

Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici

Luciana CROCI e Elisabetta SUFFREDINI

Laboratorio di Alimenti, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - I prodotti ittici costituiscono da sempre un'importante fonte per l'alimentazione umana. L'aumento del loro consumo e i dati epidemiologici che confermano il ruolo dei prodotti della pesca, specialmente molluschi, come vettori di tossinfezione alimentare hanno determinato tuttavia l'esigenza di un maggiore controllo delle loro caratteristiche microbiologiche. In questa rassegna vengono presi in considerazione i principali microrganismi patogeni associati con tali prodotti, con particolare attenzione verso i patogeni emergenti non considerati nella normativa (patogeni ambientali, ad es. vibrioni e virus enterici) esaminando le modalità della loro presenza e sopravvivenza nell'ambiente marino, i meccanismi mediante cui essi contaminano i prodotti ittici e la loro resistenza ai trattamenti subiti dall'alimento prima della commercializzazione ed al momento del consumo.

Parole chiave: prodotti della pesca, *Vibrio*, virus enterici, contaminazione.

Summary (*Microbiological risk associated to seafood consumption*). - Seafood has always been an important source for human nutrition. The increase of its consumption, however, and the epidemiological data, confirming the role of seafood, especially shellfish, as a carrier of foodborne toxoinfections, has brought the need of a greater control of his microbiological characteristics. In this review we considered the main pathogenous microorganisms associated to such products, with a special attention towards the emerging pathogens not yet considered in the legislation (autochthonous pathogens, e.g. vibrios and enteric viruses). We examined the conditions of their presence and survival in the marine environment, the mechanisms through which they contaminate seafood and their resistance to the treatments endured by food before the commercialization and at the moment of the consumption.

Key words: seafood, *Vibrio*, enteric virus, contamination.

Introduzione

I prodotti della pesca costituiscono per l'uomo un importante apporto nutrizionale in quanto fonte di proteine di elevata qualità, accompagnata, in alcune specie, ad un costo contenuto. L'incremento nella richiesta di tali alimenti ha determinato la necessità di un più rigoroso controllo sanitario al fine di prevenire le malattie da essi trasmesse, per la maggior parte costituite da intossicazioni di origine microbiologica. In aggiunta alla naturale presenza di microrganismi patogeni nell'ambiente marino, infatti, la contaminazione delle acque da parte di scarichi fognari ricchi di batteri e virus enterici e le fioriture fitoplanctoniche delle acque costiere (con conseguente possibile modificazione della flora microbica e selezione di particolari ceppi batterici) hanno accresciuto l'eventualità di comparsa di situazioni di rischio sanitario.

In questa rassegna saranno presi in analisi i principali fattori di rischio microbiologico associati con il consumo dei prodotti della pesca, specialmente

molluschi, prestando particolare attenzione ai patogeni emergenti non considerati nella normativa (patogeni ambientali, ad es. Vibrionaceae e virus enterici).

Contaminazione microbiologica dei prodotti ittici

La flora microbica di un prodotto ittico è strettamente correlata alle sue abitudini di vita e alle caratteristiche microbiologiche dell'ambiente in cui esso nasce e si sviluppa. In vita il pesce sano presenta microrganismi vitali sulla cute, sulle branchie e nell'intestino, mentre le masse muscolari sono essenzialmente sterili. I pesci provenienti da mari freddi sono prevalentemente colonizzati da batteri Gram-negativi psicofili, mentre quelli provenienti da mari tropicali prevalentemente da batteri Gram-positivi mesofili. La maggior parte dei Gram-negativi appartiene ai generi *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Flavobacterium* e *Cytophaga*. I Gram-positivi, invece, appartengono più spesso ai generi

Micrococcus e *Bacillus*. Nei gamberi tropicali sono state rinvenute significative colonizzazioni da parte di *Corynebacterium* e Gram-negativi bastoncellari.

Sulla cute e nelle branchie generalmente predominano specie aerobie (*Pseudomonas* spp, *Aeromonas* spp, *Acinetobacter* spp, *Moraxella* spp, *Cytophaga*), mentre a livello intestinale si ritrovano germi Gram-negativi aerobi-anaerobi facoltativi (*Vibrio* spp in gran maggioranza, *Alcaligenes* spp, *Flavobacterium* spp, *Xanthomonas* spp) e in forma più modesta alcuni Gram-positivi (*Micrococcus* spp, *Bacillus* spp, *Corinebacterium*) [1].

Il momento più delicato in cui può verificarsi la contaminazione della massa muscolare del pesce è quello riguardante le operazioni iniziali che si compiono direttamente sul peschereccio: scelta, lavaggio, eventuale mondadura, eviscerazione e dissanguamento del pesce. I pericoli sono dati dall'originaria contaminazione del pesce stesso e dalla possibilità di contaminazioni crociate tra i vari esemplari. Se le operazioni non vengono condotte con le dovute cautele, in particolar modo nelle fasi di eviscerazione e lavaggio, si possono avere trasferimenti di microrganismi e parassiti dalla cute e dai visceri alle masse muscolari. Nel muscolo del pesce, inoltre, sono presenti alcune proteasi, (catepsine e peptidasi) che nello stato *post mortem*, pur non provocando eccessivi danni diretti, favoriscono, mediante reazioni autolitiche, la graduale invasione batterica dall'intestino e la proliferazione.

Dopo 2-3 giorni di stoccaggio a temperature di refrigerazione tendono a prevalere i batteri psicofili Gram-negativi aerobi, in particolare *Pseudomonas* e *Alteromonas* spp mentre in pesci provenienti da mari tropicali anche germi quali *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter* e *Moraxella* possono inizialmente raggiungere livelli apprezzabili. Con l'ulteriore protrarsi della conservazione, *Pseudomonas* raggiunge livelli notevoli, potendo in alcuni casi costituire oltre l'80% della microflora presente. Nel caso di un ritardo iniziale nella conservazione a basse temperature, quando il prodotto raggiunge uno stato di deterioramento più o meno evidente, si può invece riscontrare un elevato numero di *Bacillus* e *Aeromonas* [2].

Per quanto riguarda l'induzione di patologie nell'uomo, alcune specie di *Pseudomonas*, *Klebsiella* o *Staphylococcus* sono state in diverse occasioni segnalate come responsabili; sono poi ampiamente documentati casi di gastroenteriti da Vibrionaceae, specialmente dopo il consumo, senza cottura, di pesci provenienti da mari caldi. Anche le contaminazioni del pesce da parte di spore botuliniche, provenienti dall'acqua o dai sedimenti fangosi, non sono un evento raro ed un piccolo numero di *Clostridi* produttori di tossine botuliniche può albergare nell'intestino dei pesci. Le eventuali azioni pericolose, tuttavia, si

creano in questi casi solo dopo cottura inadeguata e conservazione sottovuoto a temperatura ambiente. Rare enteriti umane sono infine dovute a *Aeromonas hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides*, mentre non sono importanti le infezioni virali. In via teorica, infatti, contaminazioni fecali umane possono produrre contaminazioni dei pesci con virus enterici, ma non ne risulta mai una concentrazione tale da essere pericolosa.

Molluschi eduli lamellibranchi

Notizie epidemiologiche

I molluschi eduli lamellibranchi sono implicati da sempre nella trasmissione di malattie gastroenteriche di diversa gravità come febbri tifoide e colera.

Soltanto dagli anni '50 comunque, grazie al miglioramento delle tecniche per il trattamento delle acque di scarico e grazie allo sviluppo di standard per la classificazione delle aree di allevamento e raccolta dei molluschi, l'incidenza di tali malattie, soprattutto della febbre tifoide, iniziò a declinare. Ciò nonostante i molluschi non hanno smesso di costituire un pericolo per la salute umana.

Secondo i dati del Center for Disease Control (CDC), ad esempio, nel decennio '78-'87, si sono verificate solo negli USA un totale di 128 epidemie gastroenteriche di vario tipo (comparsa di due o più casi collegati alla stessa sorgente alimentare) e 3747 casi associati con il consumo di molluschi (National Advisory Committee On Microbiological Criteria for Foods, 1992). E' ragionevole comunque ritenere che i dati epidemiologici a disposizione siano sottostimati; in molti casi, infatti, il consumo di molluschi provoca solo sintomi gastrointestinali di lieve entità, che non determinano il ricorso al sistema sanitario.

Un dato epidemiologico è particolarmente rilevante nella descrizione dei problemi sanitari connessi al consumo di molluschi: negli ultimi 25 anni è stato possibile riscontrare che i patogeni batterici associabili a contaminazione fecale delle acque (ad es. coliformi e salmonelle) sono stati responsabili solo del 4% delle epidemie associate a questi prodotti, mentre i batteri naturalmente presenti nell'ambiente marino sono risultati responsabili per il 20% delle malattie e per il 99% delle morti [3]. Fra tali patogeni autoctoni dell'ambiente marino un ruolo primario nelle patologie dovute al consumo di molluschi è svolto dai microrganismi appartenenti alla famiglia delle Vibrionaceae.

Per quanto riguarda *V. cholerae*, i molluschi sono sicuramente tra i maggiori fattori della sua trasmissione in diverse parti del mondo. Una ricerca del Foodborne and Diarrheal Diseases Branch del CDC ha

evidenziato come nel triennio '92-'94 in 20 Stati americani sottoposti a sorveglianza si verificarono 160 casi di colera, legati principalmente a due epidemie (a bordo di un volo Lima-Los Angeles e al termine di una crociera nel sud-est asiatico). Nel nostro Paese epidemie di colera nel 1973 interessarono la zona di Napoli e la Puglia [4], ripetendosi poi nel 1979 anche in Sardegna e del tutto recentemente, fra ottobre e dicembre del 1994, 12 casi di colera furono segnalati nella provincia di Bari in soggetti che avevano consumato molluschi e gasteropodi crudi [5]. Analisi di laboratorio consentirono di collegare con sufficiente certezza i casi di Bari all'epidemia che nel settembre del 1994 aveva coinvolto l'Albania meridionale e che aveva prodotto 300 casi, dovuti principalmente all'utilizzo di acqua municipale inquinata [6].

Un ruolo importante tra le malattie virali veicolate dai molluschi riveste sicuramente l'epatite A. Al consumo di tali prodotti, infatti, sono attribuiti per gli USA, la Gran Bretagna e la Germania rispettivamente il 19, il 25 e il 20% dei casi di epatite A notificati in quei Paesi. In Italia, secondo i dati del Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA), più del 60% dei casi di epatite A segnalati negli ultimi anni sono stati correlati al consumo di molluschi [7]. Altri virus di grande rilevanza sono i *Calicivirus*, in particolare i *Norwalk-like virus*, responsabili della malattia già nota sin dagli anni '30 come sindrome di vomito invernale. In Olanda tali virus sono responsabili di circa l'80% dei casi di gastroenterite, in Gran Bretagna ed in USA di circa il 30%. Tale incidenza è tuttavia sottostimata poiché, trattandosi di una patologia relativamente lieve, solo occasionalmente necessita dell'ospedalizzazione.

Normativa

La produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi, considerati alimenti ad alto rischio, sono disciplinate dal DL.vo 530/92. Tale decreto, recependo le raccomandazioni della direttiva CEE 91/492, stabilisce che i molluschi subiscano un destino diversificato in base alla zona di provenienza. Le acque destinate alla mitilicoltura vengono classificate dalle Regioni, attraverso un procedimento ripetuto con scadenza triennale, in tre categorie:

1) *zona A*: i cui molluschi possono essere raccolti e utilizzati per il consumo umano diretto. Tali molluschi devono soddisfare i seguenti requisiti:

- contenere meno di 300 coliformi fecali o meno di 230 *E. coli* per 100 g di polpa e di liquido intervalvare;
- non contenere salmonelle in 25 g di polpa;
- non contenere sostanze tossiche o nocive di origine naturale o immesse nell'ambiente in quantità tale che l'assunzione tramite alimenti superi la DGA (dose giornaliera ammissibile) per l'uomo;

- avere un tenore massimo di nuclidi radioattivi non superiore ai limiti fissati dalla CEE;

- avere un tenore massimo di biotossine algali PSP (*paralytic shellfish poison*) nelle parti commestibili non superiore a 80 µg per 100 g (misurato mediante metodo biologico);

- non dare, con i metodi di analisi biologica, reazione positiva per la presenza di tossine DSP (*diarrhetic shellfish poison*);

- avere un tenore massimo di ASP (*amnesic shellfish poison*) non superiore ai 20 µg di acido domoico per grammo (metodo di analisi HPLC).

2) *zona B*: i cui molluschi possono essere destinati al consumo umano diretto solo dopo aver subito un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A. I molluschi raccolti da tali zone non devono superare i livelli di 6000 coliformi fecali per 100 g di polpa o 4600 *E. coli* per 100 g di polpa nel 90% dei campioni. Mediante depurazione o stabulazione, i molluschi provenienti da tali zone di produzione dovranno arrivare a soddisfare i requisiti fissati per i molluschi delle zone A.

3) *zona C*: i cui molluschi possono essere destinati al consumo umano diretto esclusivamente previa stabulazione, per un periodo non inferiore a due mesi, in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A; la stabulazione può essere associata o meno ad un processo di depurazione intensivo. I molluschi raccolti da tali zone non devono superare i livelli di 60 000 coliformi fecali per 100 g di polpa.

La depurazione, effettuata in centri riconosciuti dal Ministero della Salute, deve consentire ai molluschi di raggiungere i parametri precedentemente citati mediante il rilascio della contaminazione residua. I molluschi devono essere messi nelle condizioni di riprendere rapidamente la nutrizione mediante filtrazione e devono mantenere intatta la loro vitalità. Nel corso del processo di depurazione è possibile utilizzare acqua di mare pulita (o resa tale mediante trattamento) ovvero acqua di mare ricostituita mediante aggiunta dei suoi principali componenti chimici all'acqua potabile. Il processo di depurazione deve essere ininterrotto e deve garantire che lotti diversi di molluschi non si trovino mai a stabulare nelle medesime vasche nello stesso momento.

I centri di depurazione devono garantire il rispetto delle buone pratiche di lavorazione mediante controllo da parte di un laureato in discipline mediche, biologiche o chimiche e devono provvedere ad effettuare i controlli analitici sulle caratteristiche igienico-sanitarie dei molluschi in un laboratorio annesso alla struttura o avvalendosi di un laboratorio esterno riconosciuto dal Ministero della Salute.

Successivamente nel Decreto del 31 luglio 1995 sono state pubblicate le metodiche di analisi per la determinazione nei molluschi bivalvi dei coliformi fecali, di *Escherichia coli*, delle salmonelle e delle biotossine algali.

Modalità di contaminazione

I molluschi sono, nella maggioranza dei casi, animali scavatori sessili o sedentari, che si nutrono di piccole particelle alimentari presenti nell'acqua o nei sedimenti mediante un meccanismo di filtrazione pressoché ininterrotto. A seconda delle dimensioni, della specie e della temperatura di stabulazione, i molluschi sono in grado di filtrare quantità variabili di acqua: un mitilo filtra a 14 °C circa 1,5 litri di acqua l'ora, l'ostrica europea ne filtra 12 a 15 °C, mentre quella americana supera i 18 litri se tenuta a 20 °C [8]. Durante questa intensa attività di filtrazione i molluschi trattengono nel loro organismo non solo il plancton necessario al loro metabolismo, ma anche batteri e virus eventualmente presenti nell'ambiente.

La normativa vigente sui molluschi, basandosi sul controllo di batteri fecali, non assicura che tali prodotti siano esenti da agenti patogeni. E' ormai, infatti, ampiamente documentato che la presenza di batteri indice di contaminazione fecale, non è correlata a quella di Vibrionaceae, che sono normalmente presenti nell'ambiente marino, né alla presenza di virus enterici. Questi ultimi, infatti, sebbene provenienti da contaminazioni fecali, risultano più resistenti dei batteri ai comuni trattamenti di bonifica delle acque di scarico e possono quindi ritrovarsi anche in acque prive di batteri fecali [9].

Le Vibrionaceae

La famiglia delle Vibrionaceae comprendeva fino ad alcuni anni or sono i generi *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas*. Con la trasformazione degli ultimi due gruppi in famiglie, le Vibrionaceae hanno continuato a racchiudere solo il genere *Vibrio* ed alcuni generi meno noti nell'ambito della microbiologia degli alimenti come *Catenococcus*, *Listonella*, *Moritella*, *Photobacter* e *Photobacterium* (NCBI Taxonomy browser). Attualmente più di 40 specie vengono riconosciute appartenere al genere *Vibrio* (a fronte delle 26 indicate nella prima edizione del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*) tutte isolate da o associate con l'ambiente acquatico.

Il genere *Vibrio*

Il genere *Vibrio* comprende bacilli Gram-negativi con dimensioni tra 0,5-0,8 µm in larghezza e 2-3 µm in lunghezza, a forma talvolta leggermente ricurva e

mobili per la presenza di un flagello polare monotrico o multitratico, racchiuso in un rivestimento continuo con la membrana esterna della parete cellulare. I vibrioni presentano metabolismo sia fermentativo che aerobio e non producono spore. Le specie appartenenti a questo genere, ad eccezione di *V. metschnikovii*, sono ossidasi-positive [10] e fermentano il glucosio, alcune con produzione di gas. La crescita della maggioranza dei vibrioni è stimolata dalla presenza di sodio e, per alcune specie, tale ione è indispensabile.

Molte specie di vibrioni sono parte della flora batterica acquatica autoctona e circa metà di essi è stata associata in modo più o meno definitivo con infezioni nell'uomo o in animali acquatici.

Alcune infezioni da vibrioni rivestono una certa importanza, poiché comprese fra quelle malattie che richiedono quarantena ed obbligo di notifica alla World Health Organization (es. *V. cholerae*), perché note per causare alta mortalità (es. *V. vulnificus*) o perché causa di un alto numero di tossinfezioni in alcuni Paesi (es. *V. parahaemolyticus* in Giappone). Oltre a queste, almeno altre nove specie sono riconosciute patogene per l'uomo (Tab. 1) [11, 12]. Fra queste *V. mimicus*, così chiamato per la sua somiglianza a *V. cholerae* O1, *V. alginolyticus* e *Photobacterium damsela* (precedentemente denominato *V. damsela*).

Vibrio cholerae

V. cholerae è diviso in sierogruppi in base all'antigene somatico O, un polisaccaride termostabile dello strato lipopolisaccaridico presente sulla superficie della cellula. Il sierogruppo O1 include i ceppi responsabili del colera epidemico ed è ulteriormente suddiviso in due biotipi: Classico, responsabile di sei pandemie verificatesi tra il 1817 e il 1923 ed El Tor, responsabile della settima pandemia che iniziò nel 1961 [13].

I ceppi appartenenti a sierogruppi diversi da O1 sono conosciuti come *V. cholerae* non-O1. Essi sono associati a casi sporadici di gastroenterite e lievi forme di malattia simili al colera e, fino a qualche anno fa, erano ritenuti incapaci di provocare colera epidemico. Tuttavia alcune epidemie di colera tipico sono state attribuite ad un sierogruppo emergente, il *V. cholerae* O139 (o *V. cholerae* Bengala). Dalla sua comparsa in India e Bangladesh nel 1992 si è diffuso talmente rapidamente da indurre alcuni ricercatori a parlare di un'ottava pandemia in corso.

Il colera è una diarrea secretoria che si manifesta per ingestione di acqua o cibo contaminato da *V. cholerae* O1 e O139, dopo un periodo di incubazione variabile tra le 12 e le 72 ore. Data la sensibilità del vibrione all'acidità gastrica la dose infettiva è piuttosto alta (circa 10⁸ batteri), però pazienti affetti da ipocloridria o problemi gastrici sono suscettibili a dosi infettanti

Tabella 1. - Vibrioni patogeni associati a patologie umane

Specie <i>Vibrio</i>	Sito di infezione						
	Tratto gastro-intestinale	Ferita	Orecchio	Setticemia primaria	Batteriemia	Polmone	Meningi
<i>V. cholerae</i> O1/O139	++	(+)	?	?	?	?	?
<i>V. cholerae</i> non-O1 / non-O139	++	+	+	(+)	(+)	?	(+)
<i>V. parahaemolyticus</i>	++	+	(+)	?	(+)	(+)	(+)
<i>V. vulnificus</i>	+	++	?	++	+	(+)	(+)
<i>V. fluvialis</i>	++	?	?	?	?	?	?
<i>V. alginolyticus</i>	?	++	+	?	(+)	?	?
<i>V. damsela</i>	?	++	?	?	?	?	?
<i>V. furnissii</i>	(+)	?	?	?	?	?	?
<i>V. hollisae</i>	++	?	?	(+)	?	?	?
<i>V. mimicus</i>	++	+	+	?	?	?	?
<i>V. metschnikovii</i>	(+)	?	?	(+)	?	?	?
<i>V. cincinnatiensis</i>	?	?	?	?	(+)	?	(+)
<i>V. carchariae</i>	?	++	?	?	?	?	?

++ più comune sito di infezione; + altri siti di infezione; (+) raro sito di infezione; ? da stabilire. Modificata da [11, 12].

inferiori (10^3 - 10^5 organismi) [14]. La simultanea ingestione di cibo inoltre può fornire ai batteri una barriera protettiva contro l'acidità gastrica, permettendo alle cellule sopravvissute di colonizzare le pareti dell'intestino tenue [15].

I fattori di virulenza principali di tali ceppi sono: l'enterotossina colerica (CT) e il pilo coregolato con la tossina (TCP), che media la colonizzazione dell'intestino tenue.

Vibrio parahaemolyticus

Il *V. parahaemolyticus* fa parte della flora batterica autoctona nell'ambiente marino costiero nelle regioni tropicali e temperate di tutto il mondo. La sua distribuzione e concentrazione in un certo luogo è influenzata da fattori ambientali (in particolare salinità dell'acqua e temperatura) e dalla sua interazione con forme di vita superiori dell'ambiente marino. Nelle regioni temperate l'andamento stagionale registra una proliferazione di tali batteri nei mesi estivi più caldi, mentre tali germi non sono rintracciabili durante i mesi invernali, quando la temperatura delle acque è inferiore a 20 °C.

Vista la scarsa correlazione di questi microrganismi con l'inquinamento fecale [16], la contaminazione dei prodotti della pesca freschi, es. crostacei, molluschi e pesce, è strettamente legata alla presenza naturale dei vibrioni nell'ambiente da cui i prodotti sono stati raccolti.

Le concentrazioni di *V. parahaemolyticus* nei prodotti della pesca sono generalmente inferiori a 10^3 c.f.u. per g, ma possono essere più alte quando la raccolta avviene da acque molto calde [17]. Tale even-

tualità, unita con i rapidi tempi di replicazione di questo microrganismo, risulta essere particolarmente pericolosa poiché permetterebbe di raggiungere rapidamente concentrazioni in grado di indurre malattia negli adulti sani, nei quali la dose infettante è superiore alle 10^5 unità [18].

Vibrio vulnificus

Il *V. vulnificus* è comunemente isolato dai molluschi. Si trova solitamente in concentrazione inferiore rispetto al *V. parahaemolyticus* ma il suo numero può raggiungere 10^5 cellule per g di mollusco, quando vengono raccolti da acque molto calde [19]. A differenza del *V. parahaemolyticus* sembra dimorare anche in acque fredde tanto che, in alcuni casi, è stato isolato nelle coste del Maine e della Nuova Scozia, nonché in acque costali dell'Olanda [6].

Le infezioni da *V. vulnificus* sono abbastanza sporadiche e sono solitamente associate al consumo di ostriche, mentre pesci e crostacei sembrano avere minore peso nella trasmissione dell'infezione. La dose infettante per questa specie però è, a differenza degli altri vibrioni, molto bassa (10^3 unità) specialmente in alcuni gruppi con patologie predisponenti (malattie epatiche, diabete, immunodepressione, tumori maligni) o con comportamenti a rischio (abuso di alcol) [20, 21]. I sintomi delle infezioni alimentari da *V. vulnificus* si manifestano principalmente al di fuori dell'intestino ed includono febbre, brividi e nausea piuttosto che gastroenterite. Il batterio, inoltre, causa setticemia e, in molti casi, lesioni cutanee, come vesciche e ulcere necrotizzanti, che si sviluppano nelle estremità e nel tronco [14]. Il periodo di incubazione

(in media 38 ore) è seguito da un rapido deterioramento delle condizioni del paziente fino, eventualmente, alla morte che occorre nel 40-60% dei casi [22] anche in presenza di terapie antibiotiche aggressive.

Sopravvivenza dei vibrioni nell'ambiente marino e fattori interferenti

I vibrioni, come altri batteri autoctoni ambientali, sono costretti a subire profonde e frequenti modificazioni dell'ambiente circostante, relative a vari fattori, quali temperatura, concentrazione dei nutrienti, salinità, pressione osmotica, pH, ecc. A tali cambiamenti i vibrioni reagiscono mediante una serie di adattamenti di carattere fisiologico e biochimico. Il più interessante di questi adattamenti è l'ingresso in una fase di quiescenza, durante la quale essi rimangono vitali ma diventano non coltivabili con i metodi tradizionali di isolamento. In tali condizioni i microrganismi, pur mantenendo intatta la loro patogenicità, subiscono diverse modificazioni morfologiche e fisiologiche:

- cambiano dimensione (si riducono da 15 a 300 volte); in queste condizioni quindi possono non essere trattenuti sulle membrane con pori da 0,45 µm comunemente utilizzate per filtrare le acque;
- modificano il proprio metabolismo riducendo il ritmo di respirazione e orientandosi verso vie metaboliche in grado di evitare i danni strutturali indotti da carenze di specifici nutrienti;
- arrestano i cicli di divisione.

I fattori che intervengono più direttamente sulla vitalità dei vibrioni sono la temperatura e la salinità. L'andamento stagionale dei vibrioni nell'ambiente, come pure l'incremento nei mesi estivi delle tossinfezioni prodotte dai vibrioni, sono stati ormai ampiamente documentati. In diversi studi è stato evidenziato come al di sopra di 17 °C la frequenza di isolamento di *V. cholerae* sia strettamente correlata alla temperatura, mentre l'isolamento di pressochè tutte le specie diventa piuttosto raro quando la temperatura scende al di sotto dei 10 °C.

Rispetto alla salinità i vibrioni hanno comportamento variabile: *V. cholerae* e *V. mimicus*, le cui principali riserve ambientali sono costituite dalle acque sia estuarine che fluviali, tollerano salinità comprese fra lo zero e il 3%, mentre altri vibrioni, tipici invece degli ambienti costieri (es. *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*), risentono maggiormente delle concentrazioni di Na⁺ e crescono più rapidamente con una salinità uguale o superiore al 3%.

Un altro fattore in grado di influenzare la sopravvivenza dei vibrioni nell'ambiente è il pH. I vibrioni sono infatti molto sensibili alle condizioni acide, anche se studi recenti hanno evidenziato come alcuni ceppi di *V. cholerae* (sia O1 che non-O1) producano una

matrice intercellulare che favorisce l'aggregazione dei batteri e fornisce protezione al microorganismo nei confronti di condizioni avverse. Anche l'associazione con zoo e fitoplancton (copepodi, alghe verdi, cianofite) e con macrofite (alghe brune) può permettere ai vibrioni una sopravvivenza più lunga rispetto alle cellule *free-living*.

Rilevamento di vibrioni nei molluschi

Si riportano a tale proposito i risultati ottenuti in alcuni studi condotti su molluschi allevati in mari italiani. Per quanto riguarda i batteri autoctoni è noto che tra questi è facile riscontrare batteri con caratteristiche di patogenicità. Ad esempio Cattabiani nel 1990 [23] isolò da mitili provenienti dal mare Adriatico il *V. vulnificus*. Un altro studio condotto in una zona compresa tra Pescara e Porto San Giorgio ha evidenziato che circa il 12% dei germi rinvenuti apparteneva al genere *Vibrio* [24]. Inoltre già dagli anni '70 erano stati isolati più volte da pesci pescati nel Golfo di Trieste ceppi di *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* che possono occasionalmente provocare patologie nell'uomo [25].

Più recentemente, un'indagine condotta presso i nostri laboratori nell'ambito del progetto Prisma sulla salvaguardia del Mare Adriatico ha evidenziato che su 726 ceppi isolati da molluschi il 46,86% apparteneva al genere *Vibrio*, il 29,75% al genere *Aeromonas*, mentre il rimanente 23,39% era costituito dai generi *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Agrobacterium* e *Ochrobacterium*. Tra i batteri appartenenti al genere *Vibrio* veniva riscontrato *V. alginolyticus* (67,95%) e specie patogene come *V. parahaemolyticus* (10%), *V. vulnificus* (10%) e *Photobacterium damsela* (10,88%). Tale rinvenimento subiva comunque delle differenziazioni a seconda della stagione; il rinvenimento di batteri del genere *Vibrio*, infatti, risultava particolarmente frequente nella stagione estiva, diminuiva in autunno ed in primavera mentre era piuttosto scarso nei mesi invernali [26]. La stagionalità degli isolamenti era probabilmente correlata all'ingresso nella già descritta fase di quiescenza che i vibrioni, analogamente ad altri autoctoni ambientali, effettuano in presenza di condizioni avverse.

Virus enterici

Sono conosciuti oltre 120 differenti tipi di virus enterici, suddivisi in diversi gruppi a seconda delle loro caratteristiche morfologiche, fisiche, chimiche ed antigeniche (Tab. 2).

Soltanto per alcuni, comunque, è stata epidemiologicamente provata la trasmissione in seguito al consumo di alimenti, anche se, potenzialmente, qualsiasi virus enterico, la cui ingestione è causa di malattia, può essere trasmesso mediante i cibi.

Tabella 2. - Principali virus enterici umani

Virus	n. di sierotipi conosciuti	Sintomatologia causata	
Enterovirus	Poliovirus	3	Meningite, paralisi, febbre
	Echovirus	32	Meningite, diarrea, rash, febbre, malattie respiratorie
	Coxsackievirus A	23	Meningite, erpagina, febbre, malattie respiratorie
	Coxsackievirus B	6	Miocarditi, anomalie cardiache congenite, pleurodinia, malattie respiratorie, febbre, rash, meningite
	Nuovi enterovirus (tipi 68-71)	> 4	Meningiti, encefaliti, congiuntivite acuta emorragica, febbre, malattie respiratorie
Calicivirus	Epatite A (enterovirus 72?)	1	Epatite infettiva
	Rotavirus	6	Diarrea, sintomi respiratori
	Adenovirus	47	Febbre, sintomi respiratori, congiuntiviti, diarrea
	Reovirus	3	Non chiaramente stabilito
	Norwalk-like(*)	2	Diarrea, vomito, febbre
	Sapporo-like(**)	?	Diarrea, vomito, età pediatrica
	Epatite	1	Epatite
	Astrovirus e altri piccoli virus a struttura rotondeggiante (SRSVs)	5+7	Gastroenteriti
	Coronavirus e altri possibili virus (torovirus, picobirnavirus, parvovirus, ecc.)	?	?

(*) Anche conosciuti come *small round structured viruses* o SRSV; (**) anche definiti come *calicivirus tipici*.

Modalità di infezione

I virus passano da ospite a ospite sotto forma di particelle inerti, che si presentano irregolarmente sferiche con un diametro che varia da 25-35 nm (Picornavirus come il virus dell'epatite A, e Calicivirus come i Norwalk-like virus), a 75 nm (Rotavirus).

I virus più piccoli trasmessi con gli alimenti contengono una singola catena di RNA, mentre i Rotavirus sono a doppia catena. Sono conosciuti anche virus enterici a DNA ma per nessuno di essi è stata provata la trasmissione attraverso alimenti o acqua.

La superficie esterna dei virus è costituita da un rivestimento proteico altamente specifico che protegge l'RNA e funge da antigene contro cui si attiva la risposta immunitaria dell'ospite. Essendo particelle inerti, non si riproducono al di fuori dell'ospite e quindi, a differenza dei batteri, non si moltiplicano né producono tossine negli alimenti, ma possono essere semplicemente veicolati da questi nel momento dell'ingestione. In base all'interazione tra il rivestimento proteico e i recettori della cellula ospite i virus presentano specificità relativamente alla specie di ospite e ai tessuti che possono infettare, perciò virus di origine non umana, eventualmente presenti negli alimenti, sono raramente un pericolo per la salute dell'uomo [27].

L'efficienza con cui i virus ingeriti infettano non è ben nota. E' stato riferito che dosi minime, fino ad una singola unità infettante le culture cellulari, hanno

prodotto infezione per via orale, ma alcuni studi hanno evidenziato effetto solo in presenza di dosi considerevolmente maggiori (il vaccino di Sabin, ad esempio, è somministrato a livelli di almeno 100 000 dosi infettanti per assicurare una risposta del 90%). Evidenze epidemiologiche, comunque, indicano per molti virus enterici una dose infettante molto bassa, dell'ordine di 10-100 unità virali [28]. E' noto tuttavia che la sola presenza dell'agente patogeno non è condizione sufficiente a determinare la malattia, che dipende da una serie di fattori quali la virulenza dell'agente eziologico, le condizioni ambientali, biologiche, sociali e fisiche dell'ospite.

Dopo essere stati ingeriti con gli alimenti i virus iniziano l'infezione a livello dei tessuti dell'intestino tenue. Nella maggior parte dei casi essi si replicano a livello della mucosa intestinale, vengono liberati probabilmente insieme alle cellule infettate nel lume intestinale e passano attraverso il colon con il chimo. Alcuni virus liberati durante la fase intestinale dell'infezione possono essere trasportati tramite il sistema linfatico ed il sangue ad altri organi, provocando infezioni secondarie (poliomielite, miocarditi, ecc.). Durante la malattia i virus vengono eliminati con le feci in gran quantità (10⁸-10¹⁰ virus/g). E' evidente quindi che una piccola frazione di g di feci può contenere abbastanza virus da indurre la malattia nell'uomo e, per tale motivo, è estremamente importante osservare tutte le norme igieniche necessarie ad evitare la contaminazione dei cibi.

Sopravvivenza nell'ambiente e contaminazione dei molluschi

I virus enterici eliminati con le feci degli individui infetti, attraverso gli scarichi, arrivano alle acque superficiali. Tali virus sono di norma più resistenti dei batteri ai comuni trattamenti di bonifica (compresa la clorazione) ed è stato dimostrato che possono sopravvivere fino a 130 giorni in acqua di mare, cioè per periodi più estesi rispetto ai batteri, come i coliformi, che vengono utilizzati come indicatori di contaminazione fecale dell'acqua e dei molluschi [29]. Inoltre molti fattori possono influenzare la sopravvivenza di tali virus: la temperatura, la salinità, l'antagonismo microbico, le radiazioni solari e l'associazione con particelle solide del plancton, che svolgono un'azione protettiva [30]. Di tutti questi fattori la temperatura è probabilmente il più importante. È noto, ad esempio, che molti virus enterici possono sopravvivere anche per parecchi mesi a temperature inferiori a 10 °C. I sedimenti marini, inoltre, costituiscono il reale reservoir dei virus e li proteggono dall'azione inattivante di temperatura, pH e UV, dall'antagonismo microbico ed anche dall'azione dei disinfettanti.

I virus, una volta arrivati nei molluschi, vengono trattenuti per diversi giorni, anche se questi vengono posti in acque di stabulazione pulite ed è stato dimostrato che permangono anche dopo che i molluschi hanno rilasciato i batteri indici di contaminazione fecale.

La legge che regola la commercializzazione dei molluschi (DL.vo 530/92), come già riportato, basa il giudizio di idoneità microbiologica al consumo di tali prodotti solo sulla determinazione di parametri batteriologici (salmonelle ed *E. coli*) data la mancanza di metodi per la ricerca dei virus da utilizzare routinariamente. È però ormai ampiamente documentato il fatto che la presenza di virus non è sempre correlata alla presenza di batteri di origine fecale [31]. Di contro, alcuni autori hanno dimostrato che in acque fortemente contaminate da germi, in particolare Gram-negativi, il reperimento di virus è molto scarso, forse a causa dell'azione inattivante di metaboliti batterici. Pertanto, dal punto di vista di una contaminazione virale, mitili stabulati in acque batteriologicamente pulite potrebbero essere più pericolosi.

Sopravvivenza negli alimenti sottoposti a trattamenti di conservazione o inattivazione

I virus enterici, una volta arrivati negli alimenti, possono sopravvivere per periodi più o meno lunghi anche se questi vengono sottoposti a trattamenti di conservazione. Ad esempio il congelamento di frutti di mare consente la sopravvivenza dei virus enterici e dell'HAV per settimane o addirittura mesi; nel 1980,

infatti, in USA si verificò un episodio di gastroenterite da Norwalk virus, causato da mitili che erano stati congelati per 15 settimane prima del consumo. Alcuni autori hanno dimostrato che i poliovirus sopravvivono per 30-90 giorni in ostriche congelate e oltre 300 giorni in gamberetti sgusciati mantenuti a -20 °C [32].

Alcuni trattamenti di bonifica, come il riscaldamento (al di sopra di 70 °C) e l'irraggiamento, provocando una denaturazione delle proteine del capsido e/o una frammentazione dell'acido nucleico, sono in grado di inattivare i virus presenti.

Il trattamento più vantaggioso rimane tuttora quello termico, anche se spesso gli stessi componenti degli alimenti (ad esempio l'ambiente proteico) possono proteggere i virus dall'effetto della temperatura. Da alcuni studi risulta, ad esempio, che i molluschi forniscono una buona protezione verso il trattamento termico: il 7-13% di poliovirus aggiunto, infatti, sopravvive in ostriche sottoposte a vari metodi di cottura (al forno, in umido, a vapore, friggitura). Prove sperimentali da noi condotte hanno confermato il ruolo protettivo svolto dai tessuti dei molluschi su HAV. È stato evidenziato infatti che nell'omogenato di mollusco trattato a 80 °C occorre prolungare i tempi di trattamento (oltre 15 min) per inattivare una determinata quantità di virus, a fronte di tempi nettamente più brevi (3 min) per ottenere l'inattivazione nella sospensione virale. Inoltre, alcuni autori hanno dimostrato che temperature di 85-90 °C all'interno del mollusco per 1 min sono sufficienti ad inattivare completamente il virus presente [33]. I dati da noi ottenuti dimostrano che, dopo immersione in bagnomaria a 100 °C per 1 min, il virus presente in un omogenato di mollusco si riduce, ma è ancora quantitativamente determinabile (da 10⁵ TCID₅₀/ml a 10² TCID₅₀/ml). Infatti, poiché la temperatura interna raggiunge gli 85 °C dopo 30 s ed i 90 °C dopo un min, solo mantenendo il campione in immersione per altri 60 s il virus risulta completamente inattivato [34]. Considerando che per alcune preparazioni domestiche i molluschi si ritengono cotti all'apertura delle valve e che essa può avvenire nella cottura a vapore ad una temperatura inferiore a 70 °C dopo 47±5 secondi [35], risulta evidente come tale trattamento non sia assolutamente sufficiente a rendere salubri molluschi contaminati. Durante i procedimenti di cottura, quindi, pur preservando la gustosità del prodotto, è consigliabile porre particolare attenzione ai tempi e alle temperature, le quali devono essere raggiunte anche al cuore del prodotto dove nei primi minuti di trattamento si registra una temperatura mediamente di 7-8 °C inferiore a quella esterna.

Efficacia dei processi di depurazione

La normativa stabilisce che tutti i molluschi non classificati idonei al consumo diretto, ovvero quelli provenienti dalle zone B e C, siano sottoposti a depurazione.

Attualmente i metodi di disinfezione delle acque destinate alla depurazione dei molluschi si basano sulla utilizzazione di particolari agenti chimici, quali cloro, iodofori ed ozono o agenti fisici quali UV e filtrazione.

La depurazione con il cloro è stato il primo procedimento usato e sebbene sia efficace nel ridurre la contaminazione batterica non risulta altrettanto efficace nei confronti dei virus enterici. Inoltre il cloro, anche a bassi livelli di concentrazione, può influenzare l'attività di filtrazione dei molluschi e quindi il cloro residuo nell'acqua deve essere abbattuto mediante tiosolfato e aereazione prima che l'acqua venga immessa nelle vasche di depurazione.

Gli iodofori vengono utilizzati a concentrazioni che vanno da 0,1 a 0,4 mg/l; essi non hanno alcun apparente effetto sulla attività dei molluschi e sulle loro caratteristiche di edibilità, riducono in breve tempo la quantità di batteri presenti, ma non sono efficaci nei confronti dei virus enterici se non a concentrazioni che danneggiano i molluschi stessi (l' HAV viene inattivato a concentrazioni di iodio attivo superiori a 100 ppm).

Un altro processo di disinfezione si basa sull'impiego dei raggi UV: questo sistema è capace di distruggere i microrganismi quando questi vengano a stretto contatto con la luce e si è dimostrato efficace nei confronti sia di batteri che di virus. Inoltre, a differenza degli altri metodi, non lascia residui e non influenza i processi fisiologici dei molluschi. E' un metodo molto utilizzato negli USA, ma necessita di un'acqua poco torbida, di un flusso a strato sottile e di lampade sempre efficienti. Il sistema deve essere regolarmente pulito per permettere una buona penetrazione della luce UV, pena la perdita di efficacia della disinfezione. Proprio per queste ragioni questo metodo comporta costi di esercizio molto elevati.

L'utilizzo della disinfezione mediante ozonizzazione ha avuto un incremento negli ultimi anni anche nel nostro Paese. L'ozono agisce sui batteri con azione combinata di ossidazione delle proteine, alterazione delle strutture molecolari (aggredisce in particolare i gruppi SH) e blocco enzimatico. I virus sono soggetti allo stesso processo di eliminazione dei batteri, con la differenza che l'ossidazione delle loro proteine avviene più facilmente in quanto privi di membrana cellulare.

Una volta depurata, l'acqua viene immessa in apposite vasche dove vengono posti a stabulare i mitili che, mediante un meccanismo di rilascio riescono a purificarsi dei microrganismi accumulati.

I tempi di depurazione (48 h) attualmente in uso si basano comunque su parametri batteriologici, ma è stato ormai più volte provato che i tempi di rilascio dei virus sono più lunghi di quelli necessari per i batteri coliformi o altri batteri patogeni; è stato inoltre dimostrato che il virus dell'epatite A viene eliminato più difficilmente rispetto agli altri Enterovirus [36]. Già da

alcuni anni nel nostro laboratorio è stata affrontata la problematica, conducendo prove su molluschi sperimentalmente contaminati con poliovirus ed HAV. Campioni di molluschi venivano posti contemporaneamente sia in acqua non trattata che in acqua trattata con ozono, effettuando dei prelievi a tempi stabiliti fino alle 72 h. I molluschi posti in acqua ozonizzata presentavano un rapido decremento del virus nelle prime ore di trattamento; la velocità di rilascio, però, rallentava notevolmente nelle ore successive e dopo 72 h di trattamento era ancora possibile evidenziare una significativa quantità di virus (poliovirus $10^{1.5}$ TCID₅₀/ml; HAV 10 TCID₅₀/ml) [37]. Al contrario, prove effettuate contaminando i campioni con *E. coli*, germe utilizzato come indice di contaminazione fecale, hanno dimostrato che poche ore di trattamento sono sufficienti ad eliminare la contaminazione [38], confermando che tale germe non è un parametro sufficiente a garantire l'assenza di virus nei molluschi e quindi la mancanza di rischio per il consumatore.

Altri studi sono stati condotti sulla depurazione dei molluschi, con l'utilizzo di vasche di nuova concezione nelle quali è possibile regolare e mantenere costanti parametri come salinità e temperatura. Tali parametri, infatti, sono particolarmente importanti per il metabolismo dei molluschi e per ogni specie esistono delle condizioni ottimali, tali da rendere più veloce ed efficace il meccanismo di rilascio dei virus da parte del mollusco. In tali condizioni le nostre prove hanno mostrato, nelle prime 48 h di trattamento, un rapido decremento della concentrazione di HAV da 10^4 TCID₅₀/ml fino ad una quantità inferiore al limite di rilevabilità del metodo quantitativo su cellule (< 10 TCID₅₀/ml). Il virus, però, evidenziato mediante RT-nested-PCR, rimane ancora presente anche in campioni mantenuti in depurazione per 120 h [39].

Prove analoghe condotte con batteri del genere *Vibrio*, in particolare *V. cholerae* O1 e *V. parahaemolyticus*, hanno ugualmente dimostrato la scarsa efficacia dei sistemi di depurazione anche su questi microrganismi. E' emerso, infatti, che sia *V. cholerae* O1 che *V. parahaemolyticus* presentano un comportamento differente rispetto a *Escherichia coli*. In particolare, nel corso del trattamento in acqua ozonizzata di 44 ore si ottiene un abbattimento della concentrazione iniziale che per *E. coli* risulta pari ad un fattore 1000, mentre per i due vibrii suddetti è pari ad un fattore 10 [40]. Nella realtà un rapido rilascio dei batteri coliformi può determinare, dopo poche ore di trattamento (5 ore), il raggiungimento dei limiti batteriologici imposti per legge e quindi consente agli stabilimenti di depurazione dei molluschi di utilizzare tempi brevi, economicamente più vantaggiosi. Tali trattamenti di ridotta durata, però, condotti su molluschi con un'alta concentrazione di partenza di vibrii (ad es. molluschi

raccolti da acque molto calde), indurrebbero una riduzione di questi ultimi non sempre sufficiente a garantire la sicurezza di quelle fasce di consumatori a rischio, suscettibili anche a dosi infettanti inferiori alla norma. Inoltre, in caso di conservazione poco idonea, si potrebbero determinare condizioni particolarmente favorevoli alla proliferazione dei vibrioni presenti, vista la diminuzione di microflora competitiva.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 22 ottobre 2002.

BIBLIOGRAFIA

- Shewan JM. The microbiology of sea-water fish. In: Borgstrom G (Ed.). *Fish as food*. New York & London: Academic Press; 1961.
- Orefice L. Contaminazione microbiologica dei prodotti ittici. In: Stacchini A (Ed.). *Contaminazione chimica e biologica dei prodotti della pesca*. Roma, Istituto Superiore di Sanità; 1997. (Rapporti Istituzionali, 97/5). p. 22-36.
- Lipp EK, Rose JB. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Rev Sci Tech* 1997;16:620-40.
- Baine W, Mazzotti M, Pocchiari F et al. Epidemiology of cholera in Italy in 1973. *Lancet* 1974;2(7893):1370-4.
- Maggi P, Carbonara S, Fico C et al. Epidemiological, clinical and therapeutic evaluation of the Italian cholera epidemic in 1994. *Eur J Epidemiol* 1997;13:95-7.
- Greco D, Luzzi I, Sallabanda A et al. Cholera in the Mediterranean: outbreak in Albania. *Eurosurveillance*, settembre 1995; 1-2.
- Mele A, Mazzolini A, Tosti ME, Ciccozzi M, Stroffolini T. SEIEVA - Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta. Rapporto 1995-1996. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1997. (Rapporti Istituzionali, 97/36).
- Richards GP. Microbial purification of shellfish. *J Food Prot* 1988;51:218-51.
- Goyal SM, Adams WN, O'Malley ML, Lear DW. Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the middle Atlantic region. *Appl Environ Microbiol* 1984;48:758.
- Murray PR (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. Washington DC: ASM Press; 1995.
- West PA. The human pathogenic Vibrios. A public health update with environmental perspectives. *Epidemiol Infect* 1989;103:1-34.
- Oliver JD, Kaper JB. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. (Ed.). *Vibrio species*. Food microbiology. Fundamentals and frontiers. Washington DC: ASM Press; 1997. p. 228-64.
- Barua D, Greenough WB. *Cholera*. New York: Plenum Medical Book Company; 1992.
- Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA, Tenover FC, White
- Koh EGL, Huyn JH, LaRock PA. Pertinence of indicator organisms and sampling variables to *Vibrio* concentrations. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:3897-900.
- De Paola A, Hopkins LH, Peeler JT et al. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U. coastal waters and oysters. *Appl Environ Microb* 1990;56:2299-302.
- Cliver DO. *Foodborne diseases*. San Diego: Academic Press; 1990.
- Desmachelier PM. *Vibrio*, introduction, including *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. In: Robinson RK (Ed.). *Encyclopedia of food microbiology*. London: Academic Press; 2000. p. 2237-57.
- Chart H, Griffiths E. The availability of iron and the growth of *Vibrio cholerae* in the sera of patients with haemochromatosis. *FEMS Microbiol Lett* 1985;26:2227-31.
- Johnson JM, McFarland LM. *Vibrio vulnificus*: man and the sea. *J Am Med Assoc* 1985;253:2580-3.
- Varnam AH, Evans MG. *Foodborne pathogens*. London: Wolfe Publishing Ltd; 1991.
- Cattabiani F, Freschi E. Primo isolamento di *V. vulnificus* (biotipo 1) da mitili provenienti da allevamenti del mare Adriatico. *Arch Vet Ital* 1990;41:83-91.
- Gianelli F, Cabassi E, Ciani G, Freschi E. Distribuzione qualitativa dei batteri organotrofi del mare Adriatico. *Vet Ital* 1971;XXII:606-2.
- Babudieri B, Rottini GD, Schreiber F. Primo isolamento di vibrioni alofili, sierologicamente correlati a *V. parahaemolyticus*, da pesci del golfo di Trieste. *Boll Ist Sierot Mil* 1971;50:403-8.
- Croci L, Serratore P, Cozzi L, Stacchini AI, Milandri S, Suffredini E, Toti L. Detection of Vibrionaceae in mussels and their sea water growing area. *Lett Appl Microbiol* 2001;32:57-61.
- Cliver DO. Virus transmission via foods. *Food Technol* 1988; 241-8.
- Iverson WD, Gill M, Bartlett CLR, Cubitt WD, Mc Swigga DA. Two outbreaks of foodborne gastroenteritis caused by a small round structured virus; evidence of prolonged infectivity in a food handler. *Lancet* 1987;8558:556-8.
- Melnick JL, Gerba CP. The ecology of enteroviruses in natural waters. *CRC Crit Rev Environ Control* 1980;10:65.
- Sobsey MD, Dean CH, Kunckles ME, Wagner RA. Interaction on survival of enteric viruses in soil material. *Appl Environ Microbiol* 1980;40:92-101.
- Douglas AW, Hackeney CR, Carrick RJ, Lovelace G, Sobsey MD. Enteric bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in hard shell clams. *J Food Prot* 1983;46:493-6.
- Di Girolamo R, Liston J, Matches JR. Survival of virus in chilled, frozen and processed oyster. *Appl Microbiol* 1970;20:58-63.
- Millard J, Appleton H, Parry JV. Studies on heat inactivation of hepatitis A virus with special reference to shellfish. *Epidemiol Infect* 1987;98:397-414.

34. Croci L, Ciccozzi M, De Medici D, Di Pasquale S, Fiore A, Mele A, Toti L. Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. *J Appl Microbiol* 1999;87:884-8.
35. Koff RS, Sear HS. Internal temperature of steamed clams. *N Engl J Med* 1967;276:737-9.
36. Sobsey MD, Davis AL, Rullman VA. Persistence of hepatitis A virus and other viruses in depurated Easter oysters. *Proc Oceans* 1987;5:1740-5.
37. Croci L, De Medici D, Gabrieli R, Franco E, Di Pasquale S, Toti L. Effectiveness of water disinfection treatment on depuration of shellfish. *Microb Alim Nutr* 1992;10:229-32.
38. Franco E, Toti L, Gabrieli R, Croci L, De Medici D, Panà A. Depuration of *Mytilus galloprovincialis* experimentally contaminated with hepatitis A virus. *Int J Food Microbiol* 1990; 11:321-8.
39. De Medici D, Ciccozzi M, Fiore A, Di Pasquale S, Parlato A, Ricci-Bitti P, Croci L. Closed-circuit system for the depuration of mussels experimentally contaminated with hepatitis A virus. *J Food Prot* 2001;64:887-90.
40. Croci L, Suffredini E, Cozzi L, Toti L. Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *E. coli*, *V. cholerae* O1 and *V. parahaemolyticus*. *J Appl Microbiol* 2002; 92:460-5.