

**PROGETTI DI RICERCA DA FINANZIARE**  
**CON RISORSE DEL FONDO SANITARIO NAZIONALE**

**Progetto presentato da:**

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA  
SARDEGNA  
STRUTTURA COMPLESSA IGIENE DEGLI ALIMENTI  
*LABORATORIO DI ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI***

**Area tematica: Sicurezza Alimentare**

**Titolo del progetto: Studio e sviluppo di nuove tecniche diagnostiche per la determinazione di fitoplancton tossigeno e di tecniche diagnostiche Immunoenzimatiche per la ricerca di biotossine algali nei molluschi bivalvi vivi della Regione Sardegna**

**Responsabile Scientifico: Sebastiano Virgilio**

**Progetto di Ricerca elaborato dalla Dr.ssa Pina Lorenzoni, Biologa di Medicina Specialistica Ambulatoriale del Laboratorio di Ispezione Alimenti**

**Titolo del progetto: Studio e sviluppo di nuove tecniche diagnostiche per la determinazione di fitoplancton tossigeno e di tecniche diagnostiche Immunoenzimatiche per la ricerca di biotossine algali nei molluschi bivalvi vivi della Regione Sardegna**

**Durata del progetto (espressa in mesi): 24**

**Area tematica: Sicurezza Alimentare**

**Responsabile scientifico del progetto:**

Cognome: Virgilio

Nome: Sebastiano

Qualifica: Dirigente Veterinario, Responsabile Laboratorio di Ispezione degli Alimenti

Telefono 0792892334

Fax 0792892324

E-mail: [sebastiano.virgilio@izs-sardegna.it](mailto:sebastiano.virgilio@izs-sardegna.it)

**ALLEGARE** - Curriculum vitae del responsabile scientifico.

Periodo di riferimento: ultimi 5 anni con indicazione anche delle 10 pubblicazioni scientifiche ritenute più significative, con particolare riferimento a quelle dell'area scientifica sulla quale insiste il progetto.

Laureato in Medicina Veterinaria nell'a.a. 1985-86 presso l'Università degli Studi di Torino, ha conseguito le Specializzazioni universitarie in Microbiologia e Virologia (Fac. Medicina e Chirurgia Univ. Sassari, a.a. 1995-96) e in Ispezione e Controllo degli Alimenti di O.A. (Fac. Med. Veterinaria Univ. Sassari, a.a. 1999-2000) e i Perfezionamenti universitari in Ittiopatologia e Controllo sanitario dei prodotti della pesca (Fac. Med. Vet. Univ. Sassari, 1997) e in Diritto, legislazione e Sanità pubblica veterinaria (Fac. Med. Vet. Univ. Sassari, 2002).

E' attualmente Responsabile del Laboratorio di Ispezione degli Alimenti di O.A. presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna in Sassari. Dal 1997 a tutt'oggi è stato responsabile scientifico e di unità operativa di 35 Progetti di Ricerca corrente e finalizzata inerenti la Sicurezza alimentare approvati e finanziati dal Ministero della Salute. Autore di circa 80 pubblicazioni inerenti la sicurezza alimentare su riviste nazionali e internazionali.

- A.Milandri, M.Cangini, A.Costa, M.G.Giacobbe, R.Poletti, M.Pomperi, E.Riccardi, S.Rubini, **S.Virgilio**, S.Pigozzi (2008) "Caratterizzazione delle tossine P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poisoning*) in mitili raccolti in differenti aree marine italiane". Atti 39° Congresso della Società Italiana di Biologia Marina, 38-41, Cesenatico (FC), 9-13 giugno 2008 ;
- **Virgilio S.**, Lorenzoni G., Marongiu E., Tedde T., Terrosu G., Campus G., Rosa M.N., Mura A. Delogu P. Piras M. (2009) "Riscontri di tossine algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) in mitili allevati nella regione Sardegna e gestione delle non conformità". Atti XIX Convegno Nazionale Associazione Italiana Veterinari Igienisti (A.I.V.I.), Perugia 24, 25, 26 giugno 2009;
- Lorenzoni G. Tedde T., Mele P., Terrosu G., Fattaccio C., Salza S., Arras I., Sanna G., Marongiu E., **Virgilio S.** (2011) "La gestione delle non conformità da biotossine algali del tipo P.S.P. in mitili allevati e commercializzati nella Regione Sardegna" (poster). XXI Convegno nazionale Associazione Italiana Veterinari Igienisti (A.I.V.I.), Signa (FI), 8-10 giugno 2011;
- Lorenzoni G., Tedde T., Terrosu G., Fattaccio C., Salza S., Arras I., Sanna G., Canu A., Uda M.T., Marongiu E., **Virgilio S.** (2011) "Management non-compliance due to algal biotoxins P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) in mussels bred and sold in Sardinia". *Italian Journal of Food Safety*, Vol. , N° 2 (2011);
- Lorenzoni G., Arras I., Sanna G., Marongiu E., Piras G., Salza S., Mudadu A., Tedde T., **Virgilio S.** "Presenza di tossine algali del tipo P.S.P. in mitili allevati nella Regione Sardegna e gestione delle non conformità". Atti XIII Congresso nazionale S.I.di.L.V. Trani (BA), 12-14/10/2011;
- Lorenzoni G., Arras I., Sanna G., Mudadu A., Piras A., Delogu P., Marongiu E., **Virgilio S.** (2012) "Positività da biotossine algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) in molluschi bivalvi allevati e commercializzati nella regione Sardegna negli anni 2002-2012 e gestione delle emergenze sanitarie". Atti XXII Convegno Nazionale dell'Associazione Italiana Veterinari Igienisti (A.I.V.I.),Torino 19-21 Settembre 2012;

- D.Ottaviani, F.Leoni, E.Rocchegiani, R.Mioni, A.Costa, **S.Virgilio**, L.Serracca, D.Bove, C.Canonico, A.Di Cesare, L.Masini, S.Potenziani, G.Caburlotto, V.Ghidini and M.M.Lieo (2012) “An extensive investigation into the prevalence and the genetic and serological diversity of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* in Italian marine coastal waters”. *Environmental Microbiology*, 2012;
- Lorenzoni G., Arras I., Bazzardi R., Sanna G., Muzzigoni C., Pes A.M., Marongiu E., **Virgilio S.** (2012) “Riscontri di positività da biotossine algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) in mitili allevati nelle zone di Olbia e Oristano (Sardegna) e fioriture di *Alexandrium minutum* e *A.catenella* negli anni 2002-2012”. Atti XIV Congresso nazionale S.I.Di.L.V., Sorrento, (NA) 24-26 Ottobre 2012;
- Lorenzoni G., Arras I., Sanna G., Mudadu A., Muzzigoni C., Tedde G., Santucciu C., Nicolussi P., Marongiu E., **Virgilio S.** (2013) “A survey for *Yessotoxin* in Shellfish farmed and marketed in the Sardinia Region in 2013”. Atti XXIII Convegno Nazionale Associazione Italiana Veterinari Igienisti (A.I.V.I.), Roma 12-14 giugno;
- Giuseppa Lorenzoni, Igor Arras, Giovanna Sanna, Alessandro Mudadu, Antonio Piras, Antonio Mura, Edoardo Marongiu, **Sebastiano Virgilio** (2013) “*Paralytic Shellfish Poison* Algal Biotoxins: Sardinia report 2002-2011 and non compliance management “ (2013). *Italian Journal of Food Safety*, 2013, Vol. 2 : e 30;
- Anna Maria Bazzoni, Tiziana Caddeo, **Sebastiano Virgilio**, Rosalba Mancuso, Bachisio M.Padedda, Silvia Pulina, Cecilia T.Satta, Nicola Sechi, Daniela Stacca, Antonella Lugliè (2013) “Potentially toxic microalgae distribution in shellfish farms along the Sardinian coast”. Poster XXI Congresso Associazione Italiana di Oceanologia e Limnologia, Lignano Sabbiadoro (UD), 23-26 /09/2013;
- Mudadu Alessandro, Lorenzoni Giuseppa, Arras Igor, Sanna Giovanna, Tedde Giuseppe, Bazzardi Riccardo, Canu Antonella, Santucciu Cinzia, Marongiu Edoardo, **Virgilio Sebastiano** (2014). Positive feedback of *yessotoxin* identified for the first time in shellfish farmed and marketed in Sardinia region in 2013. Atti XXIV Congresso Nazionale AIVI Bologna, 10-11-12 Settembre 2014, pp 25-26
- Lorenzoni G., Bazzoni A.M., Mudadu A., Bazzardi R., Tedde G., Arras I., Sanna G., Uda M.T., Piras G., Marongiu E., **Virgilio S.** (2015).The evolution of algal bloom of *Alexandrium* genus and the accumulation of PSP toxins in live bivalve molluscs breded in Olbia’s area. Atti XVI Congresso Nazionale S. I. Di. L. V., Montesilvano (Pescara) 30 Settembre - 2 Ottobre 2015

## **Descrizione complessiva del progetto**

Formulare una sintesi del progetto

Dovranno essere chiaramente esplicitati:

1. Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento;
2. Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre;
3. Metodologia;
4. Descrizione dei criteri di trasferibilità e di diffusione dei prodotti e dei risultati da conseguire;
5. Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto;
6. Output del programma (es. documenti; metodologie; corsi di formazione, attivazione di servizi, etc.) con indicazione dei tempi previsti per la presentazione;
7. Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati raggiunti.

## 1. Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento

La Sardegna è tra le regioni italiane uno dei maggiori produttori di molluschi, con rilevanti interessi economici e sociali.

Nelle zone marine costiere la presenza di organismi fitoplanctonici tossici rappresenta uno dei principali rischi per la salute umana. Alcuni di questi organismi in adatte condizioni producono, come è noto, tossine molto potenti che possono raggiungere concentrazioni particolarmente elevate in occasione di fioriture e che vengono accumulate dai molluschi bivalvi presenti nelle zone acquee interessate dai fenomeni di fioritura.

Attualmente il problema delle alghe tossiche marine a livello mondiale sembra assumere dimensioni preoccupanti sia per l'aumentare del numero delle specie riconosciute come dannose sia per l'aumento dei fenomeni di fioritura algale. Tale aumento sembra essere dovuto da un lato alla eutrofizzazione delle aree costiere e dall'altro alla progressiva diffusione di specie tossiche in nuove aree geografiche attraverso, ad esempio, l'acqua di zavorra trasportata dalle navi da carico e il commercio internazionale dei prodotti.

I fenomeni associati alla presenza di alghe tossiche e dannose vengono definiti come “*harmful algal bloom*”. Questa definizione si applica non solo alle alghe microscopiche ma anche alle macroalghe bentoniche e planctoniche, che possono proliferare in condizioni di elevate concentrazioni di nutrienti, producendo danni ecologici dovuti all'allontanamento di specie autoctone, alle alterazioni dell'habitat e alle condizioni di ipossia dei fondali. In Italia, fenomeni di proliferazione algale si verificano con una certa frequenza e interessano la maggior parte delle zone marine costiere (Hallegraeff *et al.* 1993).

Delle circa 5000 specie algali identificate (appartenenti principalmente ai taxa delle *Dinoficee*/*Dinoflagellate* e delle *Diatomee*), circa 75 sono quelle implicate nella produzione di tossine (Poletti *et al.*, 2005).

Le tossine prodotte dalle *Dinoflagellate* sono, nell'ambito delle tossine di natura non proteica, tra le più potenti che si conoscano. A seconda della loro solubilità, le tossine vengono distinte in idrosolubili (tra cui la Saxitossina e i suoi derivati) e liposolubili (Brevetossine, tossine del gruppo dell'Acido Okadaico e i suoi derivati, Pectenotossine, Yessotossine, Azaspiracidi).

L'uomo può essere esposto a queste tossine attraverso il consumo di organismi ittici che le accumulano e durante lo svolgimento di attività ricreative presso acque marine interessate da fenomeni di fioriture algali; in quest'ultima evenienza sono più frequenti i disturbi di carattere respiratorio conseguenti alla inalazione di aerosol marino contenente tossine prodotte da microalghe tossiche.

Le più comuni intossicazioni umane si verificano con maggiore frequenza a seguito dell'ingestione di molluschi bivalvi contenenti tossine di origine microalgale, talvolta in concentrazioni tali da risultare letali. Le tossine algali vengono accumulate prevalentemente dai molluschi bivalvi, in misura minore da echinodermi, tunicati, gasteropodi, crostacei, pesci.

I molluschi bivalvi maggiormente interessati dall'accumulo di tossine di origine algale appartengono ai generi *Mytilus*, *Argopecten*, *Cardium*, *Mya*, *Pecten*, *Saxidomus* e *Spisula*. Le ostriche accumulano le tossine algali in misura minore rispetto agli altri generi.

Le tossine algali marine possono anche provocare morie di pesci sia direttamente che in seguito ad ingestione di piccoli molluschi planctonici contaminati. I pesci sono in genere molto sensibili a queste tossine e muoiono prima che vengano raggiunte nelle loro carni concentrazioni pericolose per l'uomo. Tuttavia alcune tossine liposolubili, come le Ciguatossine, non hanno effetti significativi sui pesci ma tendono ad accumularsi lungo la catena alimentare fino a raggiungere elevate concentrazioni nei grossi pesci predatori, che risultano pertanto tossici per l'uomo.

Le tossine idrosolubili comprendono:

- composti responsabili della paralisi respiratoria nell'uomo per consumo di molluschi bivalvi, conosciuta più comunemente come *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP);
- composti responsabili di forme di amnesia temporanea, conosciute come *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP);

- composti che per struttura e sintomatologia sono simili alle tossine PSP ma che arrivano all'uomo attraverso il consumo di vari prodotti ittici, principalmente pesci (Tetrodotossine, TTX),
- composti originariamente ritrovate nei coralli molli delle aree tropicali e successivamente in numerosi organismi marini (Palitossine, PITX)

Le tossine PSP determinano sintomi neurologici e l'avvelenamento dell'uomo deriva in genere dal consumo di molluschi bivalvi contaminati, ma anche da cefalopodi, crostacei e pesci. La struttura di base della tossina è la Saxitossina che, parimenti ai suoi analoghi, può essere mortale nell'uomo in quanto determina nei casi più gravi la paralisi respiratoria. Le tossine idrosolubili del tipo PSP sono prodotte da *Dinoflagellati* appartenenti al genere *Alexandrium*; le specie *A. catenella* e *A. minutum* sono state più volte rilevate nelle acque della Sardegna adibite alla molluschicoltura (Ade *et al* 2003).

L'origine della molecola è principalmente microalgale, ma non si esclude che alcuni batteri, altri produttori di Saxitossine, possano agire sulle alghe come simbionti o endosimbionti (Crocchi *et al.* 1997).

La sindrome ASP è causata dall'Acido Domoico e dai suoi isomeri, molecole di origine microalgale che agiscono sui siti della memoria, nell'area dell'ippocampo. Chimicamente l'Acido Domoico è un aminoacido raro, con funzione neuroeccitatoria; i suoi effetti sono amplificati nelle persone anziane, nelle quali nei casi più gravi può subentrare la morte. *Diatomee* del genere *Pseudonitzschia* produttrici di Acido Domoico, e quindi potenzialmente tossiche, hanno in Sardegna una distribuzione piuttosto ampia.

L'intossicazione da Tetrodotossina (TTX) provoca sintomi neurotossici; la tossina si accumula in vari organismi marini ed in particolare nei pesci della famiglia dei Tetrodonti (pesce palla, pesce soffiatore). Pochi grammi di questi pesci contaminati, mangiati sia cotti che crudi, determinano gravi disturbi neurologici e nei casi più gravi l'insorgenza della morte per paralisi respiratoria. Questa tossina è di origine batterica e, attualmente, non si conoscono alghe in grado di produrla (Ade *et al.* 2003).

L'avvelenamento da Palitossina (PITX) per consumo di prodotti ittici si manifesta nell'uomo rapidamente, interessando il sistema gastrointestinale, cardiovascolare, renale e quello respiratorio. Palitossina ed analoghi sono stati scoperti in microalghe del genere *Ostreopsis* (*Dinofyceae*). In Italia importanti fioriture di *Ostreopsis ovata* sono state associate a disturbi respiratori e parainfluenzali accusati da alcune centinaia di persone che soggiornavano in riva al mare (Poletti *et al.* 2005).

Le tossine liposolubili di maggiore interesse comprendono:

- il gruppo dell'Acido Okadaico e Dinophysitossine (AOs)
- il gruppo delle Pectenotossine (PTXs)
- il gruppo degli Azaspiracidi (AZAs)
- il gruppo delle Yessotossine (YTXs)

Fra le biointossicazioni causate da molecole liposolubili, la sindrome definita come *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP) è quella maggiormente conosciuta per i gravi e prolungati disturbi gastrointestinali che procura nei consumatori di bivalvi contaminati; responsabili dell'insorgenza di questa sindrome sono le tossine appartenenti al gruppo dell'Acido Okadaico e i suoi derivati.

Le tossine che causano DSP sono prodotte da *Dinoflagellati* marini appartenenti ai generi *Dinophysis* e *Prorocentrum*, presenti nei mari italiani. Le specie più frequentemente riscontrate nelle coste marine della Sardegna sono le specie: *D. acuminata*, *D. sacculus*, *D. rotundata*, *D. fortii*, *D. caudata*, *D. tripos*, *P. lima* e *P. mexicanum*.

Alla sindrome DSP sono state in passato associate altre tossine liposolubili, quali le Yessotossine, le Pectenotossine e gli Azaspiracidi, poichè vengono estratte simultaneamente all'Acido Okadaico e ai suoi derivati. Tali tossine sono, però, composti chimicamente distinti per effetti tossicologici, meccanismi di azione e lesioni biochimiche.

I controlli sanitari e ambientali sulla molluschicoltura sono definite da una serie di norme comunitarie finalizzate alla tutela della salute dei consumatori, tra cui in particolare i Regolamenti (CE) n. 178/2002, n. 852/2004, n. 853/2004, n. 854/2004, n. 882/2004, n. 2074/2005, n. 2076/2005, n.1664/2006, n. 15/2011 e n. 786/2013.

In **Sardegna** le problematiche sanitarie connesse alla presenza di accumulo di tossine algali nei molluschi bivalvi, sia di produzione locale che di importazione comunitaria, sono da tempo all'attenzione della Sanità pubblica veterinaria.

Sulla base dei riscontri di tossicità rilevati in questi ultimi anni, sono state individuate due aree di allevamento a rischio elevato di fioritura di microalghe produttrici di tossine PSP, ossia l'area marina di Olbia (Golfo di Olbia, Golfo di Cugnana e la Laguna di Porto Pozzo) e l'area marina di Oristano (Golfo di Oristano e Foce del Tirso).

Il riscontro di queste tossine nei molluschi bivalvi a livelli superiori ai limiti stabiliti dalla normativa sanitaria vigente, comporta il divieto di raccolta e commercializzazione dei prodotti per ovvi motivi di tutela della salute pubblica. Il Reg. CE n. 853/04 stabilisce per le tossine del tipo PSP un limite massimo di 800 µg/Kg di parte edibile.

Il primo evento di tossicità per **tossine PSP** è stato riscontrato nel Golfo di Olbia nel Maggio 2002 associato alla presenza di *A. minutum*. e *A. catenella* (Virgilio *et al.* 2003). Nei mesi Aprile-Maggio del 2003, sempre nel Golfo di Olbia, si sono verificati nuovamente fenomeni di fioriture di entrambe le specie con conseguente accumulo di tossine PSP nei molluschi bivalvi (Virgilio *et al.*, 2004). Nel Golfo di Cugnana la positività per PSP si è manifestata nei mesi invernali (Gennaio-Febbraio) del 2005, sostenuta sempre dalla fioritura di entrambe le specie. La letteratura riporta i mesi primaverili come periodo a rischio di fioriture algali, mentre in Sardegna il genere *Alexandrium* si sviluppa anche nei mesi autunnali ed invernali. Fioriture del solo *A. minutum* sono state responsabili dell'accumulo di tossine PSP nei molluschi bivalvi allevati nelle zone di Cugnana e Porto Pozzo, nei mesi autunnali ed invernali del 2008, 2009, e Porto Pozzo nel 2010 e 2011 (Lorenzoni *et al.* 2013). Nel 2012 l'accumulo di tossine PSP riscontrato nel Golfo di Olbia e associato alla presenza di *A. minutum*, è risultato inferiore ai limiti stabiliti dal Reg. CE 853/04.

Per quanto riguarda il distretto di Oristano la prima positività per PSP è stata riscontrata nel Gennaio 2006, in mitili di importazione comunitaria (Spagna) e successivamente nel Novembre 2006 in molluschi bivalvi di produzione locale provenienti dalla zona Foce Tirso, associata alla fioritura di *A. minutum*. e *A. catenella*. Nel Novembre 2008 nel Golfo di Oristano, e in Febbraio 2012 nelle zone Golfo di Oristano e Foce Tirso sono state riscontrate positività associate alla sola specie *A. minutum* (Lorenzoni *et al.* 2012, 2013a).

Nel distretto di Oristano nel 2001, in mitili di importazione comunitaria (Grecia) e nel 2010 in mitili provenienti da Portoviro, sono stati riscontrati valori di tossine liposolubili appartenenti al gruppo dell'Acido Okadaico oltre i limiti consentiti dalla normativa vigente (Reg. CE n. 853/04 che stabilisce il limite di 160 µg/Kg di parte edibile per AO, DTX, PTX e AZA; Reg. (CE) n. 786/13 che stabilisce il limite di 3,75 mg/Kg di parte edibile per YTX).

Nel 2013 è stata riscontrata positività per Yessotossine in molluschi bivalvi prelevati dalle Aziende sanitarie locali di Olbia, Carbonia e Cagliari, probabilmente provenienti dall'Adriatico, in quanto le microalghe che producono le Yessotossine (*Gonyaulax spinifera*, *Lingulodinium polyedrum* e *Protoceratium reticulatum*) non erano presenti in quel periodo nelle acque marine sarde (Lorenzoni *et al.* 2013 b).

Per quanto riguarda la produzione regionale, le zone a rischio per l'accumulo di **tossine liposolubili** nei molluschi bivalvi sono principalmente quelle di Cagliari e di Tortolì. Le tossine liposolubili accumulate dai molluschi bivalvi di queste zone appartengono al gruppo dell'Acido Okadaico e sono sostenute da fioriture di *Dinoflagellate*; le specie più frequentemente riscontrate sono state *D. acuminata*, *D. sacculus* e *D. rotundata*, e tra le *Prorocentrum* le specie *P. lima* e *P. mexicanum*. Nel 2002 si sono riscontrate positività nella zona di S. Gilla (Cagliari), nel 2003 a Feraxi (Cagliari), nel 2015 le positività per Acido Okadaico e i suoi derivati sono state riscontrate, nel periodo Febbraio-Maggio, nelle zone acquee di S.Gilla (Cagliari); S.Giovanni, Feraxi, Colostrai, (Muravera) e nelle zone acquee di Tortolì e di Orosei (Bazzoni *et al.* in preparazione).

La presenza tossine del tipo **ASP** in molluschi bivalvi è stata riscontrata, per la prima volta nel territorio regionale, nel corso del 2011. La microalga *Pseudonitzschia* responsabile della produzione di tale tossina è sempre presente nelle acque marine sarde, costituendo un potenziale pericolo. Gli allevamenti interessati si trovavano nella Laguna di S. Gilla e le tossine sono state accumulate dai mitili nei mesi di Maggio e Giugno. La presenza di tossine ASP è stata inoltre rilevata in campioni prelevati presso lo stagno di Tortolì e il golfo di Oristano ma provenienti dagli allevamenti siti nella Laguna di S.Gilla, I livelli riscontrati non hanno in nessun caso superato il limite di legge (20 mg/Kg Ac.domoico+Ac. Epidomoico), tuttavia, in un campione prelevato nel circuito commerciale la concentrazione (18 mg/Kg Ac.domoico+Ac. Epidomoico) era prossima al limite di legge.

In Sardegna è in vigore il **Piano Regionale** per la vigilanza ed il controllo sanitario della produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi e per il monitoraggio periodico delle zone di produzione e di stabulazione di molluschi bivalvi vivi, predisposto e coordinato dall'Assessorato regionale dell'Igiene e Sanità in collaborazione con esperti dell'I.Z.S. Sardegna e dei Servizi Veterinari delle AA.SS.LL.. L'attività di prelievo dei campioni di acque e molluschi bivalvi è demandata ai Servizi Veterinari delle Aziende Sanitarie locali, mentre l'attività analitica è demandata alla SC di Igiene degli Alimenti dell'I.Z.S. della Sardegna per la determinazione delle biotossine algali nei molluschi bivalvi e del fitoplancton tossico e potenzialmente tossico nelle acque adibite alla molluschicoltura (Piano Regionale rev. 2015).

E' essenziale che l'attività di controllo sanitario sia associata all'attività di ricerca scientifica finalizzata all'acquisizione di dati epidemiologici e al miglioramento dell'attività diagnostica propria dell'I.Z.S., in collaborazione con i Servizi territoriali dei Dipartimenti di Prevenzione delle AA.SS.LL. e altri Enti di ricerca (Università, Centri di Referenza nazionali, Istituto Superiore di Sanità).

## Bibliografia principale

1. Ade P, Funari E, Poletti R. (2003). "Il rischio sanitario associato alle tossine di alghe marine". Annali Istituto Superiore di Sanità, Roma, 39 (1) 53-68
2. Croci L., Pompei M., Stacchini A., Toti L. (1997) "Characterization of Symbiotic bacteria isolated from microalgae of Adriatic". VIII International Conference on Harmful Algae p. 58, Vigo.
3. Hallegraeff G M, Bolch CJ. (1992). "Transport of diatom and dinoflagellate resting spores via ship's ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture". *J Plankton Res*, 14:1067-84
4. Lorenzoni G., Arras I., Bazzardi R., Sanna G., Muzzigoni C., Pes A. M., Marongiu E., Virgilio S., (2012). Riscontri di positività da biotossine algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) in mitili allevati nelle zone di Olbia e di Oristano (Sardegna) e fioriture di *Alexandrium minutum* ed *Alexandrium catenella* negli anni 2002-2012 Atti XIV Congresso Nazionale S. I. Di. L. V., Sorrento 24-26 Ottobre 2012
5. Giuseppa Lorenzoni, Igor Arras, Giovanna Sanna, Pietro Delogu, Alessandro Mudadu, Antonio Piras, Antonio Mura, Edoardo Marongiu, Sebastiano Virgilio (2013). "*Paralytic Shellfish Poison* algal biotoxins: Sardinia report 2002-2011 and non-compliance management". *Italian Journal of Food Safety* 2013; volume 2:e30, pp 104-108
6. Lorenzoni G., Arras I., Sanna G., Mudadu A., Muzzigoni C., Tedde G., Santucci C., Nicolussi P., Marongiu E., Virgilio S. (2013). "A survey for yessotoxin in shellfish farmed and marketed in the Sardinia region in 2013". Atti XV Congresso Nazionale S. I. Di. L. V., Monreale (Palermo) 23-25 Ottobre 2013, pp 64-65
7. Piano regione Sardegna Molluschi Bivalvi. Revisione 2014
8. Poletti R, Pompei M. (2005). Lo stato delle conoscenze sul fenomeno *Ostreopsis* lungo le coste italiane. Seminario Internazionale "*Ostreopsis*: problema per il Mediterraneo?" Genova 5 Dicembre 2005

9. Virgilio S., Marongiu E., Pisanu M., Mancuso R., Piras A., Viridis F., Saba A., Lorenzoni G., Rosa M.N., Carusillo F., Arras I., Sias S., Poletti R. (2003). “Riscontro di Biotossine Algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poisoning*) in mitili allevati nel golfo di Olbia, Sardegna”. Atti del XIII Convegno Nazionale A.I.V.I.; Montesilvano (Pescara) 6-7-8 Giugno 2003
10. Virgilio S., Marongiu E., Piras A., Pisanu M., Lorenzoni G., Carusillo F., Pes A., Rosa M.N., Canu A., Puggioni G., Sias S., Navone A., Poletti R. (2004) “Evoluzione della contaminazione da biotossine algali del tipo P.S.P (*Paralytic Shellfish Poison*) in mitili allevati nel golfo di Olbia, Sardegna”. Atti XIV Convegno Nazionale A.I.V.I., Santuario di Vicoforte (CN), 4-5-6 giugno 2004;

## 2. Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre

Nell'ambito del vigente Piano Regionale per la vigilanza ed il controllo sanitario della produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi e per il monitoraggio periodico delle zone di produzione e di stabulazione di molluschi bivalvi vivi, nel 2014 sono stati analizzati n.1061 campioni di molluschi bivalvi per la ricerca di biotossine algali per un totale di 3182 esami e n. 2116 campioni di acque di allevamento per la ricerca del fitoplancton potenzialmente tossico.

La grande quantità di dati di laboratorio può essere valutata mediante applicazioni statistiche che consentono di estrapolare fattori di rischio ed eventuali anomalie del sistema.

Il progetto si propone di:

- 1) effettuare una valutazione più approfondita sulla **distribuzione delle specie algali tossiche** nelle acque lagunari e marino-costiere delle aree di produzione e di stabulazione dei molluschi bivalvi e studiare **l'evoluzione temporale delle fioriture** correlata all'insorgenza di fenomeni di bioaccumulo nei molluschi bivalvi. L'identificazione e la quantificazione delle specie algali tossiche, parallelamente alla determinazione delle biotossine algali nei molluschi bivalvi, consentirebbe di avere informazioni immediate sulle dinamiche di crescita delle microalghe e del conseguente possibile accumulo nei molluschi bivalvi destinati all'alimentazione umana. Si ritiene importante, inoltre, studiare la possibile **interazione** dovuta alla contemporanea presenza di specie algali differenti, che potrebbe determinare un potenziamento della loro azione tossica. Un altro aspetto che il progetto intende approfondire è la relazione, non sempre chiara, che intercorre tra la presenza di alghe tossiche e l'accumulo di tossine nei molluschi bivalvi. E' stato ad esempio osservato, nel periodo Febbraio-Maggio 2015, nelle zone acquee di Muravera, Tortolì e Orosei il contemporaneo verificarsi di fioriture all'accumulo di Acido Okadaico, mentre nella laguna di S.Gilla, le fioriture si sono verificate negli ultimi mesi del 2014 per poi diminuire nel periodo in cui i molluschi risultavano positivi (Febbraio-Maggio 2015).
- 2) migliorare l'attività diagnostica mediante la messa a punto e l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare (**PCR**) per l'identificazione delle microalghe tossiche, a supporto e a conferma della identificazione fenotipica, in collaborazione con il Centro Ricerche Marine di Cesenatico, (CRN) e con l'Università di Sassari, Ecologia Vegetale; all'isolamento e identificazione di specie algali provenienti da nuove aree geografiche seguirà lo **studio filogenetico**, in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità.
- 3) messa a punto e validazione di tecniche diagnostiche **Immunoenzimatiche** per la determinazione di tossine del tipo PSP, come alternativa al *mouse test*, e delle tossine liposolubili come metodo di *screening* e di supporto al metodo chimico ufficiale (LC-MS/MS) in vigore dal 01/01/2015. La normativa europea (Reg. CE n.2074/2005 e Reg. CE n.15/2015) consente infatti l'utilizzo di altri metodi di analisi per il monitoraggio delle tossine liposolubili, a condizione che le performance del metodo soddisfino i criteri stabiliti dal UE-RL (Laboratorio di Riferimento Europeo). La messa a punto di metodi Immunoenzimatici mediante l'utilizzo di Kit commerciali ELISA, validati inter e intra-laboratorio, permetterebbe l'acquisizione di risultati in tempi rapidi.

### 3. Metodologia

Il progetto sarà articolato nelle seguenti fasi lavorative:

**Fase 1:** organizzazione del progetto e di collaborazione tra le diverse strutture coinvolte

**Fase 2:** prelievo e trasporto dei campioni di acque e di molluschi bivalvi, nell'ambito del Piano regionale, in collaborazione con i Servizi Veterinari territoriali delle AASSLL della Sardegna.

**Fase 3:** analisi dei campioni: il Laboratorio Ispezione degli Alimenti, eseguirà la ricerca di tossine del tipo PSP mediante la metodica ufficiale (Association of Analytical Communities, Official Method of Analysis of AOAC International. 18 th ed. Gaithersburg, M.D.: AOAC International; 2005a. AOAC Official Method 959.08. *Paralytic shellfish poison*. Biological method. Section 49.10.01); l'inoculo dei campioni sarà effettuato, presso lo stabulario dell'IZS che afferisce al Laboratorio Diagnostica Clinica - Stabulari.

La ricerca delle microalghe tossiche o potenzialmente tossiche sarà effettuata mediante microscopia inversa (UNI EN 15204:2006 "Water quality - Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique) dal Laboratorio Ispezione degli Alimenti.

Il Laboratorio di Bromatologia effettuerà la ricerca delle Tossine Liposolubili con il metodo LC-MS/MS (EU Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS. Version 5, January 2015. European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins EU-RL-MB); la determinazione delle tossine del tipo ASP sarà effettuata con metodica HPLC (EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of domoic acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using UV detection Version 1, June 2008. European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EU-RL-MB).

**Fase 4:** messa a punto di tecniche biomolecolari (PCR) per l'identificazione delle specie algali, previo isolamento e messa in coltura di microalghe potenzialmente tossiche provenienti dalle aree di interesse; ulteriori cloni di specie algali potranno essere isolati da aree di studio e tenuti in coltura in laboratorio per le successive analisi di tossicità e analisi molecolare.

All'identificazione ed isolamento di specie algali provenienti da nuove aree geografiche seguirà lo studio filogenetico dei ceppi isolati.

**Fase 5:** messa a punto, sviluppo e validazione di metodi Immunoenzimatici per la diagnosi rapida di tossine liposolubili e idrosolubili.

**Fase 6 :** raccolta dei risultati e valutazione mediante applicazioni statistiche

Alla scadenza del primo anno di attività verrà preparata una relazione intermedia con la raccolta delle analisi effettuate e dei risultati ottenuti.

Tutti i risultati ottenuti durante le fasi precedenti saranno raccolti e analizzati per il report finale del progetto.

### 4. Descrizione dei criteri di trasferibilità e di diffusione dei prodotti e dei risultati da conseguire

I risultati ottenuti nel corso del presente progetto permetteranno di ampliare le conoscenze sulla presenza di biotossine algali e sulle fioriture algali nocive emergenti presenti nelle acque marine della Sardegna.

Il progetto, inoltre, permetterà al Laboratorio Ispezione degli Alimenti di acquisire esperienza e conoscenza su una attività di recente acquisizione, quale la ricerca del fitoplancton, iniziata nel 2014, che necessita ancora di ulteriori studi ed approfondimenti per poter esplorare un mondo nuovo come quello delle microalghe.

I risultati verranno elaborati e divulgati con la partecipazione e la comunicazione di lavori a convegni scientifici e attraverso pubblicazioni su riviste scientifiche.

## **5. Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto**

Il progetto è caratterizzato dalla azione sinergica e integrata di diverse componenti professionali (Biologi, Veterinari) dell'I.Z.S. della Sardegna, dell'Università di Sassari, dell'I.S.S. , del Centro Ricerche Marine di Cesenatico caratterizzate, ciascuna nel proprio ambito, da elevata specializzazione tecnico-scientifica (esperti nel campo della sicurezza alimentare, dell'ecologia vegetale e ambientale, della chimica analitica, delle biologia molecolare, della diagnostica di laboratorio). Il lavoro fra i partecipanti di diverse professionalità, appartenenti a Enti di ricerca diversi, rappresenta un momento di attività integrata, secondo quanto dettato dalle più moderne modalità di lavoro in equipe.

## **6. Output del programma (es. documenti; metodologie; corsi di formazione, attivazione di servizi, etc.) con indicazione dei tempi previsti per la presentazione**

I risultati del progetto verranno resi disponibili tramite:

- comunicazioni orali e poster in occasione di Convegni scientifici
- pubblicazioni a stampa su riviste specializzate di settore
- pubblicazione sul sito internet dell'Ente
- materiale informativo finalizzato alla formazione degli Operatori del comparto della molluschicoltura
- Attivazione di un servizio diagnostico mediante messa a punto di metodiche di analisi Immunoenzimatiche per la ricerca rapida di biotossine algali nei MEL e di metodiche biomolecolari per l'identificazione di specie algali tossiche

Le attività sopra definite saranno realizzate entro i 12 mesi successivi alla conclusione del progetto.

## **7. Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati raggiunti.**

### **Obiettivi:**

- Raccolta e analisi di dati epidemiologici sulla presenza, tipologia e distribuzione di microalghe tossigene nelle principali aree di produzione della Sardegna e di biotossine algali nei MBV
- messa a punto e standardizzazione di metodi biomolecolari di identificazione di microalghe tossiche e di metodi Immunoenzimatici di biotossine algali del tipo PSP e Liposolubili
- contributo alla valutazione del rischio.

### **Indicatori:**

- Disponibilità e fruibilità dei dati per gli utenti
- Report annuale sui dati raccolti e relazione finale
- Produzione del materiale informativo per gli Operatori del settore (produttori, SSN)

## Cronogramma del progetto

mese	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
WP1																								
WP2																								
WP3																								
WP4																								
WP5																								
WP6																								

**WP1:** fase iniziale di organizzazione del progetto e delle collaborazioni tra le varie strutture coinvolte

**WP2:** prelievo e trasporto dei campioni

**WP3:** fase analitica (analisi dei campioni con metodi ufficiali )

**WP4:** studio e sviluppo di tecniche colturali per la coltivazione e biomolecolari (PCR) per l'identificazione delle microalghe, studio filogenetico dei ceppi isolati

**WP5:** messa a punto, sviluppo e validazione di metodi Immunoenzimatici per diagnosi rapida di tossine liposolubili e idrosolubili

**WP6:**raccolta e valutazione dei risultati ed elaborazione statistica

**Tabella n. 1**

**Titolo del progetto: Studio e sviluppo di nuove tecniche diagnostiche per la determinazione di fitoplancton tossigeno e di tecniche diagnostiche Immunoenzimatiche per la ricerca di biotossine algali nei molluschi bivalvi vivi della Regione Sardegna**

**Durata del progetto** (espressa in mesi): 24

**Responsabile scientifico** Cognome: Virgilio Nome: Sebastiano

VOCE DI SPESA	Importo	Descrizione
Borsa di studio		Veterinario con Specializzazione in Ispezione degli Alimenti

Firma del Responsabile Scientifico del progetto  
Firmato: Dr. Sebastiano Virgilio