



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA**

**Dipartimento di Scienze Veterinarie**

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

XXXV CICLO

Settore Scientifico Disciplinare VET/04

**Batteri vitali ma non coltivabili (VBNC) in  
prodotti della pesca congelati**

---

Candidata:

Dott.ssa Eleonora Di Salvo

Coordinatore:

Ch.ma Prof.ssa Rosaria Laurà

Tutor: Ch.mo Prof. Antonio Panebianco

Anno Accademico 2021/2022

## INDICE

1	Introduzione	3
1.1	Consumo dei prodotti della pesca ed aspetti nutrizionali	3
1.2	Pericoli da consumo di molluschi bivalvi e crostacei	12
1.3	Pericoli fisici	12
1.4	Pericoli chimici	13
1.5	Pericoli biologici	17
1.6	Effetti dei trattamenti di conservazione e/o trasformazione su <i>Vibrio</i> spp.	20
1.6.1	Immersione in ghiaccio	20
1.6.2	Refrigerazione	21
1.6.3	Congelamento	21
1.6.4	Le alte pressioni idrostatiche	22
1.6.5	Acqua elettrolizzata	22
1.6.6	Blandi trattamenti termici	23
1.6.7	Depurazione	23
1.7	Legislazione Comunitaria sulla produzione e sul controllo igienico sanitario dei molluschi bivalvi e dei crostacei	24
1.8	I batteri del genere <i>Vibrio</i>	43
1.9	<i>Vibrio cholerae</i>	49
1.10	Fattori di patogenicità e sintomatologia nell'uomo	51
1.11	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	54
1.12	Fattori di patogenicità e sintomatologia nell'uomo	56
1.13	<i>Vibrio vulnificus</i>	59
1.14	Fattori di patogenicità e sintomatologia nell'uomo	61
1.15	I batteri vitali ma non coltivabili (VBNC)	62
1.16	“Rivificazione”	68
2	Parte sperimentale	71
2.1	Parte prima	71
2.2	Materiali e Metodi	71
2.3	Ricerca di <i>Vibrio parahaemolyticus</i> con metodo colturale	75
2.4	Induzione dello Stato VBNC	75
2.5	Cellule morte	75
2.6	Curva di calibrazione	76
2.7	Trattamento con PMA ed estrazione del DNA genomico	77
2.8	Analisi real-time PCR	78
2.9	Analisi statistica	79
3	Risultati	79
4	Parte seconda	81
4.1	Materiali e Metodi	81
4.1.1	Preparazione dei campioni	81
4.1.2	Ricerca di <i>Vibrio cholerae</i> e <i>Vibrio parahaemolyticus</i> con metodo colturale	81
4.1.3	Curva di calibrazione	82

4.1.4	Analisi con il reagente D ed estrazione del DNA genomico	83
4.1.5	Analisi real-time PCR	84
4.1.6	Analisi statistica	85
5	Risultati	86
6	Considerazioni e Conclusioni	90
	Bibliografia	95

## **1. Introduzione**

Scopo del presente lavoro è stato quello di contribuire alle conoscenze sulla presenza di *Vibrio parahaemolyticus* in molluschi bivalvi e crostacei, congelati e surgelati, regolarmente commercializzati.

Ciò, sia per quanto concerne le forme isolabili con metodologia colturale classica che per quelle vitali ma non coltivabili (VBNC) evidenziabili con approccio biomolecolare.

Gli stimoli principali per la sua realizzazione sono stati quelli dell'aumento dei consumi dei suddetti prodotti, anche crudi o poco cotti, della nota capacità di *V. parahaemolyticus* di resistere lungamente a temperature di congelamento nonché le recenti acquisizioni sulla capacità di numerosi stressori, anche fisici, di indurre i germi ad entrare in una fase di morte apparente (VBNC) ma suscettibili di essere rivificati in opportune condizioni.

Si intuisce chiaramente l'importanza delle conoscenze al riguardo che potrebbero condurre ad una sostanziale rivisitazione della valutazione del rischio *V. parahaemolyticus* nei prodotti della pesca.

Detti aspetti verranno qui di seguito sinteticamente trattati.

### **1.1 Consumo dei prodotti della pesca e aspetti nutrizionali**

Secondo dati riportati dalla FAO (2021), a livello mondiale, fino al 2019, il consumo dei prodotti della pesca ha registrato un continuo e significativo aumento al punto da risultare uno dei mercati trainanti del contesto produttivo alimentare globale.

Il trend di crescita del settore è stato determinato da numerosi fattori, di seguito sintetizzati:

- velocizzazione dei sistemi di distribuzione globale verso la piccola e grande distribuzione;
- miglioramento delle tecnologie di produzione e conservazione con impatto positivo sulla qualità e freschezza dei prodotti e aumento della conservabilità;
- maggiore consapevolezza dei consumatori sui pregi nutrizionali dei prodotti ittici rispetto alle carni, rosse in particolare;
- maggiore consapevolezza sulle funzioni terapeutiche e preventive di una corretta alimentazione;

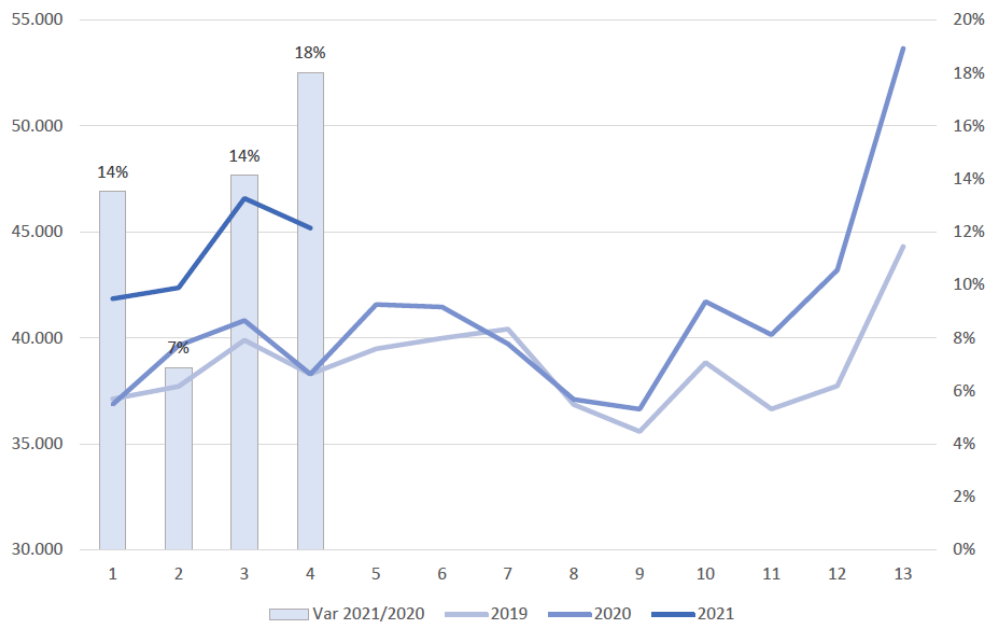
- cambiamento degli stili di vita, delle abitudini alimentari e aumento del tasso di sedentarietà, condizionamento dei consumi alimentari per esigenze salutistiche, promozione di prodotti su misura (novel food) e dietetici (light);
- aumento del consumo dei pasti fuori casa e scelta di alimenti a rapida preparazione;
- aumento dei redditi e dell'urbanizzazione;
- diffusione di società multiethniche che, unitamente alla globalizzazione dei consumi, ha contribuito alla diffusione di tendenze alimentari alternative e all'aumento del consumo di piatti extra-nazionali ed extra-europei, quali le specialità orientali a base di pesce.

Prima della pandemia la produzione ittica e dell'acquacoltura mondiale (dati riferiti al 2018) aveva raggiunto il primato assoluto di quasi 179 milioni di tonnellate. Il 54% del totale, pari a 96,4 milioni di tonnellate di pescato, era frutto della pesca marittima globale, mentre l'acquacoltura aveva contribuito per il restante 46%, equivalente a 82,1 milioni di tonnellate di prodotti ittici. Negli ultimi decenni il consumo di prodotti della pesca è andato aumentando notevolmente, a una media di oltre 20 chili pro capite e dovrebbe raggiungere i 21,4 kg entro il 2030. I tassi di crescita più elevati sono previsti in Oceania (12%), nelle Americhe (9%), in Asia (7%) e in Europa (6%).

Durante la pandemia da COVID-19 i settori della pesca e dell'acquacoltura sono stati colpiti duramente e la domanda di prodotto fresco è diminuita drasticamente a fronte, tuttavia, di un aumento della domanda di prodotti della pesca congelati, trasformati e conservati che sembrano aver attutito il duro colpo della crisi. Queste nuove tendenze hanno accelerato lo sviluppo di servizi di marketing, packaging e consegna a domicilio più efficienti.

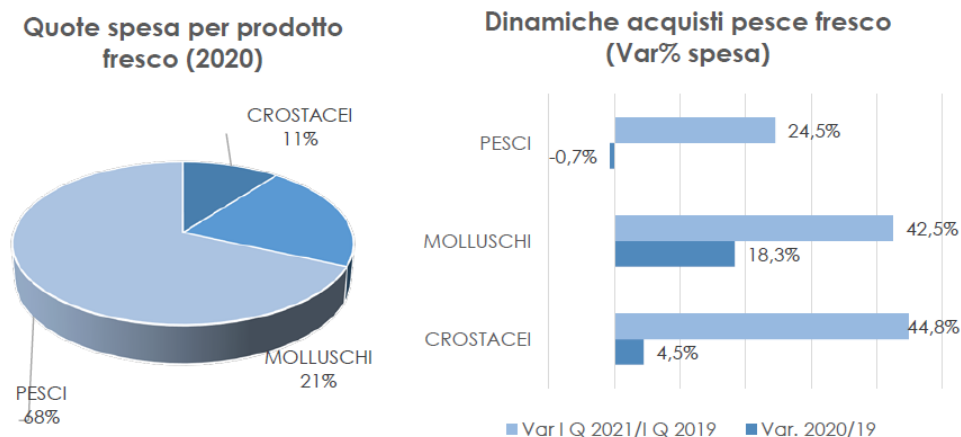
Il segmento del fresco ha avuto un'importante ripresa durante la fine del 2020 (+21% a dicembre) riportando l'intero comparto in terreno positivo. Il segmento del prodotto fresco che rappresenta quasi il 50% dell'offerta, a causa delle dinamiche sopra esposte, ha registrato solo un +2%, a fronte di una crescita del 16% del prodotto congelato (che rappresenta circa il 20% del totale).

Secondo quanto emerge dal report sull'Andamento dell'Economia agricola nel 2020 il settore ha visto un deciso ridimensionamento tanto della produzione (-8,8%) che del valore aggiunto (-5,3%).



**Figura 1.** Prodotti della pesca totali: evoluzione degli acquisti in volume (Dati ISMEA-Nielsen).

In Italia, nel primo quadrimestre del 2021 il comparto ittico è, insieme a quello delle bevande, il più dinamico mostrando una spesa in crescita del 15% su base annua. Le vendite di prodotti freschi crescono notevolmente arrivando a toccare il +33,3% rispetto all’analogo periodo dello scorso anno. A trainare le vendite nel 2021 sono soprattutto molluschi e crostacei, con incrementi superiori al 40% dopo un 2020 già chiuso in positivo (rispettivamente +18,3% e +4,5% in termini di spesa) (figura 2). A favorire questa decisa ripresa contribuiscono anche il nuovo atteggiamento salutistico del consumatore che ricorre ora più volte ai prodotti della pesca come fonte proteica e alla voglia di “compensare le privazioni subite”.



**Figura 2.** Dati ISMEA 2021

I paesi asiatici continuano ad essere i principali produttori, rappresentando il 70% della produzione totale, seguiti dalle Americhe, Europa, Africa e Oceania. La Cina rimane il primo produttore mondiale, con una quota di mercato del 35%.

Dei 178 milioni di tonnellate di pesce prodotti nel 2020, 1 milione di tonnellate in meno rispetto all'anno record del 2018, la pesca di cattura ha contribuito con 90 milioni di tonnellate (51%) e l'acquacoltura con 88 milioni di tonnellate (49%). Questa riduzione dell'offerta ha comportato una diminuzione del consumo medio di 300 grammi pro capite a 20,2 kg.

Complessivamente, entro la fine del decennio in corso, si prevede che la quantità di prodotti della pesca destinati al consumo umano aumenterà di 24 milioni di tonnellate a 182 milioni di tonnellate. Questa cifra rappresenta un aumento complessivo del 15%, un tasso più lento rispetto alla crescita del 23% registrata nel decennio 2010-2020.

I prodotti della pesca forniscono proteine di elevato valore biologico, bilanciate nella composizione in aminoacidi essenziali, ricche di metionina e lisina risultando essenziali non solo per una dieta bilanciata nei Paesi industrializzati, ma anche per l'alimentazione delle popolazioni più povere, fornendo almeno il 20% assunzione di proteine per un terzo della popolazione mondiale (Béné et al. 2007). Oltre alle proteine, i prodotti della pesca sono ricchi di acidi grassi polinsaturi, in buona parte a catena lunga (20, 22 atomi di carbonio), e fra questi di particolare rilevanza sono quelli della serie  $\omega 3$  (o n-3), quali l'acido

eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA), dei quali i prodotti ittici sono l'unica fonte alimentare significativa. Una dieta povera in n-3 provoca riduzione della vista, anomalie nell'elettroretinogramma, profonde modificazioni biochimiche nella composizione in acidi grassi delle membrane di cervello, retina e altri organi. Il DHA costituisce il 25-33% degli acidi grassi dei fosfolipidi cerebrali e il 40-50 % nella retina.

L'assunzione abituale di prodotti ittici è in grado di determinare un abbassamento del livello dei trigliceridi e del colesterolo diminuendo, quindi, i fattori di rischio coronarico e unitamente a un'alimentazione equilibrata possono contribuire alla prevenzione delle malattie cardiovascolari.

In base al contenuto di grasso i prodotti della pesca si possono distinguere in:

- molto magri, con grasso inferiore all'1% e sono per esempio la razza, il nasello, il gambero;
- magri, (lipidi tra 1 e 3%), per esempio la sogliola, spigola, palombo, rombo, calamaro, seppia, cozze e vongole, aragosta;
- semigrassi (con lipidi tra il 3 e il 10%) come la sarda, il dentice, la triglia, il tonno, il pesce spada e il sarago;
- grassi (con lipidi superiore al 10%) come l'anguilla, l'aringa, lo sgombro, il salmone.

I molluschi e i crostacei hanno una composizione simile al pesce magro, i loro grassi sono ricchi di polinsaturi, in particolare n-3 (Roos, Mazharul Islam, e Thilsted 2003), inoltre si riscontra la presenza di micronutrienti e numerosi minerali, quali selenio, iodio, fosforo e zinco e, come gli animali terrestri, contengono la maggior parte dei 90 elementi normalmente presenti in natura (Anderson et al. 1995). Gli animali acquatici, infatti, assorbono i minerali dalla loro dieta e dall'acqua che li circonda e li depositano nei tessuti scheletrici e muscolari e nei diversi organi. Per tale ragione costituiscono un'ottima fonte di minerali. Inoltre, gli esemplari di piccole dimensioni, forniscono un apporto significativo di calcio, fosforo, rame, zinco, magnesio e sodio. Importante in tutti i prodotti della pesca è il contenuto di iodio e di selenio (Lall e Kaushik 2021). I crostacei e i molluschi sono molto ricchi di sodio e hanno un rapporto calcio/fosforo molto equilibrato. Pesci, molluschi e crostacei contengono maggiori quantità di selenio rispetto al pollame e alle carni rosse. La concentrazione dei minerali nei prodotti della pesca è influenzata da numerosi fattori come le differenze stagionali o biologiche (specie, taglia, età, sesso e maturità sessuale), l'alimentazione,



l'ambiente (composizione chimica delle acque, salinità, temperatura e presenza di contaminanti) e i metodi di trasformazione e lavorazione del pescato. La maggior parte degli organismi trattengono ed accumulano i minerali assunti dall'ambiente. I molluschi sono noti per la loro capacità di accumulare metalli essenziali e tossici provenienti dall'ambiente. Lo zinco nelle ostriche, per esempio, può variare da meno di 1 a più di 1000 mg per kg. L'importanza dei prodotti della pesca nella dieta umana e i suoi effetti benefici sono stati dimostrati in termini di sicurezza alimentare e nella lotta contro la denutrizione e le carenze di micronutrienti nei paesi in via di sviluppo (Kawarazuka e Béné 2011).

Ogni organismo acquatico ha una sua composizione chimico-nutrizionale che subisce modificazioni più o meno marcate durante il corso dell'anno, in relazione al luogo di pesca, alla stagione, ma soprattutto al periodo riproduttivo, che può modificare la composizione in nutrienti. Al fine di avere informazioni quanto più dettagliate sui valori nutrizionali dei diversi alimenti sono stati creati dei database che possono essere utilizzati anche per lo sviluppo di linee guida necessarie per creare le etichette, obbligatoriamente presenti su tutti gli alimenti messi in commercio (Rittenschober, Nowak, e Charrondiere 2013). Questi database hanno contribuito a creare consapevolezza tra i consumatori, aumentando l'importanza economica delle componenti alimentari attraverso procedure di calcolo standardizzate richieste per gli studi sulla nutrizione e per le patologie potenzialmente collegate, ma anche per calcolare l'assunzione di nutrienti nei diversi paesi (Mohanty et al. 2019; 2015).

Nell'ambito dei prodotti della pesca, anche i crostacei rappresentano un'importante fonte di proteine. La quantità di grassi è molto bassa, con prevalenza di mono e polinsaturi. Anche se in percentuali molto ridotte rispetto al pesce azzurro, i crostacei presentano acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA), acidi grassi essenziali a lunga catena della serie omega-3. I livelli di colesterolo sono relativamente alti. Infine, nei crostacei, sono presenti vitamine, principalmente quelle del gruppo B e minerali come selenio, iodio, zinco, fosforo e magnesio. Una porzione di gamberi copre quasi la totalità del fabbisogno giornaliero di selenio, minerale cofattore di enzimi con un ruolo importante nella difesa antiossidante dell'organismo.

Macronutrienti	Gambero	Micronutrienti	Gambero
Parte edibile (%)	45	Potassio (mg)	266
Energia (kcal)	71	Ferro (mg)	1,8
Proteine (g)	13,6	Calcio (mg)	110
Lipidi (g)	0,6	Fosforo (mg)	349
Saturi totali (g)	0,09	Sodio (µg)	146
Monoinsaturi (g)	0,13	Selenio (µg)	30
Polinsaturi totali (g)	0,19	Iodio (µg)	100
Acido linoleico (g)	0,01	Zinco (mg)	1,90
Carboidrati disponibili (g)	2,9	Vit. B1 (mg)	0,08
Zuccheri solubili (g)	2,9	Niacina (mg)	3,20
		Vit. B12 (µg)	3
		Vit. E (mg)	0,82

**Tabella 1.** Schema dei macro e micro nutrienti presenti nel gambero.



**Figura 3.** Gambero grigio (*Cragon cragon*) da [www.chioggiapesca.it](http://www.chioggiapesca.it)

I molluschi bivalvi (ostriche, cozze, vongole) solitamente presentano un contenuto in proteine inferiore rispetto ai pesci e ai crostacei (Cheng et al. 2018). I molluschi contengono proteine di elevata qualità, per la ricchezza in aminoacidi essenziali; il contenuto proteico totale di una specie dipende da numerosi fattori ambientali e biologici come sesso, età, maturità sessuale, condizioni nutritive, e molto altro, può quindi variare nel tempo.

Da un punto di vista nutrizionale, i mitili, ricchi di vitamine C e B, sono degli ottimi antiossidanti, rallentano l'invecchiamento cellulare, sono una fonte preziosa di proteine

nobili, indispensabili per il nostro organismo e per il mantenimento delle masse muscolari (Ribera et al. 1991).

Contengono molto ferro biodisponibile (assimilabile), contrariamente a quanto succede in molti vegetali, quindi adatti a persone con anemia. Tra l'altro il binomio ferro-mitili è anche ben assimilato nell'intestino a differenza di quanto può accadere con alcuni vegetali.

La presenza di vitamina B e di minerali come iodio e magnesio consentono di combattere gli stati di affaticamento e alcune disfunzioni come quelle legate alla tiroide (Weingarten, Atkinson, e Jackson 2019). Non sono da trascurare le proprietà dei molluschi anche nei confronti del cuore; il loro alto contenuto di potassio aiuta a controllare la pressione e la ritenzione idrica.

L'apporto in acidi grassi è moderato e il profilo lipidico risulta positivo poiché equamente ripartito tra grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi. Anche vongole, cannolicchi, ostriche e capesante hanno caratteristiche, dai valori nutrizionali alle proprietà organolettiche a vantaggio della salute. Inoltre, dal punto di vista nutrizionale le vongole sono ricche di vitamina A, fondamentale per lo sviluppo dell'organismo, contengono fosforo, potassio e proteine, indispensabili per le difese immunitarie.

Valori nutrizionali medi (per 100g di prodotto)	Mitili	Vongole
Valore energetico	52 Kcal 220 KJ	63 Kcal 268 KJ
Proteine	8.51g	10g
Carboidrati di cui Zuccheri	2,09g 1,31g	2,7g 0g
Grassi totali di cui saturi	1,06 g 30,27 %	1,4g 0,3g
Sale (iodio)	1,71 g	1g

**Tabella 2.** Schema dei valori nutrizionali di mitili e delle vongole.

In linea di massima è possibile affermare che il contenuto calorico dei molluschi bivalvi sia particolarmente basso; mediamente, infatti, si aggira sulle 70-85 kcal per 100g di parte edibile; apportano circa 10-11g di proteine, l'1-3% di lipidi (prevalentemente polinsaturi) ed a volte (per esempio nella cozza o nell'ostrica) tracce di carboidrati complessi (glicogeno). Il contenuto di colesterolo può non essere trascurabile in base al periodo di fertilità degli organismi; in fase di riproduzione, infatti, è aumentata la sintesi di colesterolo per sostenere la produzione ormonale. Inoltre, essendo particolarmente ricchi in sodio sono assolutamente sconsigliati per coloro che soffrono di ipertensione. Dal punto di vista della digeribilità, i molluschi bivalvi si caratterizzano per il ridotto contenuto in tessuto connettivo, il che ne riduce il tempo di permanenza gastrica rendendoli idonei al trattamento dietetico delle difficoltà digestive, purché consumati nelle porzioni appropriate (Wright, Fan, e Baker 2018).

## **1.2 Pericoli da consumo di molluschi bivalvi e crostacei**

I prodotti della pesca oggetto di questo studio, molluschi bivalvi e crostacei, selvatici e di allevamento, sono abbondantemente presenti nei nostri mercati e, come già visto, diffusamente consumati. Purtroppo, il consumo di entrambi, può comportare serio nocimento al consumatore; ciò a causa della potenziale presenza in essi di agenti fisici, chimici e biologici che possono essere assunti da questi organismi acquatici in seguito alla loro presenza nell'ambiente acqueo di provenienza o in seguito a contaminazioni crociate

durante la cattura/raccolta, manipolazioni igienicamente inadeguate, condizioni igieniche carenti degli ambienti di lavorazione e stoccaggio.

La maggiore pericolosità potenziale è sostenuta notoriamente dai molluschi bivalvi che per la loro attività di filtrazione, elevatissima in alcune specie come i mitili, comporta l'assunzione di grosse quantità dei suddetti agenti. Gli stessi, sebbene in misura molto minore, possono essere presenti nei crostacei laddove, va sottolineato, come il più frequente pericolo potenziale sia quello della rapida moltiplicazione batterica dovuta alla limitatissima conservabilità allo stato refrigerato.

### **1.3 Pericoli fisici**

Tra i pericoli fisici, per fortuna non per frequenza ma per gravità, va ricordato il problema dei fallout radioattivi, di cui il più recente caso, quello di Fukushima del 2011, condusse a un'estesa ricerca e al riscontro dei vari isotopi a breve e lunghissima emivita anche nei prodotti della pesca (Iodio 131, Stronzio 90, Cesio 137, ecc.).

Da ricordare la possibilità che materiali estranei quali sabbia, fango, detriti vari e soprattutto microplastiche e nanoplastiche, possano essere presenti in esse in quanto assunte attivamente all'ambiente acquatico, come nel caso delle microplastiche e delle nanoplastiche, o durante le fasi di pesca o raccolta. Mentre quest'ultime non sono facilmente allontanabili durante le fasi di lavaggio e/o depurazione tutti gli altri sono eliminabili durante la cernita, lavaggio e/o depurazione.

### **1.4 Pericoli chimici**

Tra i pericoli chimici molto noti sono i residui di metalli pesanti, idrocarburi, erbicidi e pesticidi, nonché altre sostanze chimiche, tra cui policlorodibenzodiossine (PCDD), policlorobifenili (PCB) e policlorodibenzofurani (PCDF), che possono essere presenti nell'ambiente acquatico o, più raramente, contaminare successivamente il prodotto.

Questi composti clorurati originano spesso da processi di combustione non controllata quali l'incenerimento dei rifiuti, la produzione di plastiche, l'abbandono di oli esausti e di vernici nonché di accumulatori, batterie, vecchie guaine elettriche e quant'altro.

Qui si ricorda come essi abbiano, così come per altri pericoli chimici, come metalli pesanti, molti pesticidi ecc., particolare affinità per i lipidi.

Tra i metalli ricordiamo il mercurio, il piombo, il cadmio, il rame, il cromo e l'arsenico. Gli erbicidi e i pesticidi, per lo più usati in agricoltura, sono numerosissimi e preoccupano particolarmente se la loro polluzione origina in prossimità di zone di produzione e/o di stabulazione di bivalvi.

Mentre, nell'ambito idrocarburi ricordiamo gli IPA (idrocarburi policiclici aromatici), composti organici che si formano nel corso della combustione incompleta di prodotti come il carbone, il petrolio, il gas o i rifiuti e che sono capaci di lunga persistenza in ambiente acquoso ove si distribuiscono notevolmente lungo la catena trofica.

I livelli massimi residuali di contaminanti chimici negli alimenti figurano nel Reg. (CE) 1881/2006.

<b>Metalli</b>	<b>Prodotti alimentari</b>	<b>Tenori massimi</b>	
<b>Piombo</b>	Muscolo di pesce	0,30	
	Crostacei, ad eccezione delle carni scure del granchio, della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi ( <i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i> )	0,50	
	Molluschi bivalvi	1,5	
	Cefalopodi (senza visceri)	1,0	
<b>Cadmio</b>	Muscolo di pesce	0,050	
	Muscolo dei seguenti pesci: acciuga ( <i>Engraulis species</i> ) palamita ( <i>Sarda sarda</i> ) sarago fasciato comune ( <i>Diplodus vulgaris</i> ) anguilla ( <i>Anguilla anguilla</i> ) cefalo ( <i>Mugil labrosus labrosus</i> ) suro o sugarello ( <i>Trachurus species</i> ) luvaro o pesce imperatore ( <i>Luvarus imperialis</i> ) sardina ( <i>Sardina pilchardus</i> ) sardine del genere <i>Sardinops</i> ( <i>Sardinops species</i> ) tonno e tonnetto ( <i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i> ) sogliola cuneata ( <i>Dicologlossa cuneata</i> )	0,10	
	Muscolo di pesce spada ( <i>Xiphias gladius</i> )	0,30	
	Crostacei, ad eccezione delle carni scure del granchio, della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi ( <i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i> )	0,50	
	Molluschi bivalvi	1,0	
	Cefalopodi (senza visceri)	1,0	

**Tabella 3.** Livelli massimi residui dei metalli pesanti secondo il Reg. (CE) 1881/2006.

(Continua pagina seguente)

<b>Metalli</b>	<b>Prodotti alimentari</b>	<b>Tenori massimi</b>
<b>Mercurio</b>	Prodotti della pesca Il tenore massimo si applica ai crostacei, escluse le carni scure del granchio e quelle della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (Nephropidae e Palinuridae).	0,50
	Muscolo dei seguenti pesci: rana pescatrice ( <i>Lophius species</i> ) pesce lupo ( <i>Anarhichas lupus</i> ) palamita ( <i>Sarda sarda</i> ) anguilla ( <i>Anguilla species</i> ) pesce specchio ( <i>Hoplostethus species</i> ) pesce topo ( <i>Coryphaenoides rupestris</i> ) ippoglosso ( <i>Hippoglossus hippoglossus</i> ) marlin ( <i>Makaira species</i> ) rombo del genere <i>Lepidorhombus</i> ( <i>Lepidorhombus species</i> ) triglia ( <i>Mullus species</i> ) luccio ( <i>Esox lucius</i> ) palamita bianca ( <i>Orcynopsis unicolor</i> ) cappellano ( <i>Trisopterus minutus</i> ) squalo portoghese ( <i>Centroscymnus coelolepis</i> ) razze ( <i>Raja species</i> ) scorfano del genere <i>Sebastes</i> ( <i>Sebastes marinus</i> , <i>S. mentella</i> , <i>S. viviparus</i> ) pesce vela del Pacifico ( <i>Istiophorus platypterus</i> ) pesce sciabola ( <i>Lepidopus caudatus</i> , <i>Aphanopus carbo</i> ) pagello ( <i>Pagellus species</i> ) squali (tutte le specie) tirsite ( <i>Lepidocybium flavobrunneum</i> , <i>Ruvettus pretiosus</i> , <i>Gempylus serpens</i> ) storione ( <i>Acipenser species</i> ) pesce spada ( <i>Xiphias gladius</i> ) tonno e tonnetto ( <i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i> )	1,0

**Tabella 3.** Livelli massimi residui dei metalli pesanti secondo il Reg. (CE) 1881/2006.



<b>Idrocarburi policiclici aromatici</b>	<b>Prodotti alimentari</b>	<b>Tenori massimi (µg/kg di peso fresco)</b>
<b>Benzo(a)pirene (35)</b>	Muscolo di pesce affumicato e prodotti della pesca affumicati, esclusi i molluschi bivalvi. Il tenore massimo si applica ai crostacei affumicati, escluse le carni scure del granchio e quelle della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (Nephropidae e Palinuridae).	5,0
	Muscolo di pesce non affumicato	2,0
	Crostacei e cefalopodi non affumicati. Il tenore massimo si applica ai crostacei, escluse le carni scure del granchio e quelle della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (Nephropidae e Palinuridae).	5,0
	Molluschi bivalvi	10,0

**Tabella 4.** Livelli massimi residui degli idrocarburi policiclici aromatici secondo il Reg. (CE) 1881/2006.

<b>Diossine e PCB</b>	<b>Prodotti alimentari</b>	<b>Somma di diossine (OMS-PCDD/F-TEQ)</b>	<b>Somma di diossine e PCB diossina-simili (OMS-PCDD/F-PCBTEQ)</b>
	Muscolo di pesce e prodotti della pesca e loro derivati, esclusa l'anguilla (25) (34). Il tenore massimo si applica ai crostacei, escluse le carni scure del granchio e quelle della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (Nephropidae e Palinuridae).	4,0 pg/g peso fresco	8,0 pg/g peso fresco

**Tabella 5.** Livelli massimi residui dei PCB secondo il Reg. (CE) 1881/2006

Limitatamente ai molluschi bivalvi, veramente rilevante è il pericolo rappresentato dalle biotossine algali. Esse sono sostanze organiche con azione tossica, prodotte prevalentemente dal fitoplancton e la loro formazione può spesso essere più rilevante all'interno del mollusco filtratore per l'azione combinata di batteri in esso presenti, quali *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., ecc.

Esse sono molto numerose ma un loro controllo, con individuazione dei limiti di presenza, è previsto dall'attuale normativa, segnatamente dal Reg. 853/2004, in seguito riportato, il quale si occupa di quelle con maggiore impatto sulla salute pubblica e precisamente:

- PSP ("Paralytic Shellfish Poison"): 800 µg/kg;
- ASP ("Amnesic Shellfish Poison"): 20 mg/kg di acido domoico;
- acido okadaico, dinophysitossine e pectenotossine complessivamente: 160 µg di equivalente acido okadaico/kg;
- yessotossine: 1 mg di equivalente yessotossine/kg;
- azaspiracidi: 160 µg di equivalente azaspiracido/kg.

## **1.5 Pericoli biologici**

### **VIRUS**

In particolare, i molluschi bivalvi e solo occasionalmente i crostacei possono albergare virus patogeni per l'uomo. In effetti i virus in questione sono abbastanza numerosi ma sicuramente più rilevanti per impatto e frequenza sono il virus dell'epatite A (HAV) e il gruppo dei Norovirus.

Si tratta di virus di origine umana che giungono al mare attraverso le feci e vengono concentrati negli organismi filtratori. L'infezione da HAV è diffusa in tutto il mondo, con maggior incidenza nei paesi in via di sviluppo, con manifestazioni epidemiche soprattutto dove le condizioni igienico-sanitarie sono carenti e dove il trattamento dei reflui urbani non è adeguato. In Italia l'incidenza è relativamente bassa, non superando i 10-15 casi ogni 100.000 abitanti/anno. Va però considerato che spesso l'infezione è asintomatica, specialmente nella prima infanzia, e si stima che oltre il 90% della popolazione italiana con età superiore a 60 anni sia venuta a contatto con il virus, ciò testimonia l'enorme diffusione di questo agente virale. Dopo un'incubazione di circa 4 settimane, si presentano sintomi di tipo simil-influenzale, con astenia generale, possibili episodi di vomito e dolore al fianco destro in corrispondenza dell'area epatica; segue un quadro con la comparsa di segni tipici di epatite acuta. La guarigione è spesso spontanea, entro 4-5 settimane.

Il Norovirus può essere considerato il principale agente di malattia gastroenterica infettiva virale nei paesi sviluppati ed è causa nell'uomo di gastroenteriti con vomito, diarrea e crampi addominali. La capacità di dare luogo a infezioni clinicamente rilevanti in tutti i gruppi di età e di trasmettersi con diverse modalità, fra cui l'ingestione di alimenti contaminati, fa sì che i Norovirus rappresentino un importante problema di sanità pubblica in tutto il mondo. In Italia c'è una sottostima dell'effettiva distribuzione dell'infezione nella popolazione. La legge non fissa i parametri massimi di virus nei molluschi bivalvi, d'altra parte il Reg. (CE) 853/2004 (*Regolamento CE n. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale*) prevede che si possano stabilire requisiti igienico-sanitari supplementari per i molluschi bivalvi vivi in collaborazione con il laboratorio comunitario di riferimento pertinente, comprese le procedure per le analisi virologiche e le relative norme (Battistini et al. 2021). Nel nostro Paese, al momento, si sta realizzando una sorta di mappatura delle zone di produzione e/o raccolta.

## **BATTERI**

Sia i bivalvi che i crostacei sono costantemente contaminati dal momento della pesca e/o raccolta da batteri autoctoni o alloctoni delle acque e possono arricchirsi nelle tappe successive della filiera a seguito di contaminazioni crociate. Considerato da una parte che si tratta di alimenti molto deperibili e soprattutto perché tra le specie batteriche ospitate figurano agenti tossinfettivi importanti come *Salmonella* spp., ivi compresa *S. Typhi* agente del tifo addominale dell'uomo, molti altri enterobatteri, Vibrioni alofili, Clostridi, *Aeromonas* spp., *Listeria monocytogenes*, Stafilococchi, ecc., la normativa di settore, dettagliatamente di seguito riportata, ha ribadito alcune misure atte a limitare il primo tipo di contaminazione, cioè quello proveniente dall'acqua, e a minimizzare le contaminazioni secondarie lungo la filiera. Nel caso dei bivalvi ricordiamo le misure relative alle acque di produzione e raccolta così come le procedure di autocontrollo degli impianti di rifinitura e lavorazione e nel caso dei crostacei, invece, essenzialmente attraverso l'autocontrollo a partire dalle stesse fasi di pesca.

Nel caso dei bivalvi, purtroppo, si ricorda come quanto previsto in merito alla depurazione non sia sufficiente ad eliminare completamente alcuni dei pericoli biologici come i Vibrioni alofili, soprattutto *V. parahaemolyticus* ed i virus che necessitano di tempi molto più lunghi.

## **PARASSITI**

In definitiva non molto preoccupante è il quadro relativo alla presenza di parassiti nei prodotti della pesca qui trattati. Infatti, seppure molto numerosi nei molluschi bivalvi, laddove possono indurre rapida morte di interi banchi, alterazioni organolettiche, c.d. castrazioni parassitarie, assottigliamento del mantello, alterazioni cromatiche dello stesso, variazioni dimensionali importanti dell'epatopancreas, essendo peraltro, alcune di esse soggette a denuncia, in base all'attuale legislazione (Reg. CE 429/2016) (*Regolamento CE 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 9 marzo 2016, relativo alle malattie animali trasmissibili e che modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale materia*), come ad esempio le infezioni sostenute da *Bonamia exitiosa*, *Perkinsus marinus*, *Microcytos mackini*, *Marteilia refringens* e *Bonamia ostreae*, tra esse non figura nessuna specie parassitaria potenzialmente patogena per il consumatore.

Anche nel caso dei crostacei, limitando l'affermazione alle specie vendute fresche sul mercato comunitario, non esistono seri problemi. Ciò in quanto, il trematode, *Paragonimus westermanni*, noto agente di zoonosi parassitaria, non è presente nelle acque da cui viene tratto il prodotto fresco vivendo essenzialmente nei distretti acquei dell'estremo oriente, dai quali non arriva prodotto refrigerato e tenuto conto che il parassita è sensibile al congelamento.

Nemmeno le larve Anisakidi preoccupano grandemente in quanto la presenza di forme infestanti nei crostacei non è ritenuta un serio rischio, nemmeno nei piccoli gamberi eufasiacei che ne rappresenterebbero il primo ospite intermedio preferito. Ne ci sono elementi sufficienti per addebitare alle forme immature, potenzialmente presenti in essi, capacità sensibilizzante.

## AMMINE BIOGENE

### ISTAMINA

Considerata la loro estrema labilità, entrambi i prodotti soggiacciono rapidamente all'azione degli agenti batterici di spoilage che inducono fatti putrefattivi precoci e solo in questo momento, in essi può emergere anche il pericolo ammine biogene, tra cui l'istamina che qui si configura esclusivamente come prodotto della putrefazione a differenza delle specie di pesce c.d. istaminogene in cui livelli tossici di istamina possono rilevarsi rapidamente dopo la pesca con il pesce in stato di assoluta freschezza.

#### **1.6 Effetti dei trattamenti di conservazione e/o trasformazione su *Vibrio* spp.**

Considerata l'elevata frequenza di isolamento dei *Vibrio* spp. nei prodotti della pesca e la possibilità di una loro moltiplicazione, in condizioni favorevoli, numerose sono le tecniche di conservazione messe in atto al fine di contenere questo potenziale pericolo. Qui di seguito si riportano le principali.

##### **1.6.1 Immersione in ghiaccio**

Questa tecnica trova applicazione in particolare nelle ostriche al fine di raffreddarle il più rapidamente possibile, in particolare dopo la raccolta, e impedire la moltiplicazione di eventuali microrganismi patogeni. Tuttavia, questa tecnica, se da un lato rallenta la moltiplicazione di *V. parahaemolyticus*, dall'altro sembrerebbe inefficace nel ridurre la concentrazione. Ad esempio, studi condotti da Melody et al. (Melody et al. 2008) hanno permesso di osservare un leggero aumento, da 1 a 2 log CFU/g, dopo 14 giorni di conservazione. Il metodo risulterebbe più efficace se il prodotto è posto in cella frigorifera subito dopo il trattamento. Gooch et al. (Gooch et al. 2002) riscontrarono una riduzione di 0,8 log CFU/g dopo immersione in ghiaccio e successiva sosta a 3 °C per 14 ore.

## 1.6.2 Refrigerazione

In generale, la crescita dei vibrioni patogeni è inibita dalle temperature di refrigerazione. Secondo diversi autori, la moltiplicazione di *V. parahaemolyticus* verrebbe inibita a temperature <10°C (Cook e Ruple 1989; Gooch et al. 2002; Limthammahisorn, Brady, e Arias 2009). Tuttavia, i microrganismi si isolerebbero anche dopo una prolungata conservazione. Studi condotti da ricercatori giapponesi hanno dimostrato, in ostriche e vongole naturalmente contaminate, la presenza di *V. cholerae* fino a 45gg se mantenute a 0-5°C e di 15-20 gg se mantenute a 22°C.

Jones et al. (2017) hanno riferito che in campioni di ostriche immediatamente refrigerati a una temperatura <7 °C si riscontrava una concentrazione inferiore di *V. parahaemolyticus* rispetto ai campioni non refrigerati. Se tuttavia questi microrganismi vanno incontro a un lieve decremento nel corso della refrigerazione successivi abusi termici possono indurre una rivivificazione delle cellule e una loro moltiplicazione.

Ad esempio, in studi condotti su ostriche mantenute a 4°C per 3 settimane, si è osservata una riduzione delle cariche iniziali fino ai limiti di rilevabilità del metodo, successivamente riportando la temperatura a 35°C si è registrata la moltiplicazione delle cellule sopravvissute con tempi di crescita significativamente elevati.

## 1.6.3 Congelamento

I vibrioni e, in particolare, *V. parahaemolyticus*, resistono lungamente al congelamento, anche fino a 18 mesi. Tuttavia, i dati riportati in letteratura sono alquanto contrastanti essendo noto che l'efficacia del trattamento è dipendente dalle temperature, dalle tecniche impiegate e dai tempi di conservazione.

Ad esempio, in omogenati di ostriche Muntada-Garriga et al. (Muntada-Garriga et al. 1995) hanno riscontrato una riduzione di *V. parahaemolyticus* da 7 log CFU/g a valori di non rilevabilità a -18 e -24 °C, dopo, rispettivamente, 27 e 28 giorni. Tuttavia, Liu et al. (Liu, Lu, e Su 2009) hanno osservato solo una riduzione del microrganismo in ostriche con guscio di 2,45, 1,71 e 1,45 Log MPN/g, dopo 1 mese di conservazione, rispettivamente, a

temperature di  $-10$ ,  $-20$  e  $-30$  °C. Dopo sei mesi di conservazione a  $-10$ ,  $-20$  e  $-30$  °C, Liu et al. riferiscono una riduzione di *V. parahaemolyticus*, rispettivamente, di 4,55, 4,13 e 2,53 log MPN/g.

Probabilmente a causa dell'effetto della cristallizzazione del ghiaccio temperature di  $-10$ °C sarebbero più efficaci rispetto a temperature di  $-20$ ,  $-30$ °C.

#### **1.6.4 Le alte pressioni idrostatiche**

Le alte pressioni idrostatiche (HPP) sono in grado di alterare la morfologia cellulare e la membrana in alcuni batteri, provocando l'interruzione della trascrizione, della traduzione e delle funzioni cellulari responsabili della sopravvivenza e della moltiplicazione (Rendueles et al. 2011). Numerosi gli studi condotti sui vibrieni patogeni.

Valori di 200 MPa a 25 °C per 10 minuti hanno determinato una riduzione di *V. parahaemolyticus* di 6 log in ostriche (Berlin et al. 1999); di 4,0 log dopo il trattamento con 293 MPa a  $8 \pm 1$  °C per 2 minuti (Ma e Su 2011); di 5,0 log dopo il trattamento con 300 MPa a 28 °C per 3 minuti; fino a 7,0 log trattamenti di 300 MPa a 45 °C per 10 minuti (Ye, Huang, e Chen 2012).

Gli studi hanno dimostrato che l'efficacia del trattamento è in dipendenza della durata e della temperatura impiegate. Le HHP, inoltre, inducono la morte dei molluschi e il rilasciamento del muscolo adduttore che potrebbe essere ulteriormente vantaggioso nel caso della successiva sgusciatura (Campus 2010).

L'impiego delle alte pressioni è uno dei tre trattamenti post-raccolta menzionati dall'OMS/FAO per il controllo di *Vibrio* spp nelle ostriche crude (FAO 2005).

#### **1.6.5 Acqua elettrolizzata**

L'acqua elettrolizzata (EO) ha un effetto battericida su diversi microrganismi patogeni, compresi i *Vibrio*. Studi condotti da Ren e Su (Ren e Su 2006), hanno dimostrato che acqua EO (cloro, 30 ppm;

pH 2,82; potenziale di ossidoriduzione di 1.131 mV) contenente l'1% di NaCl a temperatura ambiente, è stata in grado di ridurre *V. parahaemolyticus* in ostriche da 1,1 a 1,6 Log dopo 4-6 ore di trattamento. Tuttavia, la tecnica sarebbe efficace solo in caso di basse concentrazioni del microorganismo e il tempo di esposizione non può superare le sei ore altrimenti si rischia di indurre la morte dei molluschi (Ren e Su 2006).

### **1.6.6 Blandi trattamenti termici**

I blandi trattamenti termici consistono nell'immergere i molluschi in acqua a 50 °C per 5 minuti seguiti da un rapido raffreddamento in acqua ghiacciata. In ostriche, Andrews et al. (L. S. Andrews, Park, e Chen 2000) hanno riscontrato una riduzione di *V. parahaemolyticus* da 5 log MPN/g a valori non rilevabili. Analoghe riduzioni sono state riscontrate dopo un trattamento prolungato per 8-10 min (L. Andrews, Jahncke, e Mallikarjunan 2003). Tuttavia, questi autori riportano una maggiore sopravvivenza in ceppi di *V. parahaemolyticus* patogeni che potevano, invece, essere eliminati dopo immersione in acqua a 52 °C per almeno 22 minuti.

Sebbene, Ye et al. (Ye, Huang, e Chen 2012) hanno osservato che *V. parahaemolyticus* poteva essere rilevato dopo arricchimento anche dopo l'esposizione a 52 °C per 20 minuti.

In generale, questi risultati suggeriscono che un lieve trattamento termico può ridurre la concentrazione di *V. parahaemolyticus* nei molluschi a un livello non rilevabile, tuttavia, l'efficacia di questi metodi dipende dal tempo-temperatura, considerando, inoltre, che valori superiori a 53°C possono indurre modificazioni delle caratteristiche organolettiche (L. Andrews, Jahncke, e Mallikarjunan 2003; Chai et al. 1991).

### **1.6.7 Depurazione**

La depurazione è un processo che prevede l'immersione dei molluschi bivalvi in vasche, contenenti acqua di mare pulita, per un periodo di tempo che varia da alcune ore ad alcuni giorni, in modo che i molluschi possano espletare la loro naturale funzione filtratrice.



Non sempre la depurazione si è dimostrata efficace nei confronti di alcune specie di *Vibrio* patogeni, anzi, se la salinità è ottimale (ad esempio 10-30 ppm) e la temperatura è sufficientemente elevata durante un ciclo di depurazione (ad esempio, oltre i 20 °C) si può avere addirittura un aumento della loro concentrazione.

L'efficacia di questa metodica è variabile in relazione al grado di contaminazione iniziale, al tempo e alla temperatura di lavorazione, alla salinità dell'acqua, al rapporto molluschi acqua di mare, all'applicazione di raggi UV, all'uso di NaCl, di batteri lattici o inibenti naturali (ad es. estratti di semi d'uva). Chae et al. (Chae, Cheney, e Su 2009) hanno riportato una lieve riduzione di *V. parahaemolyticus*, pari a 1,2 log in ostriche dopo 48 ore di depurazione in acqua di mare a 22 °C; leggermente più elevata se la temperatura veniva abbassata a 15°C. Ramos et al. (Ramos et al. 2012) hanno riportato una riduzione di 2 e 3 log in molluschi immersi, rispettivamente, in acqua di mare a 21,6 °C con raggi ultravioletti e a 22,4 °C con luce ultravioletta e cloro. Phuvasate et al. (Phuvasate, Chen, e Su 2012) hanno riferito che la concentrazione di questo patogeno è diminuita da 4,83 a 1,39 log MPN/g e da 6,3 a 3,04 log MPN/g dopo depurazione, rispettivamente, a 12,5 e 15 °C per 6 giorni. Phuvasate e Su (Phuvasate e Su 2013) hanno evidenziato una maggiore efficacia del processo di depurazione aumentando la salinità dell'acqua da 10 ppt a 25-30 ppt.

### **1.7 Legislazione Comunitaria sulla produzione e sul controllo igienico sanitario dei molluschi bivalvi e dei crostacei**

Per cercare di minimizzare i pericoli per il consumatore che, come prima evidenziato, sono numerosi e gravi soprattutto nel caso dei bivalvi filtratori, il legislatore comunitario ha progressivamente aggiornato la normativa di settore riguardante sia la produzione igienica da parte degli OSA che il controllo ufficiale da parte delle Autorità Competenti delegate dai vari Stati membri. Ciò fermo restando che entrambe le tipologie di prodotti sono garantiti dal c.d. “marchio di identificazione” del quale si assume la quasi totalità della responsabilità lo stesso OSA a differenza del comparto carni in cui essa viene condivisa con il Servizio Sanitario Nazionale che appone il bollo sanitario.

Con riferimento ai prodotti freschi, in particolare per quanto riguarda i molluschi bivalvi, gasteropodi ed echinodermi, la legislazione, pur essendo tecnicamente indivisibile in quella dedicata agli OSA, quella dedicata all'Autorità Competente e quella di interesse comune, è costantemente intrisa da sottolineature dell'estensore volte ad una loro applicazione condivisa. Le principali norme di comparto sono le seguenti:

***Regolamento 852/2004 sull'igiene dei prodotti alimentari*** (Rettifica del regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, sull'igiene dei prodotti alimentari (GU L 139 del 30.4.2004) 2004);

***Regolamento 853/2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, del quale qui di seguito si riportano il Capitolo I, II e V*** (Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 Laying down Specific Hygiene Rules for Food of Animal Origin 2004).

#### ***CAPITOLO I: REQUISITI GENERALI PER L'IMMISSIONE SUL MERCATO DEI BIVALVI VIVI***

- 1. I molluschi bivalvi vivi non possono essere immessi sul mercato per la vendita al dettaglio se non attraverso un centro di spedizione in cui deve essere apposto un marchio di identificazione a norma del capitolo VII.*
- 2. Gli operatori del settore alimentare possono accettare lotti di molluschi bivalvi vivi solo se sono soddisfatti i requisiti documentali di cui ai punti da 3 a 7.*
- 3. In caso di trasferimento da uno stabilimento all'altro di un lotto di molluschi bivalvi vivi da parte di un operatore del settore alimentare, un documento di registrazione deve accompagnare il lotto dal momento dell'invio fino a quello dell'arrivo al centro di spedizione o di trasformazione.*
- 4. Il documento di registrazione deve essere redatto in almeno una delle lingue ufficiali dello Stato membro in cui è situato lo stabilimento ricevente e deve contenere almeno le indicazioni specificate in appresso.*

*a) In caso di un lotto di molluschi bivalvi vivi inviato da un'area di produzione, il documento di registrazione deve contenere almeno le seguenti informazioni:*

*i) identità e indirizzo del produttore;*

*ii) data di raccolta;*

*iii) ubicazione della zona di produzione, definita nel modo più circostanziato possibile, oppure con un numero di codice;*

*iv) status sanitario della zona di produzione;*

*v) specie di molluschi e quantità ispettiva;*

*e*

*vi) destinazione del lotto.*

*b) In caso di lotto di molluschi bivalvi vivi inviato da una zona di stabulazione, il documento di registrazione deve contenere almeno le informazioni di cui alla lettera a) e le informazioni seguenti:*

*i) ubicazione della zona di stabulazione;*

*e*

*ii) durata della stabulazione.*

*c) In caso di un lotto di molluschi bivalvi vivi inviato da un centro di depurazione, il documento di registrazione deve contenere almeno le informazioni di cui alla lettera a) e le informazioni seguenti:*

*i) indirizzo del centro di depurazione;*

*ii) durata della depurazione;*

*e*

*iii) date in cui il lotto è entrato e uscito dal centro di depurazione.*

*5. Gli operatori del settore alimentare che inviano lotti di molluschi bivalvi vivi devono compilare le pertinenti sezioni del documento di registrazione in maniera facilmente leggibile e non alterabile. Gli operatori del settore alimentare che ricevono i lotti devono apporre sul documento un timbro con la data al ricevimento del lotto o registrare la data di ricevimento in altro modo.*

6. Gli operatori del settore alimentare devono conservare una copia del documento di registrazione per ciascun lotto inviato e ricevuto per almeno dodici mesi dall'invio o dalla ricezione (o per il periodo eventualmente specificato dalla competente autorità).

7. Tuttavia se:

a) il personale che raccoglie molluschi bivalvi vivi gestisce anche il centro di spedizione, il centro di depurazione, la zona di stabulazione o lo stabilimento di trasformazione che riceve i molluschi bivalvi vivi;

e

b) un'unica autorità competente controlla tutti gli stabilimenti in questione, i documenti di registrazione non sono necessari, se tale autorità competente lo permette.

## ***CAPITOLO II: REQUISITI IN MATERIA DI IGIENE APPLICABILI ALLA PRODUZIONE E ALLA RACCOLTA DI MOLLUSCHI BIVALVI VIVI***

### ***A. REQUISITI DELLE ZONE DI PRODUZIONE***

1. I produttori possono raccogliere i molluschi bivalvi vivi soltanto nelle zone di produzione la cui ubicazione e i cui confini sono fissati e classificati dall'autorità competente – se del caso in cooperazione con gli operatori del settore alimentare – come appartenenti alle classi A, B o C, ai sensi del regolamento (CE) n. 854/2004 («EUR-Lex - 32004R0854 - EN - EUR-Lex» s.d.).

2. Gli operatori del settore alimentare possono immettere sul mercato i molluschi bivalvi vivi, destinati al consumo umano diretto, raccolti nelle zone di produzione della classe A solo se soddisfano i requisiti di cui al capitolo V.

3. Gli operatori del settore alimentare possono immettere sul mercato ai fini del consumo umano i molluschi bivalvi vivi raccolti nelle zone di produzione della classe B soltanto dopo averli sottoposti a un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione.

4. Gli operatori del settore alimentare possono immettere sul mercato ai fini del consumo umano i molluschi bivalvi vivi raccolti nelle zone di produzione della classe C soltanto previa stabulazione di lunga durata, conformemente alla parte C del presente capitolo.

5. Dopo la depurazione o la stabulazione, i molluschi bivalvi vivi provenienti da zone di produzione delle classi B o C devono soddisfare tutti i requisiti previsti al capitolo V. Tuttavia, i molluschi bivalvi vivi provenienti da dette zone che non sono stati sottoposti a depurazione o stabulazione possono essere inviati a uno stabilimento di trasformazione, dove devono essere sottoposti ad un trattamento per l'eliminazione dei microrganismi patogeni (se del caso, previa asportazione di sabbia, fanghi o muco nello stesso o in altro stabilimento). I metodi di trattamento consentiti sono i seguenti:

a) trattamento sterilizzante in contenitori ermeticamente chiusi;

e

b) trattamenti termici comprendenti:

i) immersione in acqua bollente per il tempo necessario a portare la temperatura interna della loro carne ad un minimo di 90 °C e mantenimento di questa temperatura interna minima per almeno 90 secondi;

ii) cottura, da 3 a 5 minuti, in un contenitore chiuso la cui temperatura sia compresa fra 120 e 160 °C e la pressione compresa fra 2 e 5 kg/cm<sup>2</sup>, con successiva sgusciatura nonché congelamento della carne a – 20 °C al centro della massa;

iii) cottura a vapore sotto pressione, in un contenitore chiuso in cui siano rispettati i requisiti di cui al punto i), per quanto riguarda il tempo di cottura e la temperatura interna della carne dei molluschi. Dev'essere utilizzata una metodologia convalidata. Devono essere definite procedure basate sui principi del sistema HACCP per verificare la omogenea distribuzione del calore.

6. Gli operatori del settore alimentare non devono produrre, né raccogliere, molluschi bivalvi vivi in zone che non sono state classificate dall'autorità competente o che sono inadatte per ragioni sanitarie. Gli operatori del settore alimentare devono tener conto di tutte le pertinenti informazioni relativamente all'adeguatezza delle zone per quanto riguarda la produzione e la raccolta, comprese le informazioni ottenute attraverso gli autocontrolli e l'autorità competente. Essi debbono utilizzare tali informazioni, segnatamente quelle sulle condizioni ambientali e meteorologiche, per stabilire il trattamento appropriato cui sottoporre i lotti raccolti.

## ***CAPITOLO V: NORME SANITARIE PER I MOLLUSCHI BIVALVI VIVI***

*gli operatori del settore alimentare devono garantire che i molluschi bivalvi vivi immessi sul mercato e destinati al consumo umano soddisfino i requisiti contenuti nel presente capitolo.*

*1. Essi devono presentare caratteristiche organolettiche tipiche del prodotto fresco e vitale, in particolare gusci privi di sudiciume, reazione adeguata a percussioni e livelli normali di liquido intervalvare.*

*2. Essi non devono contenere biotossine marine in quantità totali (misurate nel corpo intero o nelle parti consumabili separatamente) superiori ai seguenti limiti:*

- a) PSP ("Paralytic Shellfish Poison"): 800 µg/kg;*
- b) ASP ("Amnesic Shellfish Poison"): 20 mg/kg di acido domoico;*
- c) acido okadaico, dinophysitossine e pectenotossine complessivamente: 160 µg di equivalente acido okadaico/kg;*
- d) yessotossine: 1 mg di equivalente yessotossine/kg;*
- e) azaspiracidi: 160 µg di equivalente azaspiracido/kg.*

**Regolamento 2073/2005 e s.m.i. sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari** (*Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs*).

**Regolamento 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari;**

**Regolamento 625/2017 relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari;**

**Regolamento 627/2019 che stabilisce modalità pratiche uniformi per l'esecuzione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano, di cui si riportano gli artt. 52, 53, 54, 55 e 71** (*Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 Laying down Uniform Practical Arrangements for the Performance of*

*Official Controls on Products of Animal Origin Intended for Human Consumption in Accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and Amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as Regards Official Controls (Text with EEA Relevance.) 2019).*

***Articolo 52 Classificazione delle zone di produzione e di stabulazione di molluschi bivalvi vivi***

*1. Le autorità competenti fissano l'ubicazione e i confini delle zone di produzione e di stabulazione da esse classificate in conformità all'articolo 18, paragrafo 6, del regolamento (UE) 2017/625. Se del caso, esse possono farlo in collaborazione con l'operatore del settore alimentare.*

*2. Le autorità competenti classificano le zone di produzione e di stabulazione da cui esse autorizzano la raccolta di molluschi bivalvi vivi come zone di classe A, classe B e classe C in funzione del livello di contaminazione fecale. Se del caso, esse possono farlo in collaborazione con l'operatore del settore alimentare.*

*3. Al fine di classificare le zone di produzione e di stabulazione le autorità competenti fissano un periodo di riesame dei dati di campionamento relativi a ciascuna zona di produzione e di stabulazione per determinare la conformità alle norme di cui agli articoli 53, 54 e 55.*

***Articolo 53 Prescrizioni per le zone di classe A***

*1. Le autorità competenti possono classificare come zone di classe A le zone da cui possono essere raccolti molluschi bivalvi vivi direttamente destinati al consumo umano.*

*2. I molluschi bivalvi vivi provenienti da tali zone e immessi in commercio soddisfano le norme sanitarie per i molluschi bivalvi vivi di cui all'allegato III, sezione VII, capitolo V, del regolamento (CE) n. 853/2004.*

*3. I campioni di molluschi bivalvi vivi provenienti da zone di classe A non superano, nell'80 % dei campioni raccolti durante il periodo di riesame, i 230 E. coli per 100 g di polpa e liquido intervalvare.*

*4. Il restante 20 % dei campioni non supera i 700 E. coli per 100 g di polpa e liquido intervalvare.*

5. Nel valutare i risultati per il periodo di riesame fissato per mantenere una zona nella classe A, le autorità competenti possono decidere, in base a una valutazione del rischio a seguito di un'inchiesta, di non tenere conto di un risultato anomalo che supera il livello di 700 E. coli per 100 g di polpa e liquido intervalvare.

#### **Articolo 54 Prescrizioni per le zone di classe B**

1. Le autorità competenti possono classificare come zone di classe B le zone da cui i molluschi bivalvi vivi possono essere raccolti e immessi in commercio ai fini del consumo umano solo dopo aver subito un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione in modo da soddisfare le norme sanitarie di cui all'articolo 53.

2. I molluschi bivalvi vivi provenienti da zone di classe B non superano, nel 90 % dei campioni, i 4 600 E. coli per 100 g di polpa e di liquido intervalvare.

3. Il restante 10 % dei campioni non supera i 46 000 E. coli per 100 g di polpa e liquido intervalvare.

#### **Articolo 55 Prescrizioni per le zone di classe C**

1. Le autorità competenti possono classificare come zone di classe C le zone da cui i molluschi bivalvi vivi possono essere raccolti e immessi in commercio solo previa stabulazione di lunga durata in modo da soddisfare le norme sanitarie di cui all'articolo 53.

2. I molluschi bivalvi vivi provenienti da zone di classe C non superano i 46 000 E. coli per 100 g di polpa e di liquido intervalvare.

#### **Articolo 71 Decisioni successive ai controlli**

Le autorità competenti dichiarano i prodotti della pesca non idonei al consumo umano se:

a) i controlli ufficiali effettuati in conformità all'articolo 70 rivelano che essi non sono conformi ai requisiti organolettici, chimici, fisici o microbiologici o ai requisiti relativi ai parassiti di cui all'allegato III, sezione VII, del regolamento (CE) n. 853/2004 e/o al regolamento (CE) n. 2073/2005;

b) contengono, nelle loro parti commestibili, residui chimici o contaminanti in quantità superiori ai livelli stabiliti dai regolamenti (UE) n. 37/2010, (CE) n. 396/2005 e (CE) n.



*1881/2006 o residui di sostanze vietate o non autorizzate in conformità al regolamento (UE) n. 37/2010 o alla direttiva 96/22/CE, o non sono conformi a qualsiasi altra norma dell'Unione concernente le sostanze farmacologicamente attive;*

*c) derivano da:*

*i) pesci velenosi;*

*ii) prodotti della pesca non conformi alle prescrizioni in materia di biotossine marine;*

*iii) molluschi bivalvi vivi, echinodermi, tunicati o gasteropodi marini che contengono biotossine marine in quantità totali superiori ai limiti di cui al regolamento (CE) n. 853/2004;*

*d) le autorità competenti ritengono che essi possano rappresentare un rischio per la salute umana o degli animali o che, per qualsiasi motivo, non sono idonei al consumo umano.*

Nel caso invece dei crostacei, nonché dei pesci e dei molluschi cefalopodi, il quadro legislativo è solo un po' diverso.

Questo è il quadro attuale di interesse specifico:

**Regolamento 852/2004 sull'igiene dei prodotti alimentari** (*Rettifica del regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, sull'igiene dei prodotti alimentari (GU L 139 del 30.4.2004) 2004*);

**Regolamento 853/2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, del quale qui di seguito si riportano il Capitolo III, IV e V** (*Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 Laying down Specific Hygiene Rules for Food of Animal Origin 2004*).

### ***CAPITOLO III: REQUISITI APPLICABILI AGLI STABILIMENTI, INCLUSE LE NAVI, PER LA LAVORAZIONE DEI PRODOTTI DELLA PESCA***

*Gli operatori del settore alimentare devono garantire la conformità ai requisiti in appresso, ove pertinenti, negli stabilimenti per la lavorazione dei prodotti della pesca.*

#### ***A. REQUISITI PER I PRODOTTI DELLA PESCA FRESCI***

*1. Se non vengono distribuiti, spediti, preparati o trasformati immediatamente dopo essere arrivati in uno stabilimento a terra, i prodotti refrigerati non imballati devono essere conservati sotto ghiaccio in strutture adeguate. Va reimmesso ghiaccio ogniqualvolta sia necessario. I prodotti della pesca freschi imballati devono essere refrigerati a una temperatura che si avvicini a quella del ghiaccio fondente.*

*2. Operazioni come la decapitazione e l'eviscerazione vanno effettuate nel rispetto delle norme igieniche. Se possibile dal punto di vista tecnico e commerciale, l'eviscerazione va praticata il più rapidamente possibile dopo la cattura o lo sbarco. Dopo queste operazioni, i prodotti devono essere immediatamente e abbondantemente lavati.*

*3. Le operazioni come la sfilettatura e l'affettatura devono essere eseguite in modo da evitare la contaminazione o l'insudiciamento dei filetti e delle trance. I filetti e le trance non devono restare sui tavoli di lavoro più del tempo richiesto per la loro preparazione. Essi devono essere confezionati e se necessario imballati e devono essere refrigerati al più presto una volta preparati.*

*4. I contenitori utilizzati per la spedizione o la conservazione di prodotti della pesca freschi preparati non imballati conservati sotto ghiaccio devono essere tali da assicurare che l'acqua di fusione del ghiaccio non sia a contatto con i prodotti.*

*5. I prodotti della pesca interi ed eviscerati possono essere trasportati e conservati in acqua refrigerata a bordo delle navi. Si può continuare a trasportarli in acqua refrigerata dopo lo sbarco, e dagli impianti di acquacoltura fino all'arrivo al primo stabilimento a terra che effettua una qualsiasi attività diversa dal trasporto e dalla selezionatura.*

## *B. REQUISITI PER I PRODOTTI CONGELATI*

*Gli stabilimenti a terra che congelano i prodotti della pesca devono disporre di attrezzature che soddisfino i requisiti previsti per le navi frigorifero al capitolo I, parte I. C, punti 1 e 2, della presente sezione VIII.*

## *C. REQUISITI PER I PRODOTTI DALLA PESCA SEPARATI MECCANICAMENTE*

*Gli operatori del settore alimentare che producono prodotti della pesca separati meccanicamente devono garantire la conformità ai requisiti in appresso.*

*1. Le materie prime utilizzate devono essere conformi ai seguenti requisiti:*

*a) solo pesci interi e spine di pesce possono essere utilizzati per la produzione di prodotti della pesca separati meccanicamente;*

*b) tutte le materie prime devono essere prive di intestini.*

*2. Il processo di fabbricazione deve essere conforme ai seguenti requisiti:*

*a) la separazione meccanica deve essere effettuata senza indugio dopo la sfilettatura;*

*b) se vengono utilizzati pesci interi, devono essere preventivamente eviscerati e lavati;*

*c) una volta ultimata la separazione meccanica, i prodotti della pesca devono essere al più presto possibile congelati o incorporati in prodotti destinati alla congelazione o ad un trattamento stabilizzante.*

## *D. REQUISITI RELATIVI AI PARASSITI*

*1. Gli operatori del settore alimentare che immettono sul mercato i seguenti prodotti della pesca derivati da pesci pinnati o molluschi cefalopodi:*

*a) i prodotti della pesca che vanno consumati crudi o praticamente crudi; oppure*

*b) i prodotti della pesca marinati, salati e qualunque altro prodotto della pesca trattato, se il trattamento praticato non garantisce l'uccisione del parassita vivo, devono assicurarsi che il materiale crudo o il prodotto finito siano sottoposti ad un trattamento di congelamento che uccide i parassiti vivi potenzialmente rischiosi per la salute dei consumatori.*

*2. Per i parassiti diversi dai trematodi il congelamento deve consistere in un abbassamento della temperatura in ogni parte della massa del prodotto fino ad almeno:*

a) – 20 °C, per almeno 24 ore; oppure

b) – 35 °C, per almeno 15 ore.

3. Gli operatori del settore alimentare non sono tenuti a praticare i trattamenti di congelamento di cui al punto 1 per i prodotti della pesca:

a) sottoposti, o destinati ad essere sottoposti, ad un trattamento termico che uccide il parassita vivo prima del consumo. Nel caso di parassiti diversi dai trematodi il prodotto è riscaldato ad una temperatura al centro del prodotto superiore o uguale a 60 °C per almeno un minuto;

b) che sono stati conservati come prodotti della pesca congelati per un periodo di tempo sufficiente ad uccidere i parassiti vivi;

c) derivanti da cattura in zone di pesca non di allevamento, a condizione che:

i) esistano dati epidemiologici indicanti che le zone di pesca d'origine non presentano rischi sanitari con riguardo alla presenza di parassiti; e

ii) le autorità competenti lo autorizzino;

d) derivati da piscicoltura, da colture di embrioni e nutriti esclusivamente secondo una dieta priva di parassiti vivi che rappresentano un rischio sanitario, e purché uno dei seguenti requisiti sia soddisfatto:

i) sono stati allevati esclusivamente in un ambiente privo di parassiti vivi; oppure

ii) l'operatore del settore alimentare verifica mediante procedure approvate dall'autorità competente che i prodotti della pesca non rappresentano un rischio sanitario con riguardo alla presenza di parassiti vivi.

4.

a) Al momento dell'immissione sul mercato, a meno che non siano forniti al consumatore finale, i prodotti della pesca di cui al punto 1 devono essere accompagnati da un'attestazione dell'operatore del settore alimentare che ha effettuato il trattamento di congelamento, indicante il tipo di congelamento al quale sono stati sottoposti.

b) Prima dell'immissione sul mercato dei prodotti di cui al punto 3, lettere c) e d), che non sono stati sottoposti al trattamento di congelamento o che non sono destinati ad essere sottoposti ad un trattamento, prima del consumo, volto ad uccidere i parassiti vivi che rappresentano un rischio sanitario, un operatore del settore alimentare deve

*assicurarsi che i prodotti della pesca in questione provengano da una zona di pesca o piscicoltura conforme alle condizioni specifiche di cui ai punti citati. La presente disposizione può essere ottemperata dalle informazioni presenti nel documento commerciale o da qualunque altra informazione che accompagna i prodotti della pesca.*

#### ***CAPITOLO IV: REQUISITI PER TALUNI PRODOTTI DELLA PESCA TRASFORMATI***

*Negli stabilimenti che trattano taluni prodotti della pesca trasformati, gli operatori del settore alimentare devono garantire la conformità ai seguenti requisiti.*

##### ***A. REQUISITI PER LA COTTURA DI CROSTACEI E MOLLUSCHI***

*1. Alla cottura deve seguire un raffreddamento rapido. Se non si ricorre ad alcun altro metodo di conservazione, il raffreddamento deve proseguire fino a raggiungere la temperatura del ghiaccio fondente.*

*2. La sgusciatura deve essere effettuata in condizioni igieniche evitando la contaminazione dei prodotti. Se l'operazione viene eseguita a mano, gli addetti devono lavarsi accuratamente le mani.*

*3. Una volta sgusciati, i prodotti cotti devono essere congelati immediatamente o refrigerati appena possibile alla temperatura stabilita nel capitolo VII.*

#### ***CAPITOLO V: NORME SANITARIE PER I PRODOTTI DELLA PESCA***

*Oltre a garantire la conformità ai requisiti microbiologici adottati ai sensi del regolamento (CE) n. 853/2004, gli operatori del settore alimentare devono garantire, in funzione della natura del prodotto o delle specie, che i prodotti della pesca immessi sul mercato per il consumo umano soddisfino i requisiti contenuti nel presente capitolo. I*

*requisiti delle parti B e D non si applicano a tutti i prodotti della pesca usati direttamente per la preparazione dell'olio di pesce destinato al consumo umano.*

#### *A. CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DEI PRODOTTI DELLA PESCA*

*Gli operatori del settore alimentare devono effettuare un esame organolettico dei prodotti della pesca. In particolare, tale esame deve garantire che i prodotti della pesca soddisfano tutti i criteri di freschezza.*

#### *B. ISTAMINA*

*Gli operatori del settore alimentare devono garantire che i limiti relativi all'istamina non siano superati.*

#### *C. AZOTO VOLATILE TOTALE*

*I prodotti della pesca non trasformati non devono essere immessi sul mercato se le analisi chimiche rivelano che i limiti relativi all'ABTV o al TMA-N sono stati superati.*

#### *D. PARASSITI*

*Gli operatori del settore alimentare devono assicurare che i prodotti della pesca siano sottoposti ad un controllo visivo alla ricerca di endoparassiti visibili prima dell'immissione sul mercato. Gli operatori non devono immettere sul mercato per il consumo umano i prodotti della pesca manifestamente infestati da parassiti.*

#### *E. TOSSINE NOCIVE PER LA SALUTE UMANA*

*1. Non devono essere immessi sul mercato i prodotti della pesca ottenuti da pesci velenosi delle seguenti famiglie: Tetraodontidae, Molidae, Diodontidae e Canthigasteridae.*

*I prodotti della pesca freschi, preparati, congelati e trasformati appartenenti alla famiglia delle Gempylidae, in particolare il Ruvettus pretiosus e il Lepidocybium flavobrunneum, possono essere immessi sul mercato solo in forma di prodotti confezionati o imballati e devono essere opportunamente etichettati al fine di informare i consumatori sulle modalità di preparazione o cottura e sul rischio connesso alla presenza di sostanze con effetti gastrointestinali nocivi.*

*Il nome scientifico dei prodotti della pesca deve accompagnare il nome comune sull'etichetta.*

*2. Non devono essere immessi sul mercato i prodotti della pesca contenenti biotossine (ad esempio la ciguatossina o le tossine che paralizzano i muscoli). Tuttavia, i prodotti della pesca ottenuti da molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini possono essere immessi sul mercato se sono stati prodotti a norma della sezione VII e soddisfino i requisiti di cui al capitolo V, punto 2, di detta sezione.*

**Regolamento 2073/2005 e s.m.i. sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari;**

**Regolamento 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari;**

**Regolamento 2406/2006 che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca;**

**Regolamento 625/2017 relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari;**

**Regolamento 627/2019 che stabilisce modalità pratiche uniformi per l'esecuzione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano**, di cui si riportano l'art. 70 e l'allegato VI e il Capitolo II.

***Articolo 70 Controlli ufficiali sui prodotti della pesca***

*I controlli ufficiali sui prodotti della pesca comprendono come minimo le modalità pratiche stabilite nell'allegato VI per quanto riguarda:*

- a) gli esami organolettici;*
- b) gli indicatori di freschezza;*
- c) l'istamina;*
- d) i residui e i contaminanti;*
- e) i controlli microbiologici;*
- f) i parassiti;*
- g) i prodotti della pesca velenosi.*

***ALLEGATO VI - MODALITÀ PRATICHE PER I CONTROLLI UFFICIALI SUI PRODOTTI DELLA PESCA IN CONFORMITÀ ALL'ARTICOLO 70***

***CAPITOLO I - DISPOSIZIONI GENERALI***

***A. Esami organolettici***

*Sono effettuati controlli organolettici a campione in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione. Uno degli scopi di tali controlli è verificare la conformità ai criteri di freschezza stabiliti in conformità al presente regolamento. Ciò comprende in particolare la verifica, in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione, che i prodotti della pesca soddisfino almeno i livelli minimi dei criteri di freschezza stabiliti in conformità al regolamento (CE) n. 2406/96 del Consiglio (1).*



#### *B. Indicatori di freschezza*

*Se dall'esame organolettico emergono dubbi circa la freschezza dei prodotti della pesca, possono essere prelevati campioni da sottoporre a prove di laboratorio per determinare i livelli di azoto basico volatile totale (ABVT) e di trimetilamina-azoto (TMA-N) in conformità alle modalità tecniche di cui al capitolo II.*

*Le autorità competenti utilizzano i criteri stabiliti dal presente regolamento.*

*Se dall'esame organolettico emergono dubbi circa la presenza di altre condizioni che potrebbero incidere sulla salute umana, sono prelevati campioni adeguati a fini di verifica.*

#### *C. Istamina*

*Sono effettuati controlli a campione per la sorveglianza dell'istamina al fine di verificare la conformità ai livelli consentiti di cui al regolamento (CE) n. 2073/2005.*

#### *D. Residui e contaminanti*

*È istituito un sistema di monitoraggio in conformità alla direttiva 96/23/CE e alla decisione 97/747/CE per il controllo del rispetto della legislazione dell'UE in materia di:*

- limiti massimi di residui di sostanze farmacologicamente attive, in conformità ai regolamenti (UE) n. 37/2010 e (UE) 2018/470,*
- sostanze vietate e non autorizzate, in conformità al regolamento (UE) n. 37/2010, alla direttiva 96/22/CE e alla decisione 2005/34/CE,*
- contaminanti, in conformità al regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti,*
- residui di antiparassitari, in conformità al regolamento (CE) n. 396/2005.*

#### *E. Controlli microbiologici*

*Ove necessario, sono effettuati controlli microbiologici in conformità alle norme e ai criteri pertinenti stabiliti dal regolamento (CE) n. 2073/2005.*

## *F. Parassiti*

*Sono svolte prove basate sul rischio per verificare la conformità all'allegato III, sezione VIII, capitolo III, parte D, del regolamento (CE) n. 853/2004 e all'allegato II, sezione I, del regolamento (CE) n. 2074/2005.*

## *G. Prodotti della pesca velenosi*

*Sono effettuati controlli per garantire che:*

*1. non siano immessi in commercio prodotti della pesca ottenuti da pesci velenosi delle seguenti famiglie: Tetraodontidae, Molidae, Diodontidae e Canthigasteridae;*

*2. i prodotti della pesca freschi, preparati, congelati e trasformati appartenenti alla famiglia delle Gempylidae, in particolare Ruvettus pretiosus e Lepidocybium flavobrunneum, possano essere immessi in commercio soltanto sotto forma di prodotti confezionati o imballati e siano opportunamente etichettati al fine di informare i consumatori sulle modalità di preparazione o cottura e sul rischio connesso alla presenza di sostanze con effetti gastrointestinali nocivi. Sull'etichetta dei prodotti della pesca figurano sia il nome scientifico che il nome comune;*

*3. i prodotti della pesca contenenti biotossine come la Ciguatera o altre tossine pericolose per la salute umana non siano immessi in commercio. I prodotti della pesca ottenuti da molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini vivi possono essere tuttavia immessi in commercio se sono stati prodotti in conformità all'allegato III, sezione VII, del regolamento (CE) n. 853/2004 e soddisfano le norme di cui al capitolo V, punto 2, di tale regolamento (CE) n. 853/2004 e all'allegato II, sezione I, del regolamento (CE) n. 2074/2005.*

## **CAPITOLO II**

### **CONTROLLI SULL'AZOTO BASICO VOLATILE TOTALE (ABVT)**

*A. Valori limite di ABVT per talune categorie di prodotti della pesca e metodi di analisi da utilizzare*

*1. I prodotti della pesca non trasformati sono considerati non idonei al consumo umano se dalla valutazione organolettica emergono dubbi circa la loro freschezza e il controllo chimico dimostra che i seguenti valori limite di ABVT sono superati:*

*a) 25 mg di azoto/100 g di polpa per le specie di cui alla parte B, punto 1, del presente capitolo;*

*b) 30 mg di azoto/100 g di polpa per le specie di cui alla parte B, punto 2, del presente capitolo;*

*c) 35 mg di azoto/100 g di polpa per le specie di cui alla parte B, punto 3, del presente capitolo;*

*d) 60 mg di azoto/100 g di prodotti della pesca interi utilizzati direttamente per la preparazione di olio di pesce destinato al consumo umano di cui all'allegato III, sezione VIII, capitolo IV, parte B, punto 1, secondo capoverso, del regolamento (CE) n. 853/2004. Se la materia prima è conforme al primo capoverso, lettere a), b) e c), di detto punto, gli Stati membri possono tuttavia fissare limiti più elevati per talune specie finché non saranno state stabilite norme dell'Unione specifiche.*

Nel caso del primo corpus normativo, va sottolineato come, al di là delle caratteristiche di vitalità e freschezza comuni a bivalvi, gasteropodi, ecc., le maggiori attenzioni riguardino i molluschi bivalvi. Ad essi, infatti, sono essenzialmente dedicate le indicazioni sulle zone di produzione e raccolta così come i limiti batteriologici e quelli sulle biotossine algali. Importante è evidenziare che, proprio sotto il profilo dei parametri batteriologici non si faccia alcun riferimento al genere *Vibrio*, oggetto principale del presente studio.

Nel caso, invece, del corpus normativo relativo ai crostacei, pesci e molluschi cefalopodi, va notato come non tutte le indicazioni presenti siano estensibili ai suddetti prodotti della pesca. Nel caso dei crostacei, si rileva come non siano genericamente applicabili gli indicatori

chimici di freschezza, non vi sia un effettivo problema “parassiti visibili” e per tutti i prodotti non vi siano indicazioni pregnanti per il controllo batteriologico. Anzi, il Regolamento 627/2019 relativo al controllo ufficiale sembra limitare l’utilizzo solo a qualche aspetto relativo ai criteri previsti dal Regolamento 2073/2005 e s.m.i. anche se, in effetti, all’art. 71 lettera d) non sono ritenuti idonei al consumo umano i prodotti se “le autorità competenti ritengono che essi possano rappresentare un rischio per la salute umana o degli animali o che, per qualsiasi motivo, non siano idonei al consumo umano”.

### **1.8 I batteri del genere *Vibrio***

Al genere *Vibrio* spp. appartengono batteri Gram-negativi a forma di bastoncino, ampiamente distribuiti negli ecosistemi acquatici, sia dolci che marini e nelle acque di estuario (Ansaruzzaman et al. 2005).

Si rinvenivano sia nei sedimenti che nel corpo d’acqua, sulle alghe, all’interno o adesi al plancton, sulla cute o nell’intestino di diversi animali acquatici, entrando a far parte della normale flora microbica di diversi organismi marini. Nei crostacei, ad esempio, l’epatopancreas, l’emolinfa e il tratto digestivo sono normalmente colonizzati da *Vibrio*. In *Penaeus vannamei* un’alta concentrazione di *vibrio* (da  $10^4$  a  $10^5$  cfu/g di tessuto) è stata riscontrata nell’epatopancreas e nell’emolinfa di soggetti sani.

Sulla superficie dei copepodi possono raggiungersi, in alcuni casi, concentrazioni di  $10^9$  cellule/g a fronte di una presenza nel corpo d’acqua di  $10^2$  cellule/ml. In corso di fioriture algali è possibile osservare un incremento dei batteri appartenenti al genere *Vibrio* sia per la maggiore presenza di nutrienti disciolti nell’acqua sia per la possibilità dei microrganismi di aderire alla superficie delle microalghe.

Al genere *Vibrio* appartengono 147 specie, di cui circa 20 sono state identificate come patogene per diversi vertebrati e invertebrati marini (pesci, gamberi, crostacei); 12 sono le specie considerate patogene per l’uomo di cui 8 sono associate a patologie gastroenteriche dovute al consumo di alimenti contaminati.

I vibriani sono microrganismi distribuiti in tutto il mondo, tollerano temperature comprese tra 5 e 40°C, anche se preferiscono acque temperate con  $T > 18^\circ\text{C}$  e condizioni alcaline

(pH 6,5 – 9,0). Molti di essi richiedono concentrazioni saline comprese tra 1 e il 12%, a seconda della specie, con eccezione di *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii* e *V. mimicus* che preferiscono condizioni di bassa salinità (0,1 % NaCl).

I vibriani condividono diverse caratteristiche biologiche e genomiche. I loro i genomi sono divisi tra due cromosomi, che sono stati modellati dalla ricombinazione e dal trasferimento genico orizzontale tramite l'acquisizione di materiale genetico o per trasferimento da altri organismi.

Fattori ambientali come la temperatura e la salinità influenzano la densità e la diversità delle specie presenti. L'ingestione di acqua contaminata, di prodotti della pesca crudi o poco cotti, in particolare molluschi, l'esposizione di ferite all'acqua rappresentano le più comuni fonti di infezioni per l'uomo. Esse compaiono prevalentemente nelle acque calde, nei periodi più caldi e hanno picchi stagionali. Nei climi temperati si riscontrano con maggiore frequenza nel periodo compreso tra maggio e ottobre, quando la temperatura dell'acqua è più alta.

Frequente l'isolamento nei molluschi bivalvi che essendo degli organismi filtratori tendono a trattenere questi microrganismi nelle branchie e nel tratto digestivo, dove possono rimanere adesi per diverse settimane. I trattamenti di depurazione intensiva, il cloro, gli UV, l'ozono e gli iodofori non sembra siano efficaci nel loro rapido allontanamento.

Da uno studio condotto su 129 campioni di gamberi freschi, refrigerati e congelati, Prasad e Rao (Prasad e Rao 1994) riscontrano la presenza del genere *Vibrio* nel 30% dei campioni, con prevalenza di *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. metschnikovii*, *V. cholerae* non 01 e *V. fluvialis*. Analogamente Wong et al. (H. Wong e Lee 1994; G. Wong, Kaattari, e Christensen 1992) riscontrano positività tra il 13% e il 36% dei campioni di gamberi e pesci da loro esaminati, mentre Lowry et al. (Lowry et al. 1989) in uno studio condotto su ostriche isolano *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, rispettivamente, nel 100% e nel 67% dei campioni.

*V. parahaemolyticus* è isolato nel 94% di campioni di ostriche in India, tra il 77% e il 100% in Brasile, 100% in Messico e 71% a Taiwan. Kirs et al. (Kirs et al. 2011) riscontrano il 94,8% di positività in ostriche raccolte in Islanda del Nord e Nuova Zelanda. Dati simili sono riportati da altri autori negli Stati Uniti (Jones et al. 2014; Kaysner et al. 1990).

Proprio per le specifiche abitudini alimentari in Giappone, ed in altre regioni dell'Asia, *V. parahaemolyticus* è stato riconosciuto quale principale agente di gastroenterite.

In condizioni ambientali non favorevoli, come ad esempio carenza di nutrienti, basse temperature, bassa concentrazione salina, i vibriani possono entrare in uno stato di latenza, perdere la capacità di moltiplicarsi e diventare non coltivabili con le comuni tecniche di laboratorio pur rimanendo vitali. Le cellule vitali ma non coltivabili (VBNC) presentano alterazioni della morfologia, della struttura della parete cellulare, della composizione della membrana e del metabolismo; tuttavia, possono manifestare la propria azione patogena se ingerite da un ospite, come ad esempio l'uomo.

Nell'ambito delle diverse specie, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, di cui nella tabella 6 si riportano le principali caratteristiche, sono di maggiore interesse per l'uomo perché in grado di determinare patologie anche gravi.

	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
range di temperatura (°C)	10-43	5-43	8-43
optimum di temperatura (°C)	30-37	37°C	37
temperatura di inattivazione (°C)	>70	>63	>50
range pH	5-9.7	5-11	5-10
optimum di pH	7.6	7.5-8.5	7.8
aW	0.97	0.94	0.96
NaCl (%)	<4.0	0.5-8.0	0.5-5.0
Salinità (PSU)	0-20	5-30	8-16

**Tabella 6.** Principali caratteristiche delle specie di *Vibrio* spp. patogene per l'uomo.

Di minore gravità, in genere, le patologie sostenute da *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. furnissii*, *V. metschnikovii* e *V. harveryi*.

Quasi tutti questi organismi sono considerati patogeni opportunisti e quadri più gravi si rinvencono in categorie a rischio (soggetti immunocompromessi). Più frequentemente inducono infezioni delle ferite, ma sono stati documentati anche casi a trasmissione alimentare tipicamente caratterizzati da gastroenterite da lieve a moderata. Solo occasionalmente questi quadri possono evolvere in setticemia, con tassi di mortalità inferiori all'1%.

Recentemente, il riscaldamento globale e il conseguente aumento della temperatura della superficie del mare sono stati collegati a focolai di malattia nell'uomo causati da *V. cholerae* non O1 e non O139, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* in diversi paesi europei. Tuttavia, la mancanza di un sistema obbligatorio di notifica impedisce di avere dati accurati sui casi effettivi in Europa.

L'aumento della temperatura ambientale, se a breve o a lungo termine, unitamente alla salinità delle acque, hanno effetti significativi sulle concentrazioni di questi microrganismi negli ambienti acquatici e nei prodotti della pesca (Takemura, Chien, e Polz 2014). Insieme, salinità e temperatura sono responsabili del

50% della variazione della concentrazione di *Vibrio* nelle acque (Brett A. Froelich e Daines 2020)(Nigro et al. 2011; Wetz et al. 2008). Numerosi studi hanno cercato di correlare le condizioni ambientali con l'abbondanza di *Vibrio* spp. (Coutinho et al. 2019; Deeb et al. 2018) e sembrerebbe che un aumento delle patologie sostenute da *V. parahaemolyticus* si avrebbe quando le temperature dell'acqua raggiungono i 15°C per *V. parahaemolyticus* e quelle sostenute da *V. vulnificus* i 20°C (Kaspar e Tamplin 1993; Martinez-Urtaza et al. 2010; Paz et al. 2007; Ulitzur 1974).

Inoltre, i tre principali agenti patogeni, *V. cholerae*, *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* hanno requisiti e tolleranza alla salinità differenti, e quindi i cambiamenti della concentrazione salina in un distretto acqueo possono modificare il rapporto e la concentrazione di questi tre agenti patogeni. Ad esempio, l'apertura dello stabilimento del Bonnet Carre Spillway nello stato del Mississippi negli Stati Uniti, che ha comportato un aumento di acqua dolce nell'estuario, ha provocato una diminuzione della presenza di *V. vulnificus* e di *V. parahaemolyticus* e un aumento di *V. cholerae* (Griffitt e Grimes 2013). *V. cholerae* può, infatti, sopravvivere in acqua dolce, mentre *V. parahaemolyticus* è un organismo tipicamente alofilo e *V. vulnificus* più alotollerante di *V. cholerae* e questa tolleranza sembrerebbe aumentare all'aumentare della temperatura (B. A. Froelich et al. 2015; Randa, Polz, e Lim 2004).

Così *V. cholerae* è spesso associato ad infezioni trasmesse dal consumo di acqua potabile. Tali patogeni, riescono ad adattarsi molto facilmente perché hanno un meccanismo di replicazione molto breve (replicano il loro DNA in 20 minuti o anche meno) e sono così in grado di reagire rapidamente ai cambiamenti delle condizioni ambientali come: inondazioni, innalzamento delle temperature e ondate di caldo che favoriscono "fioriture" di *Vibrio*, rappresentando un potenziale pericolo per l'uomo.

Malattie alimentari sostenute da *Vibrio* spp. sono in aumento non solo negli Stati Uniti ma, in generale, in tutto il mondo. Una tendenza che è stata attribuita al riscaldamento delle acque oceaniche ed è previsto un ulteriore aumento dovuto al cambiamento climatico in corso (Chowdhury et al. 2017; Logar-Henderson et al. 2019). Anche un lieve aumento della temperatura dell'acqua (circa 5°C) determinerebbe, secondo Huq et al. (Huq et al. 2005) un aumento delle patologie nell'uomo sostenute da *Vibrio*.



Dati bisettimanali raccolti dalle acque superficiali in un sito di campionamento nell'estuario del fiume Neuse, nel nord orientale Carolina (USA), mostra che la concentrazione di *Vibrio* spp. rimane al di sopra della media oltre il normale periodo stagionale (B. A. Froelich et al. 2015). Gli Stati Uniti ed in particolare le regioni della costa del Golfo del Texas, Alabama, Florida, Mississippi e Louisiana, hanno avuto il maggior numero di segnalazioni di casi di vibriosi (CDC, 2005).

Secondo alcuni autori la presenza dei batteri del genere *Vibrio* aumenterebbe quando la temperatura dell'acqua è compresa tra 20 e 30°C (Tantillo et al. 2004), sebbene Kelly e Stroh (Kelly e Stroh 1988) isolano i microrganismi nelle acque costiere degli Stati Uniti a temperature di 17°C e salinità al di sotto di 13 ppt.

In un altro studio, *V. parahaemolyticus* è stato isolato nel 94,2% dei campioni di ostriche provenienti da acque con temperature di circa 25°C e solo nel 14,9% dei campioni pescati in acque al di sotto di 10°C (Cook et al. 2002; Cook, Bowers, e DePaola 2002). Anche la concentrazione nei molluschi sarebbe notevolmente influenzata dalle temperature delle acque come dimostrato dagli studi condotti da Gooch et al. (Gooch et al. 2002) che riscontrano in molluschi concentrazioni di *V. parahaemolyticus* pari a 13.000 UFC/100 g nel periodo compreso tra aprile e dicembre (temperature superiori a 20°C) e valori significativamente più bassi in altri periodi dell'anno.

Ad esempio, nell'estate 2014 sono stati riportati 89 casi di contagi da *Vibrio* spp. in Svezia e Finlandia ed altri 100 mila casi segnalati all'interno del Circolo Polare Artico (Baker-Austin et al. 2017). Ciò fornisce un'ulteriore prova che l'innalzamento della temperatura superficiale dell'acqua costiera aumenta la presenza di vibrioni, anche in maniera temporanea, con implicazioni significative per la salute pubblica (Chowdhury et al. 2017).

È noto, inoltre, come improvvise epidemie possano comparire a seguito di eventi atmosferici rilevanti.

Ad esempio, dopo le inondazioni dell'uragano Rita e Katrina, verificatesi nell'ottobre del 2005, il numero di vibrioni patogeni (*V. cholerae*, *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*) in campioni prelevati da entrambi i laghi di Pontchartrain, vicino alla riva dei siti interessati, così come dai canali di New Orleans, erano significativamente aumentati. Ventidue casi di

malattie legate a *Vibrio* sono stati segnalati nelle 2 settimane successive all'uragano Katrina, con cinque di questi che hanno provocato la morte di alcuni pazienti (Morantz 2005).

Occorre, inoltre, ricordare che molte di queste specie rivestono una certa importanza anche nella patologia degli organismi acquatici e in questi ultimi anni, forse anche in relazione al riscaldamento delle acque, si è registrato un aumento dei casi di mortalità in diversi di essi, come in ostriche, pesci d'allevamento, gamberi, ecc., sostenuti da diverse specie di *Vibrio*.

### **1.9 *Vibrio cholerae***

*Vibrio cholerae* si rinviene comunemente negli ambienti acquatici, preferibilmente in acque dolci, anche potabili, in acque reflue, ma è possibile isolarlo anche in ambienti salmastri e marini. Sulla base dell'antigene somatico è possibile distinguere oltre 200 sierotipi di *V. cholerae* di cui, solo i sierotipi O1 e O139 sono responsabili di forme epidemiche e pandemiche di colera, malattia infettiva dell'uomo a trasmissione oro-fecale veicolata, spesso, dall'acqua o da alcuni alimenti contaminati. All'interno della specie, possono rinvenirsi sia ceppi patogeni che non patogeni che normalmente differiscono per la capacità di produrre la tossina colerica codificata dal gene *ctx*.

Il sierotipo O1 è ulteriormente classificato nei biotipi classico ed El Tor, sulla base di una serie di differenze fenotipiche, biochimiche e genetiche, inclusa la suscettibilità alla polimixina B e alle infezioni fagiche (Alam et al. 2006; Waldor e Mekalanos 1994) e in tre sierotipi, Inaba, Ogawa e Hikojima, sulla base della presenza di antigeni somatici. Il sierotipo Ogawa è il prevalente, mentre l'Hikojima è molto raro e non persiste a lungo nell'ambiente. Lo stato immunitario della popolazione colpita condizionerebbe la prevalenza di un sierotipo rispetto ad un altro nel corso delle epidemie.

Gli altri sierogruppi, denominati non-O1 e non-O139, determinano patologie meno gravi caratterizzate da forme gastro-enteriche sporadiche e autolimitanti, infezioni cutanee, raramente batteriemie.

Il colera è una malattia endemica in Asia da dove si sono originate, a partire dal diciannovesimo secolo, sette diverse pandemie. Nell'ambito dei biotipi, il Classico, è responsabile delle prime sei pandemie, e oggi risulta confinato quasi esclusivamente nel sud

del Bangladesh, mentre il biotipo El Tor, isolato per la prima volta nel 1961 in Indonesia, si è poi diffuso in Africa (1971), America Latina (1991), India (1992), Brasile (1999), Sud Africa (2000) causando la settima pandemia che risulta ancora oggi in corso (Mukhopadhyay, Takeda, e Balakrish Nair 2014; Jutla et al. 2013). La persistenza di questo biotipo, che sarebbe tuttavia meno virulento rispetto al classico, sarebbe favorita da una maggiore capacità di adattamento nell'ambiente e da una maggiore capacità di colonizzare l'epitelio intestinale (Kaper, Fasano, e Trucksis 1994).

Nel 1992 un nuovo ceppo di *V. cholerae* è apparso in Asia ed è stato nominato O139 Bengala. Esso è fenotipicamente e genotipicamente molto simile a El Tor e con alcune caratteristiche tipiche del Classico ed è stato identificato come un nuovo sierogruppo. Successivamente ceppi molto simili sono stati isolati nel corso di una epidemia scoppiata a Calcutta nel 1995 e denominati O139 Calcutta. Recentemente, nuove varianti del biotipo El Tor sono state descritte in numerosi paesi, soprattutto in Asia, Africa e Messico, caratterizzate da una maggiore virulenza e capacità di diffusione (A. S. G. Faruque, Fuchs, e Albert 1996). La comparsa di nuovi sierogruppi come accaduto più volte nell'ultimo decennio nelle regioni endemiche, farebbe ipotizzare che l'immunità acquisita giochi un ruolo importante nella loro comparsa. Inoltre, la rapida evoluzione e il riarrangiamento genetico dei ceppi O1 e O139 contribuiscono alla persistenza e al riemergere di questa malattia (S. M. Faruque et al. 2003; Mukhopadhyay, Takeda, e Balakrish Nair 2014).

In passato, la permanenza di ceppi tossigeni di *V. cholerae* nell'ambiente era considerata breve e focolai di malattia sono stati principalmente associati a trasmissione oro-fecale. Attualmente, è stato riscontrato che *V. cholerae* può sopravvivere a lungo nell'ambiente acquatico, assumendo lo stato vitale ma non coltivabile. Ciò farebbe ipotizzare che questo serbatoio ambientale del microrganismo possa essere responsabile di forma endemiche della malattia in dipendenza dello stato sanitario della comunità interessata. Infatti, in condizioni igienicamente soddisfacenti sarebbe necessaria una presenza permanente del microrganismo nell'ambiente mentre in condizioni igieniche carenti e in comunità povere sarebbe sufficiente un serbatoio transitorio.

Nelle acque *V. cholerae* si ritrova sia in forma libera che adeso alla superficie di alghe, copepodi (zooplankton), alcune specie di cianobatteri, crostacei e aggregati di uova di

chironomidi in condizioni di simbiosi. Quando le condizioni ambientali come temperatura, salinità e disponibilità di nutrienti sono favorevoli, il microrganismo può moltiplicarsi, come dimostrato in acqua di fiume, di lago e negli effluenti di impianti di trattamento di acque reflue, raggiungendo concentrazioni di  $1,55 \times 10^6$  cellule/ml, riuscendo a sopravvivere per anni senza l'intervento dell'uomo.



**Figura 4.** *Vibrio cholerae* da <https://locatus.com/fr/blog/que-nous-apprend-une-epidemie-de-cholera-sur-limportance-de-la-cartographie-du-commerce-de-detail/vibrio-cholerae-bacteria-2/>

### **1.10 Fattori di patogenicità e sintomatologia nell'uomo**

Si stima che annualmente 1,4-4,3 milioni di persone nel mondo contraggano il colera con circa 21.000-143.000 morti per anno. Nei paesi in cui la malattia è endemica, la metà dei decessi riguarda bambini di età inferiore ai 5 anni. Recentemente il colera ha colpito comunità vulnerabili, come ad Haiti dopo il terremoto, in Iraq e Yemen, dove disastri naturali, guerre, carestie, il movimento di profughi aumentano il rischio di infezioni ed epidemie. Solo nell'ultimo decennio, milioni di casi di colera, sono stati segnalati ad Haiti, Yemen, Vietnam e Zimbabwe e in altri luoghi in cui mancano adeguate strutture igienico-sanitarie, infrastrutture ed acqua potabile (Ali et al. 2012; Legros 2018).

Nell'Unione Europea il colera è una malattia sporadica; nel 2019 sono stati confermati 26 casi di cui 24 in pazienti che avevano effettuato viaggi all'estero (India, Pakistan, Tunisia, Bangladesh, Indonesia, Kenia).

Nelle aree endemiche la principale via di trasmissione è quella acquatica. Il colera è normalmente trasmesso attraverso il consumo di acqua potabile contaminata con acque reflue o dall'ingestione di acque di fiumi, di laghi o di stagni.

Nelle aree non endemiche la malattia è più frequentemente associata al consumo di alimenti, come molluschi bivalvi crudi o poco cotti, crostacei e, in minor misura, pesci, spesso importati da aree endemiche, ma anche frutta e vegetali. Sono documentati inoltre epidemie di colera associate al consumo di riso, carni rosse, carni di pollame e prodotti lattiero-caseari. Possibile, inoltre, la trasmissione da uomo a uomo ma, in questo caso, è necessaria un'elevata carica infettante per indurre la malattia. Altri veicoli di trasmissione, quali insetti e substrati inanimati contaminati, sono stati nel tempo incriminati ma oggi sono ritenuti meno importanti in situazioni epidemiche.

La tossina colerica rappresenta il principale fattore di virulenza di questo microrganismo. Essa risulta composta da una subunità A legata a 5 subunità B, la cui produzione è codificata dai geni *ctxA* e *ctxB* che risiedono nel genoma integrato di un batteriofago lisogenico filamentoso CTXΦ. Questo batteriofago si lega al pilo co-regolato con la tossina (TCP), essenziale per la colonizzazione intestinale da parte del microrganismo (codificato dal gene *tcpA*) e si sposta all'interno della cellula batterica, integrandosi nel genoma di *V. cholerae*.

Poiché *ctxA* e *ctxB* fanno parte di un elemento genico mobile, il trasferimento orizzontale di questo batteriofago è responsabile dell'emergenza di nuovi sierogruppi tossigeni di *V. cholerae*.

Molti altri geni importanti per la patogenicità del microrganismo, compresi quelli che codificano la biosintesi del TCP, i fattori di colonizzazione accessori e quelli che regolano l'espressione dei geni di altri fattori di virulenza (ad es. l'emolisina-citolisina di ceppi El Tor codificata dal gene *hlyA* e una tossina simile alle shigattossine dei ceppi O1 e non O1) sono riuniti insieme in uno dei due cromosomi del vibrione e costituiscono la c.d. "Isola di Patogenicità di *Vibrio cholerae*" (VPI) che sembra sia stata acquisita dal vibrione per trasferimento genico orizzontale.

Altri fattori di patogenicità sono rappresentati dall'enterotossina colerica accessoria, codificata dal gene *ace*, che svolge un'azione analoga a quella della CT essendo in grado di determinare un aumento della differenza di potenziale a livello della mucosa intestinale

aumentando la secrezione di liquidi. Alcuni studi hanno suggerito che Ace potrebbe svolgere tale azione polimerizzando ed inserendosi nella membrana plasmatica delle cellule eucariote e formando un canale ionico. Il gene *zot* per la tossina della zonula occludens che svolge un'azione simile a quella della CT generando una modificazione della permeabilità della mucosa intestinale tramite una variazione del trasporto ionico attraverso la membrana cellulare (pathway transcellulare) e il gene *cep* per le proteine chemiotattiche.

Il mancato riscontro di tali geni in sierotipi non-O1/non-O139 ma in possesso dei geni *ctx*, spiegherebbe la minore virulenza di questi ultimi rispetto a quelli dotati di un set completo di tossine e in grado di determinare casi epidemici di colera.

Molti ceppi di *V. cholerae* appartenenti al sierotipo O1 biotipo El Tor, ma anche ai sierotipi non-O1 e non-O139, producono una esotossina emolitica chiamata El Tor emolisina o *V. cholerae* citolisina (VCC) capace di legarsi alle membrane lipidiche e di formare dei canali, preferenzialmente permeabili agli anioni che sono considerati responsabili di alcuni effetti citotossici come la lisi cellulare ed un'estesa vacuolizzazione.

La dose infettante è in genere abbastanza elevata ( $10^8$  cellule) anche considerato che il microrganismo risente molto dell'acidità gastrica, tuttavia, in soggetti affetti da ipocloridria o patologie gastriche sarebbero sufficienti cariche comprese tra  $10^3$  e  $10^5$  cellule per indurre la malattia.

Il periodo di incubazione varia da poche ore a 5 giorni e la sintomatologia si caratterizza per una diarrea acquosa (ad acqua di riso) e rapida disidratazione (è possibile perdere fino a 20L di liquidi in 24 ore) che, se non trattata, può portare a shock ipotonico e morte entro 12 ore dai primi sintomi (Charles e Ryan 2011; Kaper, Fasano, e Trucksis 1994). In caso di mancato trattamento la mortalità può interessare oltre il 40% dei soggetti colpiti.

La patogenesi è legata all'innescò di meccanismi di adesione delle subunità B della tossina colerica ai recettori per i gangliosidi GM1 presenti sulla superficie degli enterociti mentre la subunità A ne promuove la penetrazione all'interno. Ne deriva l'attivazione irreversibile dell'adenilato-ciclastasi all'interno delle cellule epiteliale dell'intestino tenue seguita da un aumento di C-AMP che promuove la secrezione verso il lume di cloro e di conseguenza sodio,  $H_2CO_3$  e acqua.

### 1.11 *Vibrio parahaemolyticus*

*Vibrio parahaemolyticus* è microrganismo naturalmente presente negli ambienti marini, nelle acque costiere e temperate di tutto il mondo ed è considerato un normale componente della flora microbica di questi ambienti.

*V. parahaemolyticus* è causa di malattie alimentari umane ampiamente segnalate in Asia, negli Stati Uniti e, con minore frequenza, in Europa, più frequentemente associate al consumo di prodotti della pesca, specie molluschi bivalvi, crudi o poco cotti, soprattutto nelle stagioni più calde. Inoltre, è nota l'infezione di ferite a seguito del contatto con acque contaminate. Non è riconosciuta, invece, la trasmissione da uomo a uomo né quella oro-fecale.

Sulla base della combinazione degli antigeni somatici (13 sierotipi O) e capsulari (71 sierotipi K) è possibile distinguere diversi sierotipi di cui numerosi sono agenti di malattia nell'uomo, ad es. O3:K6, O4:K68, O1:K25, O1:KUT, O1:K26, ecc. e un numero ancora più grande si rinviene comunemente nell'ambiente e negli alimenti in assenza di effetti sulla salute umana. Fino al 1960 la malattia era geograficamente limitata al Giappone per poi diffondersi in diverse località lungo l'Oceano Atlantico e il Pacifico. Successivamente episodi sporadici sono stati segnalati in Europa, Africa, Nuova Zelanda e nei paesi Asiatici. L'epidemiologia di *V. parahaemolyticus* è radicalmente cambiata nel 1996 quando è stato segnalato un incremento degli episodi di gastroenterite a Calcutta in India, tutti causati da una variante del sierotipo O3:K6. I ceppi isolati presentavano gli stessi caratteri di virulenza, l'emolisina diretta termostabile (TDH) ma non l'emolisina correlata al TDH (TRH) ed erano ureasi negativi. Utilizzando tecniche biomolecolari è stato possibile dimostrare che questi isolati erano chiaramente differenti rispetto ai ceppi O3:K6 già noti prima dell'epidemia di Calcutta. Questa variante si è diffusa nei paesi sud-est Asiatici in meno di un anno per poi diventare pandemica, con carattere di endemicità in diverse aree in cui è stata introdotta, ed è oggi il sierotipo più comune negli Stati Uniti, Corea del Sud, Thailandia, Giappone, Laos, Taiwan e India.

L'aumento dei consumi dei prodotti della pesca, la diffusione del commercio dei molluschi bivalvi, il riscaldamento globale delle acque possono aver contribuito alla diffusione

intercontinentale di questo microrganismo. Più recentemente è stata segnalata la diffusione di un nuovo clone, denominato ST36, caratterizzato da una maggiore patogenicità e una minore dose infettante.

*V. parahaemolyticus* si rinviene comunemente nei prodotti della pesca che vivono stanzialmente nelle acque costiere e, naturalmente, ancor di più negli organismi filtratori come i molluschi bivalvi che tendono a concentrare il microrganismo nel tratto digestivo.

Nei gamberi e nei granchi pescati in diversi siti costieri dell'Atlantico, sono state segnalate percentuali d'isolamento dal 25 – 30 % al 100%, in dipendenza della stagione fredda o calda. Quest'ultimo fattore, ovviamente, ne condiziona spesso anche la concentrazione dal momento che da valori di  $10^3$  ufc/g riscontrati in ostriche durante la stagione fredda si può passare a valori superiori a  $10^4$  ufc/g nel periodo più caldo. A ciò si aggiunge che il microrganismo può moltiplicare rapidamente in ostriche sottoposte ad abusi termici raggiungendo concentrazioni da 50 a 790 superiori alla contaminazione iniziale dopo 24 ore a 26°C.

In una recente review condotta su 48 studi pubblicati tra il 2003 e il 2015 in ostriche, vongole, pesci, gamberi e mitili la presenza di *V. parahaemolyticus* è stata riscontrata in percentuali, rispettivamente, del 63,4%, 52,9%, 51,0%, 48,3% e 28,0%.

Abusi termici, anche per breve periodo, ne favoriscono la moltiplicazione come dimostrato in polpo bollito, pesce crudo, omogenato di gamberi e di ostriche, dove, in base alla temperatura di conservazione si sono osservati tempi di duplicazione anche inferiori a 12 minuti (30°C).

Recentemente è stata osservata la sua trasmissione per contaminazione crociata, da prodotti della pesca o attraverso gli utensili da cucina, anche da altri substrati alimentari come carne di pollo e di maiale, pesci d'acqua dolce, uova e loro prodotti, riso.

Non resiste, invece, al calore, possedendo un valore D - 60 - pari a circa 2.3'. Al riguardo, è stato dimostrato come i trattamenti termici praticati per la sgusciatura dei molluschi bivalvi possono ridurre il numero al di sotto del limite di rilevabilità del metodo di conta, anche se alcune cellule sono state successivamente isolate, in tali prodotti cotti, anche dopo alcuni giorni di refrigerazione.



Resiste lungamente al congelamento (fino a 18 mesi). Studi condotti a questo proposito mostrano che, dopo un iniziale rapido calo delle conte vitali quando incubato a 3, 7, 10 o -18°C, il microrganismo sarebbe in grado di adattarsi alle basse temperature attraverso modificazioni della composizione in acidi grassi della membrana cellulare e della sintesi proteica (Wong, Chen, e Yu 1994) rimanendo vitali e potenzialmente patogeni per lungo tempo. Temperature di -10°C sarebbero più efficaci nell'inattivare *V. parahaemolyticus*, dopo 6 mesi di conservazione (Liu, Lu, e Su 2009). In uno studio simile, Shen et al. (Shen et al. 2009) hanno dimostrato una riduzione della popolazione batterica da un livello iniziale di 8,59 log UFC/ml a 2,04 e 3,84 log UFC/ml dopo 15 giorni di conservazione rispettivamente a -18°C e -30°C.



**Figura 5.** *Vibrio parahaemolyticus* da <https://pubmlst.org/organisms/vibrio-parahaemolyticus>.

### **1.12 Fattori di patogenicità e sintomatologia nell'uomo**

I ceppi patogeni di *V. parahaemolyticus* producono una varietà di fattori di virulenza, di questi, l'emolisina diretta termostabile (TDH), responsabile dell'emolisi di tipo  $\beta$  su agar sangue Wagatsuma (eritrociti umani), da cui la definizione di ceppi “Kanagawa positivi” (KP). Quasi tutti gli isolati clinici di *V. parahaemolyticus* mostrano attività beta-emolitica, tuttavia, numerosi isolati clinici KP negativi, non in grado di produrre la TDH, possono

risultare ugualmente patogeni per la produzione dell'emolisina correlata al TDH (TRH). Uno studio condotto su 215 ceppi clinici di *V. parahaemolyticus* isolati da pazienti con diarrea ha permesso di accertare che il 24,3 % dei ceppi (n. 52) presentava il gene trh e non il tdh.

Tuttavia, l'analisi completa del genoma di un ceppo di *V. parahaemolyticus* isolato nel 2003 ha rivelato meccanismi patogenetici più complessi di quanto precedentemente ipotizzato, essendo stata dimostrata l'esistenza di due distinti sistemi di secrezione di tipo III (T3SS) sui cromosomi 1 e 2, rispettivamente indicati come T3SS1 e T3SS2. In particolare, il TSS1 contribuisce principalmente alla citotossicità del microrganismo che induce, tra l'altro, autofagia e lisi cellulare. Il T3SS2, esistente nel cromosoma 2, è incluso in una grande isola di patogenicità di circa 80 kb che è caratteristicamente fiancheggiata da due geni tdh ed è coinvolto nell'enterotossicità di *V. parahaemolyticus* provocando l'accumulo di liquido intestinale in un modello di ansa ileale di coniglio.

Di conseguenza, la presenza del gene tdh è direttamente collegata all'esistenza di un T3SS. Tuttavia, i geni per T3SS2 non sono stati trovati nei ceppi di *V. parahaemolyticus* trh-positivi (KP-negativi), anche questi patogeni per l'uomo. Recentemente, la sequenza della regione circostante il gene trh dal ceppo trh-positivo TH3996 ha rivelato la presenza di un nuovo T3SS omologo al T3SS2, anch'esso inserito in un'isola di patogenicità. In modo simile ai ceppi tdh-positivi, la presenza del gene trh è legata al nuovo T3SS, che è presente in tutti i ceppi trh-positivi di *V. parahaemolyticus* testati.

Un altro fattore di patogenicità importante è rappresentato dal ToxR che interviene nella modulazione della persistenza e della virulenza batterica, inoltre, sarebbe coinvolto nell'espressione dei geni TDH, T3SS1 e T3SS2, probabilmente anche in dipendenza della densità cellulare del microrganismo, suggerendo una possibile connessione tra l'espressione del ToxR e il quorum sensing (QS) nei vibriani patogeni (un'azione simile è stata ipotizzata anche per il ToxR di *V. cholerae*).

Relativamente agli episodi di malattia alimentare questi vengono segnalati con maggiore frequenza nei Paesi in cui sussiste, da un lato, una maggiore prevalenza nei prodotti della pesca in virtù delle caratteristiche delle acque da cui essi vengono pescati o allevati, e dall'altro, un'elevata frequenza di consumo di tali prodotti crudi o poco cotti. La trasmissione all'uomo attraverso il consumo di prodotti della pesca è stata dimostrata per la prima volta

nel 1951 in Giappone a seguito del consumo di sardine essiccate che causò la morte di 20 persone e l'ospedalizzazione di 270 soggetti.

In Asia, *V. parahaemolyticus* è una delle più comuni cause di tossinfezione alimentare (circa il 70% degli episodi malattia alimentare) probabilmente anche in relazione al clima favorevole e alla temperatura dell'acqua. Dati simili provengono dal Giappone, paese nel quale, peraltro, l'incidenza in quest'ultimo decennio sembra in crescita. In questo paese, annualmente vengono segnalati da 500 a 800 episodi che coinvolgono circa 10.000 persone e il consumo di sashimi e sushi sono responsabili, rispettivamente, del 26% e del 23% dei casi.

Negli Stati Uniti la maggiore frequenza degli episodi è stata segnalata per consumo di polpa di granchio impropriamente cotta (cottura a vapore), anche se esistono numerose segnalazioni di casi di tossinfezione da *V. parahaemolyticus* in seguito a consumo di gamberi crudi o poco cotti e di ostriche crude. Nel 2006 i frutti di mare sono stati collegati a 177 casi a New York, Oregon e Washington; nel 2004, in Alaska, 62 casi sono stati collegati al consumo di ostriche crude.

È stato stimato che annualmente, negli Stati Uniti, *V. parahaemolyticus* è responsabile di circa 35.000 casi di tossinfezione alimentare. A differenza degli Stati Uniti e dell'Asia, le infezioni da *V. parahaemolyticus* sono raramente riportate in Europa (Feldhusen 2000) e, anche in questi casi la principale fonte di trasmissione all'uomo è rappresentata dal consumo di ostriche o mitili crudi o poco cotti. Tuttavia, in alcuni paesi del Mediterraneo sono stati segnalati focolai sporadici e studi recenti indicano che il numero di infezioni da *V. parahaemolyticus* sembrano essere in aumento (Baker-Austin et al. 2010; Lozano-León et al. 2003). Nell'Unione Europea, su 326 campioni alimentari raccolti nel 2019, il 9,8% (32), inclusi pesce crudo, gamberi e aragoste provenienti da paesi terzi, è risultato positivo per *Vibrio* spp. Nel 2019 sono stati segnalati quattro focolai di *Vibrio* in Francia e in Italia e *V. parahaemolyticus* è stato identificato come l'agente responsabile in tutti i focolai francesi (Letchumanan et al. 2019).

La dose infettante può variare da ceppo a ceppo, mediamente tra  $2 \times 10^5$  e  $3 \times 10^7$  CFU, tuttavia, in nuovi cloni, come ad es. ST36, è stata evidenziata una dose infettante più bassa rispetto ai precedenti isolati, compresa tra  $10^3$  e  $10^4$  cellule. In focolai segnalati in Canada e negli USA,

occorsi tra il 1997 e il 1998, i campioni di ostriche incriminate contenevano <200 UFC/g di batteri a testimonianza che in alcuni casi la malattia può manifestarsi anche con livelli di contaminazione molto più bassi di quelli normalmente considerati.

La sintomatologia è caratterizzata da diarrea acquosa, nei casi più gravi muco-sanguinolenta, accompagnata da crampi addominali, nausea, febbre mal di testa e brividi. Essa compare, in media, dopo 15 ore (da 4 a 96 ore) dall'ingestione e si risolve in genere in meno di 3 giorni. *V. parahaemolyticus* colonizza l'intestino e produce le tossine che causano il danno cellulare, la perdita di fluidi ed elettroliti.

La gastroenterite è in genere autolimitante tuttavia, in alcuni casi, in soggetti non sottoposti a cure mediche, immunosoppressi o affetti da patologie epatiche, si può avere setticemia. Due episodi mortali sono stati segnalati negli USA a seguito dell'infezione di ferite occorse durante l'uragano Katrina nel 2005.

### **1.13 *Vibrio vulnificus***

*Vibrio vulnificus* è un microrganismo naturalmente presente nelle acque marine, costiere e di estuario, può essere isolato dai sedimenti, dal plancton, da molluschi, crostacei e pesci. La densità è notevolmente influenzata dalla temperatura, con variazioni in base ai distretti geografici. Ad esempio, la temperatura più bassa d'isolamento è stata 8°C nella Baia di Chesapeake e 12,5°C lungo le coste del Golfo degli Stati Uniti, sebbene il microrganismo preferisca temperature superiori a 18°C. In ambienti tropicali il principale fattore che ne influenzerebbe la concentrazione sarebbe la salinità. Nelle acque degli Stati Uniti, ad esempio, sono state riscontrate concentrazioni più elevate di *V. vulnificus* con valori di salinità tra il 5% e il 25% e più basse del 58-88% con valori di salinità del 30%. Allo stesso modo sono state rilevate concentrazioni di *V. vulnificus* di 10<sup>4</sup> CFU/g nelle ostriche della costa del Golfo degli Stati Uniti durante i mesi estivi a fronte di <10/g durante la stagione invernale. Di conseguenza, la maggior parte delle infezioni umane si registrano nei paesi tropicali o subtropicali anche se, occasionalmente, piccoli focolai, a seguito dell'esposizione ad acqua di mare contaminata o da consumo di frutti di mare, sono stati segnalati anche in Danimarca durante i mesi estivi (J. D. Oliver 2005). Recentemente sono stati descritti in

Israele diversi casi di infezioni dei tessuti molli in pazienti che avevano manipolato pesci d'acqua dolce (tilapie e carpe) allevati in stagni (Zaidenstein et al. 2008).

Sulla base delle caratteristiche biochimiche, sono noti tre biotipi di *V. vulnificus* in grado di causare infezioni nell'uomo. Il biotipo 1, il più comune, si trova prevalentemente in ambienti salati e in acque salmastre di tutto il mondo; il biotipo 2 occupa una nicchia più specifica trovandosi in acque salate in Estremo Oriente e Europa occidentale utilizzate per l'allevamento di anguille (genere *Anguilla*); il biotipo 3 è stato isolato in allevamenti di pesci d'acqua dolce soprattutto in Israele e, dal punto di vista genetico, sarebbe un ibrido tra il tipo 1 e il 2.

Il biotipo 1 è il principale agente di malattia nell'uomo ed è responsabile di tutti i quadri che caratterizzano la malattia (sepsi primaria e fascite necrotizzante), con tassi di mortalità superiori al 50%. Il biotipo 2 di solito è un grave patogeno delle anguille, ma in rare occasioni può causare infezioni delle ferite nell'uomo. Anche il biotipo 3 può causare gravi infezioni dei tessuti molli nell'uomo, che richiedono l'amputazione, ma il tasso di mortalità sembra essere inferiore all'8%. In ogni caso, tutti i ceppi sono potenzialmente considerati patogeni per l'uomo.

La maggior parte delle infezioni sono segnalate in pazienti affetti da patologie epatiche croniche, come cirrosi o epatite, immunodeficienze, disturbi ematologici caratterizzati da elevati livelli di ferro, disturbi gastrointestinali (ad es. interventi chirurgici, ulcere, acloridria), diabete mellito, malattie croniche, in particolare quelle cardiache e l'età avanzata (>60 anni). Gli uomini sono più colpiti delle donne. Il microrganismo moltiplica rapidamente quando la saturazione della transferrina supera il 70%.

A seguito dell'ingestione di prodotti della pesca contaminati, in particolare ostriche crude, dopo un periodo medio d'incubazione di 16-18 ore, compaiono i sintomi di una setticemia primaria caratterizzata da febbre, brividi, nausea, ipotensione e, meno frequentemente, dolori addominali, vomito e diarrea. Nei soggetti con fattori predisponenti, la setticemia primaria sviluppa molto velocemente, entro uno o due giorni, con esiti fatali (> 50% di mortalità).

La dose infettante è intorno a  $10^3$  UFC/g soprattutto in soggetti con patologie predisponenti o con comportamenti a rischio (es. abuso di alcol) (Johnston, Becker, e McFarland 1985).

La forma cutanea può essere considerata, in un certo senso, una malattia professionale che colpisce prevalentemente chi manipola prodotti della pesca contaminati o per esposizione di ferite aperte in acque contaminate. Il microrganismo penetra attraverso lesioni cutanee e dopo un periodo di incubazione di circa 12 ore compaiono i primi sintomi rappresentati da dolori intensi, eritema ed edema nel punto d'ingresso del germe seguiti dalla formazione di vescicole, spesso circondate da un alone blu-porpora che, nel giro di qualche giorno vanno incontro a necrosi.

#### **1.14 Fattori di patogenicità e sintomatologia nell'uomo**

*V. vulnificus* possiede molteplici fattori di virulenza. Riesce a sopravvivere in ambienti acidi come quello dello stomaco grazie alla regolazione della produzione di lisina decarbossilasi e superossido di manganese dismutasi (MnSOD). La lisina decarbossilasi converte la lisina in cadaverina, che funziona sia come neutralizzatore di acidi (attraverso deaminazione) che come scavenger di radicali superossido. Il MnSOD contribuisce anche alla neutralizzazione degli acidi e alla riduzione dello stress ossidativo con un meccanismo ancora non chiaro.

*V. vulnificus* penetra, dunque, attraverso la parete intestinale e raggiunge il flusso sanguigno; ciò comporta l'attivazione del complemento e la produzione di citochine da parte dei neutrofili e dei macrofagi ma grazie a un polisaccaride superficiale (CPS) il microrganismo resiste alla fagocitosi e all'attività del complemento.

Si ritiene che molte di queste citochine intervengano nella mediazione della risposta infiammatoria sistemica: tra le più importanti, ricordiamo l'interleuchina (IL)-1b, IL-6, IL-8 e il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-a). Sebbene questi mediatori siano probabilmente promotori della sepsi, carenze di citochine proinfiammatorie come quelle trovate in alcuni pazienti con infezione da *V. vulnificus* e affetti da patologie croniche a carico del fegato sono paradossalmente associate a scarsi effetti. Questo suggerirebbe che entrambi gli estremi, cioè inadeguata espressione di citochine o induzione di citochine iperattive, può essere o è una delle principali cause che contribuiscono all'elevata mortalità associata al microrganismo.

Altri fattori di virulenza sono i siderofori, *V. vulnificus* infatti è incapace di crescere in siero umano con livelli normali di ferro, mediante i siderofori, però, è in grado di sottrarre questo elemento alle sieroproteine che lo legano, transferrina e lattoferrina.

Tra le esotossine, la Vvha emolisina facilita il rilascio di ioni Fe nell'emoglobina, contribuendo alla virulenza batterica attraverso la sua attività emolitica e citotossica (Yuan, Feng, e Wang 2020). Vvpe è una metalloproteasi extracellulare coinvolta nella formazione di necrosi tissutale, aumento della permeabilità vascolare e formazione di vescicole, caratteristiche dell'infezione sistemica del microrganismo.

A differenza degli altri vibrioni *V. vulnificus* non provoca di regola epidemie ma solo episodi sporadici. Tra i prodotti della pesca, i molluschi bivalvi e, in particolare, le ostriche (specialmente se consumate crude) rappresentano la principale fonte alimentare di trasmissione all'uomo e si ritiene che siano responsabili del 95% circa di tutti i decessi legati al consumo di prodotti della pesca negli Stati Uniti (Jay, Loessner, e Golden 2009). Nei molluschi si trova solitamente in concentrazioni inferiori rispetto a *V. parahaemolyticus*, ma può raggiungere valori superiori a  $10^5$  UFC/g se i molluschi sono pescati in acque molto calde. Esso è presente pure nel Mar Mediterraneo ma in quantità inferiore rispetto ad altre aree geografiche; questa minore incidenza è probabilmente da imputare ad una maggiore salinità delle sue acque.

Livelli superiori a  $10^6$  per g sono stati segnalati dall'intestino di pesci bentonici che abitano le scogliere di ostriche e in Giappone, le più alte densità di *V. vulnificus* sono state osservate in pesci pescati nel lago Shinji.

La contaminazione degli alimenti da parte del microrganismo può essere difficile da rilevare perché esso non incide in nessun modo sulle caratteristiche organolettiche dei prodotti né la normativa del settore ne prevede specificatamente la ricerca.

### **1.15 I batteri vitali ma non coltivabili (VBNC)**

Lo stato vitale ma non coltivabile (VBNC), uno stato fisiologico speciale, è stato scoperto per la prima volta da Xu et al. nel 1982 (Xu et al. 1982), che sottoponendo una coltura in fase di crescita esponenziale di *V. cholerae* ed una di *Escherichia coli* in un microcosmo privo di

nutrienti (ad esempio, in acqua di mare o artificiale sterile priva di nutrienti) a bassa temperatura (4 °C), hanno riscontrato una riduzione della coltivabilità sui terreni convenzionali, pur rimanendo metabolicamente attive e con evidente modificazione della forma. Questo è stato il primo esperimento che ha gettato le basi per distinguere la vitalità dalla coltivabilità, poiché la vitalità cellulare è stata tipicamente riconosciuta come la capacità di produrre colonie visibili su terreni solidi o mostrare torbidità in un mezzo liquido (Colwell 2000; Pinto, Santos, e Chambel 2015). Da allora, lo stato VBNC è stato ampiamente studiato e ha dimostrato di essere una strategia di sopravvivenza unica che si verifica in un'ampia gamma di batteri Gram-negativi, meno frequentemente nei batteri Gram-positivi ed in alcune specie fungine (James D. Oliver 2010; Pinto, Santos, e Chambel 2015). Le cellule entrano nello stato VBNC in risposta a una varietà di stressori ambientali, che danno inizio a una complessa serie a cascata di eventi cellulari (Ayrapetyan e Oliver 2016). Nello stato VBNC, i batteri mostrano una crescita inferiore e livelli ridotti di metabolismo, ad esempio c'è un rallentamento della frequenza respiratoria, del trasporto dei nutrienti e della sintesi proteica. Molte specie batteriche VBNC riescono a ridurre le dimensioni cellulari, cambiando forma e passando ad esempio da una caratteristica forma bastoncellare ad una forma sferica coccoide più piccola. Il rapporto superficie/volume può aiutare i batteri a ridurre il loro fabbisogno energetico (Bodor et al. 2020; Pinto, Santos, e Chambel 2015). Inoltre, le cellule VBNC di solito contengono concentrazioni ridotte di citoplasma, di proteine totali e di acidi grassi di membrana, mantenendo però la loro integrità strutturale e la replicazione cellulare. Infatti, le cellule VBNC contengono livelli di ATP relativamente elevati e mostrano un alto potenziale di membrana delle pareti cellulari del peptidoglicano (Ayrapetyan e Oliver 2016; Pinto, Santos, e Chambel 2015). Inoltre, le cellule VBNC mostrano una ridotta attività della superossido dismutasi e un aumento del danno ossidativo. A causa di questi cambiamenti, le cellule VBNC hanno una maggiore resistenza agli antibiotici e agli stress fisici e chimici rispetto alle cellule coltivabili. Inoltre, il potenziale di virulenza tra i patogeni VBNC non è chiaro. Alcuni agenti patogeni VBNC non sono in grado di causare malattie fino a quando non riguadagnano la coltivabilità. Al contrario, altri rimangono potenzialmente patogeni poiché continuano ad esprimere fattori di patogenicità (Dong et al. 2020). Un altro stato batterico non coltivabile che è simile allo stato VBNC è la dormienza, definita come uno



stato reversibile di arresto metabolico (Kell et al. 1998). Lo stato VBNC si presenta in modo leggermente diverso rispetto alla dormienza perché le cellule VBNC mostrano un'attività metabolica, che non viene invece rilevata nelle cellule dormienti (Mukamolova et al. 2003).

Le cellule batteriche VBNC possono tornare a uno stato attivo e coltivabile quando ricevono dei segnali molecolari che indicano il ripristino di condizioni ambientali favorevoli (Colwell 2000; Pinto, Santos, e Chambel 2015; Dong et al. 2020).

Ad oggi, dopo la prima scoperta da parte di Xu, sono state identificate 101 specie batteriche appartenenti ad almeno 50 generi che possono entrare nello stato VBNC (tabella 7), inclusi agenti di patologia umana, tra cui *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Yersinia pestis* e, naturalmente, numerose specie del genere *Vibrio*.

Batteri 50 generi e 101 specie	
<b>Proteobacteria</b> (38 generi, 75 specie)	<b>Gammaproteobacteria</b> (continua)
<b>Alphaproteobacteria</b> (6 generi, 8 specie)	<i>Vibrio campbellii</i>
<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Vibrio cincinnatiensis</i>
<i>Methylocella tundrae</i>	<i>Vibrio fischeri</i>
<i>Methylocystis hirsuta</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Methylocystis parvus</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Vibrio proteolytica</i>
<b>Betaproteobacteria</b> (5 generi, 6 specie)	<i>Vibrio salmonicida</i>
<i>Acidovorax citrulli</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<b>Epsilonproteobacteria</b> (4 genera, 8 specie)
<b>Gammaproteobacteria</b> (23 generi, 53 specie)	<i>Arcobacter butzleri</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Campylobacter lari</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Klebsiella planticola</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Erwinia amylovora</i>	<b>Actinobacteria</b> (continua)

<b>Gammaproteobacteria</b> (continua)	<b>Actinobacteria</b> (5 genera, 12 species)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Arthrobacter albidus</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>
<i>Methylocaldum gracile</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>
<i>Methylococcus capsulatus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Methylomicrobium alcaliphilum</i>	<i>Micrococcus flavus</i>
<i>Methylomonas methanica</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Methylosarcina fibrata</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>Methylosinus sporium</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Methylosinus trichosporium</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Pasteurella piscicida</i>	<i>Rhodococcus biphenylivorans</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<b>Bacteroidetes</b> (1 genus, 1 species)
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Cytophaga allerginae</i>
<i>Pseudomonas syringae</i>	<b>Firmicutes</b> (6 genera, 13 species)
<i>Salmonella enterica</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Salmonella montevideo</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
<i>Salmonella oranienbur</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Lactobacillus lindneri</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Lactobacillus paracollinoides</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Shigella sonnei</i>	<i>Oenococcus oeni</i>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Vibrio mimicus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>

**Tabella 7.** Specie batteriche segnalate per entrare nello stato VBNC riportato da Zhang et al (Zhang et al. 2021).

In particolare, i vibriani sono soggetti a repentini cambiamenti dell'ambiente acquatico in cui sono naturalmente presenti, dovuti a modificazioni della temperatura, della concentrazione di nutrienti, di salinità e pH, alle quali reagiscono, entrando proprio nello stato VBNC, mantenendo però invariata la loro patogenicità. Durante la fase VBNC subiscono diverse modificazioni morfologiche e fisiologiche: cambiano dimensioni riducendo da 15 a 300 volte il loro volume, rallentano il ritmo respiratorio, incrementano le vie metaboliche in grado di evitare i danni indotti da carenze nutrizionali ed arrestano i cicli di divisione (Suffredini et al. 2014).

I patogeni VBNC erano inizialmente considerati incapaci di indurre infezioni, in realtà studi più recenti hanno dimostrato che la virulenza dei patogeni VBNC può essere recuperata dopo la rivificazione ed essere mantenuta anche durante lo stato non coltivabile, portando successivamente a infezione e malattia (Du et al. 2007; Sebastiano e Paolo Guglielmino 2012). Le cellule VBNC possono recuperare uno stato coltivabile dopo che lo stressore è stato rimosso e, quando le condizioni ambientali tornano vantaggiose, questi batteri possono ricominciare a moltiplicarsi (Zolfaghari et al. 2019). Non si esclude, inoltre, che diversi patogeni VBNC possano essere coinvolti in focolai di malattia alimentare. Infatti, quando si trovano nello stato VBNC, *V. parahaemolyticus* e *V. cholera*, mantengono l'attività metabolica e sono persino in grado di produrre fattori di virulenza (Alleron et al. 2013; Ayrapetyan e Oliver 2016; Morishige, Fujimori, e Amano 2015).

I batteri VBNC negli alimenti possono rappresentare un rischio per la salute pubblica a causa di una sottovalutazione delle cellule batteriche vitali totali e per la loro capacità di rianimare virulente. Per questi motivi, negli ultimi anni, si è cercato di sviluppare tecniche sempre più all'avanguardia per rilevare selettivamente i batteri nello stato VBNC (Ling et al. 2020; Telli e Doğruer 2019; Yoon et al. 2019).

## 1.16 “Rivificazione”

Le cellule VBNC possono tornare a uno stato metabolicamente attivo e coltivabile su terreni batteriologici convenzionali, sotto stimoli fisici, chimici e biologici, quali aumento della concentrazione di nutrienti, salinità, temperatura, ecc..

La cellula VBNC è metabolicamente attiva sebbene le cellule non siano in grado di moltiplicarsi per formare colonie sui normali terreni colturali. Come abbiamo già ricordato, questa forma è stata evidenziata in numerosi batteri, ma il modo migliore per indurre la rivificazione rimane ancora controverso. Mentre si trovano nello stato VBNC, queste cellule sono in grado di resistere a una varietà di stress normalmente fatali, incluso il trattamento antibiotico, il trattamento termico, l'aumento della salinità, l'aumento del pH senza pregiudicare la successiva capacità di moltiplicarsi e mantenendo la loro patogenicità (Nowakowska e Oliver 2013).

Inizialmente si è supposto che lo stato VBNC poteva essere interrotto dal trattamento con alte temperature (Novitsky e Morita 1976; Whitesides e Oliver 1997); sembra, invece, che i trattamenti termici, soprattutto in campo alimentare, non siano sempre efficaci per la diversa termoresistenza esistente tra le specie. Durante l'innalzamento della temperatura in effetti si ha una certa crescita batterica ma che può riguardare solo una parte, anche molto ridotta, della popolazione VBNC. Ad esempio, Ravel ed altri (Ravel et al. 1995) hanno riportato che dopo un aumento della temperatura a 30 °C, è stata evidenziata una crescita di alcune cellule VBNC di *V. cholerae*, ma non la rivificazione di tutte le cellule presenti in coltura. Durante la fase iniziale della rivificazione, sono sintetizzate proteine ed enzimi utili alla costruzione del peptidoglicano o di altri componenti della membrana batterica (Novitsky e Morita 1976). Recentemente, è stato segnalato che anche il danno ossidativo può avere un ruolo chiave nel far entrare i batteri nello stato VBNC; per tale ragione un significativo aumento di enzimi ad attività antiossidante, tra cui catalasi e superossidodismutasi (SOD), sono sintetizzati durante la fase di rivificazione cellulare, un segnale che si esplica attraverso il ripristino e l'aumento delle attività metaboliche (Maertens, Matroule, e Van Houdt 2021).

Ciò che è stato inizialmente supposto e successivamente comprovato è che esiste una regolazione dell'espressione di alcuni geni in grado di rivificare i batteri dalla forma VBNC (Rice et al. 2000). Il gene RpoS, ad esempio, codifica per la subunità S dell'RNA polimerasi, che inizia la trascrizione di numerosi geni coinvolti nella risposta allo stress ambientale. L'espressione di rpoS potrebbe essere controllata a diversi livelli, come trascrizione, traduzione e stabilità proteica. I *V. cholerae* con una rpoS mutata sono più sensibili alla carenza di carbonio, alla elevata osmolarità e allo stress ossidativo (Hengge-Aronis 2002; Yildiz e Schoolnik 1998). RpoS è un fattore importante nella rivificazione e con l'aumento della segnalazione di AI-2 stimola l'espressione di rpoS attraverso l'azione di LuxR. Il secondo messaggero di-GMP ciclico (c-di-GMP), attiva la formazione del biofilm e inibisce la motilità. Le proteine che regolano LuxR (ad esempio VpsT) rilevano il di-GMP ciclico attivando la trascrizione del gene *vps* e diminuiscono la motilità. Livelli elevati di di-GMP ciclico reprimono la trascrizione di rpoS inducendo VpsT, che si lega al promotore rpoS (Wang et al. 2014). Ciò induce successivamente l'espressione della catalasi, consentendo così alle cellule di superare le proprietà tossiche nei mezzi batterici e di tornare a uno stato coltivabile.

La presenza di batteri VBNC nell'ambiente preoccupa anche nell'ottica della salvaguardia degli equilibri biologici dello stesso ed è, dunque, temibile la rivificazione numericamente sostenuta di certe specie che potrebbero interferire in detti equilibri. Nel comparto la disponibilità di nutrienti così come le modificazioni chimico-fisiche potrebbero essere di primaria importanza.

Tra gli stimoli di rivificazione esterni sono stati utilizzati con successo sia la proteina Rpf (Mukamolova et al. 2006) che il piruvato di sodio, per il recovery di VBNC da ambienti naturali, che agirebbero a concentrazioni minime promuovendo la crescita di cellule coltivabili di oltre 100 volte.

Alcuni di questi fattori ambientali, come pH, salinità e temperatura, potendo interferire nei meccanismi del c.d. quorum-sensing influenzano le dinamiche dei VBNC. Il quorum-sensing è la regolazione dell'espressione genica in risposta a delle modificazioni di densità della popolazione cellulare, nel tentativo cioè di “comunicare” tra loro una variazione di densità

della popolazione in un determinato ambiente o di valutare la posizione ambientale delle cellule (Miller e Bassler 2001). La comunicazione cellula-cellula può avvenire sia all'interno della stessa specie ma anche tra specie batteriche differenti. In particolare, i batteri che rilevano il quorum-sensing producono e rilasciano molecole di segnale chiamate autoinduttori che aumentano di concentrazione in funzione della densità cellulare. Questo aumento di concentrazione dell'autoinduttore porta ad un'alterazione dell'espressione genica. Sia i batteri Gram-positivi che i Gram-negativi utilizzano gli autoinduttori come segnale per l'inizio del quorum-sensing. Sebbene la natura dei segnali chimici, i meccanismi di trasmissione del segnale e i geni bersaglio controllati dai sistemi del quorum batterico differiscano, in ogni caso la capacità di comunicare tra loro consente ai batteri di coordinare l'espressione genica, e quindi il comportamento, dell'intera comunità. Si è ipotizzato che gli autoinduttori del quorum-sensing riescano a mediare la rivivificazione delle cellule VBNC, come dimostrato per la molecola AI-2 che stimola l'espressione di *rpoS* attraverso l'azione di LuxR, che a sua volta induce l'espressione della catalasi (*katG*), enzima essenziale per la rivivificazione dallo stato VBNC. Le molecole di rilevamento del quorum (CAI-1 e AI-2), possono, dunque, catalizzare la coltivabilità di *V. cholerae* (Bari et al. 2013).

## 2. Parte sperimentale

La parte sperimentale dell'indagine è stata condotta in due fasi. La prima è stata svolta presso l'Università degli Studi di Messina, dove si è proceduto alla ricerca di *V. parahaemolyticus* VBNC in molluschi bivalvi congelati, regolarmente commercializzati. La seconda è stata condotta presso la Freie University di Berlino, in cui si è proceduto alla determinazione di *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* nello stato VBNC in gamberi congelati. Le ricerche sono state effettuate impiegando sia tecniche tradizionali che molecolari.

### 2.1 Parte prima

Ricerca di *Vibrio parahaemolyticus* VBNC in molluschi bivalvi congelati.

### 2.2 Materiali e Metodi

L'indagine è stata condotta su 77 campioni di molluschi bivalvi congelati, di cui n. 42 vongole (54,5%) e n. 35 mitili (45,5%), acquistati in diversi punti vendita presenti in Sicilia (Italia), nel periodo compreso tra febbraio 2020 e marzo 2021.



**Figura 6.** Campioni di vongole utilizzati nella sperimentazione.



Come riportato nella tabella 8, le vongole appartenevano a cinque differenti specie (*Paphia undulata*, *Chamelea gallina*, *Paphia textile*, *Meretrix lyrata*, *Meretrix meretrix*), provenivano da tre zone di pesca (zona FAO 71, zona FAO 37 e zona FAO 61) e si presentavano sgusciate, n. 35/42 (83,3%), e con guscio, n. 7/42 (16,7%). Le cozze, invece, tutti appartenenti ad una sola specie (*Mytilus chilensis*), provenivano dalla stessa zona di pesca (zona FAO 87) e risultavano n. 32/35 (91,4%) sgusciate, n. 2/35 (5,7%) a mezzo guscio e n. 1/35 (2,9%) a guscio intero.

Id campione	Nome scientifico	Tipologia prodotto	Zona FAO
1	<i>Paphia undulata</i>	vongole sgusciate	71
2	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
3	<i>Paphia undulata</i>	vongole sgusciate	71
4	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze mezzo guscio	87
5	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
6	<i>Chamelea gallina</i>	vongole sgusciate	71
7	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
8	<i>Paphia undulata</i>	vongole sgusciate	71
9	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
10	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
11	<i>Paphia undulata</i>	vongole sgusciate	71
12	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
13	<i>Paphia undulata</i>	vongole con guscio	71
14	<i>Chamelea gallina</i>	vongole sgusciate	37
15	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
16	<i>Chamelea gallina</i>	vongole sgusciate	71
17	<i>Chamelea gallina</i>	vongole sgusciate	71
18	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
19	<i>Chamelea gallina</i>	vongole sgusciate	71
20	<i>Paphia textile</i>	vongole sgusciate	61
21	<i>Chamelea gallina</i>	vongole sgusciate	71
22	<i>Paphia textile</i>	vongole sgusciate	61
23	<i>Chamelea gallina</i>	vongole sgusciate	71
24	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
25	<i>Chamelea gallina</i>	vongole sgusciate	71

Id campione	Nome scientifico	Tipologia prodotto	Zona FAO
26	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
27	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
28	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
29	<i>Meretrix lyrata</i>	vongole con guscio	61
30	<i>Paphia undulata</i>	vongole sgusciate	71
31	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze con guscio	87
32	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
33	<i>Paphia undulata</i>	vongole sgusciate	71
34	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
35	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
36	<i>Paphia undulata</i>	vongole sgusciate	71
37	<i>Paphia textile</i>	vongole sgusciate	61
38	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
39	<i>Paphia undulata</i>	vongole sgusciate	71
40	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
41	<i>Paphia textile</i>	vongole sgusciate	37
42	<i>Paphia textile</i>	vongole sgusciate	61
43	<i>Paphia textile</i>	vongole sgusciate	61
44	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
45	<i>Paphia undulata</i>	vongole sgusciate	71
46	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
47	<i>Chamelea gallina</i>	vongole sgusciate	71
48	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
49	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
50	<i>Meretrix meretrix</i>	vongole con guscio	61
51	<i>Paphia undulata</i>	vongole sgusciate	71
52	<i>Paphia undulata</i>	vongole sgusciate	71
53	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze con guscio	87
54	<i>Meretrix lyrata</i>	vongole con guscio	61
55	<i>Paphia undulata</i>	vongole sgusciate	71
56	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
57	<i>Paphia textile</i>	vongole sgusciate	61
58	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
59	<i>Meretrix lyrata</i>	vongole sgusciate	61

Id campione	Nome scientifico	Tipologia prodotto	Zona FAO
60	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
61	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
62	<i>Chamelea gallina</i>	vongole sgusciate	71
63	<i>Chamelea gallina</i>	vongole sgusciate	71
64	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
65	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
66	<i>Chamelea gallina</i>	vongole sgusciate	71
67	<i>Chamelea gallina</i>	vongole sgusciate	71
68	<i>Paphia textile</i>	vongole sgusciate	61
69	<i>Meretrix lyrata</i>	vongole con guscio	61
70	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
71	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
72	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
73	<i>Paphia textile</i>	vongole sgusciate	61
74	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
75	<i>Mytilus chilensis</i>	cozze sgusciate	87
76	<i>Paphia textile</i>	vongole sgusciate	61
77	<i>Meretrix meretrix</i>	Vongole con guscio	61

**Tabella 8.** Elenco dei campioni utilizzati per la sperimentazione.

I campioni sono stati trasferiti in laboratorio a temperatura controllata e analizzati entro 24 ore. Preliminarmente i campioni venivano scongelati a temperatura < 5°C per 4 ore per evitare shock termici, quindi posti a bagnomaria a < 20°C per 15-20 minuti, omogeneizzati e suddivisi in aliquote di 25 g. Ciascuna aliquota è stata diluita con acqua peptonata salina sterile (APTS) (pH 8,6 ± 0,2; Biolife, Milano, Italia) in un rapporto di 1:9 (p/v) e omogeneizzata con l'utilizzo di uno stomacher (Stomacher® 400 Circulator, International PBI s.p.a., Milano, Italia) per 2 min. I campioni così preparati sono stati processati per determinare *V. parahaemolyticus* tramite metodi di coltura standard, q-PCR e PMA q-PCR per determinare le cellule vitali e quelle VBNC.

### **2.3 Ricerca di *Vibrio parahaemolyticus* con metodo colturale**

Da ciascuna aliquota si seminava 1 ml di brodocoltura, in duplicato, su piastre di Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS) (Difco, Le Point de Claix, Francia), al 2,5% di NaCl, che venivano incubate a 37°C per 24-48 ore. Per la ricerca qualitativa, le brodocolture in APTS venivano incubate a 37°C per 24 h e da queste si effettuavano semine su TCBS agar. Dopo l'incubazione le piastre venivano controllate per la presenza/assenza di colonie tipiche.

### **2.4 Induzione dello stato VBNC**

Per la presente sperimentazione è stato utilizzato il ceppo certificato di *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 che, inizialmente conservato in brodo glicerolo al 20% (v/v) a -80°C, veniva seminato su piastre di agar nutritivo al 3% di NaCl (p/v), incubato a 37°C per 18-24 h. Una colonia è stata prelevata e successivamente sospesa in brodo di soia triptico (TSB; Biolife) al 3,0% di NaCl (p/v), incubato in agitazione (200 r/min) a 37°C per tutta la notte. La brodocoltura così ottenuta veniva centrifugata a 8.400 rpm per 5 minuti a 4°C, si effettuavano, quindi, due lavaggi con acqua di mare artificiale (ASW) per ottenere, infine, le sospensioni cellulari.

I pellet così ottenuti, con una concentrazione pari a 10<sup>8</sup>CFU/mL, venivano risospesi in beute contenenti 200 ml di PBS sterile a diversa concentrazione salina (3%, 5%, 10%), a pH 5 e mantenuti fino a 90 giorni a 4°C, per indurre lo stato VBNC. L'assenza di cellule coltivabili è stata confermata mediante semina, a intervalli di 40, 50, 60, 70, 80 e 90 gg., su agar di soia triptico al 3% di NaCl (TSA, Biolife, Italia), incubate a 37°C.

### **2.5 Cellule morte**

Un ml della sospensione cellulare fresca è stata trattata a 90°C per 15 minuti per ottenere le cellule morte; anche in questo caso l'assenza di cellule coltivabili è stata confermata mediante semina su agar di soia triptico al 3% di NaCl.

## 2.6 Curva di calibrazione

Le curve di calibrazione sono state ottenute da diluizioni scalari di *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 a partire da una brodocoltura, in fase stazionaria, con una concentrazione pari a  $10^9$  CFU/ml.

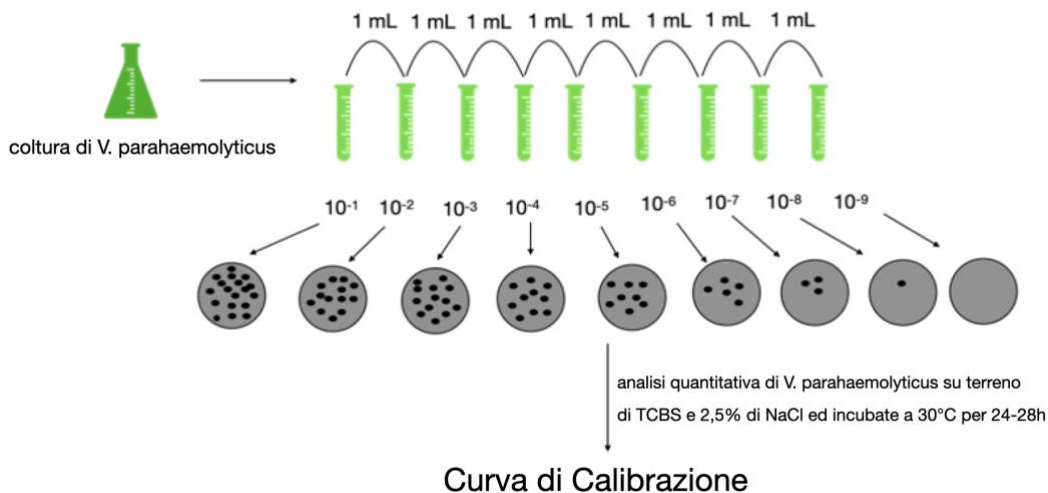
Per ottimizzare il trattamento con PMA a temperatura ambiente, ad aliquote di 500  $\mu$ l di colture vive, inattivate con il calore e VBNC è stato aggiunto il PMA a una concentrazione finale di 0, 10, 15, 20, 50 e 100  $\mu$ M. In base ai valori CT ottenuti è stata calcolata in 20  $\mu$ M la concentrazione di PMA in grado di discriminare le cellule vitali e VBNC dalle cellule morte.

Da ciascuna diluizione venivano prelevate due aliquote, da 1ml ciascuna, che venivano poste in provette eppendorf sterili. Per una di esse si procedeva al trattamento con PMA in condizioni ottimali per l'estrazione, la quantificazione del DNA e l'allestimento, in triplice, per ciascuna diluizione delle PMA-qPCR, in cui, ad ogni punto della curva corrispondeva una diluizione espressa in log 10 CFU/mL. Dalle restanti aliquote, non trattate con PMA, il DNA estratto veniva utilizzato per la curva standard della qPCR.

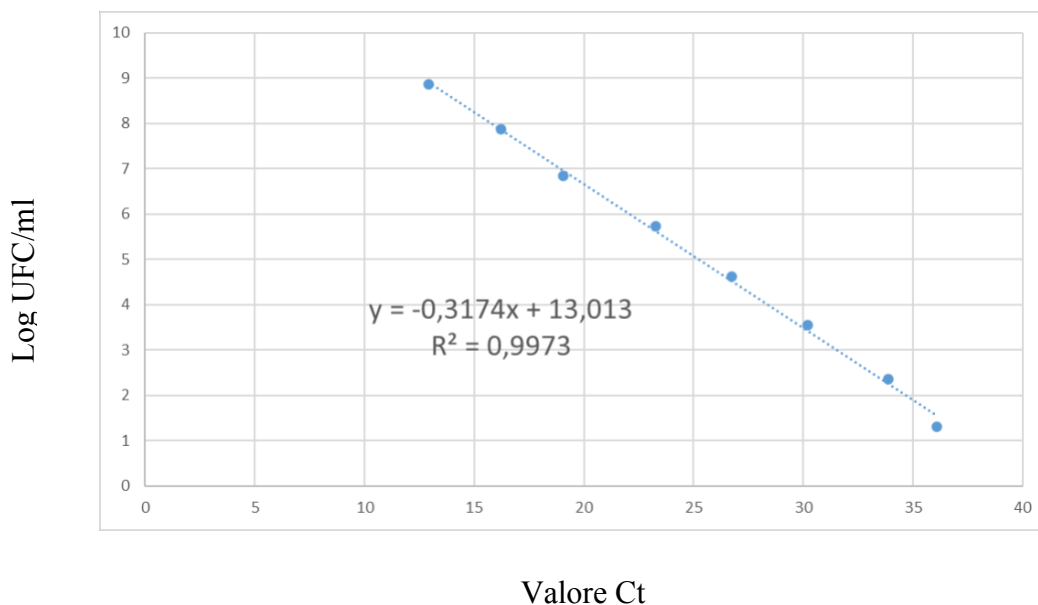
I passaggi per la creazione della curva di calibrazione sono riassunti nella Figura 6.

I coefficienti di correlazione ( $R^2$ ) e le efficienze di amplificazione sono state calcolate come precedentemente descritto da Rasmussen (Rasmussen 2001). Il limite di rivelazione (LOD) e la sensibilità della qPCR e PMA-qPCR, sono stati verificati dalle diluizioni seriali di ciascuno standard preparato secondo Caraguel et al. (Caraguel et al. 2011). È stata inoltre confermata una correlazione lineare ( $r^2=0,997$ ) tra il valore Ct e log CFU/mL (Figura 6).

La sensibilità della curva di calibrazione è stata, inoltre, testata con miscele di cellule vive, morte e VBNC a diversa concentrazione. Il limite di rilevamento è stato calcolato in 1,30 log CFU/mL e valori di Ct maggiori di 36, in questo studio, sono stati considerati negativi.



**Figura 6.** Schema riassuntivo per la realizzazione della curva di calibrazione.



**Figura 7.** Correlazione tra Log UFC/ml ed il valore Ct per la creazione della Curva standard.

## 2.7 Trattamento con PMA ed estrazione del DNA genomico

L'analisi PMA-qPCR per il rilevamento dello stato VBNC di *V. parahaemolyticus* è stata eseguita come descritto da Liu et al. (Liu et al. 2018). Brevemente, il PMA (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) è stato diluito in acqua ultrapura per ottenere una soluzione madre alla concentrazione di 20 mM e conservato a -20°C al buio, secondo le istruzioni del produttore.

Tutti i campioni sono stati divisi in due gruppi: il controllo non trattato e il gruppo trattato con PMA. In breve, 1 mL di colorante PMA è stato aggiunto al campione per ottenere una concentrazione finale di 20  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , come descritto precedentemente da alcuni autori (Liu et al. 2018; Lv et al. 2016). I campioni trattati sono stati incubati al buio per 10 minuti a temperatura ambiente, per consentire al PMA di entrare nelle cellule morte. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati esposti ad una lampada alogena da 650 W a 20 cm di distanza e successivamente posti in ghiaccio per 30 minuti. In seguito alla reazione fotoindotta, il PMA libero è stato rimosso mediante centrifugazione a 5.000 rpm per 10 minuti prima dell'estrazione del DNA. I campioni di DNA batterico, (sia i controlli non trattati che i campioni trattati con PMA) sono stati estratti utilizzando il mini kit DNA (Qiagen, Germania), seguendo il protocollo del produttore. La qualità e la concentrazione degli estratti di DNA sono state determinate mediante misurazione spettrofotometrica a 260/280 e 260/230 nm utilizzando uno spettrofotometro SmartSpec Plus (Bio-Rad, Milano, Italia). Tutti i campioni estratti sono stati conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'utilizzo.

## 2.8 Analisi real-time PCR

Tutti i campioni di molluschi bivalvi congelati sono stati esaminati mediante qPCR specie-specifica e in combinazione con PMA. Come gene bersaglio è stato utilizzato il gene *tlh* di *V. parahaemolyticus* e le sequenze dei primer sono state disegnate in accordo con Bej et al. (Bej et al. 1999) come riportato: primerF Ltl 5'-AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG-3' e primerR Rtl 5'-GCCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC-3'. La lunghezza dell'amplicone è di 450 bp. La miscela di amplificazione PCR conteneva 10  $\mu\text{L}$  di PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Italia), 2  $\mu\text{L}$  del campione di DNA, 2  $\mu\text{L}$  di ciascun primer (concentrazione finale 0,6  $\mu\text{M}$ ) e 4  $\mu\text{L}$  di acqua sterile, per un volume finale totale di 20  $\mu\text{L}$ . Le fasi del ciclo di reazione sono: 2 min a  $50^{\circ}\text{C}$ , 2 min a  $95^{\circ}\text{C}$  seguiti da 40 cicli di 15 s a  $95^{\circ}\text{C}$  e 1 min a  $60^{\circ}\text{C}$ . La qPCR è stata eseguita utilizzando lo strumento CFX96 Touch<sup>TM</sup> (Bio-Rad) munito di software Bio-Rad CFX manager 3.0.

## 2.9 Analisi Statistica

I risultati sono stati analizzati tramite il test statistico ANOVA, seguito da un test di confronto multiplo di Tukey ( $p < 0,05$ ; GraphPad Prism versione 9.0.0, GraphPad Software, San Diego, California, USA) per rilevare le differenze significative tra valori di CT e di Log CFU/g.

## 3. Risultati

Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi sia alla ricerca quantitativa che qualitativa di *V. parahaemolyticus* con i metodi di coltura standard. Le analisi qPCR e PMA-qPCR hanno permesso di rilevare forme VBNC solo in campioni di vongole. Quattordici campioni (18,2% di tutti i 77 campioni) sono risultati positivi al rilevamento qPCR. Il metodo PMA-qPCR è stato in grado di confermare la presenza di forme VBNC di *V. parahaemolyticus* in nove (11,7% di tutti i campioni) dei 14 campioni qPCR-positivi con valori compresi tra 1,67 e 2,29 Log UFC/ g (Tabella 9).



Campione	Tipo	Specie	zona FAO	Conta in piastra	CT		Log UFC/g	
					qPCR (morti + VBNC)	PMA - qPCR (VBNC)	qPCR (morti + VBNC)	PMA - qPCR (VBNC)
6	Vongole sgusc.	<i>Chamelea gallina</i>	71	NR	29.05 <sup>a</sup>	NR	3.79 <sup>a</sup>	NR
8	Vongole sgusc.	<i>Paphia undulata</i>	71	NR	31.18 <sup>b</sup>	34.54 <sup>a</sup>	3.12 <sup>b</sup>	2.05 <sup>a</sup>
11	Vongole sgusc.	<i>Paphia undulata</i>	71	NR	29.26 <sup>c</sup>	35.1 <sup>b</sup>	3.73 <sup>c</sup>	1.87 <sup>b</sup>
16	Vongole sgusc.	<i>Chamelea gallina</i>	71	NR	32.08 <sup>d</sup>	35.73 <sup>c</sup>	2.83 <sup>d</sup>	1.67 <sup>c</sup>
19	Vongole sgusc.	<i>Chamelea gallina</i>	71	NR	33.37 <sup>e</sup>	34.74 <sup>d</sup>	2.42 <sup>e</sup>	1.99 <sup>d</sup>
20	Vongole sgusc.	<i>Paphia textile</i>	61	NR	30.21 <sup>f</sup>	33.78 <sup>e</sup>	3.42 <sup>f</sup>	2.29 <sup>e</sup>
23	Vongole sgusc.	<i>Chamelea gallina</i>	71	NR	35.21 <sup>g</sup>	NR	1.84 <sup>g</sup>	NR
33	Vongole sgusc.	<i>Paphia undulata</i>	71	NR	29.74 <sup>h</sup>	35.58 <sup>f</sup>	3.57 <sup>h</sup>	1.72 <sup>f</sup>
36	Vongole sgusc.	<i>Paphia undulata</i>	71	NR	32.86 <sup>i</sup>	NR	2.58 <sup>i</sup>	NR
45	Vongole sgusc.	<i>Paphia undulata</i>	71	NR	27.32 <sup>l</sup>	34.62 <sup>g</sup>	4.34 <sup>l</sup>	2.03 <sup>a</sup>
51	Vongole sgusc.	<i>Paphia undulata</i>	71	NR	35.67 <sup>m</sup>	NR	1.69 <sup>m</sup>	NR
62	Vongole sgusc.	<i>Chamelea gallina</i>	71	NR	35.59 <sup>n</sup>	NR	1.72 <sup>n</sup>	NR
63	Vongole sgusc.	<i>Chamelea gallina</i>	71	NR	31.19 <sup>b</sup>	35.51 <sup>h</sup>	3.11 <sup>b</sup>	1.74 <sup>f</sup>
66	Vongole sgusc.	<i>Chamelea gallina</i>	71	NR	33.65 <sup>o</sup>	35.48 <sup>i</sup>	2.33 <sup>o</sup>	1.75 <sup>fg</sup>

<sup>i</sup> NR = non rilevato

<sup>ii</sup> Valori significativi ( $p < 0.05$ )

**Tabella 9** Campioni positivi per PMA-qPCR

I campioni positivi a forme VBNC di *V. parahaemolyticus* erano campioni sgusciati, appartenenti a tre diverse specie [(*Chamelea gallina* (n. 4/9; 44.4%), *Paphia undulata* (n. 4/9; 44.4%), *Paphia textile* (n. 1/9; 11.1%)] e provenienti dalle zone di pesca FAO 71e FAO 61.

## **4. Parte seconda**

Ricerca di *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* VBNC in gamberi congelati

### **4.1 Materiali e Metodi**

#### **4.1.1 Preparazione dei campioni**

Il presente studio è stato condotto su un totale di 27 campioni di gambero grigio (*Crangon crangon*) congelato, acquistati dalla Freie Universität di Berlino tra il 2018 e il 2021 e tutti provenienti dall'impianto di acquacultura della capitale tedesca. I campioni, analizzati entro 24 ore dall'arrivo al laboratorio, sono stati posti in frigorifero a 4°C e lasciati scongelare per circa 2 ore. Da ciascun campione, in condizioni di sterilità, si prelevavano 25 g di prodotto che venivano diluiti, in rapporto di 1:9 con PBS e omogeneizzati in stomacher (Stomacher® 400 Circulator, International PBI) per 1 minuto.

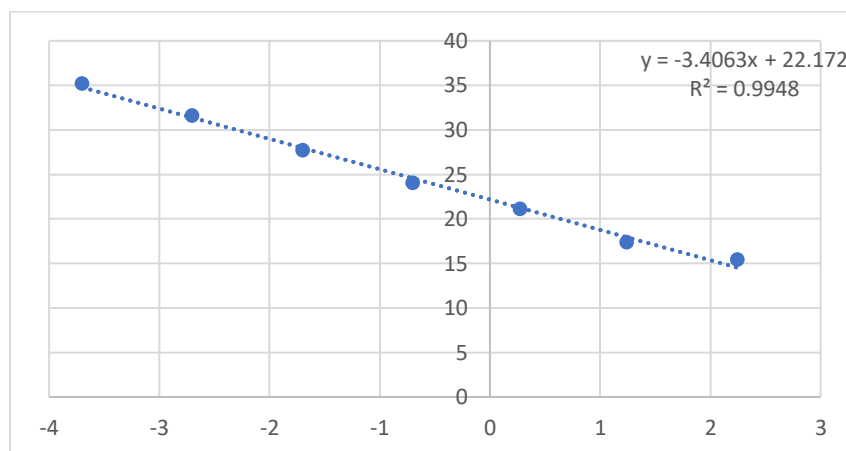
Tutti i campioni sono stati, quindi, processati per determinare *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* tramite metodi di coltura standard e Reagente D q-PCR per discriminare le cellule vive/morte e le cellule VBNC, come di seguito specificato.

#### **4.1.2 Ricerca di *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus* con metodo colturale**

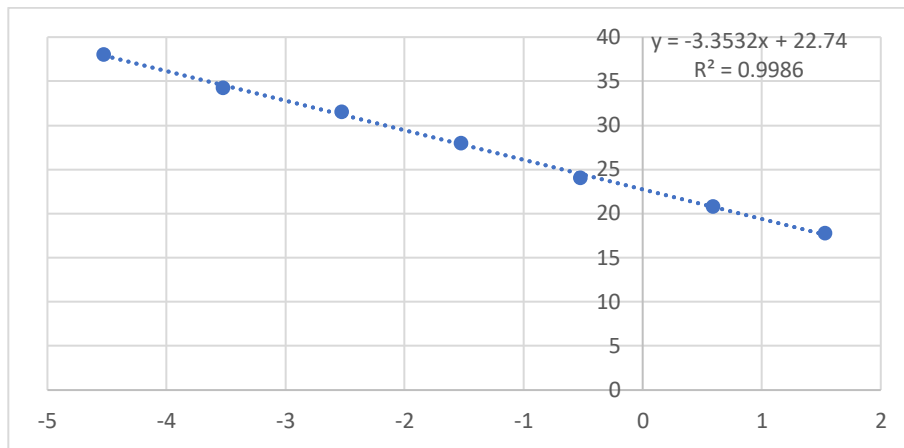
Dalle diluizioni in PBS si procedeva, per ciascun campione, in duplicato, alla semina di 1 ml su piastre di Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS) (Difco, Le Point de Claix, Francia), addizionato al 2,5% di NaCl per la determinazione di *V. parahaemolyticus*, che venivano incubate a 37°C per 24-48 ore. Per la ricerca qualitativa, le brodocolture in PBS venivano incubate a 37°C per 24 h e da queste si effettuavano semine su piastre TCBS agar. Dopo l'incubazione le piastre venivano controllate per la presenza/assenza di colonie tipiche.

### 4.1.3 Curva di calibrazione

In questo studio sono stati utilizzati il ceppo di *V. parahaemolyticus* (RIMD 2210633) e il ceppo di *V. cholerae* non-O1/non 139 (ATCC 14730) proveniente dalla ceppoteca del laboratorio di analisi. Entrambi i microrganismi, inizialmente conservati a -80 °C, sono stati scongelati e strisciati in piastre di TCBS, incubate a 37°C per 24 ore. Dopo l'incubazione, le piastre sono state controllate per la presenza/assenza di colonie tipiche. Le curve di calibrazione (Figura 9 e 10) sono state generate utilizzando diluizioni seriali di *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* durante la fase di crescita stazionaria, seguite dall'enumerazione dei batteri mediante il metodo standard di conta su piastra, nell'intervallo da 10<sup>6</sup> a 10<sup>1</sup> CFU/mL. Le qPCR per la creazione delle curve di calibrazione sono state ripetute in triplice. La curva di calibrazione ha dimostrato una correlazione lineare tra i valori di Ct (ottenuti dalla real-time PCR) e Log<sub>10</sub> CFU/mL. La sensibilità della qPCR è stata verificata tramite una corrispondente diluizione seriale di sette volte per ciascun campione. È stata dimostrata una stretta correlazione sia per *V. parahaemolyticus* (R<sup>2</sup>=0,9948) che per *V. cholerae* (R<sup>2</sup>=0,9996), corrispondente al valore tra Ct e log CFU/mL. L'efficienza di amplificazione della PCR (E) è stata calcolata dalla pendenza della curva standard utilizzando l'equazione (E=[10<sup>-1/slope</sup>-1]).



**Figura 9.** Curva di calibrazione per *V. parahaemolyticus*



**Figura 10.** Curva di calibrazione per *V. cholerae*.

#### 4.1.4 Analisi con il reagente D ed estrazione del DNA genomico

Brevemente, 50  $\mu$ l di ciascun campione sono stati risospesi in 350  $\mu$ l di brodo LB (Merck) a cui sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di Reagente D (Bioteccon Diagnostics, Postdam, Germania), secondo le indicazioni della casa produttrice. Il Reagente D è in grado di inattivare rapidamente il DNA delle cellule morte evitando così falsi positivi nelle reazioni di PCR. Il reagente contiene una sostanza fotosensibile che può penetrare solo attraverso le membrane cellulari delle cellule morte.

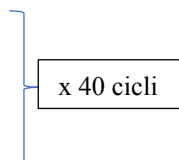
Dopo il trattamento, i campioni sono stati esposti alla luce per 10 minuti a temperatura ambiente, per consentire allo stesso di penetrare le membrane cellulari, e favorire il legame covalente di questa sostanza con il DNA e impedire al DNA stesso di essere amplificato. I campioni sono stati sottoposti a centrifugazione a 8000 rpm per 5 minuti e successivamente si è proceduto all'estrazione del DNA (per i campioni trattati e non trattati) utilizzando il DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germania) seguendo le istruzioni del produttore. Tutte le preparazioni di DNA sono state conservate a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento del successivo utilizzo.

#### 4.1.5 Analisi real-time PCR

La PCR quantitativa è avvenuta amplificando frammenti genici dei geni specie-specifici *ompW* e *groEL*. I primer utilizzati per il gene *ompW* di *V. cholerae* avevano le seguenti sequenze nucleotidiche: primer F 5'-CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG-3' e primer R 5'-GAACTTATAACCACCCGCG-3'; quelli per il gene *gro-EL* di *V. parahaemolyticus* avevano le seguenti sequenze nucleotidiche: F 5'-AGGTCAGGCTAAGCGCGTAAGC-3' e R 5'-GTCACCGTATTCACCCGTCGCT-3'. La miscela di reazione è stata preparata in un volume di 12,5 µl e comprendeva 3 µl di DNA, 0,6 pM di ciascun primer, 6,25 µl di SSoFast™ EvaGreen® e 2,95 µl di acqua. Ogni reazione è stata condotta in triplice.

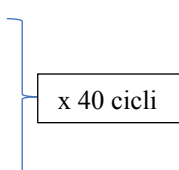
Le fasi del ciclo di reazione sono riportate in tabella 10 e 11. La qPCR è stata eseguita utilizzando lo strumento CFX96 Touch™ (Bio-Rad) con il software Bio-Rad CFX manager 3.0.

Step	Temperature	Tempo
Denaturazione	95°C	180 s
Appaiamento	95°C	30 s
Estensione	60°C	60 s
Estensione finale	65°C-95°	5 s



**Tabella 10.** Ciclo di reazione per *Vibrio cholerae*

Step	Temperature	Tempo
Denaturazione	95°C	180 s
Appaiamento	95°C	30 s
Estensione	60°C	68 s
Estensione finale	65°C-95°	5 s



**Tabella 11.** Ciclo di reazione per *Vibrio parahaemolyticus*.

#### **4.1.6 Analisi statistica**

I dati dei campioni ottenuti dalla qPCR sono stati analizzati con il test statistico ANOVA a due vie seguita da un t-test di confronto ( $p < 0,05$ ; GraphPad Prism versione 9.0.0, GraphPad Software, San Diego, California, USA) per rilevare differenze significative tra i campioni in termini di Valori Ct e di Unità Genomiche.

## 5. Risultati

Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi sia alla ricerca quantitativa che qualitativa di *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* con i metodi di coltura standard. Per quanto riguarda le analisi della qPCR e la D-qPCR abbiamo determinato la sensibilità dei saggi qPCR e D-qPCR per i geni di *V. cholerae* e di *V. parahaemolyticus*. Per la lunghezza dell'amplicone, è stata possibile un'efficienza di reazione massima del 90%. Il range di rilevabilità di *V. cholerae*, ottenuto dalla curva di calibrazione ed in seguito utilizzato per l'amplificazione della qPCR, era in un intervallo compreso tra  $2,14E+09$  e  $2,14E+00$  unità genomiche.

Per *V. parahaemolyticus*, invece, abbiamo ottenuto un range compreso tra  $2,01E+09$  e  $2,01E+00$  unità genomiche. Le pendenze delle curve standard per la quantificazione dei geni bersaglio *ompW* (588 bp) e *groEL* (510 bp) erano rispettivamente -3,35, -3,40 per *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*. Le efficienze medie della qPCR per *V. cholerae* erano del 99% e del 97% per *V. parahaemolyticus*.

Il limite inferiore di rilevamento (testato in triplice) è risultato pari a  $0,00003 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  di DNA totale, con valori medi di Cq di  $25,54 \pm 0,33$ , e con una sensibilità di rilevabilità di 6,9 (GE) per *V. cholerae* e un limite di rilevabilità di  $0,00002 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  di DNA totale, con valori medi di Cq  $24,96 \pm 0,32$  e 3,5 (GE) per *V. parahaemolyticus*. I metodi di PCR in tempo reale hanno mostrato una buona linearità nell'intervallo di quantificazione, con valori  $R^2$  compresi, rispettivamente, tra 0,9986 e 0,9948 per *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*. I risultati dei campioni positivi in seguito alle analisi statistiche sono riportati in Tabella 12 ed in Tabella 13.

I dati ottenuti sono stati calcolati utilizzando le curve di calibrazione standard sia per la qPCR che la D-qPCR.

Dei 27 campioni analizzati, 8 (29,62%) sono risultati positivi per la presenza di cellule VBNC di *V. cholerae*, con valori compresi tra 2,81 e 4,17 Log UFC/g, e 6 (22,22%) per la presenza di cellule VBNC di *V. parahaemolyticus* con valori compresi tra 1,28 e 4,07 LOG UFC/g. La presenza di entrambi i microrganismi in forma VBNC veniva riscontrata in quattro campioni.

N campione	qPCR	GE	Log UFC/g (morti+VBNC)	Reagente D + qPCR	GE	Log UFC/g (VBNC)
844	30,18	1,40E+03	4,86	32,57	2,78E+02	4,17
935	32,26	3,37E+02	4,26	34,38	5,23E+01	3,64
251	29,44	9,43E+02	5,07	34,69	6,43E+01	3,56
145	30,52	1,14E+03	4,76	34,71	6,48E+01	3,55
204/1	31,80	4,65E+02	4,39	34,75	1,12E+02	3,44
204/2	32,67	2,57E+02	4,14	34,02	1,00E+02	3,75
261	33,69	1,46E+02	3,84	37,27	9,57E+00	2,81
153	31,35	6,31E+02	4,53	34,14	9,25E+01	3,71

GE= equivalente genomico

**Tabella 12.** Campioni positivi alla qPCR e D-qPCR per *Vibrio cholerae*.

N campione	qPCR	GE	Log UFC/g (morti+VBNC)	Reagente D + qPCR	GE	Log UFC/g (VBNC)
19.2	27,45	4,99E+03	4,74	29,62	1,16E+03	4,07
20/1	28,85	1,94E+03	4,31	32,34	1,82E+02	3,24
251	34,08	5,64E+01	2,71	38,17	3,68E+00	1,45
145	34,38	4,59E+01	2,65	36,78	3,35E+01	1,88
261	32,77	1,36E+02	3,11	38,74	2,46E+00	1,28
153	35,69	1,89E+01	2,21	38,59	2,67E+00	1,33

GE= equivalente genomico

**Tabella 13.** Campioni positivi alla qPCR e Reagente D-qPCR per *Vibrio parahaemolyticus*.

I conteggi delle cellule vitali sono stati confermati mediante Reagente D-qPCR per *V. cholerae* (Figura 11a, b) e *V. parahaemolyticus* (Figura 11c, d).



Figura 11a

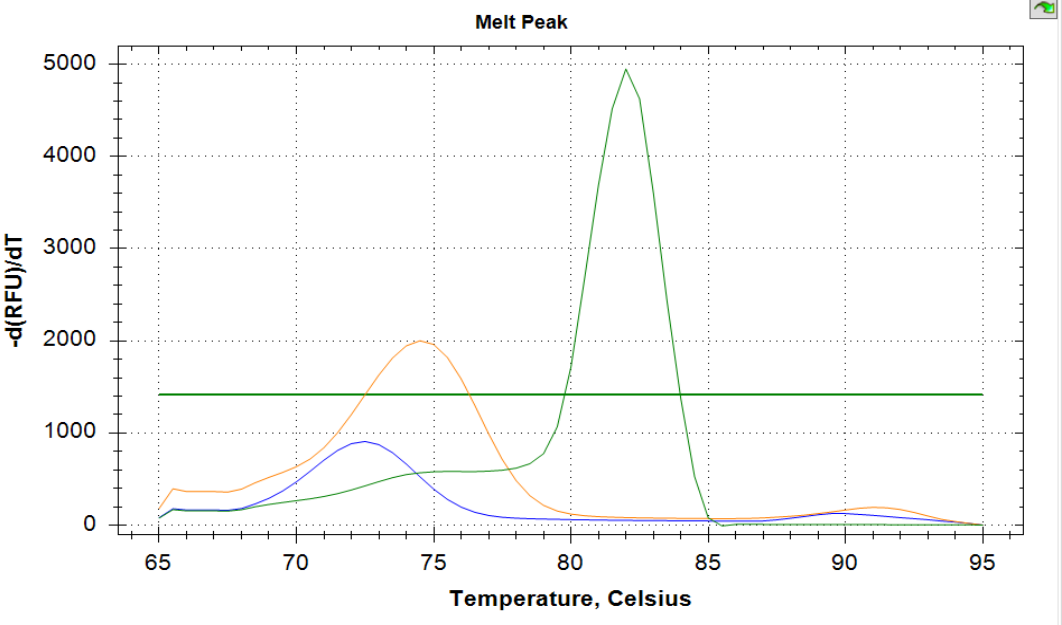


Figura 11b

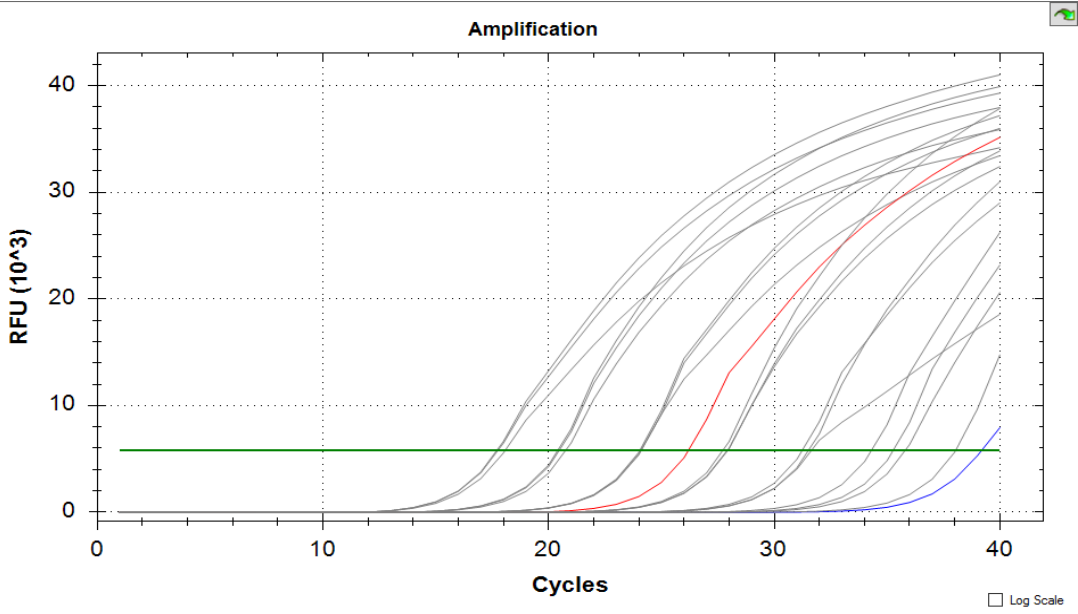


Figura 11c

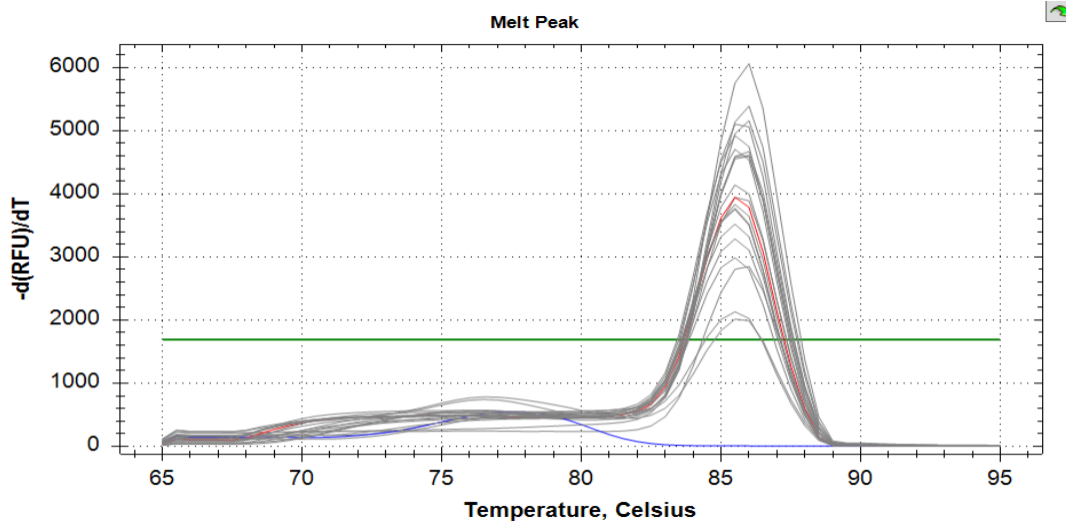
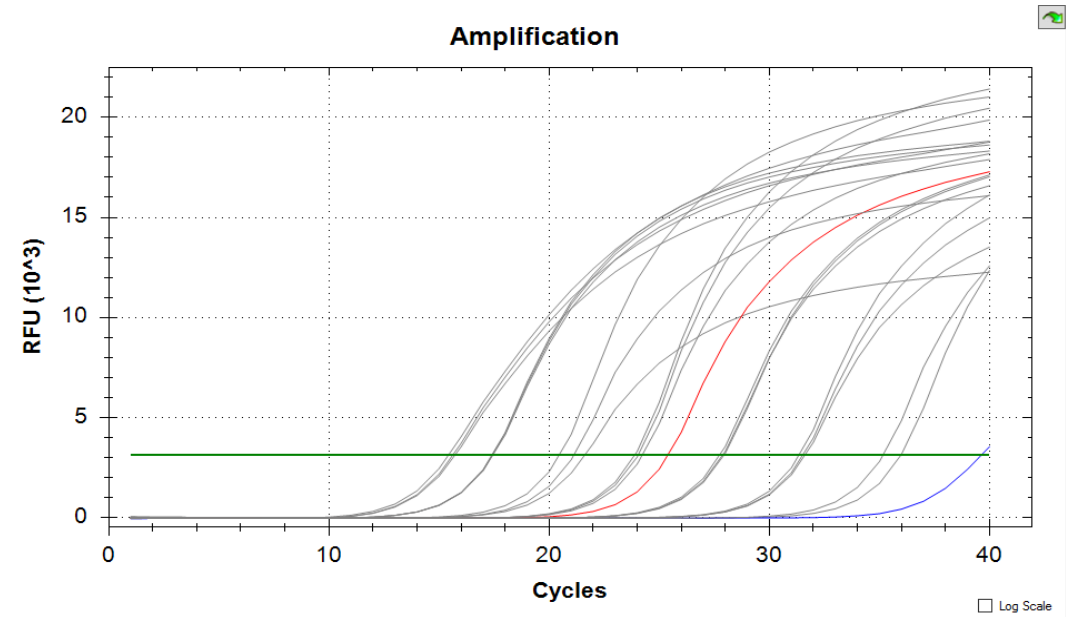


Figura 11d



NC: controllo negativo (blu), PC: controllo positivo (rosso), SD: curva standard (grigio), L: batteri vivi (verde), D: batteri morti (arancione).

La Figura 11 mostra i risultati della PCR quantitativa con differenziazione combinata tra batteri vivi/morti (l/d qPCR) direttamente da 1 ml di campione alimentare.

## 6. Considerazioni e Conclusioni

Negli ultimi anni, lo stato VBNC dei microrganismi ha destato grande attenzione a causa dell'elevato numero di agenti patogeni che possono entrare in questa condizione. Le capacità delle cellule VBNC di eludere le normali procedure di laboratorio coltura dipendenti, di tollerare condizioni stressanti, compresi i processi di pastorizzazione degli alimenti e gli antibiotici e di rivificarsi in condizioni favorevoli e causare malattie potrebbero rappresentare una grave problema di sicurezza alimentare (James D. Oliver 2005; X. Zhao et al. 2017; Ayrapetyan e Oliver 2016). Pertanto, lo sviluppo di metodi rapidi, sensibili, economici e di facile utilizzo per evidenziare i batteri VBNC negli alimenti è indispensabile per una corretta valutazione del rischio. In quest'ottica, entrambe le metodiche da noi utilizzate, sia la PMA-qPCR che la R-qPCR, si sono dimostrate efficaci.

Il limite di rilevabilità è stato determinato in 1,30 log CFU/ml con metodica PMA-qPCR per *V. parahaemolyticus*, e di 1,24 e 1,53 log CFU/ml con la D-qPCR, rispettivamente, per *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*, con il vantaggio della rapidità e della specificità rispetto ai metodi di coltura tradizionali. Altri protocolli di qPCR messi a punto da diversi autori sono riportati valori di rilevabilità per *V. parahemolyticus* pari a  $1,2 \times 10^2$  CFU/ml (Liu et al. 2018),  $5 \times 10^1$  CFU/g (Ling et al. 2020), 12 CFU/reazione (Zhu et al. 2012) e 28 CFU/g (Cao et al. 2019). Al riguardo, è noto che diverse variabili possono contribuire a tali differenze, tra cui la quantificazione delle cellule totali (morte e vitali) rispetto alle cellule vitali, l'uso di diversi coloranti intercalanti (ad es. PMA o EMA), i ceppi batterici, i primer, i protocolli di estrazione del DNA e le procedure di qPCR. Così come variabile è la concentrazione di PMA. Infatti, come descritto da diversi Autori (Liu et al. 2018; Lv et al. 2016), la capacità del PMA di eliminare il segnale delle cellule morte aumenta con l'aumentare della sua concentrazione così come vantaggioso risulta il prolungamento del periodo d'incubazione specie per alcuni substrati alimentari. Nel nostro studio, una concentrazione di PMA di 20  $\mu$ M e una incubazione di 10 min, hanno permesso di eliminare più del 99% del segnale proveniente dalle cellule morte rispetto al controllo non trattato. Analogamente, anche l'utilizzo del Reagente D per l'analisi dei geni *ompW* di *V. cholerae* e *gro-EL* di *V. parahaemolyticus*, ha dato buoni risultati.

Nell'ultimo decennio si sono valutate diverse tecniche di biologia molecolare, cercando l'alternativa più celere, valida ed economica che possa in qualche modo risolvere il problema dei batteri patogeni VBNC. I saggi di PCR, in combinazione con i coloranti intercalanti del DNA, ad oggi rappresentano i metodi più accreditati poiché riescono a rilevare sequenze geniche bersaglio di cellule batteriche vitali e sono attualmente utilizzati in combinazione con elettroforesi su gel, PCR quantitativa in tempo reale (qPCR), PCR a trascrizione inversa (rt-PCR), analisi PCR di amplificazione isotermica fino ad applicazioni di sequenziamento di nuova generazione (Fittipaldi, Nocker, e Codony 2012; Law et al. 2015). Inoltre, la qPCR offre l'opportunità di ottenere risultati sia di tipo qualitativo che quantitativo, risultati che altre tecniche non consentono di ottenere (elettroforesi, rt-PCR).

Negli ultimi decenni, come detto in precedenza, probabilmente anche in relazione al cambiamento delle abitudini alimentari nonché a una maggiore presenza dei vibrioni patogeni nei prodotti della pesca, anche a causa del riscaldamento globale delle acque, si è assistito ad un aumento delle segnalazioni di malattia alimentare nell'uomo sostenuta da microrganismi appartenenti al genere *Vibrio*.

Inoltre, la capacità di *V. parahaemolyticus* e di *V. cholerae* di tollerare le basse temperature e il loro riscontro nei prodotti congelati amplia la gamma di alimenti potenzialmente pericolosi per i consumatori, includendo anche i prodotti della pesca congelati (Chahorm e Prakitchaiwattana 2018). Diversi fattori influenzano la resistenza di questi microrganismi al congelamento, come la concentrazione extracellulare di soluti, la fase di crescita del microrganismo, la presenza di crioprotettori naturali (chitina, alcuni aminoacidi o peptidi), il pH, la temperatura, la velocità di congelamento, l'esposizione a sollecitazioni chimiche prima del congelamento, la quantità di nutrienti nell'ambiente, la velocità di congelamento e di scongelamento, ecc. (Shimodori et al. 1989). Studi condotti su ostriche, polpi, granchi e filetti di pesce (Bryan et al. 1999; Vasudevan et al. 2002; Wong, Chen, e Yu 1994) hanno evidenziato che dopo un iniziale rapido decremento, *Vibrio* sarebbe in grado di adattarsi alle basse temperature, attraverso modificazioni della composizione in acidi grassi membrana cellulare e della sintesi proteica (Wong, Chen, e Yu 1994) rimanendo vitali e potenzialmente patogeni per lungo tempo. Inoltre, come altri batteri, *Vibrio* spp. può entrare nello stato

VBNC, durante il congelamento e riacquistare la capacità di moltiplicarsi durante lo scongelamento.

I risultati ottenuti in questo studio suscitano riflessioni comuni per entrambi i prodotti esaminati ma pure specifiche per ciascuno di essi. In primis, la costante assenza di forme coltivabili di *V. parahaemolyticus* nei mitili e nei gamberi contrasta in modo evidente con i relativi frequenti, accertamenti di VBNC, rispettivamente dell'11,7% nei primi e del 22,22% nei secondi. Non meno preoccupante il riscontro di forme VBNC di *V. cholerae* in gamberi con percentuali del 29,62%.

Ciò preoccupa non poco e pregiudica in ogni caso il quadro igienico-sanitario dei prodotti. In effetti, come già riferito in precedenza, pur essendo molto resistente ai lunghi stoccaggi a temperatura di congelamento, *V. parahaemolyticus* tende comunque a diminuire nei prodotti congelati e, se le cariche batteriche iniziali non sono elevate, il recovery da campioni del commercio può scendere sotto il limite di rilevabilità dei metodi colturali, anche con arricchimento preliminare. Ciò è testimoniato dai risultati di diverse indagini degli ultimi anni che hanno rilevato una scarsa presenza di *V. parahaemolyticus* in bivalvi e crostacei congelati.

Tang et al. (Tang et al. 2014), in molluschi congelati commercializzati in Malesia, riportano percentuali più elevate (43,75% con metodo classico e 57,5% con PCR), ma gli autori non escludono la possibilità di contaminazione crociata nelle fasi di commercializzazione tra i campioni e altri prodotti della pesca nonché con il ghiaccio.

Anche alcuni Autori di questo Dipartimento (Panebianco A, et al. 2011) ne hanno verificato la presenza in bivalvi congelati del commercio (vongole, capesante e cozze), ma solamente in bassissima percentuale (3,24%).

Nei molluschi bivalvi, il riscontro di *V. parahaemolyticus* esclusivamente nelle vongole è in linea con quanto segnalato da Lopatek et al. (Lopatek, Wiczorek, e Osek 2015) (31 su 120 campioni di vongole, 25,8%) e da Roque et al. (Roque et al. 2009) (38 su 90 campioni di vongole, 42,2%). Allo stesso modo, Lamone et al. (Lamon et al. 2019) hanno riscontrato valori più elevati di *Vibrio* spp. nelle vongole (*Ruditapes decussatus*) che nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) raccolti in Sardegna (Italia). Tra i fattori che potrebbero contribuire a questa maggiore presenza non potrebbero escludersi influenze determinate dal metodo di

raccolta, le vongole, infatti, vengono solitamente pescate in sedimenti fangoso-sabbiosi maggiormente ricchi di vibroni rispetto al corpo d'acqua, ma anche dalle manipolazioni in corso di sgusciatura nonché da fattori stagionali.

Al riguardo, va comunque considerato che, come detto, lo stoccaggio prolungato comporta una riduzione dei *V. parahaemolyticus* originali e che i trattamenti termici di sgusciatura dei bivalvi possono ridurre la presenza. Così come, nel caso dei crostacei, il congelamento in toto, o senza testa, o completamente privati del carapace, possono condizionarne presenza e persistenza.

Riflettendo, invece, sulla evidenziata presenza di forme VBNC le preoccupazioni appaiono maggiori essendo ancora poco chiari i meccanismi di rivivificazione delle stesse e, dunque, la loro reale possibilità di tornare in vita in relazione alle diversificate condizioni che attraverseranno nella derrata prima del consumo umano. Per essere più chiari, si pensi alle variazioni di temperatura, percentuali di NaCl, dell'aW, del pH e quant'altro. I bivalvi, ad esempio, sono spesso sgusciati a temperature elevate ma per tempi brevi e quindi subletali per i batteri, o vengono congelati con tecniche mantengono il liquido intervalvare all'interno del guscio. Poi, possono essere preparati previo scongelamento o direttamente congelati, ricordando comunque, che i trattamenti di cottura seguenti sono di norma molto brevi per non comprometterne eccessivamente la consistenza, l'umidità e le caratteristiche gustative. Potrà, quindi, seguire un rapido consumo o una preparazione gastronomica che potrà essere consumata successivamente, stoccata incautamente a temperatura ambiente o a temperatura di refrigerazione, o, seppur raramente, rientrare nella preparazione di piatti pronti da consumarsi caldi e, dunque, da mantenersi sino al consumo alle temperature già previste dal Reg. 327/1980 superiori a 60°C. Lo stesso può essere ipotizzato per i crostacei ricordando però, in tal caso, che a differenza dei bivalvi una buona parte di essi, specialmente scampi, mazzancolle e gamberi, viene consumata cruda dopo il scongelamento.

Sebbene al momento non esistano certezze sulla possibilità che batteri VBNC possano indurre malattia nell'uomo, ricordiamo che in Giappone è stata segnalata un'epidemia di origine alimentare causata da uova di salmone salate in cui è stata riscontrata la presenza di forme VBNC di *Escherichia coli* O157 enteroemorragico (F. Zhao et al. 2016; Asakura et al. 2008). Asakura et al. (Asakura et al. 2002) hanno ipotizzato che *Salmonella Oranienburg*

sarebbe diventata VBNC in risposta allo stress da NaCl in una epidemia causata dal consumo di calamari lavorati ed essiccati, e questa ipotesi è stata confermata da prove di rivivificazione del microrganismo. Come riportato da Nicolò & Guglielmino (Sebastiano e Paolo Guglielmino 2012), solo il 20% delle malattie può essere collegato a patogeni noti, ma il restante 80% è dovuto ad agenti non specificati o non identificati, indicando che i patogeni VBNC possono essere ignorati durante la maggior parte delle epidemie a causa della non rilevabilità. Considerando che la refrigerazione e il congelamento sono i metodi di conservazione più utilizzati nei prodotti della pesca, sono necessari ulteriori dati sulla presenza di forme VBNC di *Vibrio* nei prodotti congelati ma anche diversamente conservati. Infatti, *Vibrio* spp., compreso *V. parahaemolyticus*, è stato isolato da frutti di mare essiccati (Panebianco et al. 2021) ed è dimostrato che le forme VBNC sono resistenti non solo alle basse temperature ma anche ad altri fattori di stress, incluse le alte temperature, l'acidità e la bassa salinità (H. C. Wong e Wang 2004).

Alla luce di ciò, risulta chiaro come tra le variazioni microambientali in cui possono trovarsi i batteri del genere *Vibrio* in questi prodotti della pesca, ne figurino tra quelle già ricordate capaci, per un verso di indurre forme VBNC e per l'altro di catalizzarne la loro rivivificazione. La necessaria prudenza nella salvaguardia della salute del consumatore, non disgiunta dalla necessità di tutelare i leciti interessi commerciali, fanno ritenere di importanza primaria l'intensificazione degli studi in merito ai batteri VBNC ed ai fattori di rivivificazione potendo, come visto, riguardare numerosi agenti di tossinfezione alimentare e numerosissime derrate alimentari. Solo dopo le certezze ottenute si potrà realizzare nei vari comparti una rivisitazione dell'attuale valutazione del rischio e dei conseguenti sistemi di gestione e comunicazione dello stesso.

## Bibliografia:

- Alam, Munirul, Marzia Sultana, G. Balakrish Nair, R. Bradley Sack, David A. Sack, A. K. Siddique, Afsar Ali, Anwar Huq, e Rita R. Colwell. 2006. «Toxigenic *Vibrio cholerae* in the Aquatic Environment of Mathbaria, Bangladesh». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (4): 2849–55. <https://doi.org/10.1128/aem.72.4.2849-2855.2006>.
- Ali, Mohammad, Anna Lena Lopez, Young Ae You, Young Eun Kim, Binod Sah, Brian Maskery, e John Clemens. 2012. «The global burden of cholera». *Bulletin of the World Health Organization* 90 (3): 209–18. <https://doi.org/10.2471/blt.11.093427>.
- Alleron, Laëtitia, Arbia Khemiri, Mohamad Koubar, Christian Lacombe, Laurent Coquet, Pascal Cosette, Thierry Jouenne, e Jacques Frere. 2013. «VBNC Legionella pneumophila cells are still able to produce virulence proteins». *Water Research* 47 (17): 6606–17. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.032>.
- Anderson, J. Stewart, Santosh P. Lall, Derek M. Anderson, e Mary A. McNiven. 1995. «Availability of Amino Acids from Various Fish Meals Fed to Atlantic Salmon (*Salmo Solar*)». *Aquaculture* 138 (1): 291–301. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01131-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01131-5).
- Andrews, L. S., D. L. Park, e Y.-P. Chen. 2000. «Low temperature pasteurization to reduce the risk of vibrio infections from raw shell-stock oysters». *Food Additives & Contaminants* 17 (9): 787–91. <https://doi.org/10.1080/026520300415336>.
- Andrews, Linda, Michael Jahncke, e Kumar Mallikarjunan. 2003. «Low Dose Gamma Irradiation to Reduce Pathogenic Vibrios in Live Oysters (*Crassostrea virginica*)». *Journal of Aquatic Food Product Technology* 12 (3): 71–82. [https://doi.org/10.1300/J030v12n03\\_07](https://doi.org/10.1300/J030v12n03_07).
- Ansaruzzaman, M., Marcelino Lucas, Jacqueline L. Deen, N. A. Bhuiyan, Xuan-Yi Wang, Ashrafus Safa, Marzia Sultana, et al. 2005. «Pandemic Serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* Associated with Diarrhea in Mozambique: Spread of the Pandemic into the African Continent». *Journal of Clinical Microbiology* 43 (6): 2559–62. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.6.2559-2562.2005>.
- Asakura, Hiroshi, Keiko Kawamoto, Yuji Haishima, Shizunobu Igimi, Shigeki Yamamoto, e Sou-ichi Makino. 2008. «Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 corresponds to the viable but non-culturable state». *Research in Microbiology* 159 (9–10): 709–17.
- Asakura, Hiroshi, Masahisa Watarai, Toshikazu Shirahata, e Sou-ichi Makino. 2002. «Viable but Nonculturable Salmonella Species Recovery and Systemic Infection in Morphine-Treated Mice». *The Journal of Infectious Diseases* 186 (10): 1526–29. <https://doi.org/10.1086/344353>.
- Ayrapetyan, Mesrop, e James D Oliver. 2016. «The viable but non-culturable state and its relevance in food safety». *Current Opinion in Food Science* 8 (aprile): 127–33. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.04.010>.
- Baker-Austin, Craig, Louise Stockley, Rachel Rangdale, e Jaime Martinez-Urtaza. 2010. «Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio*



- parahaemolyticus*: a European perspective». *Environmental Microbiology Reports* 2 (1): 7–18. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00096.x>.
- Baker-Austin, Craig, Joaquin Trinanes, Narjol Gonzalez-Escalona, e Jaime Martinez-Urtaza. 2017. «Non-Cholera Vibrios: The Microbial Barometer of Climate Change». *Trends in Microbiology* 25 (1): 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.008>.
  - Battistini, Roberta, Chiara Masotti, Valeria Listorti, Elisabetta Suffredini, Cristiana Maurella, Aitor Garcia-Vozmediano, Erica Costa, et al. 2021. «Norovirus Persistence in Oysters to Prolonged Commercial Purification». *Pathogens* 10 (8): 944. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080944>.
  - Bej, Asim K., Donald P. Patterson, Cynthia W. Brasher, Michael CL Vickery, Daniel D. Jones, e Charles A. Kaysner. 1999. «Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tdh and trh». *Journal of microbiological methods* 36 (3): 215–25.
  - Béné, Christophe, Graeme Macfadyen, Edward Hugh Allison, e Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2007. *Increasing the Contribution of Small-Scale Fisheries to Poverty Alleviation and Food Security*. Food & Agriculture Org.
  - Berlin, Daniel L., Diane S. Herson, Doris T. Hicks, e Dallas G. Hoover. 1999. «Response of Pathogenic *Vibrio* Species to High Hydrostatic Pressure». *Applied and Environmental Microbiology* 65 (6): 2776–80. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2776-2780.1999>.
  - Bodor, Attila, Naila Bounedjoum, György Erik Vincze, Ágnes Erdeiné Kis, Krisztián Laczi, Gábor Bende, Árpád Szilágyi, Tamás Kovács, Katalin Perei, e Gábor Rákhely. 2020. «Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives». *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 19 (1): 1–22.
  - Bryan, Patrick J., Robert J. Steffan, Angelo DePaola, John W. Foster, e Asim K. Bej. 1999. «Adaptive response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*». *Current microbiology* 38 (3): 168–75.
  - Campus, Marco. 2010. «High Pressure Processing of Meat, Meat Products and Seafood». *Food Engineering Reviews* 2 (4): 256–73. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9028-y>.
  - Cao, Xiao, Lichao Zhao, Jingfeng Zhang, Xun Chen, Lei Shi, Xiang Fang, Hui Xie, Yanlei Chang, e Li Wang. 2019. «Detection of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp samples using improved real-time PCR and real-time LAMP methods». *Food Control* 103: 145–52.
  - Caraguel, Charles GB, Henrik Stryhn, Nellie Gagné, Ian R. Dohoo, e K. Larry Hammell. 2011. «Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23 (1): 2–15.
  - Chae, M. J., D. Cheney, e Y.-C. Su. 2009. «Temperature effects on the depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American oyster (*Crassostrea virginica*)». *Journal of food science* 74 (2): M62–66.
  - Chahorm, Kanchana, e Cheunjit Prakitchaiwattana. 2018. «Application of Reverse Transcriptase-PCR-DGGE as a rapid method for routine determination of *Vibrio* spp. in foods». *International journal of food microbiology* 264: 46–52.

- Chai, T., K.T. Liang, J. Pace, e D.V. Schlimme. 1991. «Effect of Heat Processing on Quality of Pasteurized Oysters». *Journal of Food Science* 56 (5): 1292–94. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb04755.x>.
- Charles, Richelle C., e Edward T. Ryan. 2011. «Cholera in the 21st century». *Current Opinion in Infectious Diseases* 24 (5): 472–77. <https://doi.org/10.1097/qco.0b013e32834a88af>.
- Cheng, Chang-Hong, Zhi-Xun Guo, Chao-Xia Ye, e An-Li Wang. 2018. «Effect of Dietary Astaxanthin on the Growth Performance, Non-Specific Immunity, and Antioxidant Capacity of Pufferfish (*Takifugu Obscurus*) under High Temperature Stress.» *Fish Physiology and Biochemistry* 44 (1): 209–18. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0425-5>.
- Chowdhury, Fazle Rabbi, Zannatun Nur, Nazia Hassan, Lorenz von Seidlein, e Susanna Dunachie. 2017. «Pandemics, pathogenicity and changing molecular epidemiology of cholera in the era of global warming». *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0185-1>.
- Colwell, Rita R. 2000. «Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy». *Journal of Infection and Chemotherapy* 6 (2): 121–25. <https://doi.org/10.1007/pl00012151>.
- Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 Laying down Uniform Practical Arrangements for the Performance of Official Controls on Products of Animal Origin Intended for Human Consumption in Accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and Amending Commission.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs (Text with EEA Relevance). 2005. OJ L. Vol. 338. <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj/eng>.
- Cook, David W., John C. Bowers, e Angelo DePaola. 2002. «Density of total and pathogenic (tdh+) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf Coast molluscan shellfish at harvest». *Journal of food protection* 65 (12): 1873–80.
- Cook, David W., Paul O’Leary, Jeff C. Hunsucker, Edna M. Sloan, John C. Bowers, Robert J. Blodgett, e Angelo DePaola. 2002. «*Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in US retail shell oysters: a national survey from June 1998 to July 1999». *Journal of food protection* 65 (1): 79–87.
- Cook, David W., e Angela D. Ruple. 1989. «Indicator Bacteria and *Vibrionaceae* Multiplication in Post-Harvest Shellstock Oysters». *Journal of Food Protection* 52 (5): 343–49. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.5.343>.
- Coutinho, F.H., C.C. Thompson, A.S. Cabral, R. Paranhos, B.E. Dutilh, e F.L. Thompson. 2019. «Modelling the influence of environmental parameters over marine planktonic microbial communities using artificial neural networks». *Science of The Total Environment* 677: 205–14. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.009>.
- Deeb, Reem, Daniel Tufford, Geoffrey I. Scott, Janet Gooch Moore, e Kirstin Dow. 2018. «Impact of Climate Change on *Vibrio vulnificus* Abundance and Exposure Risk». *Estuaries and Coasts* 41 (8): 2289–2303. <https://doi.org/10.1007/s12237-018->

0424-5.

- Dong, Kai, Hanxu Pan, Dong Yang, Lei Rao, Liang Zhao, Yongtao Wang, e Xiaojun Liao. 2020. «Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19 (1): 149–83.
- Du, Meng, Jixiang Chen, Xiaohua Zhang, Aijuan Li, e Yun Li. 2007. «Characterization and resuscitation of viable but nonculturable *Vibrio alginolyticus* VIB283». *Archives of Microbiology* 188 (3): 283–88. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0246-5>.
- FAO, WHO. 2005. «Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002». *Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens, an interpretative summary. Microbiological Risk Assessment Series* 1.
- Faruque, A. S. G., G. J. Fuchs, e M. J. Albert. 1996. «Changing epidemiology of cholera due to *Vibrio cholerae* O1 and O139 Bengal in Dhaka, Bangladesh». *Epidemiology and Infection* 116 (3): 275–78. <https://doi.org/10.1017/s0950268800052572>.
- Faruque, Shah M., Nityananda Chowdhury, M. Kamruzzaman, Q. Shafi Ahmad, A.S.G. Faruque, M. Abdus Salam, T. Ramamurthy, G. Balakrish Nair, Andrej Weintraub, e David A. Sack. 2003. «Reemergence of Epidemic *Vibrio cholerae* O139, Bangladesh». *Emerging Infectious Diseases* 9 (9): 1116–22. <https://doi.org/10.3201/eid0909.020443>.
- Feldhusen, Frerk. 2000. «The role of seafood in bacterial foodborne diseases». *Microbes and Infection* 2 (13): 1651–60. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)01321-6](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)01321-6).
- Fittipaldi, Mariana, Andreas Nocker, e Francesc Codony. 2012. «Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification». *Journal of microbiological methods* 91 (2): 276–89.
- Froelich, B. A., M. Ayrapetyan, P. Fowler, J. D. Oliver, e R. T. Noble. 2015. «Development of a Matrix Tool for the Prediction of *Vibrio* Species in Oysters Harvested from North Carolina». *Applied and Environmental Microbiology* 81 (3): 1111–19. <https://doi.org/10.1128/aem.03206-14>.
- Froelich, Brett A., e Dayle A. Daines. 2020. «In hot water: effects of climate change on *Vibrio*–human interactions». *Environmental Microbiology* 22 (10): 4101–11. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14967>.
- Gooch, J. A., A. DePaola, J. Bowers, e D. L. Marshall. 2002. «Growth and Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in Postharvest American Oysters». *Journal of Food Protection* 65 (6): 970–74. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.6.970>.
- Griffitt, Kimberly J., e D. Jay Grimes. 2013. «Abundance and Distribution of *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* Following a Major Freshwater Intrusion into the Mississippi Sound». *Microbial Ecology* 65 (3): 578–83. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0203-6>.
- Hengge-Aronis, Regine. 2002. «Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the *Sigma*(S) (*RpoS*) Subunit of RNA Polymerase». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 66 (3): 373–95, table of

contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.373-395.2002>.

- Huq, Anwar, R. Bradley Sack, Azhar Nizam, Ira M. Longini, G. Balakrish Nair, Afsar Ali, J. Glenn Morris, et al. 2005. «Critical Factors Influencing the Occurrence of *Vibrio cholerae* in the Environment of Bangladesh». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (8): 4645–54. <https://doi.org/10.1128/aem.71.8.4645-4654.2005>.
- Jay, James M., Martin J. Loessner, e David A. Golden. 2009. «Gastroenteriti di origine alimentare causate da *Vibrio*, *Yersinia* e *Campylobacter*». *Microbiologia degli alimenti*, 707–29.
- Johnston, J. M., S. F. Becker, e L. M. McFarland. 1985. «*Vibrio Vulnificus*: man and the Sea». *JAMA* 253 (19): 2850–53. <https://doi.org/10.1001/jama.253.19.2850>.
- Jones, Jessica L., Catharina HM Lüdeke, John C. Bowers, Kristin DeRosia-Banick, David H. Carey, e William Hastback. 2014. «Abundance of *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus*, and *V. parahaemolyticus* in Oysters (*Crassostrea virginica*) and Clams (*Mercenaria mercenaria*) from Long Island Sound». *Applied and environmental microbiology* 80 (24): 7667–72.
- Jutla, Antarpreet, Anwar Huq, Nur Hasan, Ali Akanda, Elizabeth Whitcombe, Rita Colwell, Bradd Haley, Munir Alam, e R. Bradley Sack. 2013. «Environmental Factors Influencing Epidemic Cholera». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 89 (3): 597–607. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0721>.
- Kaper, James B., Alessio Fasano, e Michele Trucksis. 1994. «Toxins of *Vibrio cholerae*». *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives*, 143–76.
- Kaspar, C W, e M L Tamplin. 1993. «Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish». *Applied and Environmental Microbiology* 59 (8): 2425–29. <https://doi.org/10.1128/aem.59.8.2425-2429.1993>.
- Kawarazuka, Nozomi, e Christophe Béné. 2011. «The Potential Role of Small Fish Species in Improving Micronutrient Deficiencies in Developing Countries: Building Evidence». *Public Health Nutrition* 14 (11): 1927–38. <https://doi.org/10.1017/S1368980011000814>.
- Kaysner, Charles A., Carlos Abeyta Jr, Robert F. Stott, Mary Helen Krane, e Marleen M. Wekell. 1990. «Enumeration of *Vibrio* species, including *V. cholerae*, from samples of an oyster growing area, Grays Harbor, Washington». *Journal of food protection* 53 (4): 300–301.
- Kell, Douglas B., Arseny S. Kaprelyants, Dieter H. Weichart, Colin R. Harwood, e Michael R. Barer. 1998. *Antonie van Leeuwenhoek* 73 (2): 169–87. <https://doi.org/10.1023/a:1000664013047>.
- Kelly, Michael T., e E. M. Stroh. 1988. «Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and the environment». *Journal of Clinical Microbiology* 26 (9): 1754–56.
- Kirs, M., A. Depaola, R. Fyfe, J. L. Jones, J. Krantz, A. Van Laanen, D. Cotton, e M. Castle. 2011. «A survey of oysters (*Crassostrea gigas*) in New Zealand for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*». *International journal of food microbiology* 147 (2): 149–53.
- Lall, Santosh P., e Sadasivam J. Kaushik. 2021. «Nutrition and Metabolism of Minerals in Fish». *Animals* 11 (9): 2711. <https://doi.org/10.3390/ani11092711>.

- Lamon, Sonia, Asmine Bastardo, Domenico Meloni, Simonetta Gianna Consolati, Federica Fois, Gabriella Porcheddu, Vanessa Agus, Margherita Pes, Maria Giovanna Cambula, e Anna Mureddu. 2019. «Clonal relationship among *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and grooved carpet shells (*Ruditapes decussatus*) harvested in Sardinia (Italy)». *Food microbiology* 84: 103258.
- Law, Jodi Woan-Fei, Nurul-Syakima Ab Mutalib, Kok-Gan Chan, e Learn-Han Lee. 2015. «Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations». *Frontiers in Microbiology* 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00770>.
- Legros, Dominique. 2018. «Global Cholera Epidemiology: Opportunities to Reduce the Burden of Cholera by 2030». *The Journal of Infectious Diseases* 218 (suppl\_3): S137–40. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy486>.
- Letchumanan, Vengadesh, Ke-Yan Loo, Jodi Woan-Fei Law, Sunny Hei Wong, Bey-Hing Goh, Nurul-Syakima Ab Mutalib, e Learn-Han Lee. 2019. «*Vibrio parahaemolyticus*: The protagonist of foodborne diseases». *Progress In Microbes & Molecular Biology* 2 (1).
- Limthammahisorn, S., Y.j. Brady, e C.r. Arias. 2009. «In Vivo Gene Expression of Cold Shock and Other Stress-Related Genes in *Vibrio Vulnificus* during Shellstock Temperature Control Conditions in Oysters». *Journal of Applied Microbiology* 106 (2): 642–50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04038.x>.
- Ling, Nan, Jinling Shen, Jingjing Guo, Dexin Zeng, Jianluan Ren, Lixin Sun, Yuan Jiang, Feng Xue, Jianjun Dai, e Baoguang Li. 2020. «Rapid and accurate detection of viable *Vibrio parahaemolyticus* by sodium deoxycholate-propidium monoazide-qPCR in shrimp». *Food Control* 109 (marzo): 106883. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106883>.
- Liu, Chengchu, Jianzhang Lu, e Yi-Cheng Su. 2009. «Effects of Flash Freezing, Followed by Frozen Storage, on Reducing *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific Raw Oysters (*Crassostrea gigas*)». *Journal of Food Protection* 72 (1): 174–77. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.1.174>.
- Liu, Yufei, Qingping Zhong, Juan Wang, e Shuwen Lei. 2018. «Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in VBNC state by PMA-combined real-time quantitative PCR coupled with confirmation of respiratory activity». *Food Control* 91: 85–91.
- Logar-Henderson, Chloë, Rebecca Ling, Ashleigh R. Tuite, e David N. Fisman. 2019. «Effects of large-scale oceanic phenomena on non-cholera vibriosis incidence in the United States: implications for climate change». *Epidemiology and Infection* 147. <https://doi.org/10.1017/s0950268819001316>.
- Lopatek, Magdalena, Kinga Wieczorek, e Jacek Osek. 2015. «Prevalence and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from raw shellfish in Poland». *Journal of food protection* 78 (5): 1029–33.
- Lowry, Philip W., Louise M. McFarland, Barbara H. Peltier, Nell C. Roberts, Henry B. Bradford, Joy L. Herndon, Donna F. Stroup, Joyce B. Mathison, Paul A. Blake, e Robert A. Gunn. 1989. «*Vibrio* gastroenteritis in Louisiana: a prospective study among attendees of a scientific congress in New Orleans». *Journal of Infectious*

*Diseases* 160 (6): 978–84.

- Lozano-León, Antonio, Julio Torres, Carlos R Osorio, e Jaime Martínez-Urtaza. 2003. «Identification of *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain». *FEMS Microbiology Letters* 226 (2): 281–84. [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(03\)00604-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00604-9).
- Lv, Xu-Cong, Yan Li, Wan-Wei Qiu, Xiao-Qi Wu, Bing-Xin Xu, Yi-Ting Liang, Bin Liu, Shao-Jun Chen, Ping-Fan Rao, e Li Ni. 2016. «Development of propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR (PMA-qPCR) assays to quantify viable dominant microorganisms responsible for the traditional brewing of Hong Qu glutinous rice wine». *Food Control* 66: 69–78.
- Ma, Lei, e Yi-Cheng Su. 2011. «Validation of High Pressure Processing for Inactivating *Vibrio Parahaemolyticus* in Pacific Oysters (*Crassostrea Gigas*)». *International Journal of Food Microbiology* 144 (3): 469–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.037>.
- Maertens, Laurens, Jean-Yves Matroule, e Rob Van Houdt. 2021. «Characteristics of the Copper-induced Viable-but-non-culturable State in Bacteria». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37 (3): 37. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03006-5>.
- Martínez-Urtaza, Jaime, John C. Bowers, Joaquin Trinanés, e Angelo DePaola. 2010. «Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses». *Food Research International* 43 (7): 1780–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.001>.
- Melody, Kevin, Reshani Senevirathne, Marlene Janes, Lee Ann Jaykus, e John Supan. 2008. «Effectiveness of Icing as a Postharvest Treatment for Control of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*)». *Journal of Food Protection* 71 (7): 1475–80. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.7.1475>.
- Miller, Melissa B., e Bonnie L. Bassler. 2001. «Quorum Sensing in Bacteria». *Annual Review of Microbiology* 55 (1): 165–99. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>.
- Mohanty, Bimal Prasanna, D. Karunakaran, Arabinda Mahanty, Satabdi Ganguly, Dipesh Debnath, Tandrima Mitra, Sudeshna Banerjee, et al. 2015. «Database on nutritional composition of food fishes from India». *Current Science* 109 (11): 1915–17.
- Mohanty, Bimal Prasanna, Arabinda Mahanty, Satabdi Ganguly, Tandrima Mitra, D. Karunakaran, e R. Anandan. 2019. «Nutritional composition of food fishes and their importance in providing food and nutritional security». *Food Chemistry* 293 (settembre): 561–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.039>.
- Morantz, Carrie. 2005. «CDC reports on illnesses in hurricane Katrina evacuees and relief workers». *American Family Physician* 72 (10): 2132.
- Morishige, Yuta, Ko Fujimori, e Fumio Amano. 2015. «Use of Flow Cytometry for Quantitative Analysis of Metabolism of Viable but Non-culturable (VBNC) *Salmonella*». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 38 (9): 1255–64. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00005>.

- Mukamolova, Galina V., Arseny S. Kaprelyants, Douglas B. Kell, e Michael Young. 2003. «Adoption of the transiently non-culturable state — a bacterial survival strategy?» *Advances in Microbial Physiology*, 65–129. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(03\)47002-1](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(03)47002-1).
- Mukamolova, Galina V., Alexey G. Murzin, Elena G. Salina, Galina R. Demina, Douglas B. Kell, Arseny S. Kaprelyants, e Michael Young. 2006. «Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation». *Molecular microbiology* 59 (1): 84–98.
- Mukhopadhyay, Asish K., Yoshifumi Takeda, e G. Balakrish Nair. 2014. «Cholera Outbreaks in the El Tor Biotype Era and the Impact of the New El Tor Variants». *Cholera Outbreaks*, 17–47. [https://doi.org/10.1007/82\\_2014\\_363](https://doi.org/10.1007/82_2014_363).
- Muntada-Garriga, J. M., J. J. Rodriguez-Jerez, E. I. Lopez-Sabater, e M. Teresa Mora-Ventura. 1995. «Effect of Chill and Freezing Temperatures on Survival of *Vibrio parahaemolyticus* Inoculated in Homogenates of Oyster Meat». *Letters in Applied Microbiology* 20 (4): 225–27. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb00433.x>.
- Nigro, Olivia D., Aixin Hou, Gayatri Vithanage, Roger S. Fujioka, e Grieg F. Steward. 2011. «Temporal and Spatial Variability in Culturable Pathogenic *Vibrio* spp. in Lake Pontchartrain, Louisiana, following Hurricanes Katrina and Rita». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (15): 5384–93. <https://doi.org/10.1128/aem.02509-10>.
- Novitsky, J A, e R Y Morita. 1976. «Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine *vibrio*». *Applied and Environmental Microbiology* 32 (4): 617–22. <https://doi.org/10.1128/aem.32.4.617-622.1976>.
- Nowakowska, Joanna, e James D. Oliver. 2013. «Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state». *FEMS Microbiology Ecology* 84 (1): 213–22. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12052>.
- Oliver, J. D. 2005. «Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria». *Epidemiology & Infection* 133 (3): 383–91.
- Oliver, James D. 2005. «The viable but nonculturable state in bacteria». *Journal of microbiology* 43 (spc1): 93–100.
- Oliver, James D. 2010. «Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria». *FEMS Microbiology Reviews* 34 (4): 415–25. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>.
- Panebianco A, Ruolo A., Giarratana F., Ziino G. 2011. «Indagine sulla presenza di *vibrioni* alofili in bivalvi congelati del commercio». In *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, Volume LXV:341-343.
- Panebianco, Felice, Vincenzo Nava, Filippo Giarratana, Teresa Gervasi, e Nicola Cicero. 2021. «Assessment of heavy-and semi-metals contamination in edible seaweed and dried fish sold in ethnic food stores on the Italian market». *Journal of Food Composition and Analysis* 104: 104150.
- Paz, S., N. Bisharat, E. Paz, O. Kidar, e D. Cohen. 2007. «Climate change and the emergence of *Vibrio vulnificus* disease in Israel». *Environmental Research* 103 (3): 390–96. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.07.002>.

- Phuvasate, Sureerat, Ming-Hui Chen, e Yi-Cheng Su. 2012. «Reductions of *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by depuration at various temperatures». *Food microbiology* 31 (1): 51–56.
- Phuvasate, Sureerat, e Yi-Cheng Su. 2013. «Impact of water salinity and types of oysters on depuration for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)». *Food Control* 32 (2): 569–73.
- Pinto, Daniela, Mário A. Santos, e Lélia Chambel. 2015. «Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms». *Critical reviews in microbiology* 41 (1): 61–76.
- Prasad, M. M., e C. C. P. Rao. 1994. «Pathogenic vibrios associated with seafoods in and around Kakinada, India».
- Ramos, Roberta Juliano, Marilia Miotto, Francisco Jose Lagreze Squella, Andrea Cirolini, Jaime Fernando Ferreira, e Cleide Rosana Werneck Vieira. 2012. «Depuration of oysters (*Crassostrea gigas*) contaminated with *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* with UV light and chlorinated seawater». *Journal of food protection* 75 (8): 1501–6.
- Randa, Mark A., Martin F. Polz, e Eelin Lim. 2004. «Effects of Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* Population Dynamics as Assessed by Quantitative PCR». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (9): 5469–76. <https://doi.org/10.1128/aem.70.9.5469-5476.2004>.
- Rasmussen, Randy. 2001. «Quantification on the LightCycler». In *Rapid cycle real-time PCR*, 21–34. Springer.
- Ravel, J., I. T. Knight, C. E. Monahan, R. T. Hill, e R. R. Colwell. 1995. «Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation?». *Microbiology* 141 (2): 377–83. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-2-377>.
- *Regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 9 marzo 2016, relativo alle malattie animali trasmissibili e che modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale («normativa in materia di sanità animale») (Testo rilevante ai fini del SEE)*. 2016. *OJ L*. Vol. 084. <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/429/oj/ita>.
- *Regulation (EC) No 850/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on Persistent Organic Pollutants and Amending Directive 79/117/EEC*. 2004. *OJ L*. Vol. 158. <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/850/oj/eng>.
- *Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 Laying down Specific Hygiene Rules for Food of Animal Origin*. 2004. *OJ L*. Vol. 139. <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/853/oj/eng>.
- Ren, Tingting, e Yi-Cheng Su. 2006. «Effects of Electrolyzed Oxidizing Water Treatment on Reducing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Raw Oysters». *Journal of Food Protection* 69 (8): 1829–34. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.8.1829>.
- Rendueles, E., M. K. Omer, O. Alvseike, C. Alonso-Calleja, R. Capita, e M. Prieto. 2011. «Microbiological Food Safety Assessment of High Hydrostatic Pressure Processing: A Review». *LWT - Food Science and Technology* 44 (5): 1251–60.



<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.001>.

- *Rettifica del regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, sull'igiene dei prodotti alimentari (GU L 139 del 30.4.2004)*. 2004. *OJ L*. Vol. 226. <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/852/corrigendum/2004-06-25/oj/ita>.
- Ribera, D., J.F. Narbonne, X. Michel, D.R. Livingstone, e S. O'Hara. 1991. «Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100 (1–2): 177–81. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90149-n](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90149-n).
- Rice, Scott A., Diane McDougald, Staffan Kjelleberg, Scott A. Rice, e Staffan Kjelleberg. 2000. «*Vibrio vulnificus*: a physiological and genetic approach to the viable but nonculturable response». *Journal of Infection and Chemotherapy* 6 (2): 115–20. <https://doi.org/10.1007/pl00012150>.
- Rittenschober, Doris, Verena Nowak, e U. Ruth Charrondiere. 2013. «Review of availability of food composition data for fish and shellfish». *Food Chemistry* 141 (4): 4303–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.007>.
- Roos, Nanna, Md. Mazharul Islam, e Shakuntala Haraksingh Thilsted. 2003. «Small fish is an important dietary source of vitamin A and calcium in rural Bangladesh». *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 54 (5): 329–39. <https://doi.org/10.1080/09637480120092125>.
- Roque, Ana, Carmen Lopez-Joven, Beatriz Lacuesta, Laurence Elandaloussi, Sariqa Wagley, M. Dolores Furones, Imanol Ruiz-Zarzuola, Ignacio de Blas, Rachel Rangdale, e Bruno Gomez-Gil. 2009. «Detection and identification of *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains from four species of cultured bivalve molluscs on the Spanish Mediterranean Coast». *Applied and Environmental Microbiology* 75 (23): 7574–77.
- Marco Sebastiano Nicolò e Salvatore Pietro Paolo Guglielmino. 2012. «Viable but Nonculturable Bacteria in Food». *Public Health - Methodology, Environmental and Systems Issues*, maggio. <https://doi.org/10.5772/38118>.
- Shen, Xiaosheng, Youqiong Cai, Chengchu Liu, Wenwei Liu, Yunhua Hui, e Yi-Cheng Su. 2009. «Effect of temperature on uptake and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea plicatula*)». *International Journal of Food Microbiology* 136 (1): 129–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.012>.
- Shimodori, Shoichi, T. Moriya, O. Kohashi, Dong Faming, e K. Amako. 1989. «Extraction from prawn shells of substances cryoprotective for *Vibrio cholerae*». *Applied and environmental microbiology* 55 (10): 2726–28.
- Suffredini, Elisabetta, Renzo Mioni, Rina Mazzette, Paola Bordin, Patrizia Serratore, Federica Fois, Annamaria Piano, Loredana Cozzi, e Luciana Croci. 2014. «Detection and quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish from Italian production areas». *International journal of food microbiology* 184: 14–20.
- Takemura, Alison F., Diana M. Chien, e Martin F. Polz. 2014. «Associations and dynamics of *Vibrionaceae* in the environment, from the genus to the population level». *Frontiers in Microbiology* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00038>.
- Tang, John Yew Huat, W. F. Wan-Rosli, N. H. Abdul-Razak, C. C. Yeo, CA Abu

- Bakar, e R. Son. 2014. «Incidence and antibiogram of *Vibrio parahaemolyticus* in processed and frozen bivalve mollusks in Kuala Terengganu, Malaysia». *International Food Research Journal* 21 (4): 1349.
- Tantillo, G. M., M. Fontanarosa, A. Di Pinto, e M. Musti. 2004. «Updated perspectives on emerging *vibrios* associated with human infections». *Letters in applied microbiology* 39 (2): 117–26.
  - Telli, A. Ezgi, e Yusuf Doğruer. 2019. «Discrimination of viable and dead *Vibrio parahaemolyticus* subjected to low temperatures using Propidium Monoazide – Quantitative loop mediated isothermal amplification (PMA-qLAMP) and PMA-qPCR». *Microbial Pathogenesis* 132 (luglio): 109–16. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.029>.
  - Ullitzur, S. 1974. «*Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*: Short generation-time marine bacteria». *Microbial Ecology* 1 (1): 127–35. <https://doi.org/10.1007/bf02512384>.
  - Vasudevan, Pradeep, Patrick Marek, Scott Daigle, Thomas Hoagland O, e Kumar S. Venkitanarayanan. 2002. «Effect of chilling and freezing on survival of *vibrio parahaemolyticus* on fish fillets 1». *Journal of Food Safety* 22 (4): 209–17.
  - Waldor, M. K., e J. J. Mekalanos. 1994. «Emergence of a New Cholera Pandemic: Molecular Analysis of Virulence Determinants in *Vibrio cholerae* 0139 and Development of a Live Vaccine Prototype». *Journal of Infectious Diseases* 170 (2): 278–83. <https://doi.org/10.1093/infdis/170.2.278>.
  - Wang, Hongxia, Julio C. Ayala, Jorge A. Benitez, e Anisia J. Silva. 2014. «The LuxR-Type Regulator VpsT Negatively Controls the Transcription of RpoS, Encoding the General Stress Response Regulator, in *Vibrio Cholerae* Biofilms». *Journal of Bacteriology* 196 (5): 1020–30. <https://doi.org/10.1128/JB.00993-13>.
  - Weingarten, Eric A., Carla L. Atkinson, e Colin R. Jackson. 2019. «The gut microbiome of freshwater Unionidae mussels is determined by host species and is selectively retained from filtered seston». *PLOS ONE* 14 (11): e0224796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224796>.
  - Wetz, JJ, AD Blackwood, JS Fries, ZF Williams, e RT Noble. 2008. «Trends in total *Vibrio* spp. and *Vibrio vulnificus* concentrations in the eutrophic Neuse River Estuary, North Carolina, during storm events». *Aquatic Microbial Ecology* 53 (settembre): 141–49. <https://doi.org/10.3354/ame01223>.
  - Whitesides, M D, e J D Oliver. 1997. «Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State». *Applied and Environmental Microbiology* 63 (3): 1002–5. <https://doi.org/10.1128/aem.63.3.1002-1005.1997>.
  - Wong, George, Stephen L. Kaattari, e John M. Christensen. 1992. «Effectiveness of an oral enteric coated *vibrio* vaccine for use in salmonid fish». *Immunological investigations* 21 (4): 353–64.
  - Wong, H.C., e P. Wang. 2004. «Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses». *Journal of Applied Microbiology* 96 (2): 359–66. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2004.02166.x>.
  - Wong, Hin-Chung, Li-Li Chen, e Chung-Ming Yu. 1994. «Survival of

Psychrotrophic *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis* and *Vibrio parahaemolyticus* in Culture Broth at Low Temperatures». *Journal of Food Protection* 57 (7): 607–10. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-57.7.607>.

- Wong, Hin-chung, e Yeong-Sheng Lee. 1994. «Regulation of iron on bacterial growth and production of thermostable direct hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus* in intraperitoneal infected mice». *Microbiology and immunology* 38 (5): 367–71.
- Wright, Anita C., Ying Fan, e George L. Baker. 2018. «Nutritional Value and Food Safety of Bivalve Molluscan Shellfish». *Journal of Shellfish Research* 37 (4): 695–708. <https://doi.org/10.2983/035.037.0403>.
- Xu, Huai -Shu, N. Roberts, F. L. Singleton, R. W. Attwell, D. J. Grimes, e R. R. Colwell. 1982. «Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment». *Microbial Ecology* 8 (4): 313–23. <https://doi.org/10.1007/bf02010671>.
- Ye, Mu, Yaoxin Huang, e Haiqiang Chen. 2012. «Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Oysters by High-Hydrostatic Pressure and Mild Heat». *Food Microbiology* 32 (1): 179–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.05.009>.
- Yildiz, F. H., e G. K. Schoolnik. 1998. «Role of RpoS in Stress Survival and Virulence of *Vibrio Cholerae*». *Journal of Bacteriology* 180 (4): 773–84. <https://doi.org/10.1128/JB.180.4.773-784.1998>.
- Yoon, J.-H., S.-K. Moon, C. Choi, B.-Y. Ryu, e S.-Y. Lee. 2019. «Detection of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* induced by prolonged cold-starvation using propidium monoazide real-time polymerase chain reaction». *Letters in Applied Microbiology* 68 (6): 537–45. <https://doi.org/10.1111/lam.13157>.
- Yuan, Yuan, Zihan Feng, e Jinglin Wang. 2020. «*Vibrio vulnificus* hemolysin: biological activity, regulation of vvhA expression, and role in pathogenesis». *Frontiers in Immunology* 11: 599439.
- Zaidenstein, Ronit, Chantal Sadik, Larisa Lerner, Lea Valinsky, June Kopelowitz, Ruth Yishai, Vered Agmon, Michele Parsons, Cheryl Bopp, e Miriam Weinberger. 2008. «Clinical characteristics and molecular subtyping of *Vibrio vulnificus* illnesses, Israel». *Emerging infectious diseases* 14 (12): 1875.
- Zhang, Xiao-Hua, Waqar Ahmad, Xiao-Yu Zhu, Jixiang Chen, e Brian Austin. 2021. «Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms». *Marine Life Science & Technology* 3 (2): 189–203.
- Zhao, Feng, Yongtao Wang, Haoran An, Yanling Hao, Xiaosong Hu, e Xiaojun Liao. 2016. «New insights into the formation of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 induced by high-pressure CO<sub>2</sub>». *Mbio* 7 (4): e00961-16.
- Zhao, Xihong, Junliang Zhong, Caijiao Wei, Chii-Wann Lin, e Tian Ding. 2017. «Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens». *Frontiers in Microbiology* 8 (aprile). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00580>.
- Zhu, Ru-Gang, Tuo-Ping Li, You-Feng Jia, e Li-Feng Song. 2012. «Quantitative study of viable *Vibrio parahaemolyticus* cells in raw seafood using propidium monoazide in combination with quantitative PCR». *Journal of Microbiological*

*Methods* 90 (3): 262–66.

- Zolfaghari, Mehdi, Masoud Rezaei, Ashraf Mohabbati Mobarez, Mehdi Forozandeh Moghaddam, Hedayat Hosseini, e Mohammad Khezri. 2019. «Virulence genes expression in viable but non-culturable state of *Listeria monocytogenes* in fish meat». *Food Science and Technology International* 26 (3): 205–12. <https://doi.org/10.1177/1082013219877267>.

Sitografia:

[www.ISMEA.it](http://www.ISMEA.it)

[www.chioggiapesca.it](http://www.chioggiapesca.it)

[www.locatus.com](http://www.locatus.com)

[www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org)