

Azienda Sanitaria Locale di Olbia

**ZOONOSI: Sorveglianza del rischio e
tutela della salute pubblica**

**SORVEGLIANZA SANITARIA SUI RISCHI
CAUSATI DALLE BIOTOSSINE ALGALI**

Sebastiano Virgilio e Pina Lorenzoni

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale della
Sardegna, Dip. Igiene Alimenti, Sassari**

Microalghe tossiche: origine

- fenomeni di **eutrofizzazione** antropogenica
- intensificazione commerci internazionali per via navale (**acque di zavorra**)
- forme cistiche di resistenza
- **diffusione di specie algali tossiche** in nuove aree geografiche

Molluschi bivalvi e patologie umane

- **l'ambiente** in cui i MEL vivono e crescono
- le particolari modalità di nutrizione e le capacità di **concentrazione**
- alcune diffuse **consuetudini** nel consumo di tali prodotti

evidenziano

il ruolo da essi svolto nella trasmissione di alcune patologie umane

Problematiche igienico-sanitarie relative al consumo di molluschi bivalvi

- Il meccanismo di filtrazione dell'acqua fornisce al mollusco bivalve ossigeno e alimento sotto forma di particolato
- Nel particolato possono essere contenuti **inquinanti** di tipo:
 - a) **biologico** (batteri, virus, microalghe produttrici di tossine)
 - b) **chimico** (metalli pesanti, PCB, pesticidi..)

Conseguenze della presenza di microalghe tossiche nei MEL

- di **natura sanitaria** (patologie umane)
- di **natura economica** per le imprese ittiche:
 - divieto di raccolta e commercializzazione dei molluschi bivalvi
 - impatto psicologico negativo sul consumatore
 - riduzione consumi

principali microalghe marine produttrici di
tossine che causano malattia nell'uomo
associata al consumo di molluschi bivalvi

- *Alexandrium* (*minutum, catenella..PSP*)
- *Pseudo-nitzschia* (*pungens..ASP*)
- *Dinophysis* (*sacculus..DSP*)
- *Gymnodinium* (*breve..NSP*)
- *Gambierdiscus* (*toxicus..Ciguatera*)

Biotossine marine

Tossine idrosolubili

PSP (*Paralytic Shellfish Poison*)



A.minutum



A.catenella

*Vibrio Bacillus
Moraxella*

ASP (*Amnesic Shellfish Poison*)



*Pseudo-nitzschia
pungens*

TTX (Sindrome neurotossica da pesce palla)

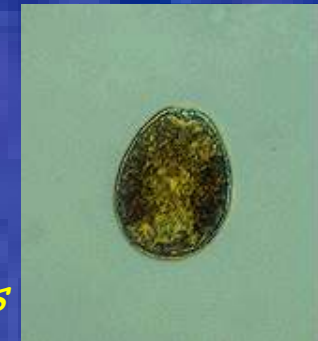
Biotossine marine

Tossine liposolubili

DSP (*Diarrhetic Shellfish Poison*)



Dinophysis sacculus



Prorocentrum lima

NSP (*Neurotoxic Shellfish Poison*)



Gymnodinium breve

Ciguatera o CFP



Gambierdiscus toxicus

Biotossine algali P.S.P.

- ❑ rilevante problema di sanita' pubblica in molte aree del mondo (ogni anno si registrano numerosi casi di intossicazione nell'uomo con una mortalità del 7-15%)
- ❑ importante causa di perdite economiche per il comparto della molluschicoltura
- ❑ causa di mortalità della fauna ittica sensibile

Biotossine algali P.S.P.

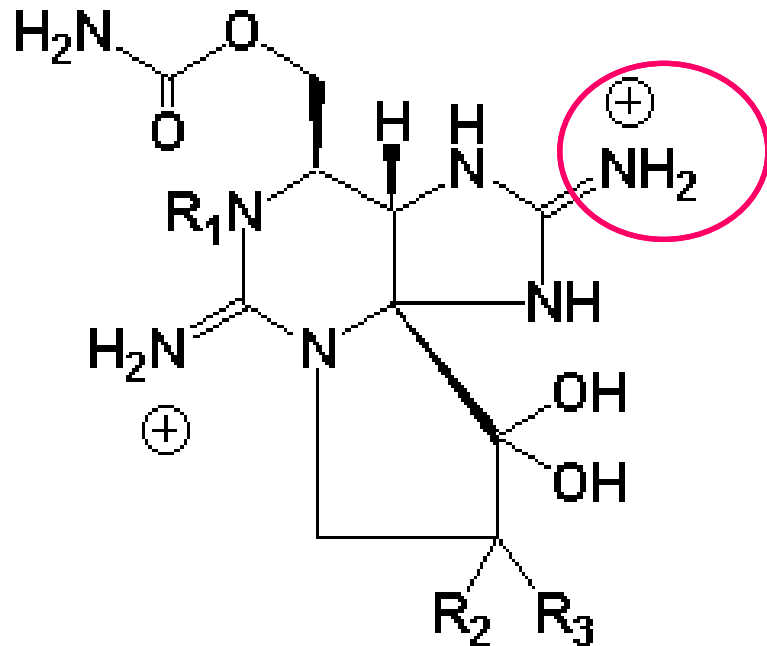
- **MICROALGHE** dinoflagellate marine dei generi *Alexandrium* (*A. minutum*, *A. catenella*, *A. tamarense*) e *Gymnodinium* (*G. catenatum*)
- **BATTERI** marini dei generi *Vibrio*, *Moraxella*, *Bacillus*, *Aeromonas*

Biotossine algali P.S.P.

- tossine idrosolubili e **termostabili**

- I circa 20 costituenti PSP finora conosciuti si dividono in tre gruppi: carbammati, composti N-solfocarbamilici e decarbamilici. Questi hanno complessivamente proprietà chimiche simili a quelle della saxitossina, seppure a **tossicità** **differente**:
 - **alta** nei composti *carbammati* (mitili)
 - **media** nei *decarbamilici*
 - **bassa** nei composti *N-solfocarbamilici* (*microalghe*)

Saxitossina

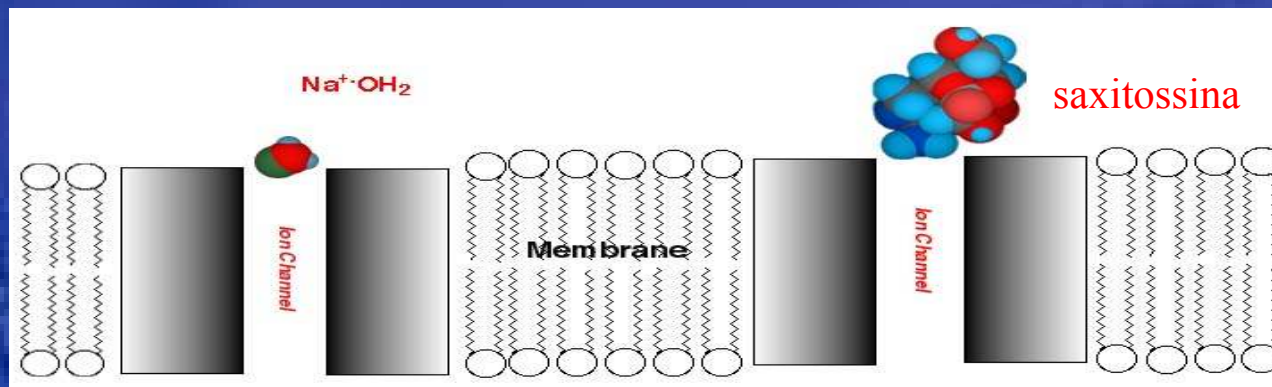


STX	R_1	R_2	R_3
STX	H	H	H
GTX-II	H	H	OSO_3^-
GTX-III	H	OSO_3^-	H
NeoSTX	OH	H	H
GTX-I	OH	H	OSO_3^-
GTX-IV	OH	OSO_3^-	H

Come struttura di base le **saxitossine** hanno una **molecola tetroidopurinica** con due gruppi guanidinici; uno di questi è interessato al blocco dei canali del Na^+ della membrana cellulare.

meccanismo di azione

- ❑ occlusione dei canali del sodio della membrana plasmatica delle cellule eccitabili
- ❑ blocco dell'impulso nervoso
- ❑ paralisi



natura e decorso della **sindrome paralitica**

- i sintomi si manifestano molto rapidamente (30' - 2 ore)
- **sintomatologia** prevalente di **tipo neurologico** (parestesie alla bocca, labbra, lingua, all'estremità degli arti, profonda astenia muscolare, impossibilità a mantenere la stazione eretta, andatura atassica, perdita dell'equilibrio)
- sintomatologia gastrointestinale rara o assente
- possibilità di morte. Nei casi fatali la morte avviene dopo 3-12 ore per **paralisi respiratoria**. I pazienti che superano le prime 12 ore di solito si riprendono rapidamente senza effetti secondari (Steidinger, 1984; WHO, 1984; Viviani, 1992)

modalità di trasmissione

L'INTOSSICAZIONE UMANA
avviene per ingestione di:

- ✓ mitili (90%)
- ✓ pesci planctofagi
- ✓ crostacei
- ✓ gasteropodi
- ✓ cefalopodi



Tossicità umana

- **Venezuela 1997**: persone intossicate 256 con 10 casi mortali
- **Guatemala 1987**: persone intossicate 187 con 26 casi mortali
- Gli episodi più gravi in **Europa** si sono manifestati nel **Regno Unito** (78 casi) nel 1968 e nel 1976 in **Spagna** ed Europa occidentale, di cui 38 in **Italia** per consumo di cozze spagnole importate dai rias della Galizia (Viviani, 1977; 1978; Lüthy, 1979) e nel 2006 in Italia per consumo di mitili provenienti dalla Spagna.

Tossicità umana

- I **bambini** sono molto più sensibili degli adulti alla STX. In Guatemala nel 1987, durante un grave episodio d'avvelenamento da PSP, la mortalità dei bambini con età inferiore ai sei anni è risultata del 50 %, mentre quella degli adulti del 7% (Rosales, 1989; Rodriguez e coll., 1990).
- Nella Patagonia cilena nel 2002 sono morti due pescatori 3-4 ore dopo aver mangiato 7-8 molluschi bivalvi (*Aulacomyaater*). La concentrazione di STX equivalente era di 8575 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ di p.e.

Il **tenore massimo di P.S.P.** nei molluschi bivalvi vivi stabilito dalla UE (Reg. CE 853/2004) è di:

800 μ g di equivalente di saxitossina /kg di parte edibile

Capacità fisiologica di accumulo delle biotossine marine

PSP

<i>Mytilus galloprovincialis</i>	● ● ● ● ●
<i>Donax trunculus</i> (tellina) e <i>Tapes philippinarum</i> (vongole filippine)	● ● ●
<i>Callista chione</i> (fasolari)	●
<i>Cardium sp</i> (cuore)	●
<i>Chamelea gallina</i> (vongola g.)	●
<i>Clhamys sp.</i> (conchiglia)	●
<i>Crassostrea gigas</i> (ostrica)	●
<i>Pecten jacobaeus</i> (capesante)	●

PSP: mesi potenzialmente a rischio

Gennaio	●
Febbraio	●
Marzo	●
Aprile	● ● ●
Maggio	● ● ● ●
Giugno	● ● ●
Luglio	● ●
Agosto	●
Settembre	●
Ottobre	●
Novembre	●
Dicembre	●

D. Min. Sal. 16/05/02

Metodi di determinazione biotossine algali

P.S.P. & D.S.P.

□ Metodo **ufficiale**: test biologico su topi

(Metodi **alternativi**: HPLC, LC-MS, Immunosaggi,
Test funzionali)

A.S.P.

□ Metodo **ufficiale**: HPLC

Reg. CE 1664/06 (modifica il Reg. 2074/05)

- Il tenore di **tossine PSP** delle parti commestibili dei molluschi deve essere determinato con il metodo **dell'analisi biologica** o con altro metodo internazionalmente riconosciuto.
- Il c.d. **metodo di Lawrence** nella forma pubblicata nell'AOAC Official method 2005 può essere utilizzato come metodo alternativo per l'individuazione di tali tossine
- In caso di contestazione dei risultati, **il metodo di riferimento è il metodo biologico**

Tossine PSP: metodica di analisi

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- pulizia esterna dei molluschi
- prelievo di circa 150 g di corpo intero
- omogeneizzazione
- prelievo di 100 g di materiale omogenato

Tossina PSP: metodica di analisi

PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO

- aggiungere HCl 0,25 N e controllare il pH (2 ÷ 2,5)
- portare ad ebollizione per 5'
- raffreddare e controllare di nuovo il pH (2 ÷ 2,5)
- portare a volume di 200 ml
- centrifugare la miscela a 3000 r.p.m. per 5 minuti
- separare il **surnatante** in beuta e ricontrollare il pH

TOSSINA PSP: METODICA DI ANALISI

INOCULO

UTILIZZARE IL SURNATANTE PER L'INOCULO

- prelevare 1 ml di estratto acido e inocularlo per via i.p. in topi di razza *Swiss* del peso 20 ± 1 g
- prendere il tempo all' inizio dell'inoculazione e tenere gli animali in osservazione per circa 1 ora

Determinazione tossine idrosolubili **PSP**

mouse test

- ☑ *Preparazione del campione*
- ☑ *Preparazione dell'estratto*
- ☑ *Inoculazione dell'estratto in topi albini di razza Swiss*
- ☑ *In caso di positività i topi muoiono con sintomatologia caratteristica*



Interpretazione dei risultati
 $\mu\text{g STX/Kg}$ (C.F. = 0,192)
in funzione di T.M., U.T. e peso del topo

T.M. (minuti)	U.T.	Peso topi (g)	$\mu\text{g STX/Kg}$ p.e.
1'	100,00	20	38400
2'	7,67	20	2945
3'	3,70	20	1421
4'	2,50	20	960
4',40"	2,08	20	799
5'	1,92	20	737
60'	0,88	20	336

DSP (*Diarrhetic Shellfish Poison*)

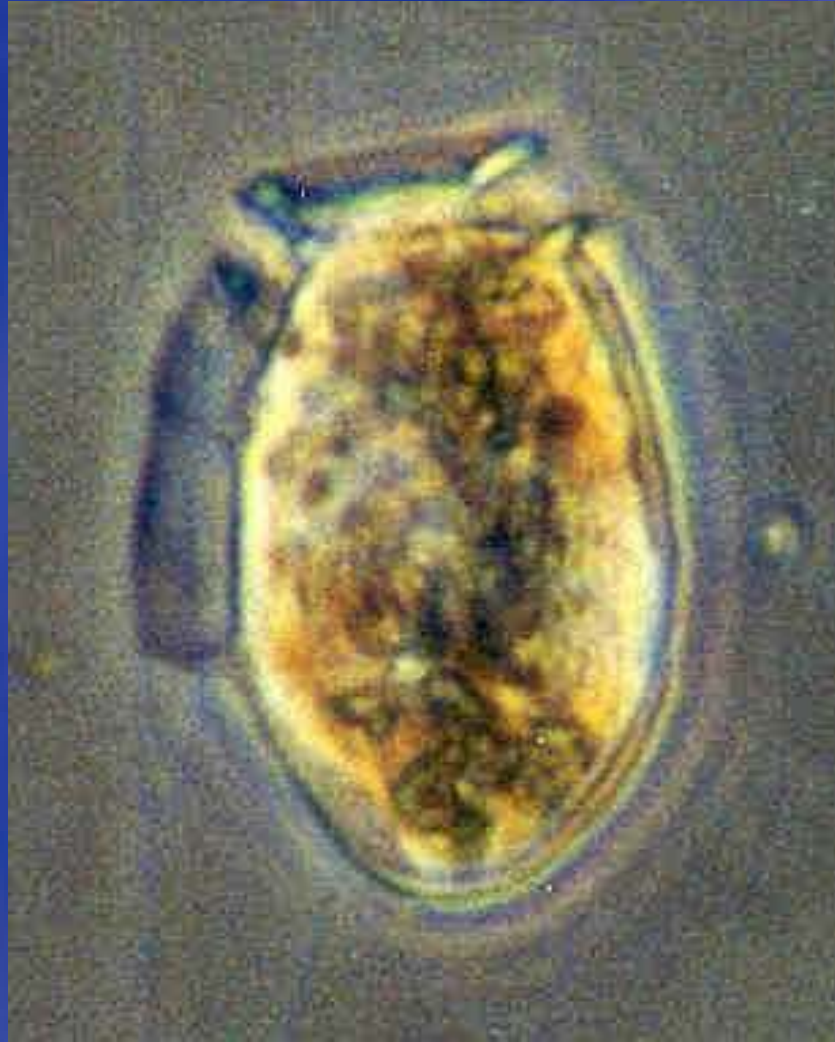
Le tossine DSP sono divise in diverse classi strutturali tra loro differenti per effetti tossicologici, meccanismi d'azione e lesioni biochimiche

- 1) tossine acide: acido okadaico e derivati (**OAs, DTXs**)
- 2) tossine neutre: le pectenotossine (**PTXs**)
- 3) yessotossina e derivati (**YTXs**)
- 4) azaspiracidi e derivati (**AZAs**)

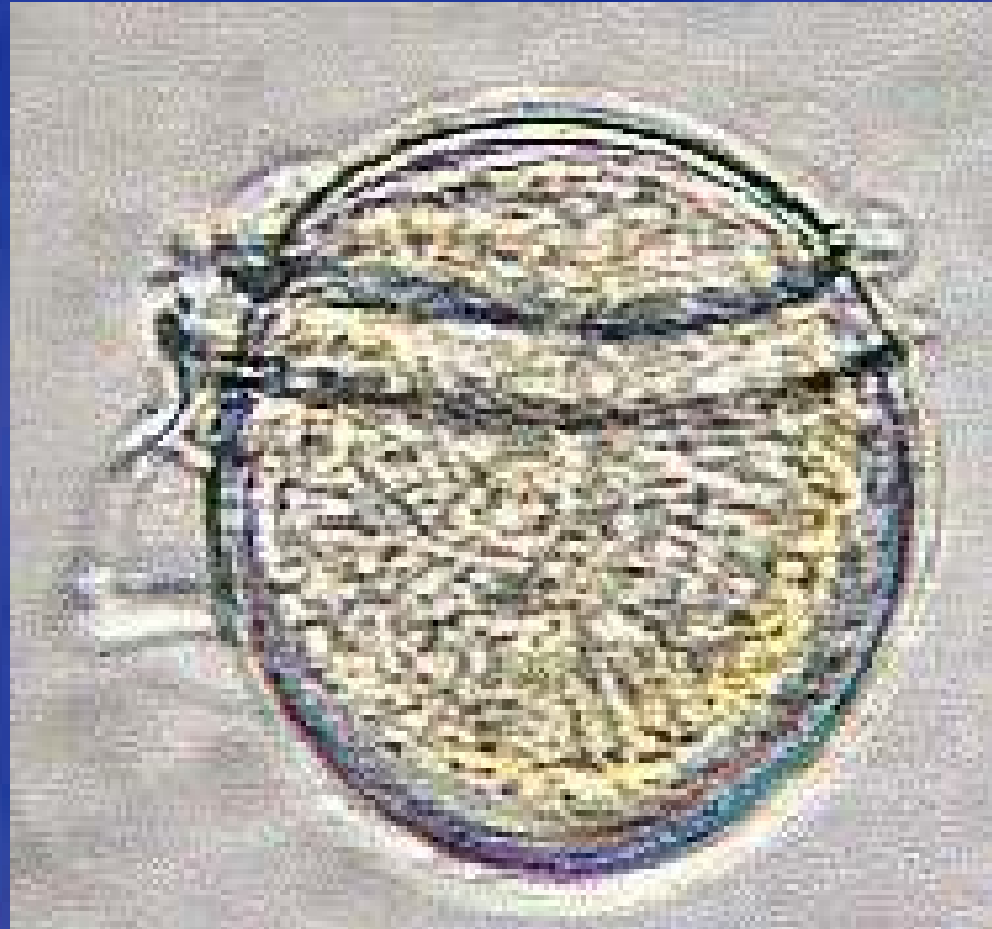
Dinophysis caudata



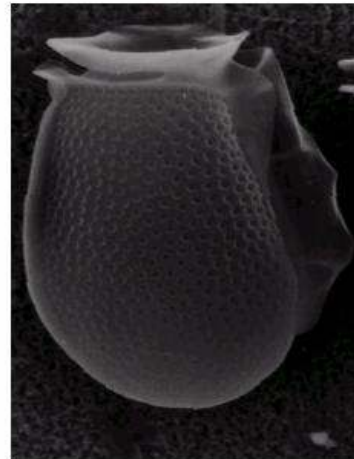
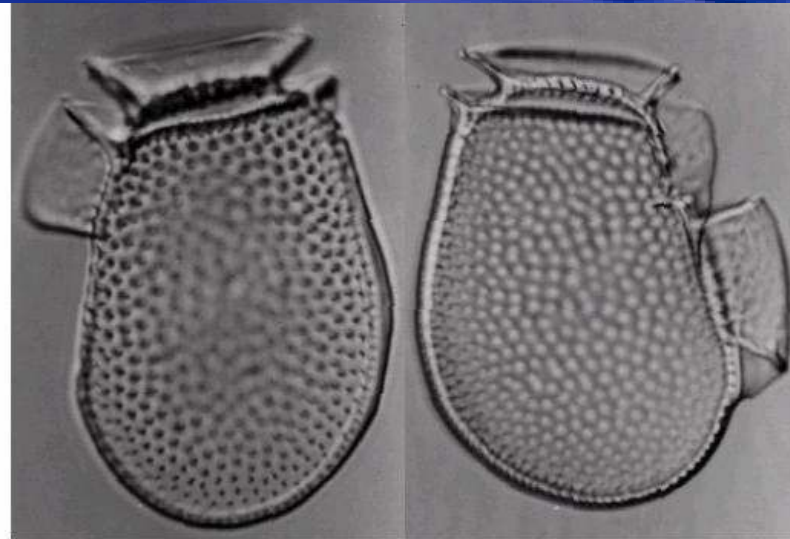
Dinophysis acuminata



Dinophysis rotundata



Dinophysis fortii



Dinophysis fortii
Pavillard

Photomicrograph
by Yasuwo Fukuyo

WESTPAC-HAB
IOC Harmful Algal Bloom Programme

T0003

Meccanismo di azione delle tossine DSP

- Ac. Okadaico e derivati. :
 - stimolazione processi di fosforilazione che controllano la secrezione del sodio da parte delle cellule intestinali (diarrea)
 - contrazione muscolatura liscia intestinale
 - promotori di tumore allo stomaco
- Pectenotossine: danni a cellule fegato, stomaco, intestino
- Yessotossine: danni a cellule miocardio e fegato
- Azaspiracidi: danni a cellule fegato, pancreas, intestino

Natura e decorso della sintomatologia da DSP

- ❑ I sintomi si manifestano dopo il consumo di molluschi che hanno accumulato tossine prodotte da diverse specie di Dinoflagellati.
- ❑ Il **periodo di incubazione** varia da 30 minuti a 12 ore
- ❑ La **natura dei sintomi è di tipo gastrointestinale**:
 - 1) diarrea (92%), nausea (80%), vomito (79%), dolori addominali (53%)
 - 2) La **durata** della sintomatologia varia da 2 a 3 giorni








Modalita' di trasmissione

L' INTOSSICAZIONE UMANA da DSP
avviene per ingestione di:

- mitili
- pettini
- vongole
- ostriche



Capacità fisiologica di accumulo delle tossine DSP

<i>Mytilus galloprovincialis</i>	
<i>Tapes philippinarum</i>	
<i>Callista chione</i>	
<i>Cardium sp</i>	
<i>Chamelea gallina</i>	
<i>Clhamys sp.</i>	
<i>Crassostrea gigas</i>	
<i>Pecten jacobaeus</i>	

D. Min. Sal. 16/05/02

Tenori massimi e metodiche di analisi delle
biotossine algali nei molluschi bivalvi vivi etc..

Tenori massimi per le Biotossine marine liposolubili

AO + PTXs	YTXs	AZAs
160 µg eq. AO/kg p.e.	1 mg eq. YTX/kg p.e.	160 µg eq. AZA/kg p.e.

Tenori massimi per le Biotossine marine idrosolubili

PSP	ASP
800 µg eq. STX/kg p.e.	20 mg AD/kg p.e.

Decr. Min. Salute 16/05/02
Determinazione tossine liposolubili
(AO, DTXs, PTXs, YTXs, AZA)

test applicato sul mollusco intero (parte edibile)

Protocollo 1: (AO, YTXs, PTXs, AZA)

Procedimento:

- estrazione delle tossine con **acetone metanolo e etere**
- iniezione i.p. di 1 ml di estratto (corrispondente a 25 g eq di parte edibile) in ciascuno dei 3 topi utilizzati (18-20 g)
 - ***Interpretazione dei risultati:***
- nel caso di **morte di 2 topi su 3 entro 24 h** con sintomatologia caratterizzata da abbattimento e diarrea i livelli di tossine DSP sono superiori ai limiti stabiliti dalla Decisione CEE 2002/225 e dal Reg. CE 853/04

□ **Test +**

Decr. Min. Salute 16/05/02

Determinazione tossine liposolubili

(AO, DTXs, PTXs, YTXs, AZA)

☞ Protocollo 1: (AO, YTXs, PTXs, AZA)

- ☐ Nel caso di sopravvivenza di almeno 2 topi su 3 oltre le 24 h significa che vi è assenza di tossine DSP o presenza di tossine DSP a livelli inferiori ai limiti stabiliti dalla Decisione CEE 2002/225 e dal Reg. CE 853/2004 e il Test è da considerarsi negativo

in caso di morte dei topi entro 5 h
con sintomatologia neurologica (*spasmi,*
convulsioni)



sospetta presenza di
Yessotossine (YTX)



Protocollo 2

D. Min. Sal. 16/05/02

Determinazione tossine liposolubili

(AO, DTX, PTX, VTX, AZA)

Protocollo 2

Procedimento:

- estrazione con acetone e metanolo
- evaporazione e risospensione con diclorometano + metanolo 60%

Step 1 (AO, PTXs, AZA)

- evaporazione estratto fase in diclorometano
- iniezione i.p. di 1 ml dell'emulsione (25 g eq di parte edibile) in ciascuno dei 3 topi utilizzati
- morte di 2 topi su 3 entro le 24 h:

test + per AO, DTX, PTX, AZA

D. Min. Sal. 16/05/02

Determinazione tossine liposolubili

(AO, DTX, PTX, YTX, AZA)

Protocollo 2

Procedimento:

-Step 2 (YTXs)

- evaporazione estratto fase metanolica
- iniezione i.p. di 1 ml di emulsione (2 g eq di parte edibile) in ciascuno dei 3 topi
- morte di 2 topi su 3 entro le 5 h:

test + per YTXs

Biointossicazione A.S.P.

- 1987, Canada: 153 casi di intossicazione acuta per ingestione di mitili tossici , 3 morti
- Rilievo presenza tossine ASP in molluschi bivalvi e pesci planctofagi (acciughe), morie di uccelli marini (cormorani, pellicani)
- Presente in Canada, California, Australia, coste atlantiche di Spagna, Danimarca

Biotossine A.S.P. organismi produttori

- microalghe Diatomee pennate planctoniche:
- *Nitzschia pungens multiseriis*
- *Pseudo-nitzschia australis*
- Alcune macroalghe rodoficee (es. *Chondria armata*)

Pseudonitzschia seriata



Tossine A.S.P.

acido domoico e isomeri

- *L'acido domoico è un amminoacido raro non presente nelle proteine*
- *Sono stati identificati svariati isomeri dell'acido domoico*
- *Ha attività neurotossica e gastro-enterotossica*

Meccanismo di azione delle tossine A.S.P.

- L'acido domoico agisce a livello delle sinapsi come agonista dei recettori dell'ac. glutammico, il più importante neurotrasmettitore eccitatorio del SNC
- L'acido domoico è 100 volte più potente dell'ac. glutammico e questo meccanismo di azione spiega gli effetti neurotossici

Sintomatologia dell'intossicazione ASP

➤ Il maggior costituente è l'acido domoico: un amminoacido neuroeccitatore che agisce sui siti della memoria (ippocampo)

➤ **I sintomi** dell'intossicazione da ASP sono:

- ❑ nausea
- ❑ vomito
- ❑ crampi addominali
- ❑ mal di testa
- ❑ **perdita della memoria breve**
- ❑ lesioni gravi ai neuroni dell'ippocampo e **coma**

D. Min. Sal. 16/05/02

Tenori massimi e metodiche di analisi delle
biotossine algali nei molluschi bivalvi vivi etc..

Tenori massimi per le Biotossine marine liposolubili

AO + PTXs	YTXs	AZAs
160 µg eq. AO/kg p.e.	1 mg eq. YTX/kg p.e.	160 µg eq. AZA/kg p.e.

Tenori massimi per le Biotossine marine idrosolubili

PSP	ASP
800 µg eq. STX/kg p.e.	20 mg AD/kg p.e.

Tossine A.S.P. metodica di analisi (HPLC)

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- pulizia esterna dei molluschi
- prelievo di circa 100 gr di corpo intero
- omogeneizzazione del campione
- prelievo di 4 g di omogenato

Tossina A.S.P.: metodica di analisi (HPLC)

ESTRAZIONE

- Trattamento dell'omogenato con soluzione estraente di acqua (metanolo 1:1)
- Centrifugazione dell'estratto a 3000 rpm per 10'
- Ultrafiltrazione del surnatante per 30' a 9000 rpm
- Analisi dell'estratto filtrato

Tossina A.S.P.: metodica di analisi (HPLC)

DETERMINAZIONE HPLC-UV

CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE:

- separazione mediante eluizione isocratica a fase mobile a 40°C
- a fase mobile
- flusso 1 ml/min
- volume iniettato 20 µl
- rivelazione spettrofotometrica a 242 nm
- costruzione della curva di taratura

Tossina A.S.P. metodica di analisi (HPLC)

IDENTIFICAZIONE

L'identificazione dell'acido domoico si ottiene per confronto del tempo di ritenzione del picco del campione ed il tempo di ritenzione del picco dello standard di acido domoico

DETERMINAZIONE

La determinazione quantitativa è realizzata mediante interpolazione dell'area del picco dell'acido domoico nell'estratto campione sulla curva di taratura

Biotossine algali e molluschi biv.: la situazione epidemiologica in Sardegna

- Il **livello di attenzione** delle Autorità sanitarie e ambientali sui rischi connessi alla presenza di tossine algali nei molluschi bivalvi è andato via via aumentando negli ultimi anni anche nella **Regione Sardegna** a seguito dei **ripetuti riscontri di queste tossine a partire dal 2001**, in
 - prodotti locali
 - prodotti di importazione comunitaria

**DETERMINAZIONI BIOTOSSICOLOGICHE IN CAMPIONI DI MOLLUSCHI
BIVALVI VIVI PRELEVATI IN SARDEGNA
(1991-2001)**

Anno	n. campioni	Ricerca <u>tossine P.S.P.</u>	
		Negativa ($< 80 \mu\text{g STX}/100 \text{ g p.e.}$)	Positiva ($> 80 \mu\text{g STX}/100 \text{ g p.e.}$)
1991	38	38	0
1992	96	96	0
1993	250	250	0
1994	224	224	0
1995	386	386	0
1996	354	354	0
1997	334	334	0
1998	664	664	0
1999	428	428	0
2000	410	410	0
2001/06	103	103	-

**DETERMINAZIONI BIOTOSSICOLOGICHE IN CAMPIONI DI MOLLUSCHI
BIVALVI VIVI PRELEVATI IN SARDEGNA NELL'AMBITO DEI PIANI DI
SORVEGLIANZA
(1991-2001)**

Anno	n. campioni	Ricerca <u>tossine D.S.P.</u>	
		Negativa	Positiva
1991	38	38	0
1992	96	96	0
1993	250	250	0
1994	224	224	0
1995	386	386	0
1996	354	354	0
1997	334	334	0
1998	664	664	0
1999	428	428	0
2000	410	410	0
2001	412	412	0

Riscontri positività di tossine algali in molluschi biv.vivi Regione Sardegna

Anno	Biotossine	Provenienza
2001	DSP	Grecia (vincolo san.)
2002	PSP	Olbia
2002	DSP	S. Gilla
2003	DSP	Feraxi
2003	PSP	Olbia
2005	PSP	Golfo di Cugnana
2006	PSP	Spagna (vinc.san.) Golfo di Oristano

PSP nel Mediterraneo

contaminazione di molluschi biv. da:

Alexandrium minutum

- | | |
|------------------|------|
| □ Coste spagnole | 1989 |
| □ Baia di Tolone | 1990 |
| □ Emilia Romagna | 1994 |
| □ Albania | 1994 |
| □ Croazia | 1995 |

Alexandrium catenella e minutum

- | | |
|---------------------|-------------|
| • Golfo di Olbia | • 2002-2003 |
| • Golfo di Cugnana | • 2005 |
| • Golfo di Oristano | • 2006 |

Riscontri tossine **PSP** in Italia: 1994 (E.Romagna);
2002-2003-2005-2006 (Sardegna)

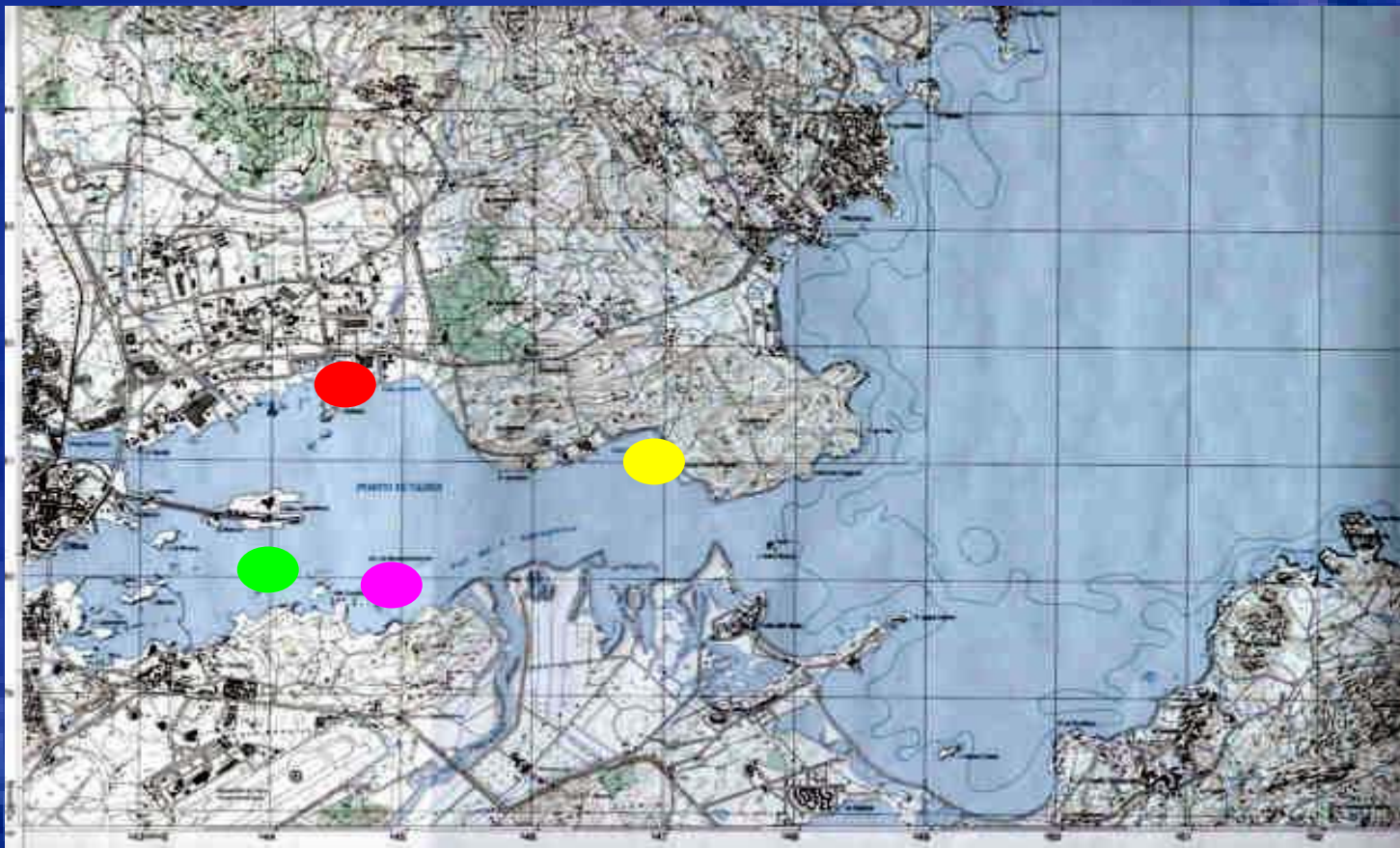


**DETERMINAZIONI BIOTOSSICOLOGICHE IN CAMPIONI
DI MOLLUSCHI BIVALVI VIVI (Olbia, 2002)**

Ricerca tossine P.S.P.

Mese	n. campioni	Negativa ($< 80 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ p.e.)	<u>Positiva</u> ($> 80 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ p.e.)
Maggio	74	58	16
Giugno	144	144	0

Golfo di Olbia: siti di prelievo



● Seno Cocciani

● Cala Saccaia

● Isola di Cavallo

● Mezzo cammino

Campioni positivi per PSP- (Olbia, 2002)
(> 80 µg STX eq/100 g p.e.)

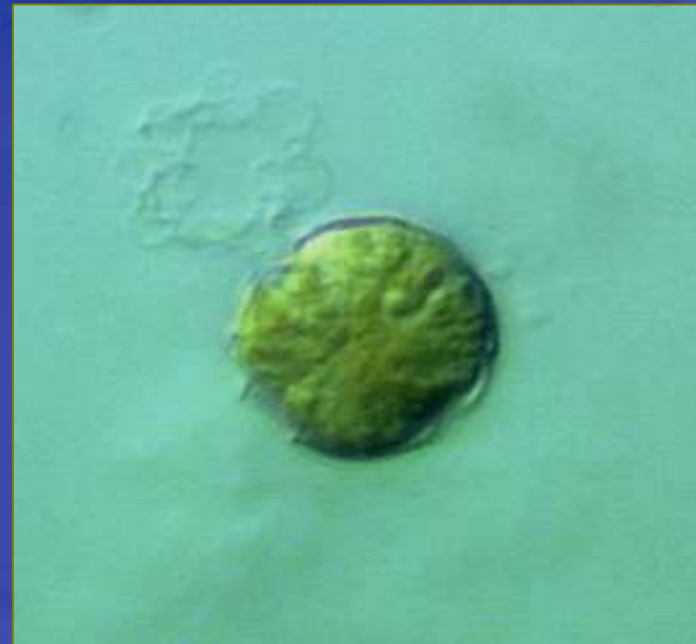
Campione	Provenienza	Data prelievo	P.S.P (µg di STX eq/100 g p.e.)
Mitili/31679	Loc. Cala Saccaia	14/05/2002	251
Mitili/31672	Loc. Cala Saccaia	14/05/2002	138
Mitili/31699	Loc. Cala Saccaia	14/05/2002	118
Mitili/31689	Loc. Cala Saccaia	14/05/2002	160
Mitili/31684	Loc. Cala Saccaia	14/05/2002	175
Mitili/31468	Loc. Seno Cocciani	16/05/2002	117
Mitili/32465	Loc. Seno Cocciani	16/05/2002	125
Mitili/35235	Loc. Cala Saccaia	25/05/2002	140
Mitili/35251	Loc. Mezzo Camino	25/05/2002	193
Mitili/35266	Loc. Mezzo Camino	25/05/2002	243
Mitili/35269	Loc. Seno Cocciani	25/05/2002	284
Mitili/35278	Loc. Seno Cocciani	25/05/2002	135
Mitili/35666	Loc. Cala Saccaia	27/05/2002	109
Mitili/36689	Loc. Seno Cocciani	29/05/2002	109
Mitili/37396	Loc. Cavallo	31/05/2002	109
Mitili/37460	Loc. Scoglio del Lardo	31/05/2002	109

MICROALGHE TOSSICHE ISOLATE NEL CORSO
DELL'EMERGENZA
del 2002 (Olbia)

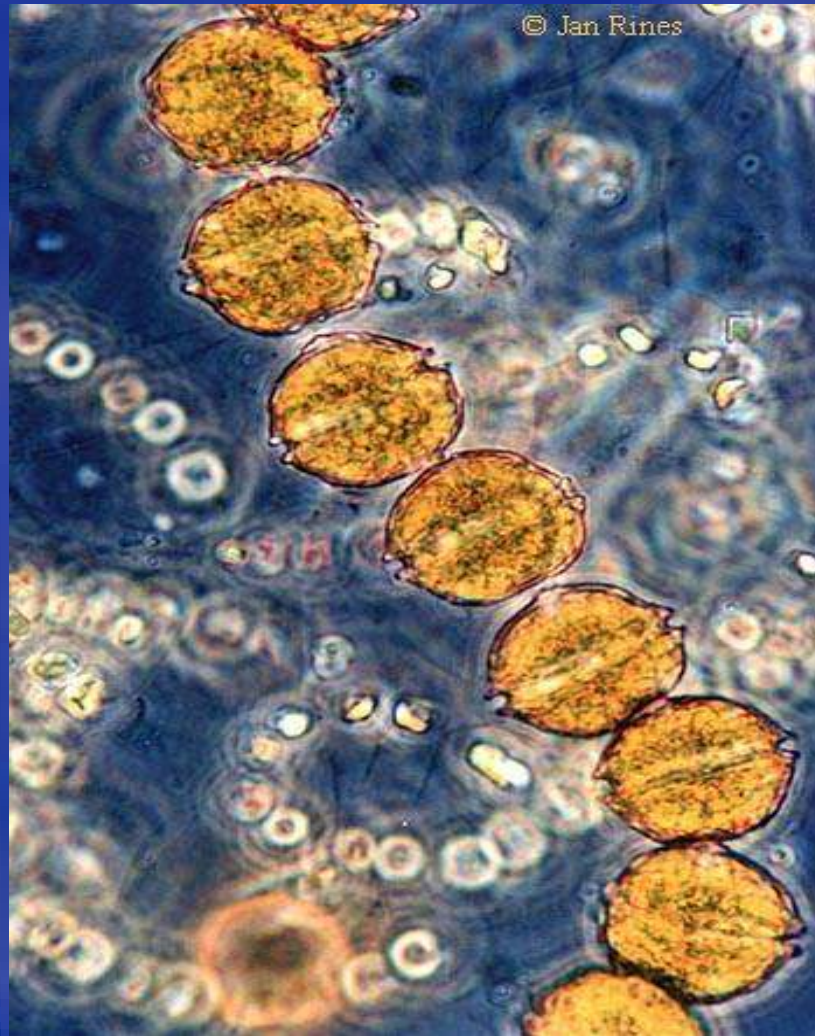
A. catenella



A. minutum



A. catenella



A. catenella

Densità cellulare anno 2002 (cellule/litro) (Olbia)

Data	Provenienza			
	Seno Cocciani	Loc. Cavallo	Cala Saccaia	Mezzo Camino
25/04/2002	400	-	-	-
16/05/2002	700	1073	3738	400
25/05/2002	400	450	613	450
27/05/2002	-	-	-	-
30/05/2002	400	307	-	-
04/06/2002	-	2058	245	-
20/06/2002	-	137	43	-

A. catenella

- ❑ prima segnalazione nel golfo di Olbia nel 1999
- ❑ ulteriori segnalazioni: dal 2002 a tutt'oggi
- ❑ **specie alloctona** introdotta nel mediterraneo con acque di zavorra delle navi
- ❑ diffusione mediante materiale biologico di allevamento
- ❑ adattamento alle condizioni ambientali presenti
- ❑ bassa possibilità di previsione degli eventi sia in termini temporali che di pericolosità

A. catenella

sono stati eseguiti:

- studi genetici per dimostrare la **vicinanza del clone sardo con quello giapponese**
- studi morfologici per accertare specie e relativa tossicità

A. minutum

Densità cellulare anno 2002 (cellule/litro) (Olbia)

Data	Provenienza			
	Seno Cocciani	Loc. Cavallo	Cala Saccaia	Mezzo Camino
25/04/2002	200	-	0	-
16/05/2002	700	307	325	600
25/05/2002	200	-	613	600
27/05/2002	-	-	146	600
30/05/2002	200	-	511	200
04/06/2002	200	-	-	-
20/06/2002	-	103	-	-

**DETERMINAZIONI BIOTOSSICOLOGICHE IN CAMPIONI DI
MOLLUSCHI BIVALVI VIVI (Olbia, 2003)**

Mese	n. campioni	Ricerca <u>tossine P.S.P.</u>	
		Negativa ($< 800 \mu\text{g STX/Kg}$ p.e.)	Positiva ($> 800 \mu\text{g STX/Kg}$ p.e.)
Aprile	37	29	8
Maggio	144	140	4
Giugno	29	29	0

Campioni positivi per PSP (Olbia, 2003)

(>800 µg STX eq/Kg p.e.)

Campione	Provenienza	Data prelievo	P.S.P (µg di STX eq/Kg p.e.)
Mitili/25145/1	Loc.Seno Cocciani	22/04/2003	1095
Mitili/25145/2	Loc.Seno Cocciani	22/04/2003	841
Mitili/25145/5	Loc. Cavallo	22/04/2003	841
Mitili/25947/1	Loc.Seno Cocciani	28/04/2003	841
Mitili/25947/3	Loc.Seno Cocciani	28/04/2003	841
Mitili/26413/2	Loc.Seno Cocciani	29/04/2003	816
Mitili/26768/1	Loc.Seno Cocciani	30/04/2003	841
Mitili/26768/8	Loc. Cavallo	30/04/2003	990
Mitili/26984/3	Loc.Seno Cocciani	02/05/2003	828
Mitili/27244/1	Loc.Seno Cocciani	03/05/2003	841
Mitili/27244/3	Loc.Seno Cocciani	03/05/2003	841
Mitili/27374/1	Loc.Seno Cocciani	05/05/2003	820

Golfo di Olbia: siti con positività da
PSP (2003)



● Seno Cocciani

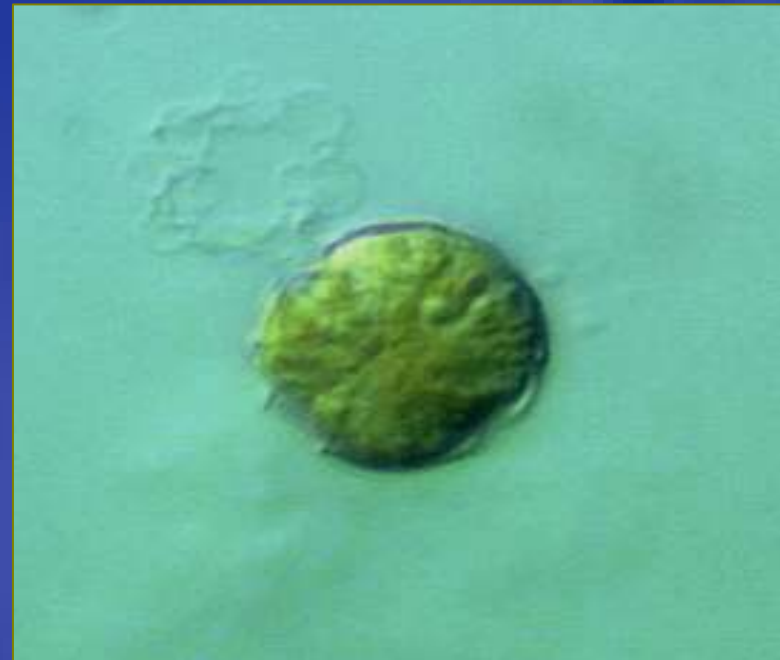
● Isola di Cavallo

MICROALGHE ISOLATE NEL CORSO DELL'EMERGENZA (Olbia, 2003)

A. catenella



A. minutum



A. catenella

Densità cellulare (n.cellule/litro) (Olbia, 2003)

Data	Provenienza		
	Seno Cocciani	Loc. Cavallo (St.A)	Cala Saccaia (St.B)
30/03/2003	0	0	0
22/04/2003	200	200	400
25/04/2003	2360	4060	124
27/04/2003	2434	193	403
28/04/2003	200	100	0
03/05/2003	0	0	0
06/05/2003	0	100	0

A. minutum

Densità cellulare (cellule/litro) (Olbia, 2003)

Data	Provenienza		
	Seno Cocciani	Loc. Cavallo (St.A)	Cala Saccaia (St.B)
10/04/2003	0	0	0
22/04/2003	2100	1900	1200
25/04/2003	2360	4060	124
27/04/2003	2434	193	403
28/04/2003	200	100	0
03/05/2003	0	0	0
06/05/2003	0	100	0

Temperatura acque zone di allevamento (Olbia)

Maggio 2002:

- T° minima pari a 18,5°C
- T° massima pari a 21,5°C

Aprile 2003:

- T° minima pari a 15,4°C
- T° massima pari a 19,9°C

Insorgenza del fenomeno PSP

2002 (golfo di Olbia)

- introduzione delle microalghe di *A. catenella* con acque di zavorra e materiale biologico di allevamento (1999)
- formazione di cisti durature nel sedimento marino
- in condizioni ambientali favorevoli, sviluppo forme vegetative (fioritura algale)
- produzione di tossine
- accumulo di tossine nei molluschi bivalvi (2002)
- **riscontro tossicità nei mitili in n. 4 siti di prelievo**

Evoluzione del fenomeno PSP

2003 (golfo di Olbia)

- riscontro tossicità nei mitili in n. 2 siti di prelievo
- decremento della concentrazione di saxitossina nei mitili provenienti dalle medesime zone
- medesima tipologia delle microalghe isolate nel 2002

Fenomeno HABs (Harmful Algal Blooms)

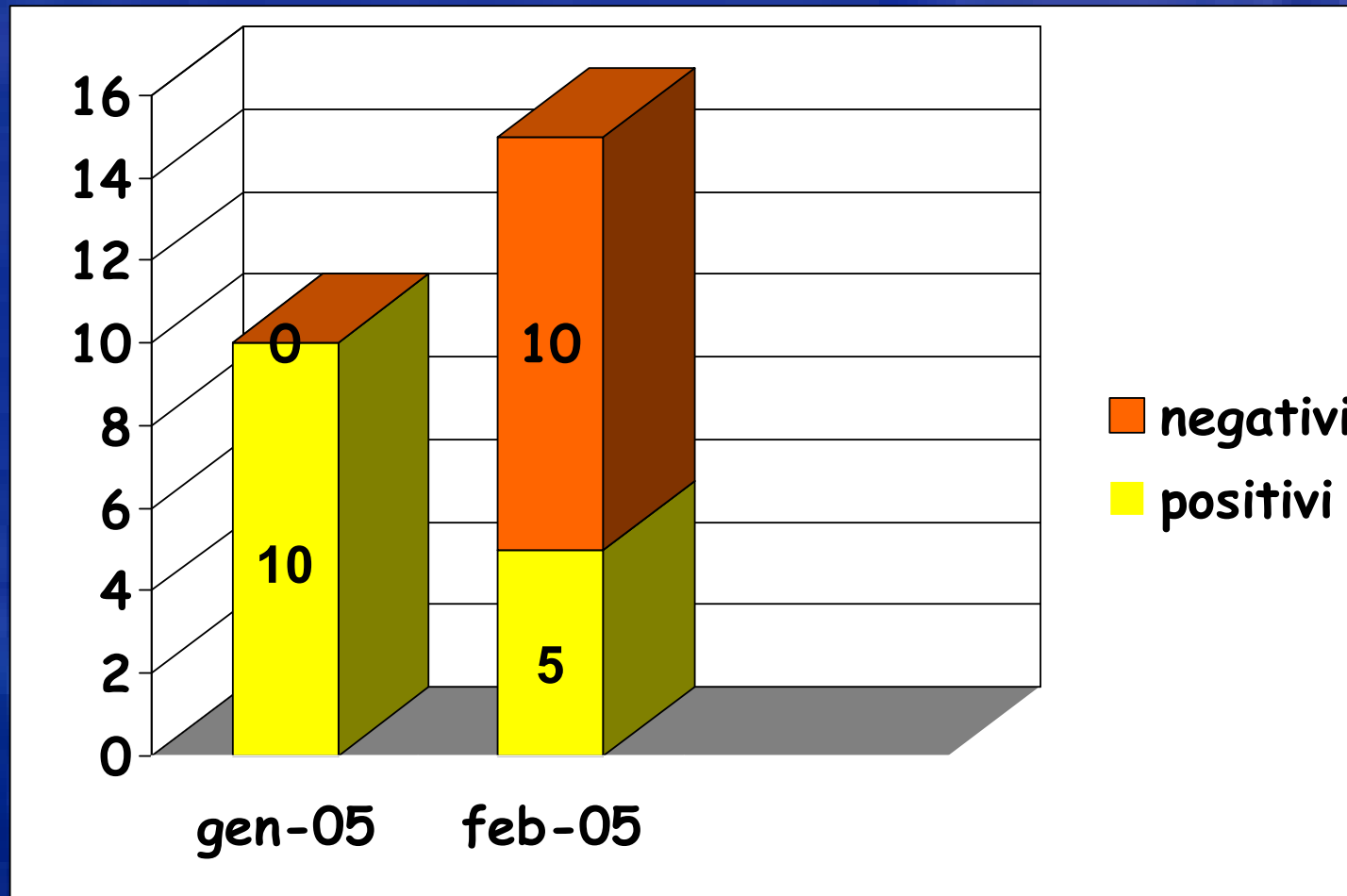
Fattori predisponenti:

- ❑ basso idrodinamismo
- ❑ elevata trofia
- ❑ scarico acque zavorra
- ❑ attività acquacoltura

**RISCHIO SANITARIO
STABILMENTE PRESENTE NELLE
AREE DI ALLEVAMENTO DI
MITILI DEL GOLFO DI OLBIA**

DETERMINAZIONI PSP IN CAMPIONI DI MOLLUSCHI BIVALVI

VIVI (Golfo di Cugnana, gennaio-febbraio 2005)



Campioni di mitili positivi per PSP (Golfo di Cugnana, gennaio-febbraio 2005)

(>800 μg STX eq/Kg p.e.)

Campione	Provenienza	Data prelievo	P.S.P (μg di STX eq/Kg p.e.)
Mitili/1707	Loc. Golfo di Cugnana	12/01/05	1621
Mitili/2900	Loc. Golfo di Cugnana	19/01/05	1621
Mitili/2902	Loc. Golfo di Cugnana	19/01/05	1621
Mitili/2903	Loc. Golfo di Cugnana	19/01/05	1621
Mitili/3619	Loc. Golfo di Cugnana	24/01/05	1778
Mitili/3622	Loc. Golfo di Cugnana	24/01/05	1621
Mitili/3628	Loc. Golfo di Cugnana	24/01/05	1152
Mitili/4423	Loc. Golfo di Cugnana	27/01/05	889
Mitili/4424	Loc. Golfo di Cugnana	27/01/05	889
Mitili/4425	Loc. Golfo di Cugnana	27/01/05	1261
Mitili/5250	Loc. Golfo di Cugnana	02/02/05	876
Mitili/5263	Loc. Golfo di Cugnana	02/02/05	876
Mitili/5264	Loc. Golfo di Cugnana	02/02/05	876
Mitili/6332	Loc. Golfo di Cugnana	08/02/05	876
Mitili/6334	Loc. Golfo di Cugnana	08/02/05	876

Determinazione PSP in campioni di *Paracentrotus lividus* (*mouse - test*)

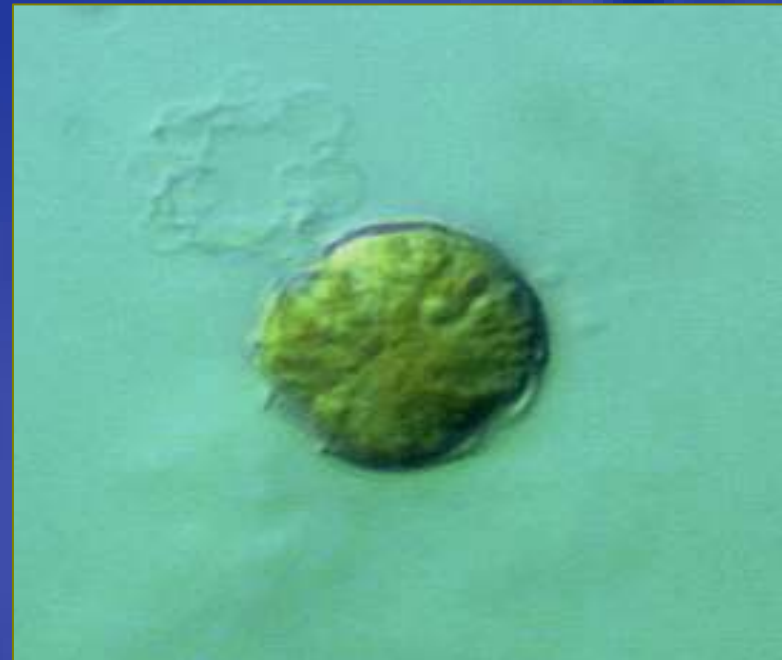
Campione (120 esemplari ciascuno)	Provenienza	Data prelievo	PSP (μg di STX eq/Kg p.e.)
<i>P. lividus</i> / c.non uff.	Golfo di Cugnana	19-01-05	< 380
<i>P. lividus</i> / c.non uff.	Golfo di Cugnana	27-01-05	< 380
<i>P. lividus</i> / 5495	Golfo di Cugnana	02-02-05	< 380

MICROALGHE ISOLATE NEL GOLFO DI CUGNANA,
OLBIA (gennaio - febbraio 2005)

A. catenella



A. minutum



Alexandrium catenella

Data prelievo	Provenienza	Densità (cellule/litro)
12/01/2005	Golfo di Cugnana	20
25/01/2005	Golfo di Cugnana	30
27/01/2005	Golfo di Cugnana	40
07/02/2005	Golfo di Cugnana	20

Alexandrium minutum

Data prelievo	Provenienza	Densità (cellule/litro)
12/01/2005	Golfo di Cugnana	120
19/01/2005	Golfo di Cugnana	40
24/01/2005	Golfo di Cugnana	100
25/01/2005	Golfo di Cugnana	30
27/01/2005	Golfo di Cugnana	100
07/02/2005	Golfo di Cugnana	60
14/02/2005	Golfo di Cugnana	30
21/02/2005	Golfo di Cugnana	20

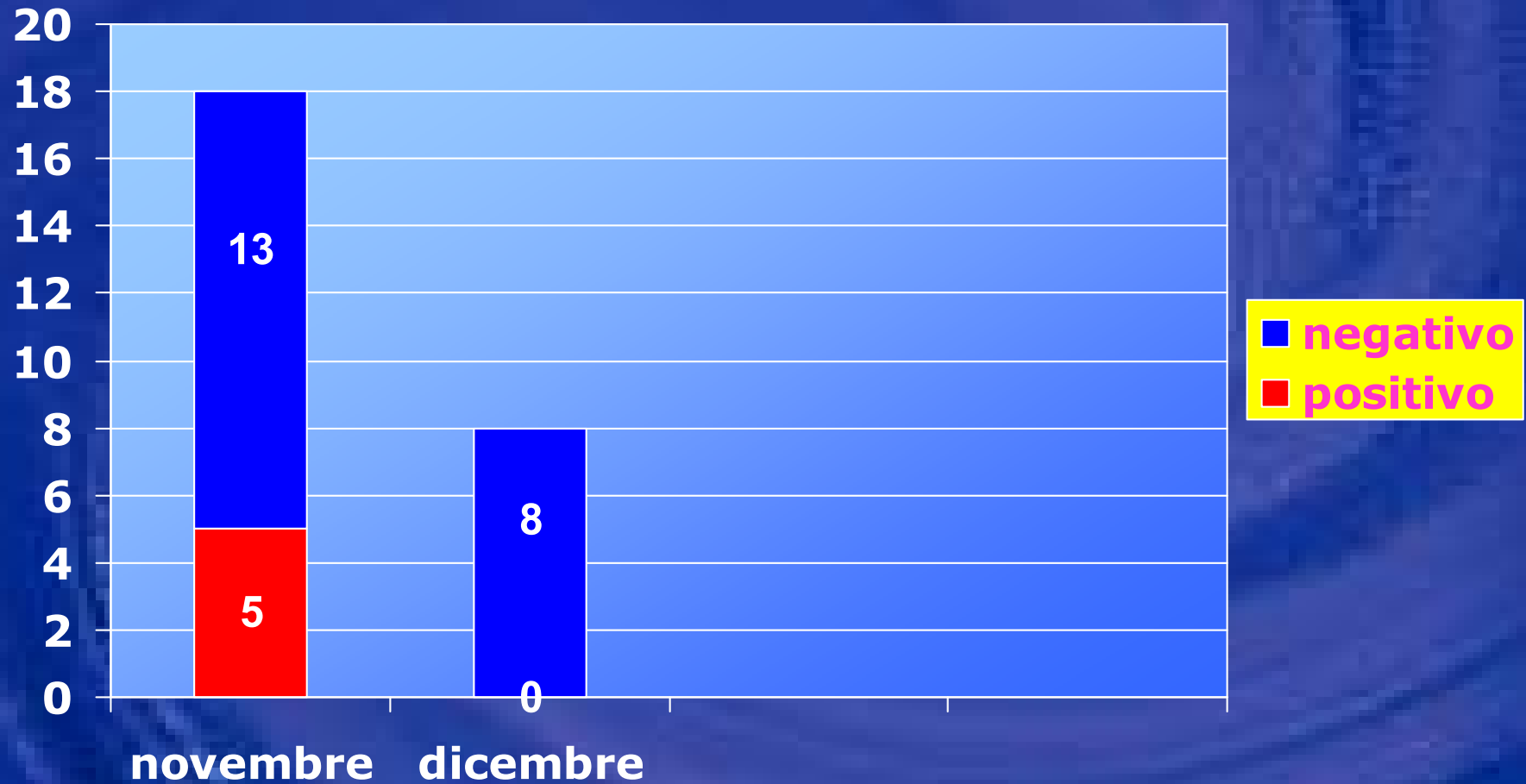
Campioni provenienti dalla Spagna positivi per PSP - Anno 2006
(>800 µg STX eq/Kg p.e.)

Campioni Mitili	Provenienza	Data prelievo	<u>P.S.P</u> (µg di STX eq/Kg p.e.)
2574/2	Spagna (Cambados zona VIII)	13/01/06	2405
3650/1	Spagna (zona B Cangas C)	18/01/06	1062
3650/2	Spagna (zona B Cangas C)	18/01/06	1572
3650/3	Spagna (zona B Cangas C)	18/01/06	2124
4658/3	Spagna (zona B Cangas C)	23/01/06	1062
4700/1	Spagna (zona B Cangas C)	23/01/06	1266
4700/2	Spagna (zona B Cangas C)	23/01/06	1062
4677/2	Spagna (zona B Cangas C)	23/01/06	1648
4681/1	Spagna (zona B Cangas C)	23/01/06	986
4681/2	Spagna (zona B Cangas C)	23/01/06	1011
4689/1	Spagna (zona B Cangas C)	23/01/06	1832
4689/2	Spagna (zona B Cangas C)	23/01/06	1384
4689/3	Spagna (zona B Cangas C)	23/01/06	1186

**Campioni provenienti dalla Spagna positivi per PSP - Anno 2006
($>800 \mu\text{g STX eq/Kg p.e.}$)**

Campioni Mitili	Provenienza	Data prelievo	P.S.P ($\mu\text{g di STX eq/Kg p.e.}$)
4692/2	Spagna (zona Cangas)	23/01/06	2941
5131/1	Spagna (zona B Vigo)	24/01/06	1266
5132/1	Spagna (zona B Vigo)	24/01/06	1152
5505/1	Spagna (zona B Cangas)	25/01/06	1349
5505/2	Spagna (zona B Cangas)	25/01/06	1062
5508/2	Spagna (zona B Cangas)	25/01/06	1572
5510/3	Spagna (zona B Cangas)	25/01/06	1349
5960/1	Spagna (zona B Cangas)	26/01/06	946
5965/1	Spagna (zona B Cangas)	26/01/06	1572
6196/1	Spagna (zona B Cangas)	27/01/06	1062
6196/3	Spagna (zona B Cangas)	27/01/06	1062
6729/1	Spagna (zona B Cangas)	30/01/06	1037
6729/2	Spagna (zona B Cangas)	30/01/06	1572

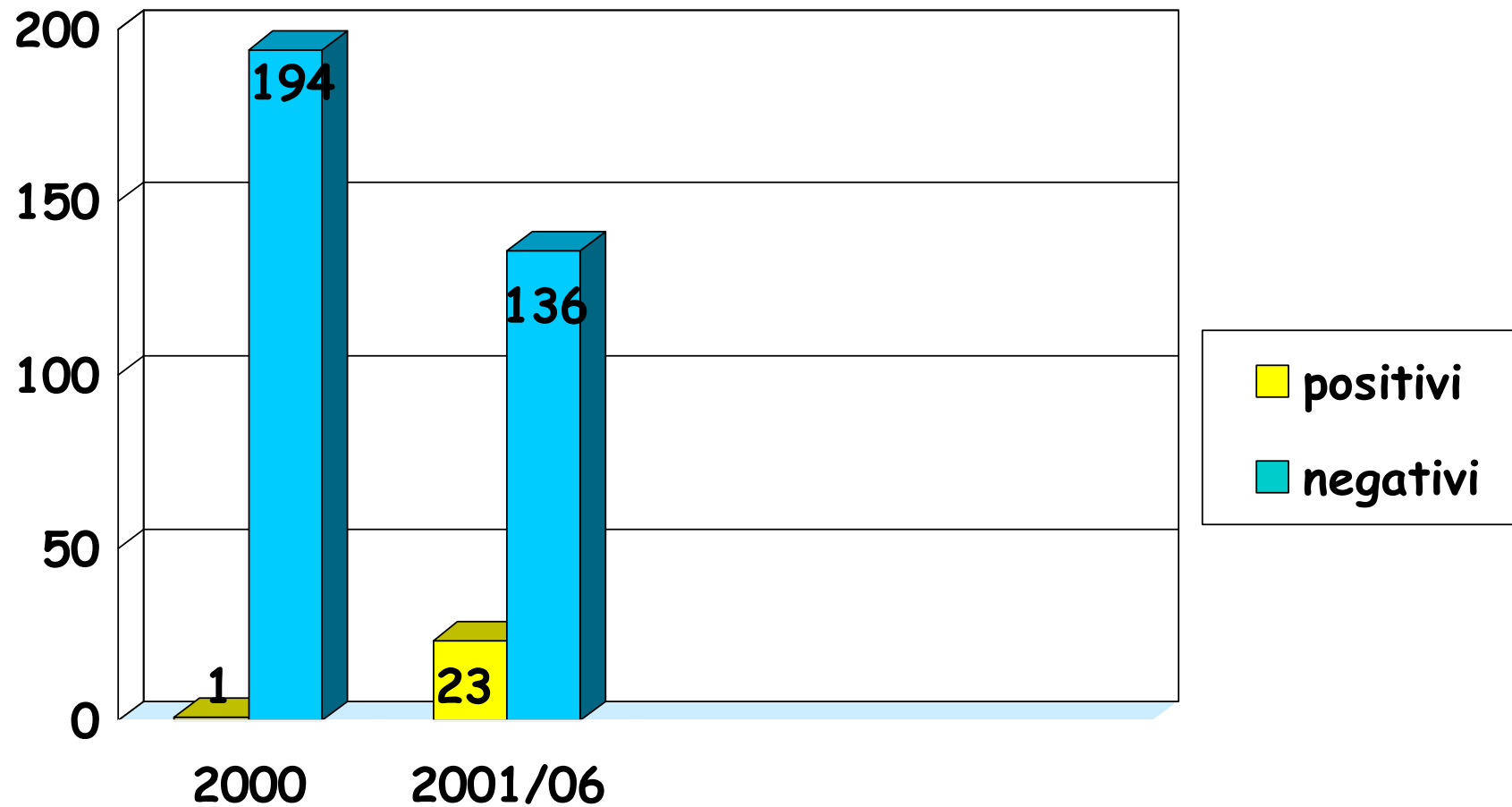
Determinazione biotossine algali del tipo PSP in campioni di MBV di **produzione locale** prelevati dalla ASL di **Oristano** (novembre-dicembre 2006)



**DETERMINAZIONI BIOTOSSICOLOGICHE IN CAMPIONI DI MOLLUSCHI
BIVALVI VIVI PRELEVATI IN SARDEGNA NELL'AMBITO DEI PIANI DI
SORVEGLIANZA
(1991-2001)**

Anno	n. campioni	Ricerca <u>tossine D.S.P.</u>	
		Negativa	Positiva
1991	38	38	0
1992	96	96	0
1993	250	250	0
1994	224	224	0
1995	386	386	0
1996	354	354	0
1997	334	334	0
1998	664	664	0
1999	428	428	0
2000	410	410	0
2001	412	412	0

Determinazioni tossine D.S.P. in campioni di mitili di provenienza comunitaria in vincolo sanitario ministeriale (2000-2001)



Controlli veterinari su animali e merci intracomunitari

- D. Lgvo 28/93
- Il sistema comunitario dei Controlli è basato sulle garanzie sanitarie fornite all'origine dal Paese produttore
- Ciascun Paese U.E. può comunque effettuare propri controlli su animali/merci di importazione comunitaria

Riscontri positività da tossine algali D.S.P. in molluschi biv.vivi Regione Sardegna

Anno	biotossine	Provenienza
2001	DSP	Grecia (vincolo san.)
2002	DSP	S. Gilla
2003	DSP	Feraxi

BIOTOSSINE ALGALI

- Le misure di prevenzione
- La Sorveglianza sanitaria sui rischi causati dalle biotossine algali

Regione Sardegna

ASSESSORATO IGIENE SANITA' E ASSISTENZA SOCIALE

Determinazioni del Direttore Generale 17 dicembre 1999, n. 3405/4 e n. 3405/5

- Piano di "Sorveglianza periodica delle zone di produzione e di stabulazione dei molluschi bivalvi vivi "
- Piano di "Vigilanza e controllo sanitario della produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi "

Piano di "Sorveglianza periodica delle zone di produzione e di stabulazione dei molluschi bivalvi vivi "
finalita' del Piano:

- » evitare eventuali **infrazioni** sulla provenienza e sulla destinazione dei molluschi bivalvi vivi;
- » verificare i **requisiti microbiologici** dei molluschi bivalvi vivi relativamente alla zona di raccolta;
- » verificare l'eventuale presenza di **plancton tossico** nelle acque di produzione e di stabulazione e di **biotossine** nei molluschi bivalvi vivi;
- » verificare l'eventuale presenza di **contaminanti chimici**.

Piano regionale di Sorveglianza periodica delle zone di produzione e stabulazione dei molluschi bivalvi vivi

individuazione e classificazione delle zone acque nelle quali e' operante il sistema di sorveglianza periodica :

- ❑ Cagliari : *S.Gilla (A)*
- ❑ Muravera : *S.Giovanni, Feraxi, Colostrai (A)*
- ❑ Tortolì : *Arbatax (A)*
- ❑ Oristano : *Golfo di Oristano (A), Foce del Tirso (B)*
- ❑ Arborea : *Corru Mannu est. (A), C.M. int. (B), Corru S'Ittiri (B)*
- ❑ Terralba : *Marceddi (B)*
- ❑ Olbia : *Seno Cocciani, Isola di Cavallo, Cala Saccaia (B), Golfo di Cugnana (A)*
- ❑ Santa Teresa: *Porto Pozzo (B)*

Piano regionale di Sorveglianza periodica delle zone di produzione e stabulazione dei molluschi bivalvi vivi



principali zone acque
nelle quali è operante
il Sistema di
Sorveglianza periodica



In ciascuna zona classificata sono state individuate apposite stazioni di campionamento

Per esse sono state definite le modalità e le frequenze dei controlli, secondo quanto previsto dalla norme vigenti

Piano di Sorveglianza: COMPETENZE

REGIONE:

Assessorato della Difesa dell'Ambiente

- Provvede alla classificazione delle acque ed ai provvedimenti conseguenti.
- Trasmette la documentazione relativa alla classificazione delle acque a
 - **Ministero** della Sanità,
 - **Assessorato** dell'Igiene e Sanità e dell'Assistenza Sociale della RAS,
 - **ARPAS** / Presidi multizonali di Prevenzione,
 - **Istituto Zooprofilattico** Sperimentale della Sardegna
 - competenti **Servizi Veterinari e Medici** del Dipartimento di Prevenzione delle Aziende USL interessate.
- Provvede, se necessario, alla revisione della classificazione delle acque.

competenze dell'Assessorato regionale dell'Igiene e Sanità

predispone

- ✓ il Piano di Sorveglianza Periodica delle zone di Produzione e Stabulazione dei molluschi bivalvi vivi

coordina le attività

- ✓ del Dipartimento di Prevenzione delle Aziende USL,
- ✓ dei Laboratori di riferimento (Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Presidi Multizonali di Prevenzione/ARPAS)
- ✓ del Dipartimento di Botanica ed Ecologia Vegetale dell'Università degli Studi di Sassari.

competenze Azienda Sanitaria Locale

Serv. Vet. e Med. del Dipartimento di Prevenzione

- ❑ individua le stazioni di prelievo
- ❑ provvede alla definizione dei piani di campionamento
- ❑ provvede al prelievo dei campioni delle acque e dei molluschi e al successivo invio ai Laboratori di riferimento
- ❑ provvede all'attuazione di eventuali provvedimenti restrittivi emanati dalle Autorità competenti
- ❑ provvede ad informare gli altri soggetti interessati per l'eventuale adozione di provvedimenti restrittivi di competenza

competenze ARPAS/Presidi Multizonali di Prevenzione

- provvedono all'esecuzione delle **analisi** microbiologiche, chimiche, fisiche su acque e molluschi;
- provvedono all'esecuzione della determinazione del **fitoplancton** nelle acque (attualmente vi provvede solamente la ASL 1);
- provvedono a **comunicare** gli esiti analitici ai competenti Assessorati regionali ed al Dipartimento di Prevenzione dell'Azienda USL competente per territorio.

competenze Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

- provvede alla ricerca e determinazione delle biotossine algali nei molluschi e all'esecuzione delle analisi microbiologiche e chimiche
- comunica gli esiti analitici ai due Assessorati regionali interessati ed al Dipartimento di Prevenzione dell'Azienda USL competente per territorio.

l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna può avvalersi del Laboratorio Nazionale di riferimento per le tossine marine (Centro Ricerche Marine di Cesenatico) e dell'Istituto Superiore di Sanità per l'eventuale identificazione di tossine non conosciute nei molluschi

competenze Università degli Studi di Sassari
*Dipartimento di Botanica ed Ecologia
Vegetale*

- provvede alla determinazione del **fitoplancton tossico** o potenzialmente tale nelle acque adibite alla molluschicoltura (sino a quando tutte le Aziende USL siano in grado di svolgere autonomamente tale indagine)
- assicura il supporto scientifico per la formazione del personale delle A. USL.

frequenze minime di campionamento delle Acque

- Controlli microbiologici: frequenza minima trimestrale
- Controlli sul fitoplancton tossico o potenzialmente tossico: frequenza minima almeno **quindicinale**
- Controlli chimico-fisici: frequenza minima trimestrale

Piano di Sorveglianza: modalità di campionamento

- **ACQUE (FITOPLANCTON):**
- Prelievo con retino a maglie del diametro di 20 micron con pescata verticale dal fondo alla superficie
- Qualora la colonna d'acqua sia inferiore a 1 m si preleverà 1 litro di acqua con una bottiglia a metà altezza

frequenze minime di campionamento dei Molluschi Bivalvi Vivi

- Controlli microbiologici: frequenza minima trimestrale
- Controlli chimici: frequenza minima semestrale
- Controlli sulle biotossine marine: frequenza minima **quindicinale**

Biotossine algali: Quadro normativo comunitario

- **Reg. CE 854/2004** (Controlli Ufficiali su A.O.A.)
- Capo II : Controlli ufficiali sui molluschi bivalvi vivi provenienti da zone di produzione classificate
- B. Monitoraggio delle zone di stabulazione e di produzione classificate
 - 1. *Le zone di stabulazione e produzione classificate devono essere monitorate periodicamente al fine di verificare:*
 - C) la presenza di **plancton tossico** nelle acque di produzione e stabulazione e di **biotossine** nei molluschi bivalvi vivi.
 - 5. **Il prelievo di campioni** ai fini dell'analisi delle tossine deve avere, come regola generale, cadenza settimanale nei periodi in cui è consentita la raccolta.
 - Tale frequenza può essere aumentata o ridotta in funzione di una valutazione periodica dei rischi

Biotossine algali: Quadro normativo comunitario

- **Reg. CE 854/2004** (Controlli ufficiali su A.O.A.)
- Capo II : Controlli ufficiali sui molluschi bivalvi vivi provenienti da zone di produzione classificate
- B. Monitoraggio delle zone di stabulazione e di produzione classificate
- 6. Se sono noti i tassi di accumulazione delle tossine di un gruppo di specie che vivono nella stessa zona , **una delle specie con il tasso più elevato può essere utilizzata come indicatore**, rendendo possibile lo sfruttamento di tutte le specie del gruppo se i livelli di tossine della specie che fa da indicatore sono sotto i limiti prescritti.
- Quando i livelli di tossine della specie che funge da indicatore sono al di sopra dei limiti prescritti, il raccolto delle altre specie è permesso soltanto se ulteriori analisi sulle altre specie mostrano che i loro livelli di tossine sono inferiori ai limiti prescritti

Biotossine algali: Quadro normativo comunitario

- **Reg. CE 854/2004** (Controlli ufficiali su A.O.A.)
- Capo II :Controlli ufficiali sui molluschi bivalvi vivi provenienti da zone di produzione classificate
- B. Monitoraggio delle zone di stabulazione e di produzione classificate
- Relativamente al **monitoraggio del plancton**, i campioni devono essere rappresentativi della colonna d'acqua e devono fornire informazioni sulla presenza di specie tossiche e sulle tendenze in atto all'interno della popolazione esaminata.
- Qualora siano rilevati cambiamenti delle popolazioni tossiche che possono portare a un accumulo di tossine, si deve **aumentare la frequenza del campionamento** dei molluschi **oppure** decidere la **chiusura precauzionale delle zone interessate** fino all'ottenimento dei risultati dell'analisi delle tossine

Piano di Sorveglianza: modalità di campionamento dei molluschi bivalvi

Campione:

aliquota di almeno 4 Kg di prodotto preferibilmente in pezzatura da commercio composta da più campioni elementari

Campione elementare:

quantità prelevata in un singolo punto della stazione di monitoraggio

Piano di Sorveglianza: modalità di campionamento dei molluschi bivalvi

- Banchi naturali o allevamenti che utilizzano completamente la colonna d'acqua:
 - prelievi a 3 livelli: fondo, metà e a 50 cm dalla superficie
- Banchi naturali o allevamenti di MBV che vivono sul fondo:
 - più Campioni elementari prelevati in un tratto di 500/1000 m parallelo alla costa
- allevamenti su filari log line:
 - più Campioni elementari di MBV prelevati in ogni singola zona di allevamento

Il campione, costituito dai vari campioni elementari raccolti, deve essere posto in un contenitore pulito che assicuri un'adeguata protezione dalla contaminazione e dai danni durante il trasporto

il contenitore deve essere sigillato e provvisto di etichetta di identificazione apposta dal Servizio prelevatore del Dip. di Prevenzione

Dal momento del prelievo, il campione deve essere conservato a **temperatura di refrigerazione** e consegnato al Laboratorio ufficiale nel più breve tempo possibile (al massimo entro 6 ore)

Le **analisi biotossicologiche** vengono eseguite in conformità a quanto previsto dal **Decreto 16/05/2002** del Ministero della Salute e dai recenti Regolamenti Comunitari del "pacchetto Igiene"

CAMPIONAMENTO INTENSIVO è previsto

- aumento della frequenza dei campionamenti
- aumento del numero delle stazioni di prelievo

in caso di accentuata presenza di alghe tossiche o potenzialmente tossiche o di biotossine algali nei molluschi bivalvi o ogni qualvolta l'Azienda USL lo ritenga necessario.

Biotossine algali: Quadro normativo comunitario

- **Reg. CE 854/2004** (Controlli ufficiali su A.O.A.)
- Capo II :Controlli ufficiali sui molluschi bivalvi vivi provenienti da zone di produzione classificate
- B. Monitoraggio delle zone di stabulazione e di produzione classificate
- Relativamente al **monitoraggio del plancton**, i campioni devono essere rappresentativi della colonna d'acqua e devono fornire informazioni sulla presenza di specie tossiche e sulle tendenze in atto all'interno della popolazione esaminata.
- Qualora siano rilevati cambiamenti delle popolazioni tossiche che possono portare a un accumulo di tossine, si deve **aumentare la frequenza del campionamento** dei molluschi **oppure** decidere la **chiusura precauzionale delle zone interessate** fino all'ottenimento dei risultati dell'analisi delle tossine

**PROCEDURA
PER L'ADOZIONE DEL
PROVVEDIMENTO
AMMINISTRATIVO IN CASO DI
ESITO SFAVOREVOLE ANALITICO**

Il laboratorio ufficiale dell' **I.Z.S.** che ha effettuato le analisi sui molluschi bivalvi, qualora riscontri il superamento dei limiti biotossicologici stabiliti per le diverse tossine algali, **informa tempestivamente** via fax il **Servizio sanitario del Dipartimento di Prevenzione dell'Azienda USL competente per territorio**, che ha prelevato il campione

Il Servizio dell'azienda USL che ha eseguito il campionamento informa:

- il Sindaco del Comune competente per territorio per l'emanazione dell' **Ordinanza sindacale** di **divieto temporaneo di raccolta e/o commercializzazione dei molluschi bivalvi** presenti nella zona acquea interessata;
- gli altri Comuni eventualmente competenti, (per il tramite dell'azienda USL, se diversa da quella di cui al punto precedente) per l'emanazione delle apposite Ordinanze sindacali;

- l'Assessorato regionale dell'Igiene e Sanita' e dell'assistenza sociale;
- l'Assessorato regionale della difesa dell'Ambiente;
- gli altri Servizi eventualmente interessati del Dipartimento di Prevenzione dell'Azienda USL

In caso di superamento, nei molluschi bivalvi, dei limiti biotossicologici stabiliti dalle norme comunitarie, viene adottato un provvedimento amministrativo temporaneo (**Ordinanza Sindacale**) per vietarne la raccolta e l'avvio al consumo umano.

Il **divieto** deve essere mantenuto fino a quando non risultino ripristinati i requisiti di idoneità e comunque, secondo il vigente Piano di Sorveglianza della R.A.S. (che sarà revisionato entro il 2007), per almeno 15 giorni dall'ultimo rilevamento sfavorevole

chiusura / riapertura zone di produzione

- **Reg. CE 854/2004 (controlli ufficiali su AOA)**
- **Capo II : Controlli ufficiali sui molluschi bivalvi vivi provenienti da zone di produzione classificate**
- **C. Decisioni successive al monitoraggio**
- **2. L'Autorità competente può riaprire una zona di produzione chiusa soltanto quando i requisiti sanitari dei molluschi risultino nuovamente conformi alla normativa comunitaria**
- **Qualora per presenza di plancton tossico o per livelli eccessivi di tossine nei molluschi l'Autorità competente chiude una zona di produzione, sono necessari almeno 2 risultati consecutivi al di sotto dei valori limite prescritti, separati da un intervallo di almeno 48 ore, affinché la zona possa essere riaperta.**
- **Qualora siano disponibili dati recenti indicanti una tendenza decrescente della tossicità, l'Autorità competente può decidere di riaprire la zona in presenza di risultati al di sotto dei valori limite ottenuti con 1 solo campionamento**

Piano regionale di Vigilanza e Controllo Sanitario della produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi

scopo

coordinare e razionalizzare le procedure di vigilanza ed il controllo sanitario nel settore dei molluschi bivalvi vivi dal momento dello sbarco all'immissione in commercio e nel periodo di vita commerciale

Piano regionale di Vigilanza e Controllo Sanitario
della produzione e commercializzazione dei
molluschi bivalvi vivi

si applica a

- ❑ Centri di **Depurazione** Molluschi (**CDM**)
- ❑ Centri di **Spedizione** Molluschi (**CSM**)
- ❑ Esercizi di **somministrazione** (rist., alberghi..)
- ❑ Esercizi di **commercializzazione**
- ❑ Ristorazione **collettiva** (mense..)

Piano regionale di Vigilanza e Controllo Sanitario della
produzione e commercializzazione dei MBV vivi: fasi attuative

- prelievo campioni: Dip. di Prevenzione
(Servizio Veterinario IAOA- area B) **A.S.L.**
- ricerca plancton tossico : Dip. Botanica e
Ecologia Vegetale, **Università Sassari**
- verifica requisiti microbiologici,
biotossicologici e chimici: **I.Z.S. Sardegna**

Piano Vigilanza : suddivisione dei campionamenti
in impianti idonei CDM-CSM
Regione Sardegna

Attualmente nell'ipotesi di un controllo medio mensile per ogni CDM e CSM e' previsto un totale di circa 190 campioni/anno.

Piano Vigilanza: suddivisione campioni
settore commercializzazione e
somministrazione

sono previsti controlli nell'ambito della vendita al **dettaglio** e nella **rist. pubblica** per un totale rispettivamente di 121 e di 45 campionamenti

nel settore della **ristorazione collettiva** le relative aziende USL provvederanno a stabilire, se necessario, eventuali controlli.

Piano Vigilanza: controlli di laboratorio

- microbiologici (*E. coli*, *Salmonella*) (il Reg. 2073/05 prevede per *Salmonella* la ricerca in 5 u.c.)
- biotossicologici (PSP, DSP, ASP)
- chimici (mercurio, piombo, cadmio e arsenico) (2 analisi per anno)
- fisici (radionuclidi) (2 analisi per anno)

Piano Vigilanza:
controlli di laboratorio
2 volte/anno:

- chimici (mercurio, piombo, cadmio e arsenico)
- fisici (radionuclidi)

Biotossine algali: quadro normativo comunitario

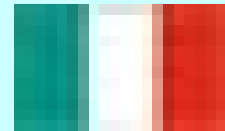
- **Reg. CE 853/2004** (norme igieniche specifiche per Alimenti di Origine Animale)
- Cap. V : norme sanitarie per i molluschi bivalvi vivi
- 2. Essi non devono contenere biotossine marine in quantità totali superiori ai seguenti limiti:
 - A) **PSP** (*Paralytic shellfish poison*): 800 µg/Kg
 - B) **ASP** (*Amnesic shellfish poison*) : 20 mg/Kg
 - C) **acido okadaico, dinophysitossine e pectenotossine** complessivamente: 160 µg di equivalente AO/Kg
 - D) **yessotossine** : 1 mg di equivalente YTX/Kg
 - E) **Azaspiracidi** : 160 µg di eq azaspiracido/Kg

PSP in molluschi bivalvi vivi



Normativa Comunitaria

- Dec. Commiss. 15/03/2002
- Reg. 853/2004, All. III
sezione VII, cap. V, p.2
- Reg. n. 854/04
- Reg. 2074/05, All. III
- Reg. 1664/06 All. I



Normativa Nazionale

- D.lgvo n. 530/92
- Decr.Min.Salute
16/5/2002

Tenore massimo: 800 µg di equivalente di saxitossina/kg di parte edibile

Piano Vigilanza: Procedure da adottare per il campionamento

ALIQUOTE:

due, di cui una al Laboratorio per l'analisi garantita non ripetibile e una per il detentore/produttore della merce

QUANTITÀ:

ogni aliquota dovrà essere costituita da non meno di **4 kg** di campione

FORMAZIONE DELLE ALIQUOTE:

devono essere prelevate **confezioni originali** e integre

□ il campione deve essere costituito da molluschi di **pezzatura da commercio del medesimo lotto**

□ sul **verbale di prelievo** deve essere sempre riportato quali analisi vengono richieste, quando e dove saranno effettuate

□ dovrà essere dato **avviso agli interessati** (detentore, produttore) che gli accertamenti di laboratorio sono **accertamenti tecnici non ripetibili** ai quali possono presenziare o farsi rappresentare da un consulente tecnico

CONFEZIONAMENTO ALIQUOTE

IN SACCHETTO DI NYLON
RIGOROSAMENTE CHIUSO, SIGILLATO
E MUNITO DI CARTELLINO
IDENTIFICATIVO A CURA DEL
SERVIZIO PRELEVATORE (**SERVIZIO
VETERINARIO IGIENE ALIMENTI O.A.**)

TRASPORTO

- deve essere effettuato in contenitore refrigerato (0°-6°C) coibentato
- dal momento del prelievo del campione alla sua consegna al laboratorio non devono trascorrere più di 6 ore
- **Il campione non deve mai essere congelato** in quanto con lo scongelamento e il conseguente successivo sgocciolamento si verifica perdita di una quota delle tossine eventualmente presenti (specie di quelle idrosolubili) con conseguente difformità del risultato di analisi rispetto al valore reale
- il prelievo e la successiva consegna dei campioni deve sempre essere preventivamente concordata con il **Laboratorio I.Z.S.**

Modalità di esecuzione del campionamento per la verifica simultanea dei requisiti microbiologici e biotossicologici dei Molluschi Bivalvi vivi in commercio

- Prelievo di 2 aliquote dello stesso lotto del peso di 4 Kg ciascuna costituite ciascuna da 5 unità campionarie (Reg. CE 2073/05), 1 al detentore/produttore e 1 al Laboratorio, con avviso agli interessati su data, ora e luogo di esecuzione di **analisi non ripetibili**
- Sulla aliquota del Laboratorio si procede alla ricerca di *Salmonella spp* in tutte le u.c., alla ricerca di *E.coli* su almeno 10 individui (2 individui da ciascuna u.c.), alla determinazione delle biotossine algali (PSP, DSP, ASP) sul materiale rimanente delle 5 u.c.
- I microrganismi del genere *Salmonella* devono essere assenti in tutte e 5 le u.c. (metodo di analisi EN/ISO 6579),
- *E.coli* viene ricercato su un campione aggregato di almeno 10 individui e deve risultare con un titolo inferiore a 230 MPN/100 g di carne e liquido intervalvare (metodo di analisi ISO TS 16649-3)
- La quantità di **biotossine algali** non deve superare i limiti massimi previsti dal Reg. CE 853/04 (metodi di analisi: Reg. 2074 e 1660)



La gestione delle non
conformità / emergenze

Comunicazioni analisi di laboratorio dell'I.Z.S. al Dip. Prevenzione A.S.L relativamente a

- ✚ presenza di fitoplancton tossico nelle zone acquee di produzione e stabulazione dei M.B.V.
- ✚ presenza di tossine algali nei molluschi bivalvi oltre i limiti stabiliti dalla normativa vigente

La gestione delle emergenze sul prodotto locale in allevamento

1. es. riscontro concentrazione tossine PSP > 800 microngrammi/Kg p.e.: comunicazione risultati analisi IZS al Dip. Prevenzione ASL e RAS
2. ORDINANZA SINDACO (divieto di raccolta e commercializzazione del prodotto interessato, sino al ripristino dei requisiti)
3. intensificazione SORVEGLIANZA in allevamento e **vigilanza** nel circuito commerciale
4. Piano di campionamento intensivo (aumento frequenza campionamento e/o del numero delle stazioni di prelievo)

La gestione delle emergenze sul prodotto locale in commercio

- es. riscontro concentrazione PSP > 800 microngrammi/Kg p.e.: comunicazione risultati analisi IZS al Servizio Veterinario ASL e RAS
- Attuazione procedure di RINTRACCIABILITA' e RICHIAMO/RITIRO del prodotto interessato (Reg. CE 178/02, art. 18 e 19 e nazionali (accordo Stato-Regioni 28/07/2005) e del SISTEMA di ALLERTA
- ORDINANZA SINDACO (divieto di raccolta e commercializzazione del prodotto locale interessato, sino al ripristino dei requisiti)
- intensificazione sorveglianza in allevamento e vigilanza nei CDM-CSM e nel circuito commerciale

La gestione delle emergenze sul prodotto locale in commercio

- **attivazione SISTEMA DI ALLERTA regionale e/o nazionale (acc. Stato/regioni 15/12/ 2005)** (identificazione e sequestro lotti sospetti presenti nel circuito commerciale locale, regionale, nazionale)
- **informazione e coinvolgimento di tutti i soggetti interessati** (Regione, AA.SS.LL., Ministero Salute, CSM, OSA, operatori commerciali..)
- **eventuale allerta strutture sanitarie ospedaliere**
- **eventuale comunicazione ai mezzi di informazione sull'elevato rischio sanitario**

La gestione delle emergenze

- **Riscontro di non conformita' a destinazione di prodotti di importazione comunitaria**

L'U.V.A.C. può disporre:

↳ **respingimento** della merce

↳ **vincolo sanitario** con controlli rafforzati sulle successive partite di analoga tipologia e provenienza

↳ attivazione del **Sistema di Allerta comunitario** (reg. 178, art. 50)

La gestione delle emergenze

- **Riscontro di non conformita' a destinazione di prodotti di importazione comunitaria**

L'autorità sanitaria locale
(Servizio Veterinario
ASL) può disporre

↪ **sequestro e successiva
distruzione delle merci
non conformi.**

Week 2006/4

ALERT NOTIFICATIONS

DATE:	NOTIFIED BY:	REF.:	REASON FOR NOTIFYING:	COUNTRY OF ORIGIN:
23/01/2006	Estonia	2006.0059	too high content of sulphites in dried pears	CHINA VIA LITHUANIA
23/01/2006	Germany	2006.0060	Salmonella infantis in rapeseed pellets	GERMANY
24/01/2006	United Kingdom	2006.0061	illegal trade of chilled beef meat	UNITED KINGDOM
24/01/2006	Estonia	2006.0062	too high content of sulphites in crab apple	CHINA VIA LATVIA
24/01/2006	Estonia	2006.0063	too high content of sulphites in dried apricots	TURKEY VIA LATVIA
24/01/2006	Estonia	2006.0064	too high content of sulphites in dried apricots	TURKEY VIA LITHUANIA
24/01/2006	Germany	2006.0065	migration of primary aromatic amines from kitchen utensil	UNKNOWN ORIGIN VIA THE NETHERLANDS
24/01/2006	Italy	2006.0066	Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in live mussels	SPAIN
24/01/2006	Italy	2006.0067	Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in live mussels	SPAIN
25/01/2006	The Netherlands	2006.0068	dioxins in pig fat	BELGIUM
25/01/2006	Belgium	2006.0069	aflatoxins in roasted and salted pistachios	GERMANY
25/01/2006	Estonia	2006.0070	Listeria monocytogenes in herring fillets	LITHUANIA
25/01/2006	Germany	2006.0071	spoilage of wild game products	UNKNOWN ORIGIN
26/01/2006	Hungary	2006.0072	aflatoxins in pistachio kernels	IRAN VIA CZECH REPUBLIC
26/01/2006	Belgium	2006.0073	carbon monoxide treatment of frozen yellow tuna steaks	INDONESIA VIA THE NETHERLANDS
26/01/2006	Germany	2006.0074	Salmonella group C1 in raw "Bauernmett" sausage	AUSTRIA
27/01/2006	France	2006.0075	cadmium in zinc sulphate	CHINA
27/01/2006	Italy	2006.0076	too high content of nitrates in salami	ITALY
27/01/2006	France	2006.0077	suffocation risk as a result of the consumption of lollipops	THE REPUBLIC OF KOREA

Week 2006/5

ALERT NOTIFICATIONS

DATE:	NOTIFIED BY:	REF.:	REASON FOR NOTIFYING:	COUNTRY OF ORIGIN:
30/01/2006	United Kingdom	2006.0078	unauthorised substance nitrofurantoin (metabolite) - nitrofurazone (SEM) in raw frozen headless shell-on shrimps (<i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	INDIA
30/01/2006	United Kingdom	2006.0079	unauthorised substance nitrofurantoin (metabolite) - nitrofurazone (SEM) in raw frozen headless shell-on shrimps (<i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	BANGLADESH
30/01/2006	Italy	2006.0080	Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in live mussels	SPAIN
30/01/2006	Italy	2006.0081	Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in live mussels	SPAIN
31/01/2006	Italy	2006.0082	Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in live mussels (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	SPAIN
31/01/2006	Ireland	2006.0083	insects in pasta	ITALY
01/02/2006	Latvia	2006.0084	unsuitable organoleptic characteristics of and parasites - nematodes in canned fish liver	POLAND VIA ESTONIA
01/02/2006	Finland	2006.0085	Salmonella group C in duck breast fillets	HUNGARY VIA DENMARK
02/02/2006	United Kingdom	2006.0086	chlorpropham in baby food	UNITED KINGDOM
02/02/2006	Germany	2006.0087	fragments of glass in strawberry yoghurt	GERMANY
03/02/2006	Austria	2006.0088	Salmonella cubana in fishmeal	GERMANY
03/02/2006	Germany	2006.0089	high content of iodine in canned vegetable salad	THE RUSSIAN FEDERATION
03/02/2006	Italy	2006.0090	Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in live mussels	SPAIN
03/02/2006	The Netherlands	2006.0091	undeclared peanut in lasagne white sauce and mild curry sauce	THE NETHERLANDS

Il commercio intracomunitario di animali e prodotti di origine animale (D.Lg 30 gennaio 1993 n. 28)

➤ **I controlli a destinazione** sono effettuati ai fini di

- * monitoraggio

- * verifica di conformità alla normativa comunitaria

su partite di prodotti di origine animale sulle quali il sistema dei controlli (attuati dai privati e/o dall'autorità sanitaria) propri del Paese di origine deve essere già stato assicurato.

Controlli di monitoraggio su partite di molluschi bivalvi vivi provenienti da altri Stati membri

consistono in:

- * controlli documentali
- * di identità
- * controlli di laboratorio

su una percentuale significativa e comunque non superiore rispetto a quella applicata a livello regionale sulla merce di produzione nazionale, con particolare riferimento alla verifica dei requisiti di natura microbiologica e biotossicologica.

Nei casi di riscontro di non conformita' a destinazione dei prodotti di importazione comunitaria si evidenzia

- mancanza delle necessarie garanzie sanitarie del prodotto relative agli aspetti di natura biotossicologica da parte del Paese speditore
- contemporanea presenza di lotti idonei e di lotti non conformi nel contesto delle medesime partite.

Riscontro di non conformita' a destinazione dei prodotti di importazione comunitaria

Non è ammissibile che **prodotti non conformi** per presenza di tossine di origine algale in concentrazioni superiori al limite stabilito **possano essere oggetto di scambi intracomunitari** ed essere eventualmente "sanati" a destinazione, una volta immessi in acque idonee.

Riscontro di non conformita' a destinazione dei prodotti di importazione comunitaria

- Lo stesso **Ministero della Salute** chiarisce in proposito che il **campionamento del prodotto deve essere effettuato** al momento dell'arrivo, prima di qualsiasi eventuale manipolazione o immersione, ossia **direttamente dai mezzi di trasporto**

Rischi sanitari e potenziali rischi ambientali

- nei casi in cui il prodotto di provenienza comunitaria è destinato all'immissione in acque di allevamento, il rischio sanitario può essere tenuto sotto controllo (divieto di raccolta e stretta vigilanza, sequestro e distruzione)
- in questi casi possono tuttavia verificarsi **contaminazioni ambientali da nuove microalghe tossiche** (ad. es. da *Gymnodinium catenatum*) non presenti nelle zone acquee di destinazione
- possibilità di adattamento e proliferazione delle microalghe con conseguenti **fenomeni di tossicità nelle produzioni locali di molluschi bivalvi**

Misure di prevenzione sanitaria

- ❑ **monitoraggio continuativo** delle zone acquee adibite alla molluschicoltura (ricerca specie algali tossiche)
- ❑ **monitoraggio continuo** dei molluschi bivalvi in allevamento (determinazione biotossine algali)
- ❑ **vigilanza** mediante **controlli biotossicologici** sul prodotto alla commercializzazione

Reg. CE 178/02

- Gli Operatori del settore alimentare (OSA) e le Autorità sanitarie competenti sono entrambi chiamati, ciascuno nell'ambito delle proprie responsabilità e competenze, ad assicurare il pieno soddisfacimento del dettato dell'art. 14 del Reg. (CE) n. 178/2002 "gli alimenti a rischio (*dannosi per la salute e/o inadatti al consumo umano*) non possono essere immessi sul mercato"