

# Il controllo delle aree di produzione dei molluschi verso un approccio early warning system

**Paola Bordin<sup>1</sup>, Giuseppe Arcangeli<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>SCS1 Analisi del rischio e sorveglianza in sanità pubblica*

*<sup>2</sup> Centro Specialistico Ittico*

---

WorkShop "Progetto CADEAU. Prodotti e servizi da Marine Copernicus a supporto delle Direttive Europee per l'ambiente costiero . Tecnici e stakeholder a confronto"

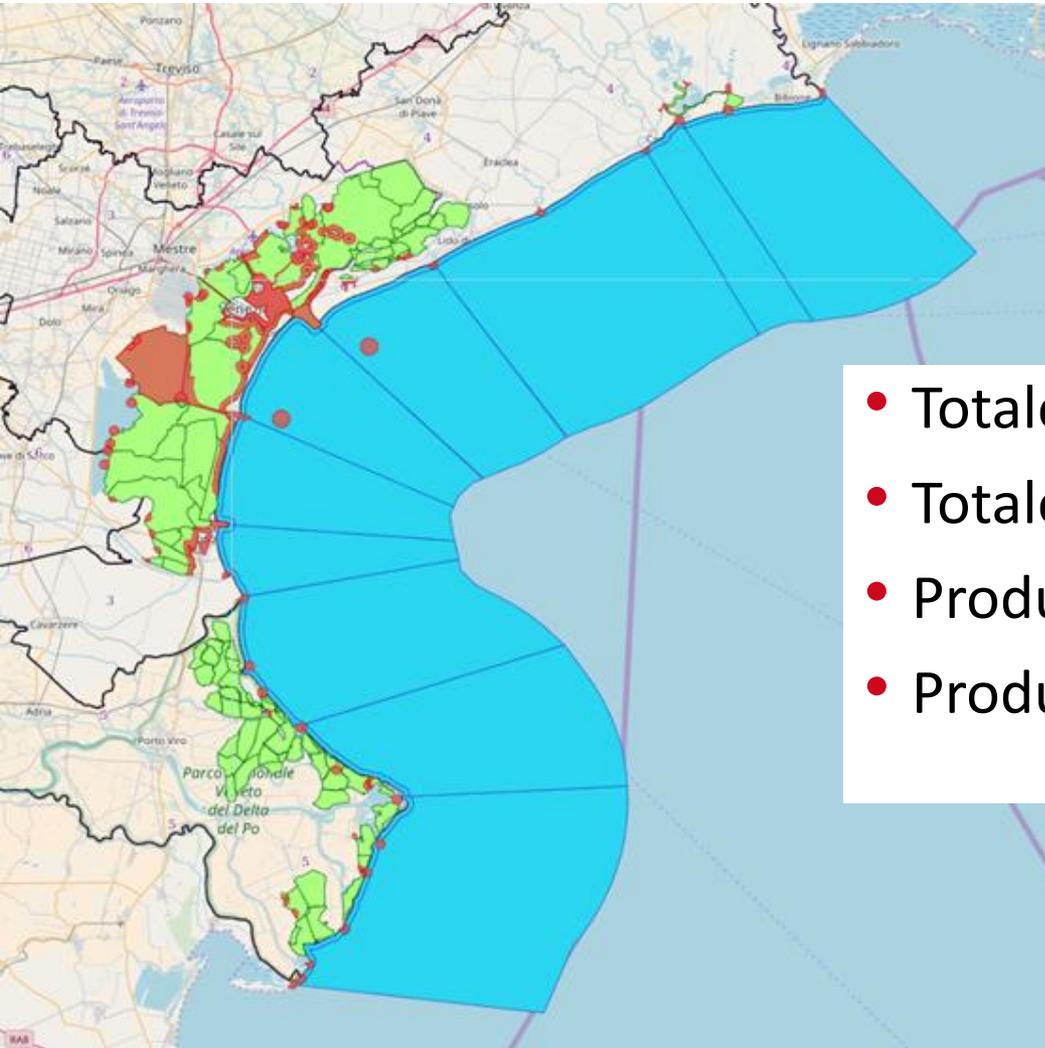
Venezia, 5 giugno 2018



- L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve) è un ente sanitario pubblico che svolge attività di prevenzione, ricerca e servizi negli ambiti della **salute animale** e della **sicurezza alimentare**.
- L'attività è di supporto per il Ministero della Salute, le Regioni e le Province Autonome, le Aziende Sanitarie Locali, i veterinari liberi professionisti, gli operatori del settore zootecnico, le aziende alimentari, i cittadini.
- E' inoltre **centro di riferimento** nazionale ed internazionale su specifiche tematiche per il Ministero della Salute, l'Organizzazione mondiale per la sanità animale (OIE) e l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO).



# ● La molluschicoltura nella Regione Veneto



- Totale allevamenti: ~ 500
- Totale zone classificate: ~ 60
- Produzione mitili: ~ 10000 t/anno
- Produzione vongole: ~ 15000 t/anno



# ● Classificazione e monitoraggio delle zone di produzione e stabulazione dei MBV (Reg.CE 854/2004 ed aggiornamenti\*)

## Le analisi **effettuate sui molluschi** sono:

- *Escherichia coli*
- *Salmonella* spp.
- Biotossine DSP, PSP e ASP
- Contaminanti chimici (Pb, Cd, Hg, Diossine e PCB, IPA; Reg. (CE) 1881/2006)

## Le analisi **effettuate sulle acque**, sono:

- Identificazione e quantificazione del fitoplancton tossico nella colonna d'acqua

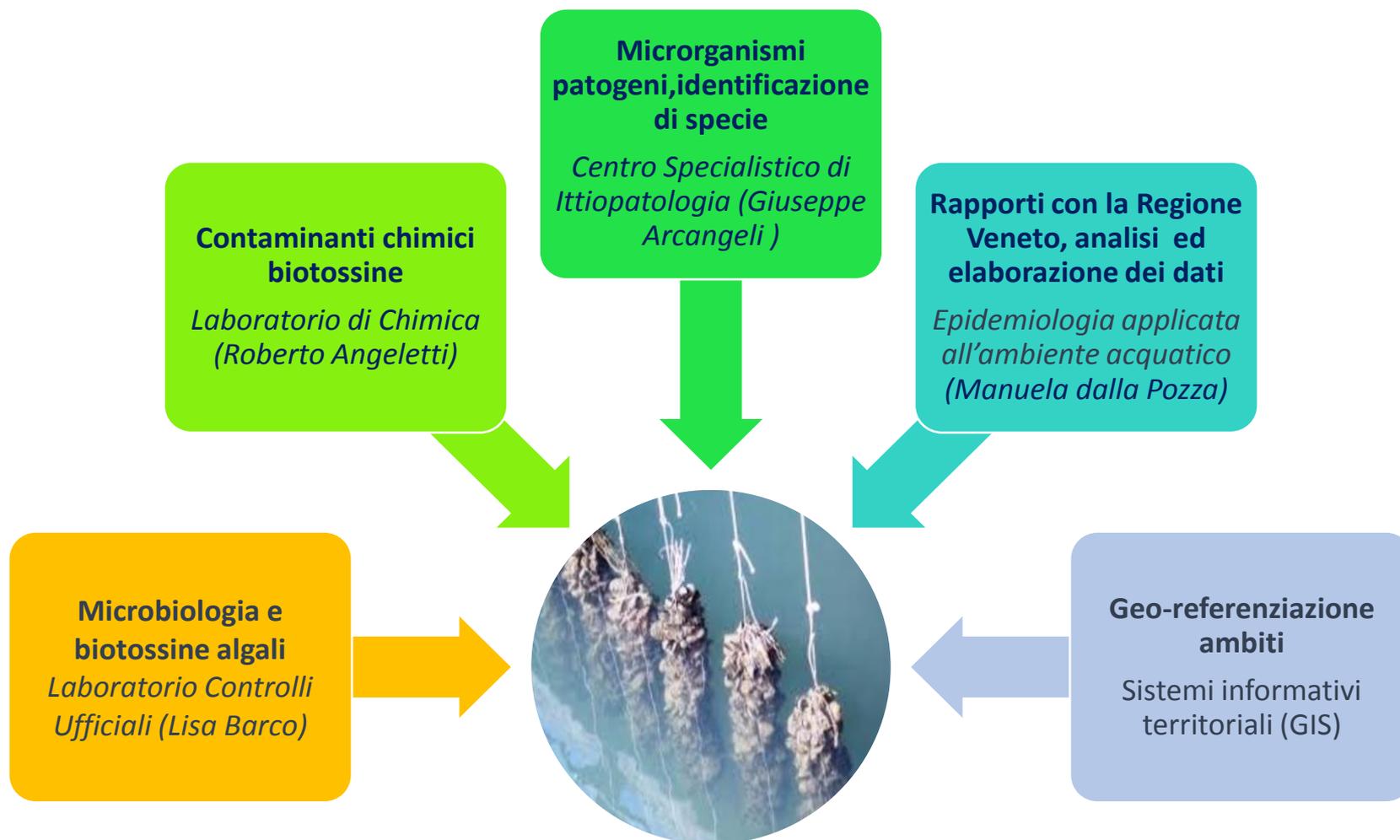
*Campionamento eseguito in concomitanza con quello di molluschi (retino e "tubo"), nell'allevamento*

*Frequenza settimanale*

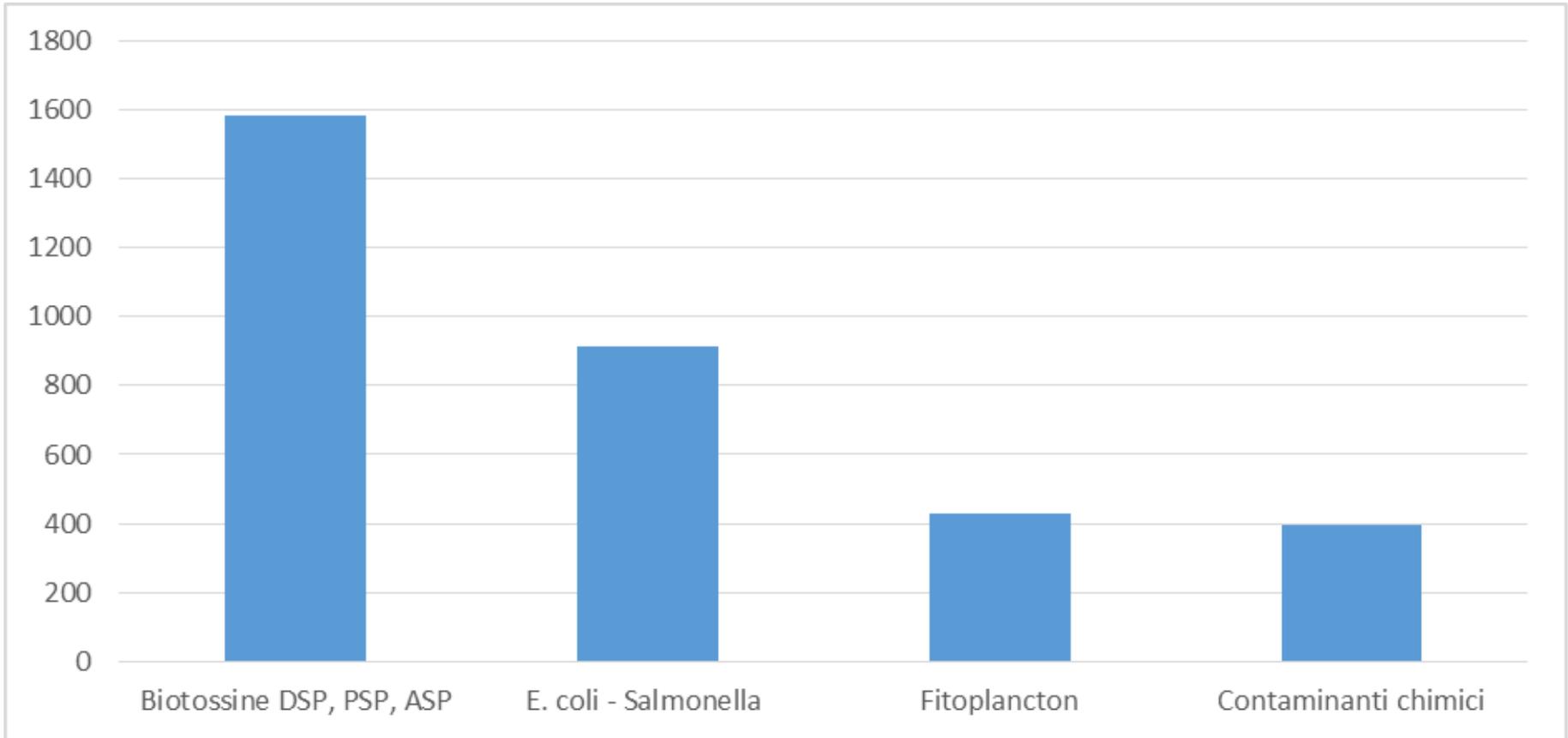
*n. cell/L, linea di tendenza, valori di allerta CEFAS, IPMA, IOC, IOC Taxonomic Reference List of Toxic Plankton Algae, Norma EN 15204:2006)*

\***DGRV N. 870** del 21 giugno 2011 recate "Linee guida per l'applicazione del Regolamento (CE) 854/2004 e del Regolamento (CE) 853/2004 nel settore dei molluschi bivalvi, che **integra\*** il quadro dei controlli sui molluschi ai fini della sicurezza alimentare.

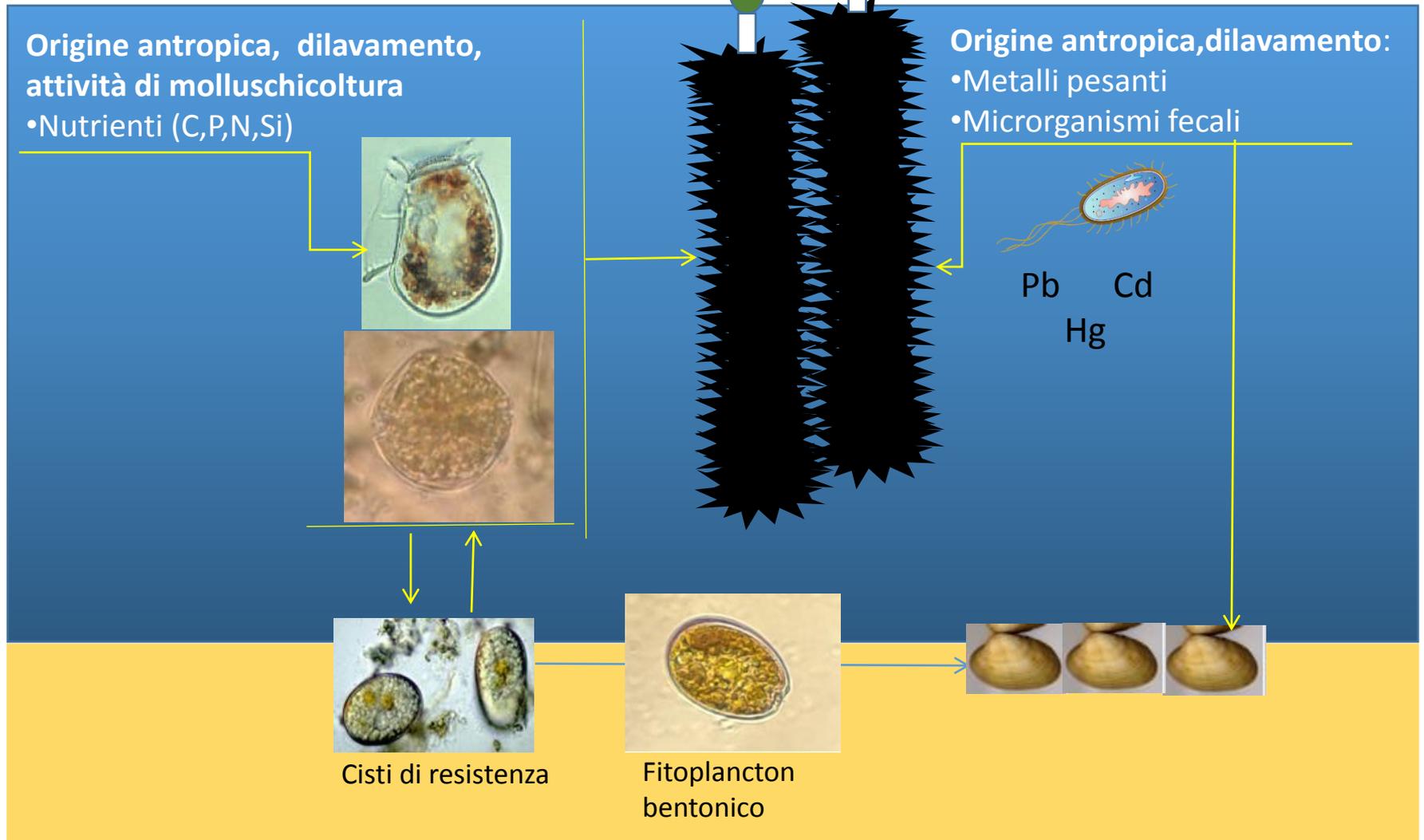
# I laboratori IZSVe a favore del monitoraggio e della sicurezza alimentare dei molluschi



# Stima delle analisi per il monitoraggio dei molluschi (dati IZSVe 2017)



# ● Origine dei rischi biologici e chimici dei molluschi



***Biotossine: composti chimici di varia natura, termoresistenti, che possono creare nell'uomo sindromi di tipo gastrointestinale e neurologico anche molto gravi, a seguito di ingestione di molluschi contaminati. Sono prevalentemente prodotte dal fitoplancton***

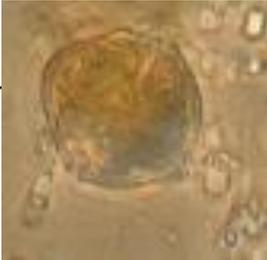
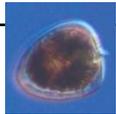
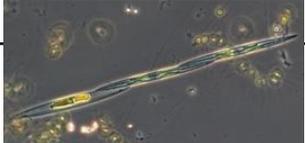
# Biotossine e fitoplancton produttore presenti in Alto Adriatico



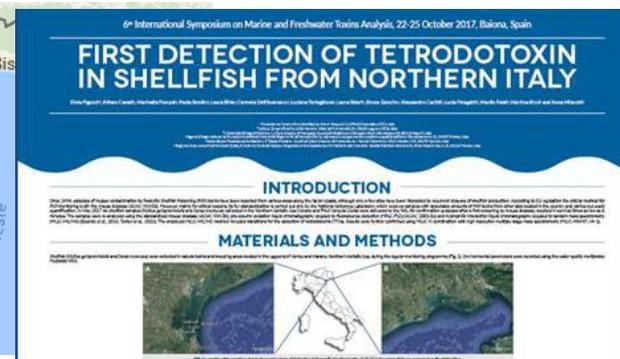
Toxins and their effects on the environment	Chemical affinity	Causative species	Biological effects	References
Saxitoxins and saxitoxin derivatives, heterocyclic guanidines, about 20 naturally occurring derivative are known, causing <b>PSP</b>	Alcaloids	<i>Alexandrium</i> spp., <i>Gymnodinium catenatum</i> , <i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i> <i>Trichodesmium</i> spp	Neurotoxic, block the Na <sup>+</sup> channels of neuronal and muscular cells, preventing depolarisation and propagation of the action potential	Shimizu (2000) Long & Carmichael (2004)
Domoic acids (DA), 10 congeners, causing <b>ASP</b>	Amino acids	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp, <i>Nitzschia navis-varingica</i> , <i>Amphora coffeaeformis</i>  <i>P. N. australis</i>	Both neurological and gastrointestinal effects, strong glutamate agonist	Bates (1998), Skov <i>et al.</i> (1999), Nijjar & Nijjar (2000), Van Dolah (2000), Quilliam (2004a)
Azaspirazids, 3 congeners, causing <b>AZP</b>	Polyether compounds	<i>Azadinium spinosum</i>	Neurotoxic symptoms with slow pro-gressive paralysis in mice, DSP-like symptoms in humans	Tillmann <i>et al.</i> 2009, Satake <i>et al.</i> (1998), Ito <i>et al.</i> (2001), James <i>et al.</i> (2001), Quilliam (2004b)
Brevetoxins, 2 groups of toxins with 10 naturally occurring analogues, causing fish kills and <b>NSP</b>	Polyether compounds	<i>Karenia brevis</i> , <i>Chattonella</i> spp.	Neurotoxic, bind to the Na <sup>+</sup> -channel resulting in persistent activation of nerve cells; some toxin analogues with haemolytic effects	Baden & Adams (2000), Quilliam (2004b)
Ciguatoxins (CTX), more than 20 analogues are known, main cause of <b>CFP</b>	Polyether compounds	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Complex neurotoxic effects primarily due to activation of the Na <sup>+</sup> -channel of cell membranes	Wright & Cembella (1998), Lewis <i>et al.</i> (2000), Lewis (2004)
Cooliatoxin	Polyether compounds	<i>Coolia monotis</i>	Neurological effects, blocking of unmyelinated nerves, causing acute respiratory distress in mice	Holmes <i>et al.</i> (1995), James <i>et al.</i> (2001)
Galacto-lipids, fatty acids	Polyether compounds	<i>Amphidinium carterae</i> , <i>A. operculatum</i> , <i>Karenia mikimotoi</i> , <i>Chrysochromulina polylepis</i>	Haemolytic, ichthyotoxic	Yasumoto <i>et al.</i> (1990)
Gymnodimine	Polyether compounds	<i>Karenia mikimotoi</i> , <i>Gymnodinium</i> spp. ?	'Fast-acting toxin' which is toxic to mice, ichthyotoxic	Wright & Cembella (1998), James <i>et al.</i> (2001)
Maitotoxins (MTX), 3 congeners, implicated in <b>CFP</b>	Polyether compounds	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Neurotoxic affecting Ca <sup>2+</sup> influx, the precise mechanism of action unknown	Legrand (1998), Estacion (2000), Van Dolah (2000),

Okadaic acid (OA), dinophysis toxins (DTX-1 and DTX-2), at least 8 congeners but some are believed to be precursors or shellfish metabolites, causing <b>DSP</b>	Polyether compounds	<i>Dinophysis</i> spp,  <i>Prorocentrum lima</i> <i>Prorocentrum mexicanum</i>	Inhibitors of protein phosphatase enzymes, OA presumably a tumor promotor	Rossini (2000), Van Dolah (2000)
Palytoxins	Polyether compounds	<i>Ostreopsis lenticularis</i> , <i>O. siamensis</i>  <i>O.ovata</i>	Depolarising cell membranes affecting both cardiac, smooth, and skeletal muscles, and myelinated nerves, cytotoxic	Wright & Cembella (1998), Tosteson (2000)
Pectinotoxins, 10 analogues are known	Polyether compounds	<i>Dinophysis</i> spp.	Non-diarrhetic, hepatotoxic	Draisci <i>et al.</i> (2000)
Prorocentrolide, 2 analogues	Polyether compounds	<i>Prorocentrum lima</i> , <i>P. maculosum</i>	Fast-acting toxins ,	Wright & Cembella (1998), James <i>et al.</i> (2001)
Prymnesins	Polyether compounds	<i>Prymnesium parvum</i>	Haemolytic, ichthyotoxic	Igarishi <i>et al.</i> (1996), Wright & Cembella (1998)
Spirolids, 4 naturally occurring analogues	Polyether compounds	<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	'Fast-acting toxins', neurological symptoms including convulsions in mice, effects on humans unknown	Cembella <i>et al.</i> (2000), Richard <i>et al.</i> (2001)
Yessotoxins, 6 congeners are known <b>DSP</b>	Polyether compounds	<i>Lingulodinium polyedrum</i> , <i>Protoceratium reticulatum</i> <i>Gonyaulax spinifera</i>	Non-diarrhetic, apparently interfering with lipid membranes, cardiotoxic	Draisci <i>et al.</i> (2000), Rhodes <i>et al.</i> (2006)
Reactive oxygen compounds		<i>Chattonella marina</i> , <i>C. antiqua</i> , <i>Fibrocapsa japonica</i> , <i>Olisthodiscus luteus</i> , <i>Heterosigma akashiwo</i> , <i>Cochlodinium polykrikoides</i>	impairment of the respiratory and osmoregulatory functions of the gills	Landsberg (2002)
Kalkitoxin	Lipidic – thiazoline compound	<i>Lyngbya majuscula</i>	neurotoxic	Long & Carmichael (2004)
Nodularins	Cyclic penta-peptids	<i>Nodularia spumigena</i>	hepatotoxic with inhibition of proteins (PP) Phosphatases 1 and 2A	Long & Carmichael (2004)
Cylindrospermopsins	Alcaloids	<i>Umezachia natans</i>	Hepatotoxic, with inhibition of glutathione and protein synthesis.	Long & Carmichael (2004)

# Attività specifica dell'IZSVe

Sindr ome	Tossine e Metodi analisi	Limite Reg 853/2004 et agg.		Limiti allerta IOC
PSP	screening mouse test che permette di rilevare STXs , GTXs,	800 microg/Kg	Alexandrium spp, 	100-1000 cell/L
	<b>TTX</b>	<b>Non da Reg. EFSA: 44 microg/Kg</b>	<b>Vibrioni, Roseobacter, Shewanella</b> 	---
DSP	Analisi chimica LC- MS/MS OA, DTX1,DTX2, PTX1,PTX2	160 microg/Kg	<i>D.acuminata</i> , <i>D.acuta</i> , <i>D.fortii</i> , <i>D.caudata</i> , <i>D.sacculus</i> , <i>D.tripos</i> , <i>Phalochroma</i> spp, <i>Prorocentrum lima</i> , <i>Prorocentrum mexicanum</i> 	100 -500 cell/L Differenziazione per specie
	YTX, Homo-YTX, 45- OH-YTX	3,75 mg/Kg	<i>Protoceratium reticulatum</i> , <i>Lingulodinium polyedrum</i> , <i>Goniaulax spinifera</i> 	P.Reticulatum 1000 cell/L
ASP	DA	20 mg/Kg	<i>PseudoNitzschia</i> spp 	100000 cell/L
AZA	Analisi chimica HPLC Screening "Elisa" AZA1, AZA2, AZA3	160 microg/Kg	<i>Azadinium</i> spp 	---
Metodi accreditati Partecipazione PT LRN nazionale			Partecipazione annuale PT «International Phytoplankton Intercalibration (IPI)», dal 2015 e IOC Certification for HAB identification Campionamenti di acqua negli allevamenti retino e "tubo"	

# Episodi di HABs e Biotossine nei molluschi in Veneto - 2017



Periodo	Fitoplancton produttore di tossine e massima concentrazione rilevata	Biotossine nei MBV
Maggio	<i>Alexandrium minutum</i> (1000 cell/L) <i>Alexandrium cf tamarense</i> (1000 cell/L)	GTX1 e GTX4 (PSP) in Veneto: telline 440 microg/kg, mare vicino costa
	<i>Prorocentrum cordatum</i> * (560 cell/L)	<b>TTX</b> in Friuli Venezia Giulia: 541 microg/Kg, laguna
Giugno-luglio	<i>Protoceratium reticulatum</i> (800 cell/L)	YTX in Veneto: mitili 2,8 mg/kg circa, laguna; FVG 30/6 – 21/7 YTX4,7 mg/kg e <i>P.reticulatum</i> 400 cell/L
Ottobre - Novembre	<i>Dinophysis spp</i> <i>Dinophysis fortii</i>	OA in Veneto: 230 microg/Kg mare; 130 microg/Kg laguna

Tossina PSP non determinabile < 317 µgSTXeq/kg (morte di 1 topo su 3)  
Tossina PSP determinabile ≥ 317 µgSTXeq/kg (morte di almeno 2 topi su 3)

Sospetto produttore assieme a

- Batteri dei Generi *Vibrio spp*, *Pseudomonas spp*, *Roseobacter spp*, *Shewanella spp*
- Pesce palla (*Lagocephalus spp*)

# TTX 22 maggio 2018



## FASE\_MAREA

Bassa calante

O2_MG_LT	O2_PERCENTUALE	PH	PIOV_REC	SALINITA	TEMP_ACQUA	TEMP_ARIA
6.76	89.3	8.31	S	27.7	21.22	18.1

IZSve analisi in mitili per PSP (mouse test)

Esito: 1 topino morto su 3

Invio del campione al LRN per la conferma e quantificazione di STXs, GTXs, TTX mediante mouse test e successiva LC-MS/MS

Riscontro di **216 µg/Kg**

In corso

indagine su liquido intervalvare dei molluschi per vibrioni ed altri batteri

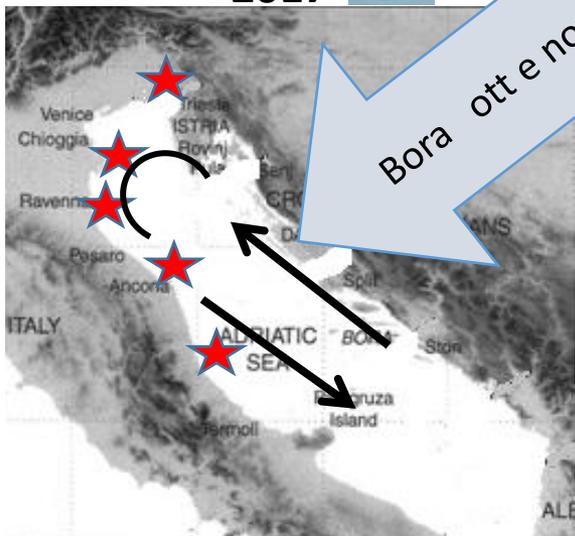
Indagine su sedimento per componente batterica e fitoplanctonica

## *Tetrodotossina*

Tossina neurotossica che si lega ai canali del Na<sup>+</sup> bloccando la trasmissione del segnale nervoso (come STXs).  
Termostabile, solubile in ambiente acido.  
I sintomi variano dalla quantità ingerita: dal torpore facciale si arriva all'insufficienza respiratoria.

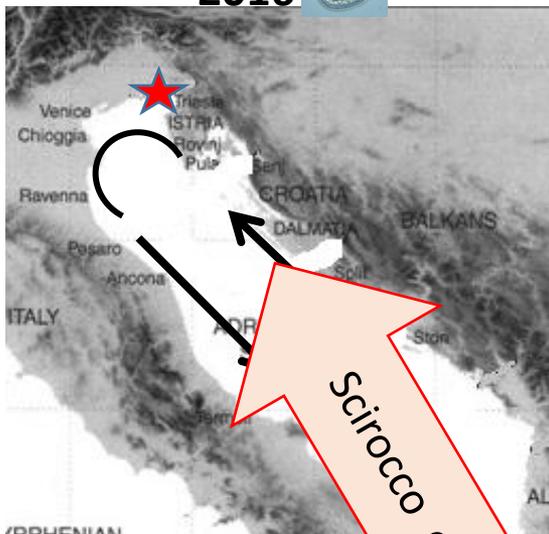
# ● OA nell'ultimo triennio

2017



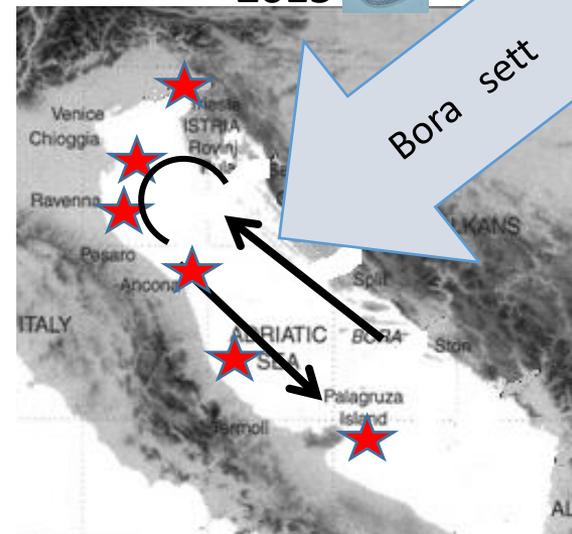
**FVG:** 21/8 – 30/10  
**OA:** max 320 microg/kg  
**Dinophysis spp** da 8/8 media 200 cell/L prevalente *D.fortii*

2016



**FVG:** sett-ott  
**OA in mitili** da settembre ad ottobre  
**D.fortii** 300-800 cell/L

2015



**FVG:** 22/9 – 9/11  
**OA:** mitili oltre 1089 microg/Kg  
**Dinophysis spp.;** prevalente *D.fortii* da Agosto (media 500 cell/L)

**Ven**  
**OA**  
**Din**  
**Emil**  
**OA**  
**D.fortii** da ott e nov

**Il vento, che può "ammassare" le acque superficiali, spesso può portare ad un accumulo di HABs nelle aree di mare "chiuse"**

*(IOC, Hallegraeff et al)*

/Kg  
 ia 500

**Marche IZSUM**  
 Biotossine OA sett-dic Max ott con circa 700 microg/kg

Marche IZSUM  
 Acido okadaico da ottobre fino a dicembre

**Abruzzo IZSAM**  
 Biotossine OA ott-nov  
 Max ott con 154 microg/kg

*Fonte dati: contributi dei partecipanti alle riunioni annuali presso il Centro Ricerche Marine*

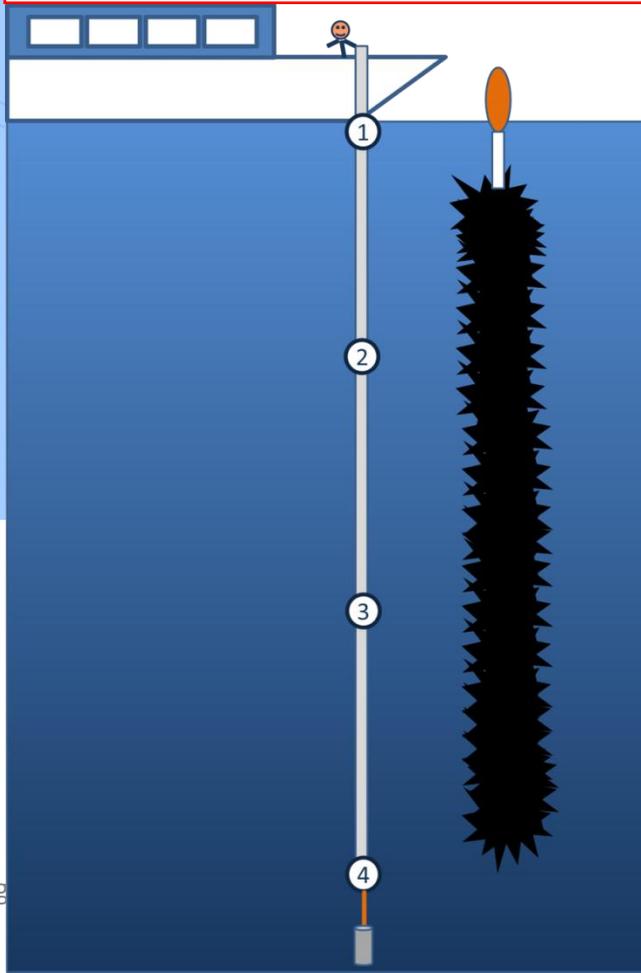
Abruzzo : dic OA  
 Dinophysis spp and Procentrum spp  
 Puglia: dic, OA

# Ricerca corrente IZSve 17/2015 (2016-2019)

cerca su Google Maps



“Study of the correlation between the occurrence of toxic algal blooms and toxins presence in shellfish farmed in marine and lagoon environment of Veneto Region (Northern Italy).”  
(coordinatore progetto dott. Arcangeli)



Working Group:

- *Laboratorio Controlli Ufficiali*
- *Laboratorio ittico di Adria*
- *Epidemiologia degli organismi acquatici*
- *Unità GIS*
- *Laboratorio di Chimica*
- *Consorzio allevatori di Scardovari*
- *Centro Ricerche Marine*

A DIVIDABLE HOSE FOR PHYTOPLANKTON SAMPLING.

by

Odd Lindahl

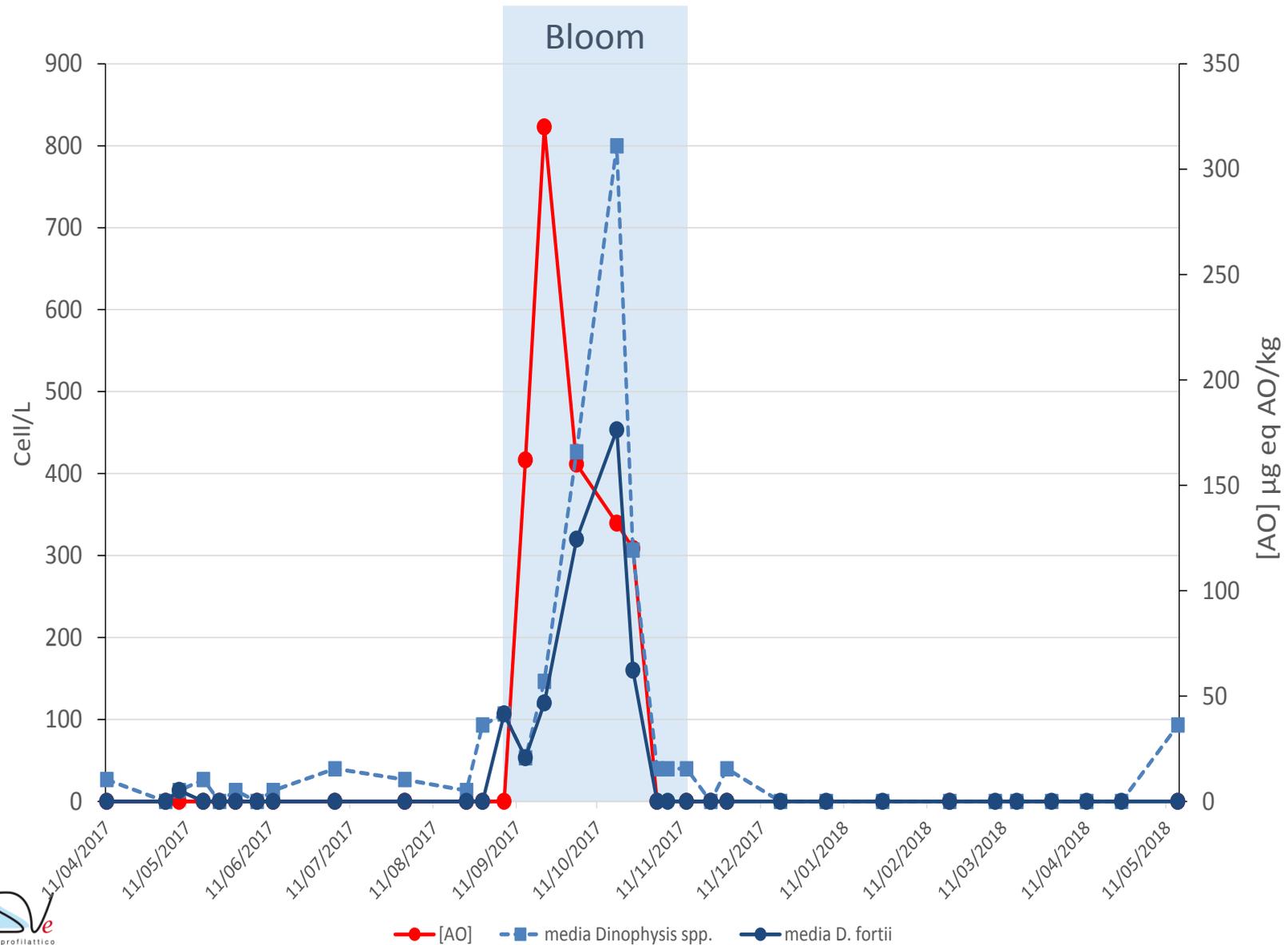
Kristineberg Marine Biological Station

S-450 34 Fiskebäckskil, Sweden

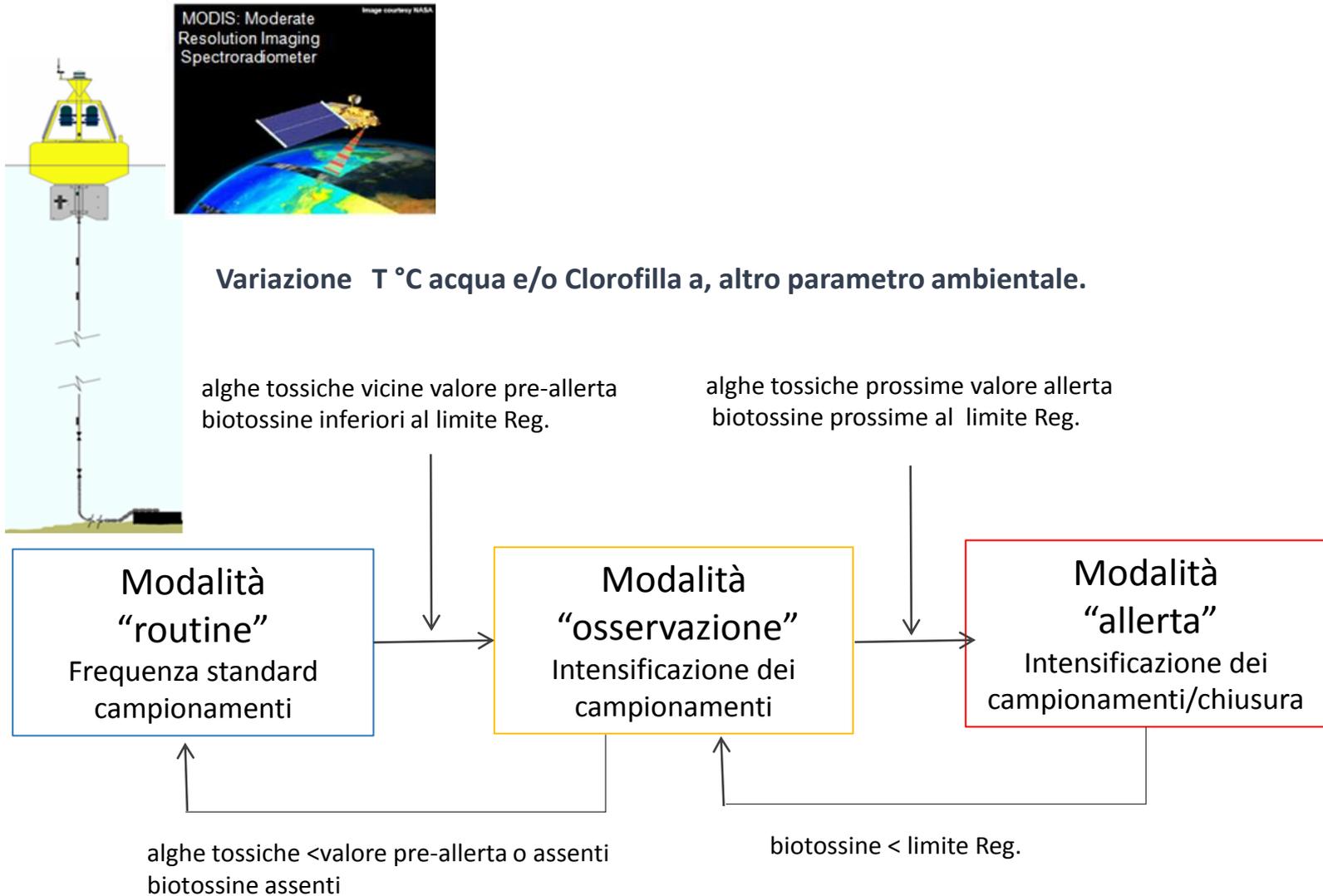


P. Bordin, G. Arcangeli

# Andamento bloom Dinophysis spp & acido Okadaico - Scardovari 2017



# Piano operativo per il monitoraggio delle HAB



Esempi: progetto "ASIMUTH" 2013, che ha coinvolto Irlanda, Inghilterra, Spagna e Portogallo

# Quali variabili sono da monitorare ai fini di un early warning system per HABs?

TABLE 22.4 Examples of potential environmental parameters to be included in HAB monitoring programmes

Physical	Chemical	Biological
Temperature (vertical profile or remote sensing data)	Salinity (vertical profile)	Phytoplankton
Current speed and direction (vertical profile)	Oxygen content (vertical profile)	– Harmful species
Wind speed and direction	Chlorophyll (vertical profile or remote sensing data)	– All species ★
Light attenuation/turbidity	Nutrients:	Meso-zooplankton
Stato della marea	– Nitrogen	Proto-zooplankton
velocità deflusso acque dolci,	– Phosphorous	Pelagic bacteria
Velocità deflusso acqua lagunari	– Silicate	Fish
		Benthos
		Birds

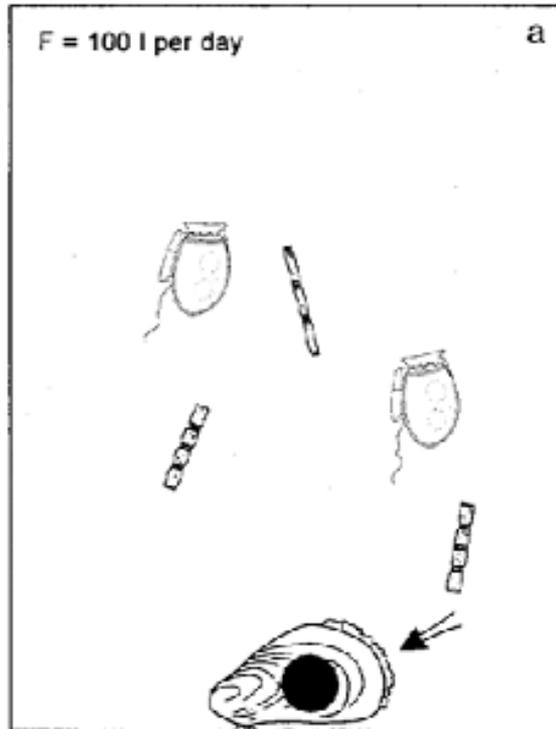
Manual on Harmful Marine Microalgae, Hallegraeff G.M. et al., Unesco publishing, 2003

In particolare per la componente del fitoplancton sono necessari:

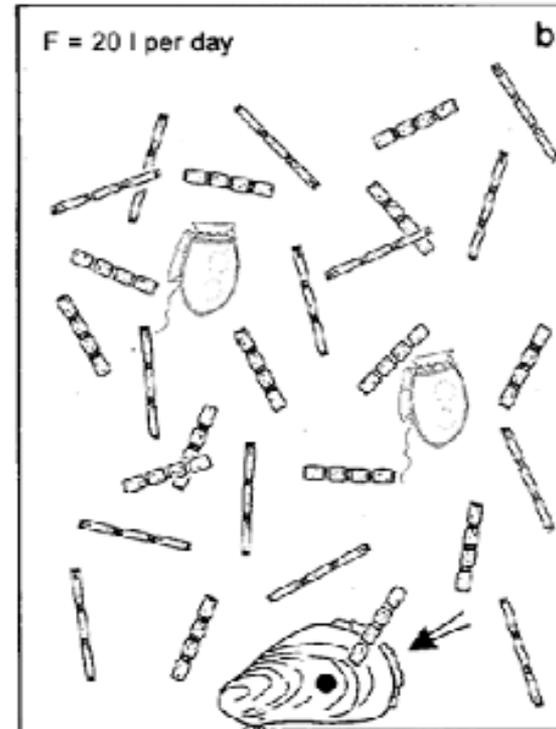
- Campioni rappresentativi della colonna d'acqua (tubo «Lindhal», numero cellule/Litro)
- Iniziale frequenza di campionamento elevata per creare una banca dati



# Relative abundance

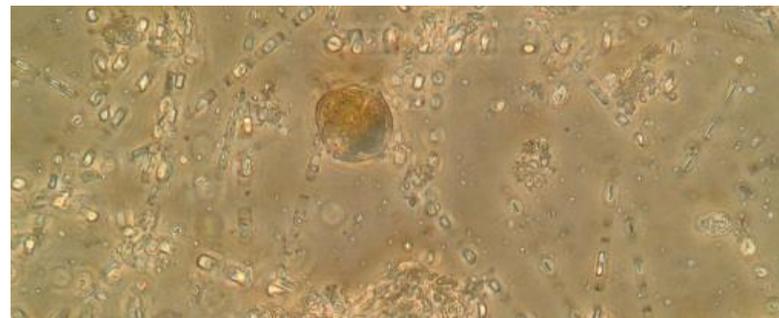


**Example 1. In this situation the shellfish ingest  $200 \times 100 = 20000$  *Dinophysis* cells per day**



**Example 2. In this situation the shellfish ingest  $200 \times 20 = 4000$  *Dinophysis* cells per day**

From Per Andersen, Bio/consult Ltd.



# Alcuni criteri per il fitoplancton

<b>Portogallo (IPMA)</b>	<b>Bloom initiation Cells/L</b>	<b>Early –warning Cells/</b>	<b>Presence in the water</b>	<b>Concentration</b>
Dinophysis spp.	>500	200	Regular	High
Alexandrium spp.	>1000	500	Regular	Low (< 200 cells/L)
Gymnodinium catenatum	>1500	500-1000	Occasional/Regular	Medium/High
Pseudo-nitzschia	>200000	80000 -100000	Regular	High

## Cefas 2015

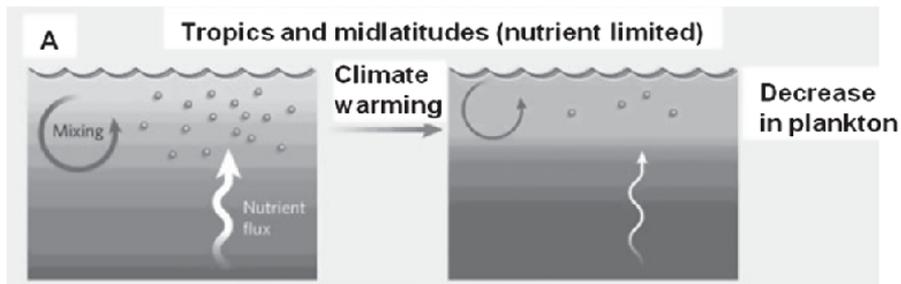
The table below shows the trigger levels which may initiate more frequent (weekly) sampling of water and will initiate additional shellfish monitoring due to increased risk of toxin accumulation in commercially harvested shellfish.

<b>Algal species</b>	<b>Toxins produced</b>	<b>Trigger level (cells/L)</b>
<i>Alexandrium species</i>	PSP	40
<i>Dinophysis species</i>	Lipophilic toxins	100
<i>Prorocentrum lima</i>	Lipophilic toxins	100
<i>Pseudo-nitzschia species</i>	ASP	150,000

# Effetto del global warming

## Climate Change ~ Abundance

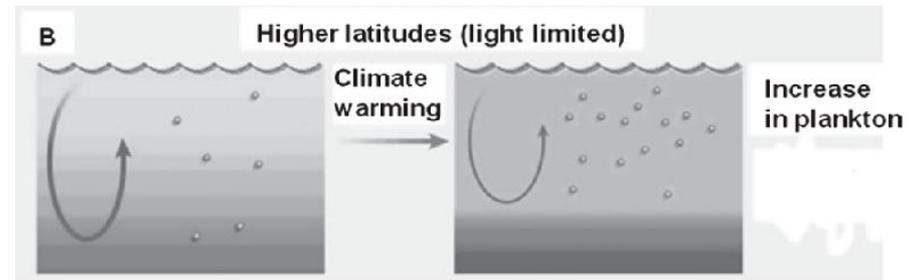
It is hypothesized that global warming may lead to a decrease in the phytoplankton in tropical waters (Doney 2006)



Nella fascia tropicale e alle medie latitudini, l'aumento della T dell'acqua superficiale comporta una stratificazione continuativa che impedisce il rimescolamento dei nutrienti che restano sul fondo, determinando una potenziale **diminuzione dell'abbondanza fitoplanctonica**

## Climate Change ~ Abundance

....while at higher latitudes the phytoplankton may increase (Doney 2006)



Alle alte latitudini, l'aumento della T dell'acqua superficiale comporta una stratificazione alternata al rimescolamento dei nutrienti che distribuendosi nella colonna d'acqua **favoriscono gli episodi di bloom algale**

# Esempi di Early Warning System



## Predicting Harmful Algal Blooms in Ireland

**HAB Bulletin [status of harmful and toxic algae]** Week 22: May 27<sup>th</sup> – June 2<sup>nd</sup> 2018  
Week runs from Sunday to Saturday

### Ireland: Predictions

	NMP Current closures			
	ASP	AZP	DSP	PSP
	0	0	0	0

**ASP event:** Low - continuous decrease  
**AZP event:** High - due to constant fluctuation  
**DSP event:** High - Highest  
**PSP event:** Moderate to high - rising (very site specific)

General – Wk. 22 – Dinophysis species appear to be following historical seasonal trend and need to be watched intensely.

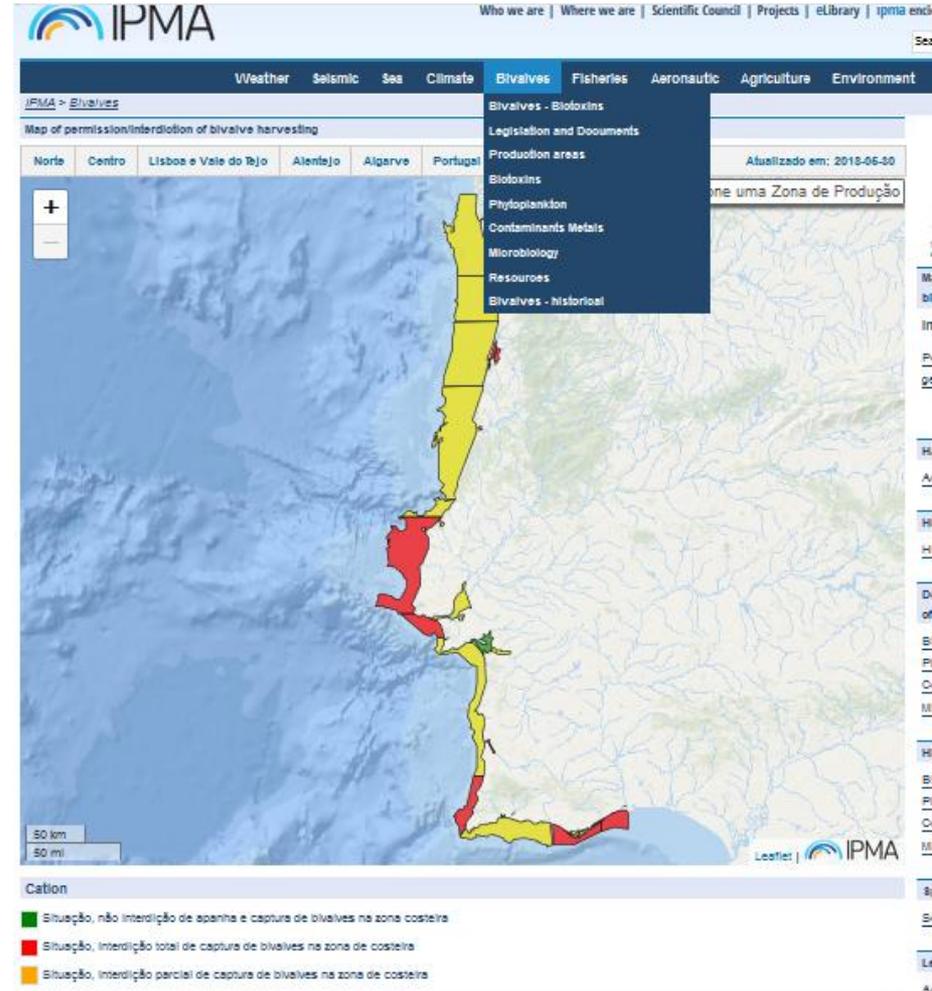
**ASP:** Same as last few weeks - Low in general. Cells and toxins are continuing to decline significantly. It appears this current treat may have subsided but caution should be exercised in affected areas in case of rebound levels until declining trend fully established .

**AZP:** High precaution level is still advised with this difficult species as a necessary precaution. Potential cell levels still fluctuating weekly with no fixed trend. Issues with this toxin can occur suddenly and acutely .No current toxin issues.

**DSP:** Highest. Continuous growth in cell levels in specific sites, following seasonal historic trends and this would be expected to continue to rise based on current environmental conditions. While specific sites may currently be affected , all adjacent clear sites should maintain highest caution also.

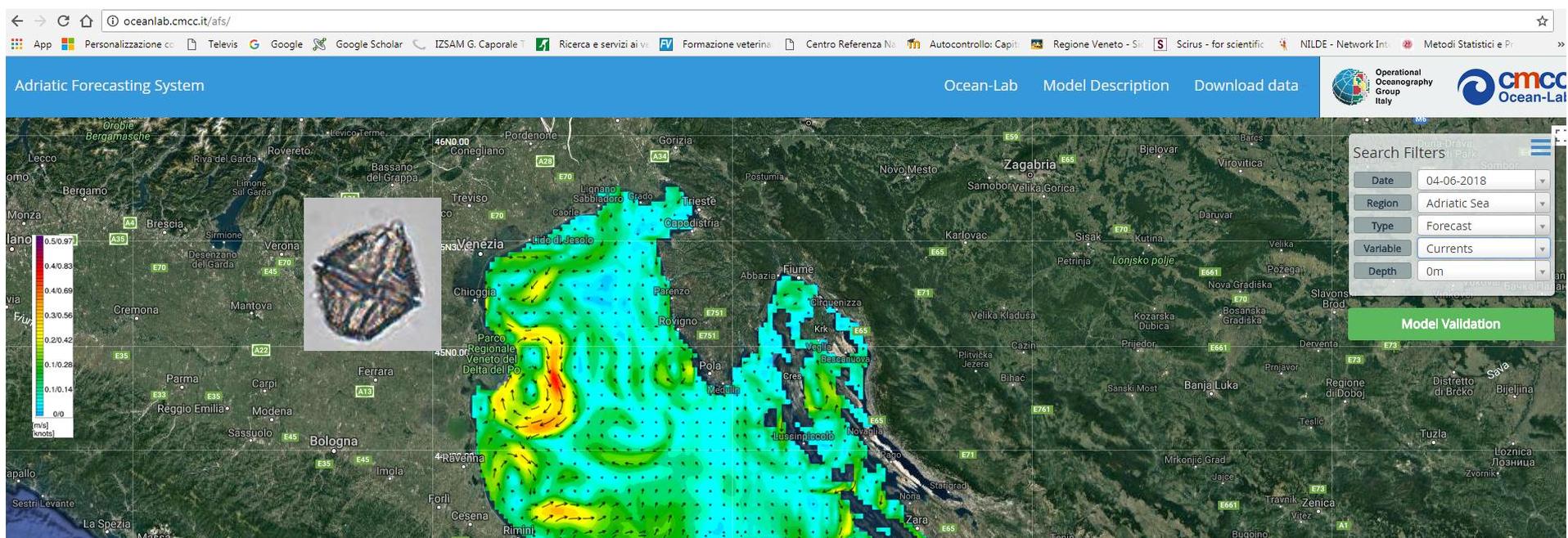
**PSP:** Moderate to high level of caution primarily because we are nearing historic period of occurrence. Stable seasonal pattern of low cell levels and low likelihood of issues establishing unless waters temperatures increases suddenly, which can happen in shallow calm waters at this time of year.

**Blooms:** No current significant issues recorded but problematic species are increasing in some areas – Caution/observance. Any unusual water discoloration should be noted and regional labs contacted if concerned /regarding possible need for additional sampling. All feedback is welcome at [Joe.Silke@Marine.ie](mailto:Joe.Silke@Marine.ie).



# Utilità di un sistema di monitoraggio fitoplancton-biotossine integrato con i dati ambientali

- Previsione di un bloom algale tossico in base alle condizioni ambientali dell'acqua (dati storici, variazione T°C stagionale, densità, chl, ...)
- Previsione degli eventi di tossicità nei molluschi in base al bloom algale e all'andamento delle caratteristiche ambientali (vento, correnti...)
- Valutazioni sulla chiusura preventiva degli allevamenti in caso di aumento delle specie produttrici di tossine
- Ottimizzazione costi gestione analisi
- Possibilità di capire come sarà la resa della produzione dei molluschi per presenza di fitoplancton "buono"
- Previsione eventi di tossicità per Tossine Emergenti per osservazione delle specie produttrici



● Grazie per l'attenzione!

[pbordin@izsvenezie.it](mailto:pbordin@izsvenezie.it)

[garcangeli@izsvenezie.it](mailto:garcangeli@izsvenezie.it)

