depurativo
NoV e *Vibrio parahaemolyticus*

