



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in  
“Disciplina nazionale ed europea sulla produzione ed  
il controllo degli alimenti”  
XXII ciclo

**“Aspetti epidemiologici e virulenza di  
*Vibrio parahaemolyticus*: studio di  
una metodica biomolecolare”**

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Franco Brindani

Tutor:  
Chiar.ma Prof. Cristina Bacci

Dottoranda:  
Federica Salmi

# Indice

|                                                                                                                            |          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1. Introduzione.....</b>                                                                                                | <b>1</b> |
| 1.1 Contaminazione batterica dei prodotti ittici.....                                                                      | 2        |
| 1.2 Molluschi bivalvi.....                                                                                                 | 3        |
| 1.2.1 Allevamento e raccolta dei molluschi bivalvi.....                                                                    | 4        |
| 1.3 <i>Vibrionaceae</i> .....                                                                                              | 8        |
| 1.4 Genere <i>Vibrio</i> .....                                                                                             | 9        |
| 1.4.1 Differenziazione biochimica delle specie<br>patogene.....                                                            | 12       |
| 1.5 Patogenicità e diffusione dei vibrioni.....                                                                            | 13       |
| 1.5.1 <i>Vibrio alginolyticus</i> .....                                                                                    | 14       |
| 1.5.2 <i>Vibrio cholerae</i> .....                                                                                         | 14       |
| 1.5.3 <i>Vibrio vulnificus</i> .....                                                                                       | 16       |
| 1.6 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....                                                                                   | 18       |
| 1.6.1 Meccanismo patogenetico.....                                                                                         | 19       |
| 1.6.2 Fenomeno di Kanagawa.....                                                                                            | 24       |
| 1.6.3 Influenza degli acidi biliari sulla produzione di<br>TDH.....                                                        | 28       |
| 1.6.4 Idrolisi dell'urea come test indicatore di potenziale<br>patogenicità.....                                           | 28       |
| 1.6.5 Epidemiologia.....                                                                                                   | 31       |
| 1.6.6 Sintomatologia della tossinfezione da <i>Vibrio</i><br><i>Parahaemolyticus</i> nell'uomo.....                        | 33       |
| 1.7 Problematiche igienico-sanitarie relative alla presenza di<br><i>Vibrio parahemolyticus</i> nei molluschi bivalvi..... | 34       |
| 1.8 Decisione della Comunità Europea.....                                                                                  | 36       |
| 1.9 Diffusione di <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in Italia.....                                                            | 38       |

|                                                                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2. Scopo.....</b>                                                                                             | <b>42</b> |
| <b>3. Materiali e metodi.....</b>                                                                                | <b>44</b> |
| 3.1 Isolamento e identificazione di <i>Vibrio parahaemolyticus</i><br>secondo il metodo ISO/TS 21872-1:2007..... | 44        |
| 3.2 Ceppo utilizzato e terreni colturali impiegati.....                                                          | 48        |
| 3.3 Determinazione del titolo delle colture batteriche.....                                                      | 49        |
| 3.4 Protocollo di estrazione del DNA batterico.....                                                              | 50        |
| 3.5 PCR (Polymerase Chain Reaction).....                                                                         | 51        |
| 3.5.1 Primers utilizzati.....                                                                                    | 51        |
| 3.5.2 Protocollo di amplificazione del DNA mediante<br>PCR per il gene <i>toxR</i> .....                         | 52        |
| 3.5.3 Protocollo di amplificazione del DNA mediante<br>PCR per il gene <i>tdh</i> .....                          | 53        |
| 3.6 Corsa elettroforetica.....                                                                                   | 54        |
| 3.7 Prove di sensibilità.....                                                                                    | 54        |
| 3.8 Prove di arricchimento.....                                                                                  | 55        |
| <b>4. Risultati.....</b>                                                                                         | <b>56</b> |
| 4.1 Prove di sensibilità <i>tox-R</i> .....                                                                      | 56        |
| 4.2 Prove di incubazione <i>tox-R</i> .....                                                                      | 58        |
| 4.3 PCR booster <i>tox-R</i> .....                                                                               | 59        |
| 4.4 Prove di sensibilità <i>tdh</i> .....                                                                        | 63        |
| 4.5 Prove di incubazione <i>tdh</i> .....                                                                        | 64        |
| <b>5. Discussione dei risultati.....</b>                                                                         | <b>67</b> |
| <b>6. Conclusioni.....</b>                                                                                       | <b>70</b> |
| <b>7. Bibliografia.....</b>                                                                                      | <b>74</b> |

## **1. Introduzione**

Gli alimenti possono essere causa di trasmissione all'uomo di batteri, virus o parassiti responsabili di manifestazioni patologiche diverse e, nonostante i progressi fatti nel settore della prevenzione, costituiscono un serio problema di sanità pubblica.

I prodotti della pesca rappresentano una categoria di alimenti molto ampia e sono una fonte proteica di rilievo nella dieta umana: il pesce ed i molluschi, infatti, risultano essere la seconda fonte proteica per l'uomo dopo i prodotti carnei. In alcuni paesi, come il Giappone, costituiscono la prima fonte di proteine.

Negli ultimi anni si è avuto un aumento delle richieste da parte dei consumatori, con conseguente incremento delle importazioni e notevole sviluppo delle tecniche di acquacoltura.

La maggior parte del pesce oggetto di commercio a livello internazionale proviene da Paesi non industrializzati, che spesso non hanno adeguati sistemi di controllo degli alimenti. Inoltre in tali Paesi, e spesso anche in quelli industrializzati, i prodotti della pesca destinati sia al mercato interno che a quello internazionale, vengono prelevati in zone marine non ben definite e trasportati in condizioni igieniche non idonee e a temperature non adeguate. Tutto ciò va influire in modo significativo sulla qualità igienica di un prodotto di per sé già molto delicato e facilmente deperibile (62).

Da qui la necessità di un rigoroso controllo sanitario, al fine di prevenire le malattie derivate dal consumo di questi alimenti, per la maggior parte costituite da intossicazioni di origine microbiologica.

In aggiunta alla naturale presenza di microrganismi patogeni nell'ambiente marino, la contaminazione delle acque da parte degli scarichi fognari, vettori di batteri e virus a ciclo oro-fecale hanno accresciuto l'eventualità di comparsa di situazioni di rischio sanitario. Le fioriture fitoplanctoniche e l'eutrofizzazione delle acque hanno contribuito alla modificazione della flora microbica ed alla selezione di ceppi batterici responsabili di infezioni.

Negli ultimi anni i batteri autoctoni dell'ambiente marino sono stati responsabili del 20% delle malattie e del 99% degli eventi fatali legati al consumo di prodotti della pesca. Tra questi, i maggiori responsabili di malattie sono alcune specie di *Vibrionaceae*, che possono indurre gastroenteriti specialmente dopo il consumo di prodotti ittici, crudi o poco cotti, provenienti da mari caldi (17).

### **1.1 Contaminazione batterica dei prodotti ittici**

La flora microbica di pesci, molluschi e crostacei è strettamente correlata alle caratteristiche microbiologiche dell'ambiente in cui vivono e alle loro abitudini di vita.

I livelli di carica microbica variano a seconda delle condizioni e della temperatura dell'acqua: pesci e crostacei provenienti da acque fredde (10-15°C), generalmente presentano cariche microbiche di  $10^2$ - $10^4$  UFC/g sulla superficie cutanea e sulle branchie, mentre animali provenienti da acque calde presentano livelli di  $10^3$ - $10^6$  UFC/g. A livello intestinale, invece, le cariche microbiche variano in rapporto all'alimentazione, passando da  $10^2$  UFC/g nel pesce a digiuno, a  $10^8$  UFC/g nei soggetti che si alimentano attivamente.

Nella maggior parte dei casi si tratta di microrganismi alotolleranti, capaci di crescere in un ampio spettro di concentrazioni saline e con un optimum intorno al 2-3% di NaCl.

Sulla cute e sulle branchie prevale una flora microbica aerobia costituita da *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., *Cytophaga* spp., mentre batteri aerobi/anaerobi facoltativi, *Vibrio* spp., *Alcaligenes* spp., *Flavobacterium* spp., *Xanthomonas* spp., si possono trovare a livello intestinale (17).

## 1.2 Molluschi bivalvi

Tra i prodotti della pesca, i molluschi eduli lamellibranchi sono i più esposti a possibili contaminazioni di tipo chimico, microbiologico e biotossicologico.

I molluschi, costituiti in gran parte da animali sessili o sedentari, si nutrono di piccole particelle alimentari presenti nell'acqua o nei sedimenti, mediante un'intensa attività di filtrazione durante la quale trattengono nel loro organismo anche i batteri eventualmente presenti nell'ambiente (17). Per questo motivo sono implicati da sempre nella trasmissione di malattie gastroenteriche di diversa gravità come febbri tifoidi, colera e di patologie virali quali epatite A.

Ancora oggi il colera è diffuso in vaste aree del mondo: nel nostro paese epidemie di colera si sono verificate nel 1973 interessando la zona di Napoli e la Puglia (5). Si sono poi ripetuti casi in Sardegna nel 1979 e, fra Ottobre e Dicembre del 1994, una dozzina di casi di colera sono stati segnalati nella provincia di Bari. Si ritiene comunque che i dati epidemiologici disponibili siano sottostimati: in molti casi, infatti, il consumo di molluschi provoca solo sintomi gastrointestinali di lieve entità che non richiedono alcun intervento medico (17).

È rilevante sottolineare come l'Italia sia uno fra i maggiori produttori mondiali di specie pregiate di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) e di vongole veraci (*Tapes decussatus*) e che qui la mitilocoltura venga praticata prevalentemente in aree costiere che subiscono le conseguenze dell'elevato tasso di urbanizzazione sulle acque interne (zona lagunare della costa adriatica, delta del Po, golfo di Taranto, golfo Ligure e Sicilia).

La normativa vigente non assicura che i molluschi siano esenti da agenti potenzialmente patogeni. Infatti, la presenza di batteri indici di contaminazione fecale non è correlata alla presenza di virus o batteri quali le *Vibrionaceae*, microrganismi patogeni normalmente presente nell'ambiente marino (21).

### 1.2.1 Allevamento e raccolta dei molluschi bivalvi

La filiera dei molluschi bivalvi o lamellibranchi, che costituiscono la classe di molluschi di maggior interesse per il consumo umano, inizia con l'allevamento o la raccolta delle diverse specie nelle zone di produzione. Tali zone possono essere parti di mare, di laguna o di estuario dove si trovano banchi naturali di molluschi bivalvi oppure luoghi utilizzati per la loro coltivazione. In entrambi i casi la loro ubicazione e i loro confini devono essere definiti e classificati dall'Autorità competente. La produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi, considerati alimenti ad alto rischio, sono disciplinate dal Decreto Legislativo 530/92 e dai Regolamenti (CE) 852/2004, 853/2004, 854/2004 e 2073/2005 (20).



Fig.1: Sistemi di allevamento molluschi bivalvi.

Le zone di produzione destinate alla mitilocoltura sono distinte dall'attuale legislazione nelle classi A, B e C che differiscono per il livello crescente di contaminazione microbiologica fecale.

**Zona di classe A:** i molluschi possono essere raccolti e utilizzati per il consumo umano diretto. Devono soddisfare i seguenti requisiti:

- *E. coli*: non oltre 230 MPN (Most Probable Number) per 100 g di polpa e liquido intervalvare;
- *Salmonella*: assente in 25 g di polpa di mollusco e di liquido intervalvare;
- Mercurio: non oltre 0,5 ppm nella polpa del mollusco;
- Piombo: non oltre 1,5 ppm nella polpa del mollusco;
- Biotossine:

complesso DSP (Diarrhetic Shellfish Poison):

- acido okadaico, dinophysitossine e pectenotossine non oltre 160 µg di equivalente acido okadaico/Kg;
  - yessotossine non oltre 1 mg di equivalente yessotossine /Kg;
  - azaspiracidi non oltre 160 µg di equivalente acido azaspiracido/kg;
- ASP (Amnestic Shellfish Poison) nelle parti commestibili non oltre 20 mg/Kg di acido domoico (secondo il metodo di analisi HPLC riportato nell'allegato del D.M. 16/5/2002;

PSP (Paralytic Shellfish Poison) nelle parti commestibili non oltre 800 µg di equivalente di saxitossina/Kg, utilizzando il metodo di analisi biologico, se del caso associato ad un metodo chimico di ricerca della saxitossina, o qualsiasi altro metodo riconosciuto secondo la procedura comunitaria.

- Nuclidi radioattivi: nei limiti previsti dalla normativa vigente

**Zona di classe B:** i 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. Devono soddisfare i seguenti requisiti:



- *E. coli*: non oltre 4600 per 100 grammi di polpa e liquido intervalvare secondo il metodo MPN in cinque provette e tre diluizioni, o altro metodo alternativo e convalidato;
- Mercurio: non oltre 0,5 ppm nella polpa del mollusco;
- Piombo: non oltre 1,5 ppm nella polpa del mollusco;
- Biotossine:
  - complesso DSP (Diarrhetic Shellfish Poison):
    - acido okadaico, dinophysitossine e pectenotossine non oltre 160 µg di equivalente acido okadaico/Kg;
    - yessotossine non oltre 1 mg di equivalente yessotossine /Kg;
    - azaspiracidi non oltre 160 µg di equivalente acido azaspiracido/kg;
  - ASP (Amnestic Shellfish Poison) nelle parti commestibili non oltre 20 mg/Kg di acido domoico (secondo il metodo di analisi HPLC riportato nell'allegato del D.M. 16/5/2002;
  - PSP (Paralytic Shellfish Poison) nelle parti commestibili non oltre 800 µg di equivalente di saxitossina/Kg, utilizzando il metodo di analisi biologico, se del caso associato ad un metodo chimico di ricerca della saxitossina, o qualsiasi altro metodo riconosciuto secondo la procedura comunitaria;
- Nuclidi radioattivi: nei limiti previsti dalla normativa vigente.

**Zona di classe C:** i 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 devono soddisfare i seguenti requisiti:

- *E. coli*: non oltre 46000 per 100 grammi di polpa e liquido intervalvare secondo il metodo MPN in cinque provette e tre diluizioni, o altro metodo alternativo e convalidato;
- Mercurio: non oltre 0,5 ppm nella polpa del mollusco;

- Piombo: non oltre 1,5 ppm nella polpa del mollusco (55).

I molluschi raccolti nelle zone di classe A possono essere destinati al consumo umano diretto purché soddisfino precisi requisiti sanitari, mentre quelli provenienti dalle zone B e C devono necessariamente essere sottoposti dopo la raccolta ad un trattamento in un centro di depurazione o di stabulazione.

La fase di depurazione avviene in appositi stabilimenti, denominati CDM (Centro Depurazione Molluschi), riconosciuti dal Ministero della Salute, comprendenti bacini alimentati con acqua marina pulita in cui i molluschi vivi sono collocati per il tempo necessario all'eliminazione dei contaminanti, affinché raggiungano requisiti igienico-sanitari sufficienti a renderli idonei al consumo umano. Prima della depurazione i molluschi devono essere liberati, mediante acqua pulita, dal fango e dai detriti accumulati, quindi vengono collocati in specifici contenitori costruiti in modo che l'acqua pulita possa passare. Devono essere sistemati in modo che lo spessore degli strati di molluschi non ne ostacoli l'apertura dei gusci. Inoltre la quantità di molluschi da depurare non deve essere superiore alla capacità del centro di depurazione e, qualora un bacino di depurazione contenga diversi lotti di molluschi bivalvi vivi, questi devono essere della medesima specie e il trattamento deve estendersi in funzione del periodo richiesto dal lotto che necessita della depurazione più lunga.

La fase di stabulazione ha le stesse finalità della fase di depurazione, la differenza riguarda gli stabilimenti che sono costituiti da parti di mare, di laguna o di estuario, chiaramente delimitate e segnalate, destinate esclusivamente alla depurazione naturale dei molluschi bivalvi vivi. A tal fine possono essere utilizzate solo zone riconosciute dall'Autorità competente e che consentano condizioni ottimali di depurazione.

Le tecniche di depurazione devono 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.

I molluschi bivalvi vivi provenienti dalle zone classificate di classe B e C, che non sono stati sottoposti a depurazione o stabulazione, possono essere inviati ad uno stabilimento di trasformazione, dove devono essere sottoposti ad un trattamento consentito per l'eliminazione dei microrganismi patogeni (previa asportazione di fango, sabbia o muco nello stesso o in un altro stabilimento) (20).

Fra i patogeni autoctoni dell'ambiente marino un ruolo primario nelle patologie dovute al consumo di prodotti ittici crudi o poco cotti provenienti da mari caldi è svolto da microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Vibrionaceae* (17).

### **1.3 *Vibrionaceae***

La famiglia delle *Vibrionaceae* include, oltre al genere *Vibrio*, anche i generi *Aeromonas* e *Plesiomonas*.

È caratterizzata da batteri a bastoncino Gram negativi, di forma lineare o incurvata, mobili e asporigeni. Si tratta di organismi chemiorganotrofi, anaerobi facoltativi con metabolismo respiratorio e fermentativo; molte specie sono ossidasi positive.

Le *Vibrionaceae* sono diffuse negli ambienti acquatici, dolci e marini, dove vivono libere o in simbiosi con la fauna presente; alcune specie sono patogene per l'uomo, i pesci, gli anfibi, altri vertebrati ed invertebrati.

La classificazione delle *Vibrionaceae* è in continua evoluzione e comprende, oltre ai generi sopra indicati, alcuni generi meno noti nell'ambito della microbiologia degli alimenti come *Photobacterium*, *Lucibacterium*, *Allomonas*, *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Ferrania*, *Grimontia*, *Listonella* e *Salinivibrio* (NCBI Taxonomy Browser).

Microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* possono essere coinvolti in forme gastroenteriche, essendo ampiamente diffusi nell'ambiente acquatico e di conseguenza nei prodotti ittici e i fattori che oggi concorrono ad aumentare il rischio di infezione sono molteplici: tra questi, l'aumento dell'immigrazione da

Paesi dove le infezioni da *Vibrio* spp. sono endemiche, e la globalizzazione dei mercati, che prevede frequenti scambi commerciali con Paesi a rischio (17).

## 1.4 Genere *Vibrio*

Vengono riconosciute appartenere al genere *Vibrio* circa 70 specie, tutte isolate dall'ambiente acquatico: di queste, venti sono in grado di causare patologia negli animali, mentre dodici sono patogene per l'uomo, otto delle quali sono associate a patologie gastroenteriche dovute al consumo di alimenti contaminati (26). (Tab.1)

|                                   | <b>SINDROMI CLINICHE</b> |                     |                   |                     |                       |
|-----------------------------------|--------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|
| <b>SPECIE</b>                     | Gastroenteriti           | Infezione di ferite | Infezioni uditive | Setticemia primaria | Setticemia secondaria |
| <i>V.cholerae</i><br>O1/O139      | +++                      | +                   |                   |                     |                       |
| <i>V. cholerae</i><br>non-O1/O139 | +++                      | ++                  | +                 | +                   | +                     |
| <i>V. mimicus</i>                 | ++                       |                     | +                 |                     |                       |
| <i>V. fluvialis</i>               | ++                       |                     |                   |                     |                       |
| <i>V. parahaemolyticus</i>        | +++                      | +                   | +                 |                     | +                     |
| <i>V. alginolyticus</i>           | (+)                      | ++                  | ++                | +                   |                       |
| <i>V. cincinnatiensis</i>         |                          |                     |                   | +                   |                       |
| <i>V. hollisae</i>                | ++                       |                     |                   | +                   |                       |
| <i>V. vulnificus</i>              | +                        | ++                  |                   | ++                  | ++                    |
| <i>V. furnissii</i>               | (+)                      |                     |                   |                     |                       |
| <i>V. damsela</i>                 |                          | ++                  |                   |                     |                       |
| <i>V. metschnikovii</i>           | (+)                      |                     |                   | (+)                 |                       |
| <i>V. carchariae</i>              |                          | +                   |                   |                     |                       |

Tab. 1: Associazione tra alcune sindromi cliniche e *Vibrio* spp. (58).

+++ : riportato molto frequentemente; ++ : meno comune; + : raro; (+) : associazione non ancora sicura

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

mobili per la presenza di un flagello polare monotrico o multitrice, racchiuso in un rivestimento continuo con la membrana esterna della parete cellulare. Presentano metabolismo sia ossidativo, sia fermentativo e non producono spore.

Le specie appartenenti a questo genere, ad eccezione di *Vibrio metschnikovii*, sono ossidasi positive 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 (*Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*), la presenza di tale ione è indispensabile ad una concentrazione pari o superiore al 2%. Possono infatti essere classificati in alofili o non alofili, in base alla richiesta di NaCl per la crescita.

I vibrioni, come altri microrganismi autoctoni ambientali, sono costretti a subire talvolta profonde modificazioni dell'ambiente circostante relative a vari fattori, quali temperatura, concentrazione di nutrienti, salinità, pressione osmotica, pH, ecc. A tali cambiamenti reagiscono con una serie di adattamenti di carattere fisiologico e biochimico: uno di questi è rappresentato dalla capacità di entrare in una fase di quiescenza, durante la quale rimangono vitali, ma diventano non coltivabili con i metodi tradizionali di laboratorio (VBNC). Durante tale fase subiscono diverse modificazioni morfologiche e fisiologiche: cambiano dimensioni riducendo da 15 a 300 volte il loro volume, rallentano il ritmo respiratorio, incrementano le vie metaboliche in grado di evitare i danni indotti da carenze di determinati nutrienti, arrestano i cicli di divisione (17). Inoltre, a temperature inferiori ai 10°C i vibrioni sembrano mostrare un'adesione più tenace ai tessuti dei molluschi, il che li renderebbe più resistenti ai normali trattamenti di depurazione (2).

Non si conoscono le dosi infettanti dei vibrioni alofili patogeni e scarsi sono anche i dati epidemiologici che possono correlare le patologie enteriche dell'uomo all'ingestione di molluschi contaminati. Tutto ciò non consente di poter realmente valutarne la diffusione di tali microrganismi nell'ambiente e, conseguentemente, anche la prevenzione di questi agenti patogeni risulta problematica.

Infatti, nel caso di presenza dei *Vibrio* spp. in una zona di raccolta di molluschi, non potendo disporre di uno strumento di depurazione adeguato, come invece è per i batteri fecali, risulta difficile poter rimuovere la fonte di contaminazione, essendo questi germi autoctoni dell'ambiente acquatico (2).

Alcune infezioni da vibrioni rivestono una certa importanza, poiché comprese tra quelle malattie che richiedono obbligo di notifica alla World Health Organization (WHO) in quanto potenzialmente letali. Tra queste il colera, il cui agente eziologico è *Vibrio cholerae* e le infezioni da taglio causate da *Vibrio vulnificus*. Altri vibrioni sono invece causa di numerose tossinfezioni alimentari diffuse soprattutto in alcuni paesi, come ad esempio *Vibrio parahaemolyticus* in Giappone (20).

Oltre a *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus*, almeno altre 9 specie sono patogene per l'uomo: tra queste *Vibrio mimicus*, così chiamato per la sua somiglianza a *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio alginolyticus* e *Photobacterium Damselae* (precedentemente denominato *Vibrio damsela*).

Le patologie dovute ai vibrioni alofili, sono generalmente acquisite attraverso l'ingestione di molluschi e frutti di mare o attraverso il diretto contatto con le ferite; a tal proposito *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Vibrio alginolyticus* vengono spesso associati a manifestazioni diarroiche, ad infezioni cutanee, otiti e forme setticemiche, prevalentemente in soggetti immunodepressi (17).

### 1.4.1 Differenziazione biochimica delle specie patogene

I vibriani isolati da campioni di interesse clinico e quelli a vario titolo intesi come patogeni veicolati da alimenti, sono divisibili in 5 gruppi sulla base di 7 test biochimici (52):

| Test     | Gruppo 1           |                   | Gruppo 2                | Gruppo 3           | Gruppo 4          |                     |                     | Gruppo 5                |                            |                      |
|----------|--------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------|
|          | <i>V. cholerae</i> | <i>V. mimicus</i> | <i>V. metschnikovii</i> | <i>V. hollisae</i> | <i>V. damsela</i> | <i>V. fluvialis</i> | <i>V. furnissii</i> | <i>V. alginolyticus</i> | <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>V. vulnificus</i> |
| 0% NaCl  | +                  | +                 | -                       | -                  | -                 | -                   | -                   | -                       | -                          | -                    |
| 1% NaCl  | +                  | +                 | +                       | +                  | +                 | +                   | +                   | +                       | +                          | +                    |
| Ossidasi | +                  | +                 | -                       | +                  | +                 | +                   | +                   | +                       | +                          | +                    |
| Nitriti  | +                  | +                 | -                       | +                  | +                 | +                   | +                   | +                       | +                          | +                    |
| Arginina | -                  | -                 | -                       | -                  | +                 | +                   | +                   | -                       | -                          | -                    |
| Lisina   | +                  | +                 | -                       | -                  | -                 | -                   | -                   | +                       | +                          | +                    |
| Ornitina | +                  | +                 | -                       | -                  | -                 | -                   | -                   | -                       | +                          | -                    |

Tab. 2: Test per dividere in 5 gruppi le 10 specie di *Vibrio* isolate da campioni clinici e da alimenti (52).

L'incapacità di crescere in brodo nutritivo privo di sale (0% NaCl) differenzia le 8 specie alofile da *Vibrio cholerae* e da *Vibrio mimicus*; il gruppo 5 di alofili è, a sua volta, ben differenziato, in accordo con i test nella tabella seguente (52):

| <b>Test</b>            | <b><i>V.alginolyticus</i></b> | <b><i>V.parahaemolyticus</i></b> | <b><i>V.vulnificus</i></b> |
|------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| <b>Cellobiosio</b>     | -                             | -                                | -                          |
| <b>Lattosio</b>        | -                             | -                                | (+)                        |
| <b>Salicina</b>        | -                             | -                                | +                          |
| <b>8% NaCl</b>         | +                             | (+)                              | -                          |
| <b>10% NaCl</b>        | *                             | -                                | -                          |
| <b>Voges-Proskauer</b> | +                             | -                                | -                          |
| <b>Saccarosio</b>      | +                             | -                                | (-)                        |
| <b>L-Arabinosio</b>    | -                             | (+)                              | -                          |

Tab. 3: Test per la differenziazione di *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* (52): +, 90% o più dei ceppi positivi; (+), usualmente dal 75% all'89% dei ceppi positivi; \*, dal 26% al 74% dei ceppi positivi; (-), dall'11% al 25% dei ceppi positivi; -, 90% o più dei ceppi negativi.

## 1.5 Patogenicità e diffusione dei vibrioni

I vibrioni penetrano attraverso il tubo gastroenterico e si localizzano nell'intestino tenue; poiché sono altamente sensibili agli acidi, il loro passaggio attraverso lo stomaco è possibile solo se l'acidità del succo gastrico viene almeno temporaneamente neutralizzata (come avviene, ad esempio, dopo un pasto proteico). Si moltiplicano attivamente senza invadere la mucosa intestinale ed esplicano la loro azione attraverso la produzione di una enterotossina, che ha tutti i caratteri delle esotossine: è una sostanza proteica di peso molecolare di circa 84 kd, termolabile, capace di indurre la formazione di anticorpi, e trasformabile in anatossina (5).

Le specie appartenenti al genere *Vibrio* di maggiore interesse per l'uomo, poiché in grado di determinare patologie anche gravi, sono *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*.



### **1.5.1 *Vibrio alginolyticus***

*Vibrio alginolyticus*, la cui patogenicità nei confronti dell'uomo è stata dimostrata solo raramente, risulta responsabile di patologie da ferite o otiti trasmesse dall'acqua di mare. È ritenuto un patogeno opportunista soprattutto per gli animali acquatici e alcuni studi lo riportano come responsabile di vibriosi nei gamberetti.

Tuttavia si ritiene che la presenza di *Vibrio alginolyticus* nei prodotti della pesca non rappresenti un serio pericolo per il consumatore in quanto la sua eziopatogenesi sarebbe eventualmente legata all'ingestione di cariche batteriche vitali molto elevate (63).

Durante un'indagine su un'epidemia da *Vibrio parahaemolyticus* in Alaska verificatasi nel 2004, furono isolati da ostriche ceppi positivi alla presenza del gene *trh* ma negativi al gene *tlh*. Questi ceppi erano anche urea positivi in quanto positivi al gene *ure*, geneticamente associato al gene *trh* in *Vibrio parahaemolyticus*.

La presenza del gene *trh* ma non del *tlh* nelle specie isolate era molto inusuale e questo risultato ha suggerito la presenza nell'ambiente di altri vibrioni: in natura infatti sono stati descritti ceppi di *Vibrio alginolitycus* che possiedono geni simil-*trh* con un omologia del 98% con il gene *trh* di *Vibrio parahaemolitycus* (28).

### **1.5.2 *Vibrio cholerae***

*Vibrio cholerae* è un vibrione debolmente alofilo e, a livello ambientale, ha una variabile capacità di resistenza a seconda di temperatura, umidità e presenza di sostanze organiche. Nell'acqua potabile può resistere da 7 a 13 giorni, mentre in quella non potabile soltanto 1 o 2 giorni; nei frutti di mare la sopravvivenza raggiunge i 14 giorni a temperatura di refrigerazione. I molluschi sono sicuramente tra i maggiori veicoli della sua trasmissione in diverse parti del mondo.

L'enterotossina colerica, prodotta dai ceppi tossinogeni di *Vibrio cholerae*, agisce penetrando nelle cellule della mucosa, dove attiva l'enzima adenil-ciclasi presente nella membrana cellulare; questo enzima catalizza una reazione che favorisce la trasformazione dell'ATP cellulare in AMP-ciclico, il quale svolge, come è noto, un ruolo importante nella regolazione dell'equilibrio idrico-salino. L'aumentata concentrazione di questa sostanza determina una notevole ipersecrezione di acqua e di elettroliti, che può superare anche il litro per ora. L'enterotossina si lega alla mucosa così rapidamente che la somministrazione di un'antitossina, anche soltanto dopo qualche minuto, non riesce a bloccarne l'attività (5).

Dopo un periodo di incubazione variabile da poche ore a 5 giorni, la malattia inizia bruscamente con vomito, dolori addominali e diarrea profusa; entro poche ore le scariche diventano assai frequenti con perdite giornaliere di liquidi fino a 10-20 litri. Ne consegue una rapida disidratazione, accompagnata da crampi muscolari diffusi, stato algido, acidosi metabolica, anuria, collasso cardiocircolatorio.

Data la sensibilità del vibrione all'acidità gastrica la dose infettante è piuttosto alta (circa  $10^8$  batteri), anche se pazienti affetti da ipocloridria o problemi gastrici sono suscettibili a dosi infettanti inferiori ( $10^3$ - $10^5$ ). 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 (20).

La letalità che in passato raggiungeva il 50-70% dei casi, oggi con una terapia idonea e tempestiva (ripristino del bilancio idro-elettrolitico ed antibiotici) non supera l'1,5% (5).

In Italia, epidemie di colera sono avvenute nel 1973 a Napoli e in Puglia. E nel 1979 in Sardegna. Più recentemente, nel 1994 in Puglia sono stati diagnosticati 12 casi di patologia da *Vibrio cholerae*, sierotipo Ogawa, biotipo El Tor, a seguito di consumo di pesce e cozze (2).

Il vibrione colerico viene diviso in sierogruppi in base all'antigene somatico O, un polisaccaride termostabile dello strato lipopolisaccaridico

presente sulla superficie della cellula. Il sierogruppo O1 include ceppi responsabili del colera epidemico ed è ulteriormente suddiviso in due biotipi: classico, responsabile di 6 pandemie verificatesi tra 1817 e il 1923, ed El Tor (con i sierotipi Ogawa, Inaba e Hikojima), responsabile della settima pandemia che iniziò nel 1961 (20).

I seriogruppi diversi da O1 sono associati a casi sporadici di gastroenteriti e lievi forme di malattie simil coleriche, e fino a qualche anno fa erano ritenuti incapaci di provocare colera epidemico. Tuttavia, alcune epidemie di colera tipico sono state attribuite ad un seriogruppo emergente, *Vibrio cholerae O 139* o *Bengala*. Dalla sua comparsa in India ed in Bangladesh nel 1992, si è diffuso tanto rapidamente da indurre alcuni ricercatori a parlare di ottava pandemia, attualmente in corso (2).

Una ricerca del Foodborne and Diarrheal Diseases Branch del CDC (Center For Disease Control) ha evidenziato come nel triennio 1992-94 in 20 stati americani sottoposti a sorveglianza, si siano verificati 160 casi di colera (20).

### **1.5.3 *Vibrio vulnificus***

*Vibrio vulnificus* è un microrganismo alofilo, un tempo confuso con *Vibrio parahaemolyticus*, caratterizzato da diffusione ubiquitaria e presente nell'ambiente marino. Come si evince dal nome, il termine *vulnificus* deriva dal latino *vulnus* che significa ferita: questo microrganismo è infatti responsabile di infezioni localizzate come vasculiti, a seguito di contaminazioni di ferite aperte con acqua contaminata. Può anche essere causa di sepsi soprattutto in soggetti immunodepressi che hanno consumato molluschi crudi e nei quali *Vibrio vulnificus* è in grado di superare la mucosa intestinale (2).

Per alcune categorie di consumatori con patologie predisponenti (malattie epatiche, diabete, tumori) o con comportamenti a rischio (abuso di alcool) la dose infettante risulta essere molto bassa (Istituto Superiore della Sanità, nota N.4519/CNRA/AL22). I casi di setticemia si sono verificati generalmente come

conseguenza dell'ingestione di frutti di mare crudi; la setticemia primaria si sviluppa generalmente molto velocemente con esiti fatali (più del 50% entro un giorno o due) (34).

*Vibrio vulnificus* è comunemente isolato dai molluschi nei quali si trova solitamente in concentrazione inferiore rispetto a *Vibrio parahaemolyticus*, ma il suo carico può raggiungere  $10^5$  cellule/gr di mollusco quando viene raccolto da acque molto calde. Inoltre, a differenza di *Vibrio parahaemolyticus*, sembra sopravvivere anche in acque fredde tanto che in alcuni casi è stato isolato nelle coste del Maine e della Nuova Scozia, nonché in acque costiere olandesi (20).

La proteina costituente l'emolisina citotossica codificata del gene *vvhA* in *Vibrio vulnificus*, mostra una potente attività emolitica con effetti letali sui topi. Questa proteina è espressa nei ceppi virulenti e non virulenti di *Vibrio vulnificus*, suggerendo che questo non sia il fattore primario di virulenza (49).

Al momento attuale, sebbene in un recente studio si affermi la presenza di due genotipi, E (di origine ambientale) e C (di origine clinica) con quest'ultimo correlato alla patogenicità, non esistono in letteratura test affidabili che possano differenziare in modo certo i ceppi patogeni da quelli non patogeni (Istituto Superiore della Sanità, nota numero 4519CNRA/AL22).

La grande invasività di *Vibrio vulnificus* è legata ad una notevole varietà dei fattori di virulenza che gli consentono di evadere i meccanismi di difesa dell'ospite. Di questi, il principale è un polisaccaride superficiale simile ad una capsula, che rende il microrganismo resistente alla fagocitosi e all'attività del complemento. La presenza di questa capsula dà luogo a colonie opache quando il microrganismo viene coltivato su terreni solidi.

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

## 1.6 *Vibrio parahaemolyticus*

*Vibrio parahaemolyticus* presenta forma bastoncellare, ricurva e, come gli altri vibrioni alofili, appartiene alla microflora autoctona delle acque costiere. È uno dei maggiori patogeni presente negli alimenti ed è stato identificato come la principale causa di gastroenteriti alimentari in Giappone.(8)

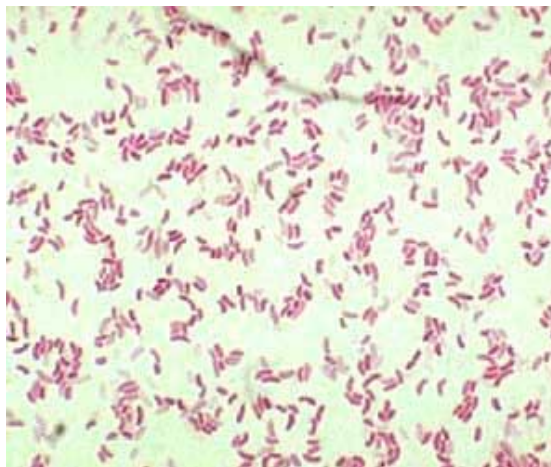


Fig. 2: *Vibrio parahaemolyticus* al microscopio  
(bacilli, Gram negativi).

Si sviluppa per lo più in ambienti con concentrazioni saline pari a 1-4 %, resiste molto bene alle variazioni di pH e si conserva in stato di quiescenza anche a temperature molto basse. La sua capacità di crescita e la sua diffusione nell'ambiente marino aumentano in relazione alle alte temperature: infatti prolifera con maggiore facilità nei mari caldi e nei periodi estivi.

*Vibrio parahaemolyticus* si ritrova tipicamente nei prodotti ittici e, sporadicamente è stato isolato da altri prodotti alimentari preparati in salagione, come ad esempio in alcune conserve vegetali.

Nei pesci e nei molluschi lo si ritrova normalmente in concentrazioni inferiori a  $10^3$  ufc/gr: se provengono da acque particolarmente calde la contaminazione può arrivare fino a  $10^6$  ufc/gr.

È un microrganismo mesofilo con optimum di crescita intorno a 37°C, in grado tuttavia di sopravvivere a temperature comprese tra 5°C e 43°C (8).

È molto sensibile al calore: 10 minuti a 50°C sono sufficienti a ridurre il carico da 10<sup>5</sup> UFC/g nell'alimento a valori non determinabili (17).

È in grado di moltiplicarsi molto velocemente (tempo di generazione inferiore a 15 minuti) nei cibi se mantenuti in abuso termico a temperature non idonee: risulta quindi importante il mantenimento della catena del freddo durante tutta la filiera alimentare. Infatti, la conservazione a temperature comprese tra 0 e 5°C è in grado di ridurre sensibilmente la velocità di crescita del microrganismo, con notevole riduzione del rischio per l'uomo.

Epidemie dovute al consumo di cibi cotti sono molto spesso causate da inadeguata cottura, cattive pratiche di lavorazione, cross-contaminazione con altri prodotti della pesca crudi o con ambienti di lavorazione contaminati. Il microrganismo non altera le caratteristiche organolettiche dell'alimento per cui è difficile capire se possa costituire un pericolo per l'uomo..

### **1.6.1 Meccanismo patogenetico**

La patogenicità di *Vibrio parahaemolyticus* sembra essere legata alla presenza di due tossine: TDH, *thermostable direct hemolysin* e TRH, *TDH-related hemolysin*, i cui geni codificanti sono rilevabili mediante tecniche biomolecolari (PCR). I ceppi patogeni sono quelli generalmente associati al fenomeno di Kanagawa, dato dalla capacità di indurre beta-emolisi su una speciale piastra di agar sangue a partire da eritrociti freschi umani o di coniglio, indotto dalla tossina TDH (2).

Oltre alla citotossicità, nel meccanismo patogenetico concorrono anche i fattori di adesività ed enterotossicità.

Le caratteristiche di adesività e citotossicità sono state valutate in monostrati cellulari di Caco-2 ed IEC-6, evidenziando l'importanza che assumono l'adesione, nel processo di colonizzazione "*in vivo*", e la citotossicità nel causare danno alla cellula ospite (54).

I sistemi di adesione cellulari (tight junctions) regolano il passaggio di soluti e fluidi attraverso gli spazi intercellulari: la produzione di TDH e/o TRH è in grado di alterare tale attività, oltre a causare una modificazione del citoscheletro di actina delle stesse cellule. Sia i ceppi tossigeni sia ceppi non tossigeni di *Vibrio parahaemolyticus*, però, possono alterare la permeabilità di membrana, per cui si suppone la presenza di altri fattori di virulenza non ancora identificati (38).

Utilizzando un monostrato cellulare IEC-6 (cellule derivate dal piccolo intestino di ratto), è stato dimostrato che la tossina provoca un aumento della concentrazione intracellulare di  $\text{Ca}^{2+}$ , per la neoformazione di pori sulla membrana cellulare che favoriscono l'ingresso dello ione. TDH potrebbe agire a livello extracellulare, legandosi a recettori di membrana e producendo un segnale che, a sua volta, stimola l'apertura dei canali del calcio. L'elevata concentrazione intracellulare di calcio non è compatibile con la sopravvivenza della cellula stessa che risponde allo stimolo tentando di eliminare rapidamente lo ione, aumentando così il fabbisogno energetico. Oltre allo ione calcio, si riscontra un passaggio all'interno delle cellule anche di altri ioni, quali sodio e manganese. Viene così ad instaurarsi una situazione di notevole stress per la cellula, che si manifesta con la formazione di filopodi, sottili proiezioni citoplasmatiche che si estendono dal fronte di avanzamento delle cellule migranti, caratteristici delle cellule carenti di nutrienti. Oltre a ciò, le cellule presentano un progressivo rallentamento del ciclo cellulare. L'azione della tossina sul monostrato è dose-dipendente; le alterazioni risultano reversibili se stimulate da basse concentrazioni di tossina (26).

L'esposizione alla tossina TDH induce anche un rallentamento del ciclo cellulare: mentre le cellule di controllo continuano la divisione cellulare ed aumentano di numero, le cellule trattate non aumentano di numero.

Gli effetti citotossici di TDH portano a degenerazione cellulare, con conseguente perdita di vitalità della cellula stessa; l'attività, oltre che dose-dipendente, è tempo-dipendente (38).

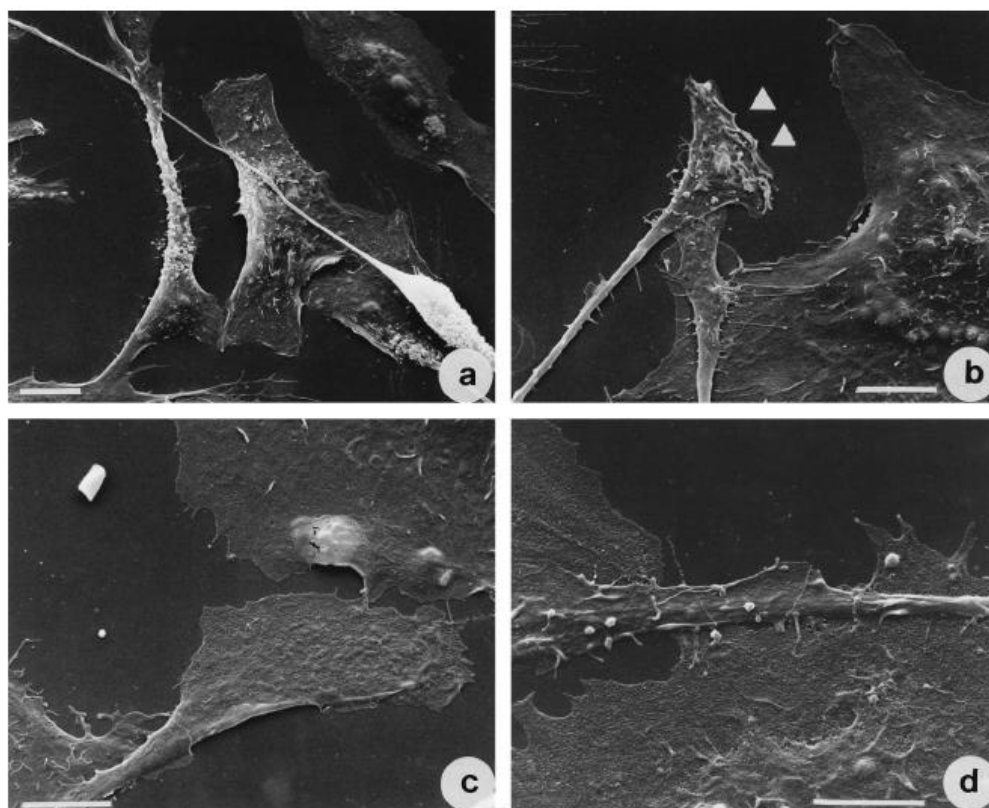


Fig. 3: Immagini al microscopio elettronico di cellule IEC-6 trattate con 2,5 HU/ml di TDH per 18 ore. Da notare i piccoli lamellipodi alle estremità dei filopodi (26).



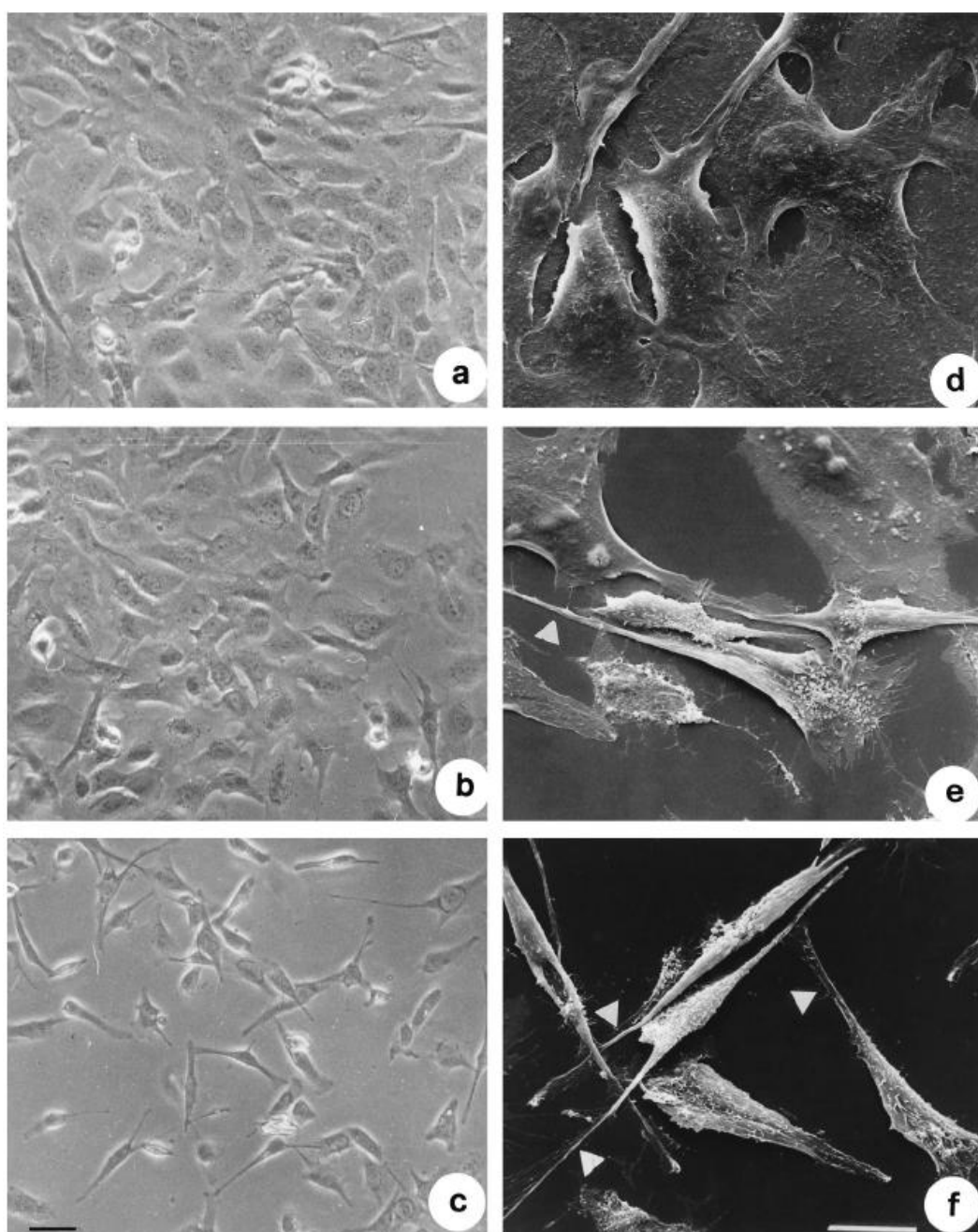


Fig. 4: Effetti di TDH su cellule IEC-6.

Immagini con contrasto di fase: controllo (a), cellule trattate con 2,5 HU (Unità Emolitiche)/ml di TDH per 2 (b) e 18 (c) ore. Immagini al microscopio elettronico: controllo (d), cellule trattate con 2,5 HU (Unità Emolitiche)/ml di TDH per 2 (e) e 18 (f) ore (26).

Diversi studi descrivono la capacità di TDH di indurre accumulo di fluidi (Fluid Accumulation, FA) a livello intestinale, anche se il meccanismo non è ancora del tutto chiaro (44).

Utilizzando la tecnica RIL (Rat Ileal Loop), che si basa sull'accumulo di fluidi nell'ansa ileale di ratto, è stato valutato il possibile ruolo dello ione  $\text{Ca}^{2+}$ , della calmodulina (CaM) e della proteinchinasi C (PKC) nel meccanismo patogenetico che porta all'accumulo di fluidi da parte di *Vibrio parahaemolyticus* TDH-produttori. Mentre lo ione calcio risulta avere un importante ruolo nella stimolazione delle secrezioni intestinali, CaM e PKC non sembrano essere coinvolte nel processo (3).

Le secrezioni dello ione  $\text{Cl}^-$ , ad esempio, sono Ca-dipendenti, e sono stimulate dalla tossina (54).

Mediante tecniche biomolecolari si evidenziano i frammenti dei geni codificanti i fattori propri di virulenza di questa specie rappresentati da *tl*, *tdh* e *trh*. Il gene *tl* codifica per una emolisina termolabile non strettamente correlata alla virulenza nell'uomo; il gene *tdh* codifica per l'emolisina termostabile TDH responsabile della beta-emolisi su agar sangue, osservata in oltre l'85% dei ceppi isolati da soggetti colpiti da gastroenteriti. Il gene *trh* contiene le informazioni per i "fattori correlati alla produzione di TDH" (nominati TRH), i quali sono stati evidenziati in ceppi di *Vibrio parahaemolyticus* negativi alla prova dell'emolisi ed isolati da soggetti colpiti da gastroenteriti (3).

Sebbene i meccanismi di questi effetti patogeni non siano ancora chiari, studi epidemiologici hanno suggerito una forte associazione tra i prodotti di *trh* con la *thermostable direct hemolysin* (TDH).

Recentemente, ceppi clinici di *Vibrio parahaemolyticus* che dimostravano un fenomeno Kanagawa-negativo dato dall'assenza del gene *tdh*, producevano una *TDH-related hemolysin* (TRH).

Il gene *trh* presenta un omologia del 68% con il gene *tdh* dimostrata da studi epidemiologici con sonde di DNA specifiche per i due geni che hanno rilevato una forte associazione tra *trh* e *tdh* nei ceppi clinici; ciò ha dimostrato come TRH sia un importante fattore di virulenza al pari di TDH. Inoltre,

variazioni di sequenza significative sono state trovate nei geni *trh* di diversi ceppi: le sonde positive *trh* manifestavano una notevole variabilità nell'intensità di ibridazione. Questo ha portato alla suddivisione in 2 sottogruppi del gene *trh*: *trh 1* e *trh 2*, con un'omologia dell'84% e con *trh 2* generante ceppi potenzialmente virulenti (3).

Il gene *toxR* era stato inizialmente scoperto come il gene regolatore dell'operone della tossina colerica e successivamente si scoprì essere coinvolto nella regolazione di tanti altri geni di *Vibrio cholerae*. È stata trovata una sottosequenza del gene in *Vibrio parahaemolyticus* e la dimostrazione della sua funzione da regolatore è stata confermata. La presenza del gene *toxR* identifica solo la specie *Vibrio parahaemolyticus* ma non la tossigenicità, che è confermata dalla presenza delle tossine TDH o TRH (sia che vi siano entrambe o una sola).

Di *Vibrio parahaemolyticus* si conoscono numerosi sierotipi in base agli antigeni O e K: le epidemie, in forte aumento in Giappone ed in Thailandia, sono dovute all'incremento dell'incidenza del sierotipo O3:K6. Epidemie da O3:K6 sono avvenute anche negli Stati Uniti, a seguito dell'ingestione di pesce crudo.

Secondo uno studio recente, questo ceppo dimostra la presenza del gene *tdh*, ma non di *trh* (30).

Risulta indispensabile la determinazione della patogenicità del ceppo isolato attraverso specifiche metodiche colturali o biomolecolari, poiché non tutti i ceppi di *Vibrio parahaemolyticus* sono patogeni. Ad oggi, solo pochi laboratori sono in grado di indagare i fattori di patogenicità e quindi spesso un esito di laboratorio si limita alla sola presenza di *Vibrio parahaemolyticus* nell'alimento, dato non sufficiente per dimostrarne pericolosità (2).

### **1.6.2 Fenomeno di Kanagawa**

Per *Vibrio parahaemolyticus* può essere fatta una suddivisione sulla base della reazione di Kanagawa, che determina la presenza dell'emolisina TDH, direttamente correlabile alla patogenicità, come descritto in precedenza.

Il fenomeno di Kanagawa (KP) consiste nel valutare la  $\beta$ -emolisi indotta dall'emolisina TDH su uno speciale terreno (agar di Wagatsuma).

Da numerosi studi è risultato che il 96% di 2720 ceppi isolati da pazienti con diarrea erano Kanagawa positivi, mentre solo l'1% di 650 ceppi provenienti da molluschi erano negativi. Questa evidenza suggerisce che il test di Kanagawa dovrebbe essere usato per distinguere i ceppi virulenti, considerazione rafforzata da prove in cui concentrazioni dell'ordine di  $10^{10}$  cellule di ceppi Kanagawa negativi, ingerite da volontari, non avevano portato a sintomi clinici, mentre concentrazioni tra  $2 \times 10^5$  e  $3 \times 10^7$  cellule di stipiti Kanagawa positivi erano sufficienti a produrre gastroenterite (52).

È stato dimostrato che l'attività emolitica dei ceppi KP-positivi è data dalla produzione di TDH (45); alcuni ceppi Kanagawa negativi, responsabili di gastroenterite, possiedono l'emolisina TRH (TDH-related haemolysin), distinta da TDH, ma immunologicamente correlata ad essa: l'azione emolitica di TRH non è dimostrabile sul terreno Wagatsuma agar, ma è necessario utilizzare altri terreni culturali (44).

La composizione del terreno Wagatsuma agar influenza l'espressione del fenomeno emolitico: sono state fatte prove con concentrazioni differenti di aminoacidi e carboidrati, sostanze in grado di modificare la sintesi di emolisina da parte di *Vibrio parahaemolyticus*.

- Aminoacidi

Dopo l'aggiunta al terreno di aminoacidi a concentrazioni comprese tra 0,1 e 1,0 mM, si è visto che solo il D-triptofano stimola la produzione di emolisina: come tutti i D-aminoacidi, infatti, provoca una temporanea inibizione della crescita cellulare, e durante questa fase di squilibrio metabolico si ha una parziale inibizione dei meccanismi che controllano la produzione di emolisina, con conseguente aumento della concentrazione della stessa.

L'azione del D-triptofano è pH-dipendente, e la massima produzione di emolisina si registra a pH=6,5.

Il triptofano in forma levogira inibisce l'azione dello stereoisomero D (14).

- Carboidrati

La presenza di carboidrati fermentabili in Wagatsuma agar, stimola la crescita di *Vibrio parahaemolyticus* e la produzione di emolisina.

Nella tabella seguente sono raccolti i risultati ottenuti da ceppi di *Vibrio parahaemolyticus* isolati sia da prodotti ittici sia da persone coinvolte in un episodio di tossinfezione alimentare: i ceppi dal numero 1 al 26 sono Kanagawa positivi, quelli dal 51 al 68 sono Kanagawa negativi.

| Ceppo | Nessun<br>carboidrato | Lattosio | Saccarosio | Dastrosio | Mannitolo | Mannosio | Malto<br>sio | Galattosio | Trealosio | Arabinosio |
|-------|-----------------------|----------|------------|-----------|-----------|----------|--------------|------------|-----------|------------|
| 1     | -                     | -        | -          | +         | +         | +        | +            | -          | -         | ±          |
| 3     | -                     | -        | -          | +         | +         | +        | +            | -          | +         | -          |
| 5     | -                     | -        | -          | +         | +         | +        | +            | -          | +         | -          |
| 8     | -                     | -        | -          | +         | +         | +        | +            | -          | +         | -          |
| 10    | -                     | -        | -          | +         | +         | +        | +            | ±          | +         | -          |
| 12    | -                     | -        | -          | +         | +         | +        | +            | -          | +         | +          |
| 23    | -                     | -        | -          | +         | +         | ±        | ±            | -          | -         | -          |
| 26    | -                     | -        | -          | +         | +         | +        | +            | ±          | +         | ±          |
| 51    | -                     | -        | -          | +         | -         | ±        | ±            | -          | +         | -          |
| 54    | -                     | -        | -          | +         | -         | -        | -            | -          | +         | -          |
| 56    | -                     | -        | -          | +         | -         | -        | +            | -          | +         | -          |
| 57    | -                     | -        | -          | +         | -         | ±        | +            | +          | +         | -          |
| 61    | -                     | -        | -          | +         | -         | +        | -            | -          | +         | -          |
| 62    | -                     | -        | -          | +         | -         | +        | -            | -          | -         | -          |
| 66    | -                     | -        | -          | +         | -         | ±        | +            | -          | +         | +          |
| 68    | -                     | -        | -          | +         | -         | -        | +            | +          | -         | +          |

Tab. 4: Effetti dei carboidrati sull'emolisi di Kanagawa di *Vibrio parahaemolyticus*:

+, positivo; -, negativo; ±, dubbio (16) .

I ceppi sono stati seminati su Wagatsuma agar addizionato con i diversi zuccheri allo 0,5% di concentrazione e incubati per 24 ore a 37°C: nelle piastre

prive di carboidrati e in quelle in cui sono stati aggiunti lattosio e saccarosio, non si è avuta emolisi, neanche da parte dei ceppi Kanagawa positivi.

L'emolisi si evidenzia solo in presenza di carboidrati fermentabili: da notare che alcuni zuccheri sono in grado di inibire l'attività emolitica in ceppi Kanagawa positivi, mentre altri sono in grado di stimolarla anche in ceppi Kanagawa negativi.

Il destrosio stimola l'emolisi in tutti i ceppi, in presenza di concentrazioni di NaCl del 7%.

Alte concentrazioni di NaCl favoriscono lo sviluppo nel terreno di zone di emolisi ben evidenti, mentre con il 3% di NaCl l'emolisi appare poco chiara.

La fermentazione dei carboidrati porta all'abbassamento del pH, che favorisce la crescita dei microrganismi (16).

Nelle colture a pH alcalino, dove cioè non stati aggiunti carboidrati, o con carboidrati non fermentabili, l'attività emolitica che si registra è scarsa, perchè il pH rimane sempre alcalino.

Dai dati ottenuti risulta che nel terreno di coltura si ha la massima produzione di emolisina quando il pH è compreso tra 6,5 e 5,5, valori ottenuti dopo l'aggiunta di mannitolo, il carboidrato normalmente utilizzato nell'agar Wagatsuma.

Il glucosio ed il mannosio, anch'essi rapidamente metabolizzati, abbassano il pH a valori inferiori a 5,5, con conseguente inibizione della produzione di emolisina e della crescita cellulare (14).

Risulta quindi evidente che la composizione del terreno di coltura influenza in modo evidente la sintesi dei fattori emolitici, soprattutto da parte dei ceppi a debole attività emolitica.

L'emolisi di Kanagawa può essere interpretata come l'espressione delle differenze nella produzione di emolisina dal punto di vista quantitativo (16).

### **1.6.3 Influenza degli acidi biliari sulla produzione di TDH**

A livello intestinale, gli acidi biliari svolgono un'importante azione antibatterica: l'acido glicocolico (GC) e l'acido taurocolico (TC), gli acidi coniugati di glicina e taurina, sono i maggiori costituenti della bile umana.

Un range di concentrazione di acido glicocolico e acido taurocolico compreso tra 0,03 e 0,3% favorisce la produzione di  $\beta$ -glucuronidasi da parte di *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*.

Ro Osawa *et al.* (1996) hanno valutato gli effetti degli acidi biliari sulla produzione di TDH da parte di *Vibrio parahaemolyticus*: la quantità di TDH prodotta in terreni di coltura arricchiti di acido glicocolico e acido taurocolico (5 mM/litro) risultava da 4 a 16 volte superiore rispetto alla quantità prodotta in terreni privi di acidi biliari. La quantità di TDH rilasciata da cellule lisate cresciute in presenza di acidi biliari (5 mM/litro), risultava da 4 a 32 volte maggiore rispetto a quella ottenuta da cellule lisate cresciute in assenza di acidi biliari.

Dai risultati si evince che gli acidi biliari stimolano la sintesi batterica di TDH, svolgendo un ruolo chiave nella patogenicità di *Vibrio parahaemolyticus*: si suppone che taurina e glicina, derivate dagli acidi biliari coniugati, vengano utilizzate dai batteri come substrato per la sintesi della tossina (47).

### **1.6.4 Idrolisi dell'urea come test indicatore di potenziale patogenicità**

In un lavoro svolto su 132 ceppi di *Vibrio parahaemolyticus* isolati da persone e da alimenti coinvolti in casi di tossinfezioni alimentari in Giappone, il biotipo predominante è risultato ureasi-positivo (UH<sup>+</sup>).

I ceppi sono stati classificati in 8 dei 12 sierogruppi conosciuti, e l'O4 era predominante (53%); i ceppi UH<sup>+</sup> erano 10 (7,5%), appartenenti a 5 diversi sierogruppi.

Per il test dell'idrolisi dell'urea è stato utilizzato il Christensen's urea agar, supplementato con NaCl, al fine di avere una concentrazione finale di NaCl

pari al 2%: il terreno è stato incubato a 37°C, e la lettura è stata effettuata nei 7 giorni successivi all'inoculo.

I ceppi sono stati poi identificati con altre prove biochimiche, utilizzando il sistema miniaturizzato API 20E® (Biomérieux): alcuni risultati positivi al test con il Christensen's urea agar, hanno dato risultati negativi al test dell'ureasi nella galleria API 20E®, per cui questa prova in micrometodo non è consigliata per la caratterizzazione dei ceppi.

Dal punto di vista genotipico, 106 ceppi (80% dei ceppi esaminati), presentavano il gene *tdh*, 3 (2%) presentavano sia il gene *tdh* sia il gene *trh*, 26 (20%) non possedevano il gene *tdh*, ma 2 avevano il gene *trh*. La presenza del gene *tdh* non sembra correlata alla capacità di idrolizzare l'urea: dei 106 ceppi risultati *tdh*-positivi, infatti, 100 erano UH<sup>-</sup>, e solo 6 erano UH<sup>+</sup> (Tab.5) (48).

| Antigeni<br>somatici<br>O | N° di<br>ceppi<br>Isolati | UH+<br><i>tdh</i> +<br><i>trh</i> + | UH+<br><i>tdh</i> +<br><i>trh</i> - | UH+<br><i>tdh</i> -<br><i>trh</i> + | UH+<br><i>tdh</i> -<br><i>trh</i> - | UH-<br><i>tdh</i> +<br><i>trh</i> + | UH-<br><i>tdh</i> +<br><i>trh</i> - | UH-<br><i>tdh</i> -<br><i>trh</i> + | UH-<br><i>tdh</i> -<br><i>trh</i> - |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| O:1                       | 15                        | 0                                   | 3                                   | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 7                                   | 0                                   | 5                                   |
| O:2                       | 13                        | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 10                                  | 0                                   | 3                                   |
| O:3                       | 15                        | 0                                   | 0                                   | 2                                   | 0                                   | 0                                   | 12                                  | 0                                   | 1                                   |
| O:4                       | 70                        | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 1                                   | 0                                   | 59                                  | 0                                   | 10                                  |
| O:5                       | 6                         | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 1                                   | 0                                   | 5                                   | 0                                   | 0                                   |
| O:6                       | 3                         | 3                                   | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 0                                   |
| O:8                       | 8                         | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 6                                   | 0                                   | 2                                   |
| O:10                      | 2                         | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 0                                   | 1                                   | 0                                   | 1                                   |
| <b>Totale</b>             | <b>132</b>                | <b>3</b>                            | <b>3</b>                            | <b>2</b>                            | <b>2</b>                            | <b>0</b>                            | <b>100</b>                          | <b>0</b>                            | <b>22</b>                           |

Tab.5: Sierogruppi di *V. parahaemolyticus* isolati da alimenti e persone coinvolte in casi di tossinfezione alimentare a Kanagawa, Giappone, dal 1980 al 1994 (48).

I dati di uno studio di Kaysner *et al.* (1994) svolto su molluschi raccolti nel Nord-Ovest del Pacifico, sono in disaccordo con quelli appena descritti: infatti, tutti i *Vibrio parahaemolyticus* TDH-positivi isolati, sono risultati anche in grado di idrolizzare l'urea. La maggior parte dei ceppi UH<sup>+</sup> appartenevano ai



sierogruppi O3, O4 e O5, mentre i ceppi TDH+ ai sierogruppi O4 e O5. I ceppi associati più di frequente a patologia nell'uomo appartenevano al sierogruppo O4, e sono risultati UH+ (Tab. 6) (31).

| <b>Antigeni somatici<br/>O</b> | <b>N° di ceppi<br/>isolati</b> | <b>UH-<br/>tdh-</b> | <b>UH-<br/>tdh+</b> | <b>UH+<br/>tdh-</b> | <b>UH+<br/>tdh+</b> |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>O:1</b>                     | <b>3</b>                       | <b>1</b>            | <b>0</b>            | <b>0</b>            | <b>2</b>            |
| <b>O:3</b>                     | <b>42</b>                      | <b>19</b>           | <b>0</b>            | <b>21</b>           | <b>2</b>            |
| <b>O:4</b>                     | <b>14</b>                      | <b>2</b>            | <b>0</b>            | <b>2</b>            | <b>10</b>           |
| <b>O:5</b>                     | <b>25</b>                      | <b>0</b>            | <b>0</b>            | <b>8</b>            | <b>17</b>           |
| <b>O:6</b>                     | <b>12</b>                      | <b>10</b>           | <b>0</b>            | <b>2</b>            | <b>0</b>            |
| <b>O:8</b>                     | <b>13</b>                      | <b>11</b>           | <b>0</b>            | <b>2</b>            | <b>0</b>            |
| <b>O:11</b>                    | <b>9</b>                       | <b>8</b>            | <b>0</b>            | <b>1</b>            | <b>0</b>            |
| <b>Totale</b>                  | <b>118</b>                     | <b>51</b>           | <b>0</b>            | <b>36</b>           | <b>31</b>           |

Tab.6: Sierogruppi di *V. parahaemolyticus* isolati nello Stato di Washington da ostriche e campioni di acqua e sedimento prelevati nelle zone di raccolta dal 1990 (31).

Dai dati riportati in Tab. 6 possiamo osservare che non è stata presa in considerazione la possibile correlazione tra la capacità di idrolizzare l'urea e la presenza o meno del gene *trh* come, invece, è stato fatto nello studio precedentemente descritto (31). Alla luce dei dati sopra riportati, possiamo affermare che l'idrolisi dell'urea può essere considerata un possibile marker fenotipico della presenza del gene *tdh*, al fine di effettuare un'iniziale selezione dei ceppi di *Vibrio parahaemolyticus* potenzialmente virulenti (27).

Le differenze tra i risultati dei vari lavori, probabilmente, rispecchiano le differenze geografiche nelle caratteristiche fenotipiche e genotipiche tra i ceppi isolati nel Nord-Est del Pacifico e quelli isolati nel Nord-Ovest del Pacifico (31).

### 1.6.5 Epidemiologia

Negli ultimi anni ceppi patogeni di *Vibrio parahaemolyticus* sono stati associati a epidemie di gastroenteriti in varie parti del mondo: Spagna, Tailandia, Giappone, Russia, Nord America e Sud-Est Asiatico (65).

#### Incidenza in Asia

*Vibrio parahaemolyticus* è stato per la prima volta identificato nel 1950 come causa di malattie alimentari in Giappone (23), dove furono registrati 272 casi di malattia e 20 morti associati al consumo di sardine. Venne indicato come comune agente eziologico di malattie associate al consumo di prodotti della pesca in molte regioni asiatiche (13, 24, 66) .

In Giappone tra il 1996 ed il 1998 *Vibrio parahaemolyticus* è stato ritenuto la principale causa di avvelenamento alimentare (1710 incidenze, 24.373 casi). Inoltre, è stato associato al 69% (1028 casi) delle epidemie alimentari di origine batterica (1495 casi) verificatesi in Taiwan tra 1981 ed il 2003 e al 31.1% di 5770 epidemie alimentari verificatesi in Cina tra il 1991 ed il 2001 (37).

#### Incidenza negli Stati Uniti

*Vibrio parahaemolyticus* fu per la prima volta identificato negli Stati Uniti nel 1971 come agente eziologico di 3 epidemie scoppiate nel Maryland con 425 casi di gastroenterite associati al consumo di granchi sottoposti ad un inadeguato trattamento termico.

Fino ad allora sporadici casi di infezione da *Vibrio parahaemolyticus* erano state segnalati nelle zone costiere degli Stati Uniti, legati al consumo di molluschi crudi o prodotti ittici poco cotti.

Tra il 1973 ed il 1998, approssimativamente sono stati registrati 40 episodi di infezione dal CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (23): i più importanti casi tra questi, tra il 1997 e il 1998, furono caratterizzati da più di 700 casi di malattia associati al consumo di ostriche crude nelle regioni costiere, nel nord-ovest del Pacifico e nel nord-est dell' Atlantico.

Nell'estate del 1997, nelle regioni del nord-ovest del Pacifico (Oregon, Washington, California e British Columbia of Canada) 209 casi (tra cui uno

mortale) di infezioni causate da *Vibrio parahaemolyticus* sono stati anch'essi associati al consumo di ostriche crude (CDC, 1998).

Nel 1998, 2 epidemie colpirono Washington (43 casi) ed il Texas (416 casi) (25); tra luglio e settembre dello stesso anno, un'altra piccola epidemia fu caratterizzata da 8 episodi dovuti a *Vibrio parahaemolyticus* in Connecticut, New Jersey e New York. Questi furono associate al consumo di ostriche e molluschi bivalvi raccolti in Long Island Sound of New York (CDC, 1999).

Più recente il caso in Alaska dove a bordo di una nave da crociera 14 passeggeri furono colpiti da una gastroenterite dopo il consumo di ostriche crude (41). Nell'estate del 2006, un caso analogo coinvolse 177 individui dopo aver consumato ostriche raccolte a Washington e nella British Columbia (CDC, 2006). Il susseguirsi di questi episodi indica come contaminazione delle ostriche da *Vibrio parahaemolyticus* sia una problematica legata alla sicurezza alimentare negli Stati Uniti.

#### Incidenza in Europa

Rispetto alle regioni asiatiche, in Europa si registra una minore incidenza delle infezioni causate da *Vibrio parahaemolyticus*. Tuttavia sporadiche epidemie sono state riportate in alcuni Paesi europei, come Spagna e Francia.

In Spagna nel 1989 furono registrati otto casi di gastroenterite da *Vibrio parahaemolyticus* dovuti al consumo di molluschi e prodotti ittici (43), e nel 1999 in Galizia si registrarono 64 casi associati al consumo di ostriche crude. Più recentemente, nel luglio 2004, in Spagna si registrarono 80 episodi, in occasione di un pranzo nuziale (40). Un'analisi epidemiologica associò i casi al consumo di granchi bolliti, preparati in condizioni igieniche inadeguate.

Un'importante epidemia associata al consumo di gamberetti importati dall'Asia colpì in Francia 44 persone (57).

### 1.6.6 Sintomatologia della tossinfezione da *Vibrio parahaemolyticus* nell'uomo

I ceppi patogeni di *Vibrio parahaemolyticus* sono responsabili di gastroenteriti con diarrea generalmente acquosa (a volte con presenza di sangue), vomito e crampi addominali. In circa la metà dei casi sono presenti anche febbre moderata e cefalea. La durata della sintomatologia è di 2-3 giorni, mentre il periodo di incubazione oscilla da poche ore ad alcuni giorni (in media 24 ore) (58).

Il breve periodo di incubazione ed i sintomi fanno ipotizzare che si tratti di un'infezione di tipo enterotossico; generalmente hanno decorso benigno e sono autolimitanti.

La diagnosi può essere fatta sulla base dell'anamnesi e dei sintomi clinici del paziente. Una diagnosi di certezza è data dall'isolamento del patogeno dalle feci del malato.

La via di trasmissione è quella orale, attraverso il consumo di cibi contaminati; non sembra possibile attualmente che eventuali portatori sani possano fungere da fonte di diffusione di *Vibrio parahaemolyticus*; il suo isolamento da soggetti asintomatici è infatti risultato molto raro.

| Sintomi      | Frequenza |
|--------------|-----------|
| Diarrea      | 95%       |
| Crampi       | 92%       |
| Debolezza    | 90%       |
| Nausea       | 72%       |
| Mal di testa | 48%       |
| Febbre       | 27%       |
| Vomito       | 12%       |

Tab. 7: Sintomatologia dell'infezione da *Vibrio parahaemolyticus* (51).

Data la natura batterica dell'infezione, la terapia richiede un trattamento antibiotico, accompagnato da opportuna terapia sintomatica, in particolare reidratante. La terapia, però, non abbrevia né il decorso clinico né la durata di escrezione fecale del microrganismo.

Gli antibiotici comunemente utilizzati sono tetracicline, cefalosporine di terza generazione, fluorchinoloni e aminoglicosidi. (36).

Fenomeni di antibiotico-resistenza da parte di *Vibrio parahaemolyticus* si sono registrati nei confronti di ampicillina, kanamicina, trimethoprim, cefalessina e amikacina (7, 36).

Talvolta è necessario il ricovero in ospedale per il ripristino dell'equilibrio idrosalino.

## **1.7 Problematiche igienico-sanitarie relative alla presenza di *Vibrio parahaemolyticus* nei molluschi bivalvi**

Uno studio condotto su molluschi allevati nel Mare Adriatico ha evidenziato che su 726 ceppi batterici isolati da molluschi, il 46,86% apparteneva al genere *Vibrio* e di questi il 10% era costituito da *Vibrio parahaemolyticus*. I dati subivano variazioni stagionali: l'isolamento di *Vibrio parahaemolyticus* risultava particolarmente frequente nella stagione estiva, diminuiva in autunno ed in primavera, ed era piuttosto scarso nei mesi invernali. 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 ambientali avverse.

In un'indagine svolta dall'Istituto Superiore di Sanità si è studiato il comportamento di *Vibrio parahaemolyticus* durante i processi di depurazione dei molluschi, confrontandolo con *Escherichia coli*, usato per valutare l'idoneità dei molluschi al consumo umano. I livelli massimi e minimi di concentrazione rilevati nelle acque contaminate sono rispettivamente:

- *E. coli*:  $1,5 \times 10^4$ - $11 \times 10^4$  MPN/ml

- *V. parahaemolyticus*:  $1,2 \times 10^4$ - $2,8 \times 10^4$  UFC/ml

I risultati della depurazione (Tab.8) mostrano un brusco calo della concentrazione di *E. coli* già dalle prime ore: dopo 5 ore, infatti, la concentrazione è diminuita da  $1,1 \times 10^5$  MPN/g a  $4,6 \times 10^3$  MPN/g, e a fine trattamento, cioè dopo 44 ore, si è ridotta a 240 *E. coli*/g.

Il calo della concentrazione di *V. parahaemolyticus* risulta molto meno marcato e a fine trattamento è ancora a valori intorno a  $10^3$  MPN/g (21).

| <b>Tempo (ore)</b> | <b><i>E.coli</i><br/>MPN/g</b>      | <b><i>E.coli</i><br/>%</b> | <b><i>V.parahemolyticus</i><br/>MPN/G</b> | <b><i>V.parahaemolyticus</i><br/>%</b> |
|--------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>0</b>           | <b><math>1,1 \times 10^5</math></b> | <b>100</b>                 | <b><math>7,4 \times 10^3</math></b>       | <b>100</b>                             |
| <b>5</b>           | <b><math>4,6 \times 10^3</math></b> | <b>4,2</b>                 | <b><math>2,4 \times 10^3</math></b>       | <b>32,4</b>                            |
| <b>24</b>          | <b><math>4,6 \times 10^2</math></b> | <b>0,4</b>                 | <b><math>2,4 \times 10^3</math></b>       | <b>32,4</b>                            |
| <b>44</b>          | <b><math>2,4 \times 10^2</math></b> | <b>0,2</b>                 | <b><math>1,1 \times 10^3</math></b>       | <b>14,9</b>                            |

Tab.8: Effetti della depurazione in molluschi sperimentalmente contaminati con *E. coli* e *V. parahaemolyticus* (21).

I risultati confermano la diversa risposta di *E. coli* e *V. parahaemolyticus* ai trattamenti di depurazione cui vengono sottoposti i molluschi.

In condizioni sperimentali, dopo 44 ore di trattamento in acqua ozonizzata, si ottiene un abbattimento della concentrazione iniziale che per *E. coli* risulta pari ad un fattore 1000, mentre per *V. parahaemolyticus* è pari ad un fattore 10.

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 consentire agli stabilimenti di depurazione dei molluschi di utilizzare tempi brevi, economicamente più vantaggiosi. È stato visto, però, che tali trattamenti di ridotta durata, condotti su molluschi con un'alta concentrazione di partenza di vibroni (ad esempio 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 della microflora competitiva (20).

*E. coli*, quindi, non può essere utilizzato come indice di sicurezza dei molluschi, sia perchè la sua presenza non è correlata alla naturale presenza di *V. parahaemolyticus*, sia perchè non permette di valutare la reale efficacia dei processi di depurazione nei confronti di altri microrganismi patogeni (21).

## **1.8 Decisione della Comunità Europea**

La trasmissione all'uomo di vibrioni patogeni, o potenzialmente patogeni, viene considerata tra i problemi emergenti all'attenzione della Comunità Europea che, nel 2001, ha nominato una commissione di esperti "Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health", con il compito di stilare un documento sulla valutazione del rischio relativa ai microrganismi *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, segnalati in più occasioni come responsabili di patologie per l'uomo.

Dal documento "Working document on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*", risultava che i dati disponibili erano insufficienti per la valutazione del rischio, che le patologie da consumo di prodotti della pesca in Europa imputabile ai due microrganismi erano apparentemente rare, ma che un aumento poteva essere previsto, dato l'intensificarsi del commercio internazionale, soprattutto di prodotti provenienti dall'Oriente. Inoltre, veniva sottolineata la già riferita mancanza di correlazioni tra la presenza di vibrioni patogeni e coliformi fecali o altri indicatori, e tra la quantità di vibrioni non-patogeni e di vibrioni patogeni.

*Vibrio parahaemolyticus* è considerato oggi un patogeno emergente, non classificato tra i criteri microbiologici fissati dal Reg.(CE) 2073/2005, che, tuttavia, raccomanda l'istituzione di codici di condotta per garantire

l'applicazione di buone prassi igieniche, la standardizzazione e l'armonizzazione delle tecniche di isolamento e numerazione al fine di garantire la sicurezza dei prodotti destinati al consumo umano.

La mancata introduzione di standard per *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus* nei nuovi Regolamenti viene giustificata con la mancanza di metodi di indagine sufficientemente affidabili e validati. Attualmente nella filiera tali indagini vengono effettuate prevalentemente con il solo approccio fenotipico, spesso unicamente con il micro metodo API 20E® (Biomérieux), che mostra però una percentuale di falsi positivi che può raggiungere il 30%, confermandosi, come riportato da diversi autori, un metodo inadeguato.

Numerosi studi confermano la presenza in ogni parte del mondo, compreso il Mare Adriatico, di ceppi apatogeni di *Vibrio parahaemolyticus*, sprovvisti dei geni *tdh* e/o *trh*, così come di *Vibrio cholerae*, ovvero sprovvisti dei geni *ctxA* e *tcpI*, per cui nel giudicare l'idoneità al consumo di un prodotto della pesca non si può prescindere dall'opportuna conferma degli isolati sia a livello di specie sia di possesso dei caratteri di patogenicità.

Per quanto riguarda in particolare *Vibrio parahaemolyticus*, il Ministero della Salute, consapevole dei danni economici conseguenti alla perdita di commerciabilità di prodotti oggetto di errate identificazioni, ha fatto proprie le indicazioni di uno studio appositamente commissionato, emanando la circolare DVGA-III.IX/32799/P-I/11 del 15/09/2005, con la quale viene stabilito che solamente in caso di accertamento di *Vibrio parahaemolyticus tdh+* e/o *trh+*, il prodotto può essere giudicato non idoneo al consumo (59)

Sono state studiate procedure biomolecolari per la numerazione dei vibrieni patogeni: le performance di tali tecniche sono state valutate e validate mediante utilizzo di campioni sperimentalmente e naturalmente contaminati. Le sequenze geniche specifiche per l'identificazione di *Vibrio parahaemolyticus* proposte in letteratura da diversi autori sono risultate *toxR* (678bp), *gyrB*, (285 bp), *pR72H* (711 bp) e *tl* (207 bp) (Kim Y., et al 1999, Lee C. et al 1995 e Venkateswaran K. 1997).



## 1.9 Diffusione di *Vibrio parahaemolyticus* in Italia

Dalla relazione sul sistema d'allerta comunitario relativo all'anno 2009 le notifiche trattate risultano 3204 (3040 nel 2008, 2933 nel 2007 e 2874 nel 2006), pervenute sia dalla Commissione Europea, sia da parte degli uffici periferici e degli Assessorati alla Sanità. Di queste, l'Italia ne ha effettuate 472 (pari al 14.7%), risultando, come negli anni 2008, 2007 e 2006, il primo Paese membro nel numero di segnalazioni inviate. Dopo l'Italia per numero di notifiche vi sono la Germania (412) e la Gran Bretagna (333), seguite da Spagna, Olanda e Francia (42).

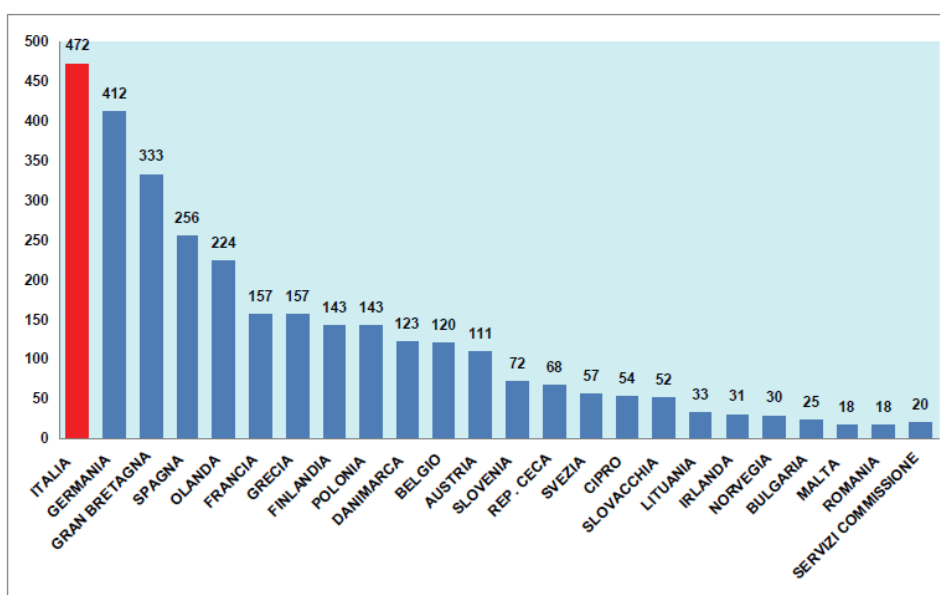


Grafico 1: Notifiche effettuate dai Paesi membri della Comunità Europea - anno 2009 (42).

Per quanto riguarda l'origine, i prodotti nazionali risultati irregolari sono stati 98 risultando il quarto Paese comunitario per numero di notifiche ricevute dopo la Germania, la Francia e la Spagna. Considerando, invece, anche i Paesi terzi, lo Stato che ha ricevuto il maggior numero di notifiche per prodotti non regolari è la Cina seguita dalla Turchia, Stati Uniti e India (42).

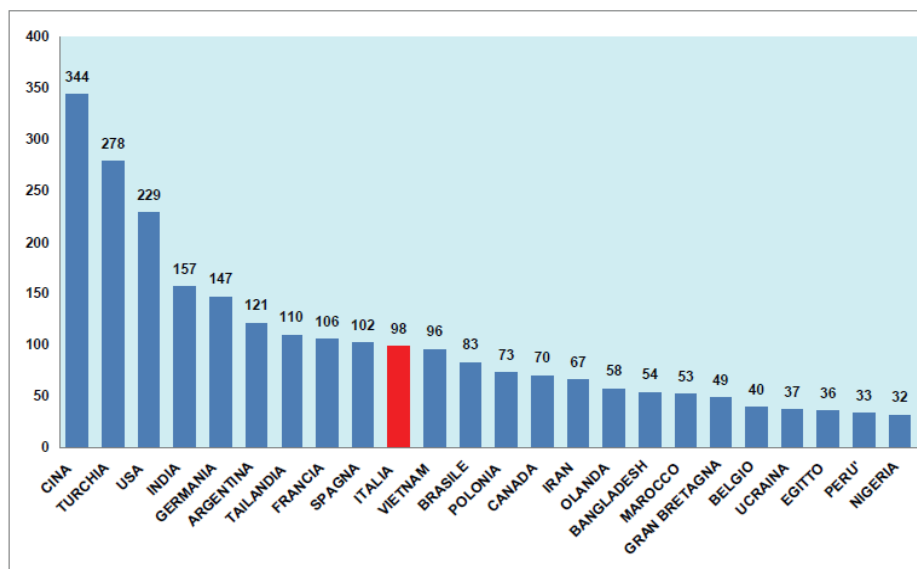


Grafico 2: Notifiche effettuate da Paesi membri e da Paesi terzi- anno 2009 (42).

Le notifiche ricevute nel corso dell'anno riferite alle diverse categorie di prodotti sono riassunte nel grafico seguente:

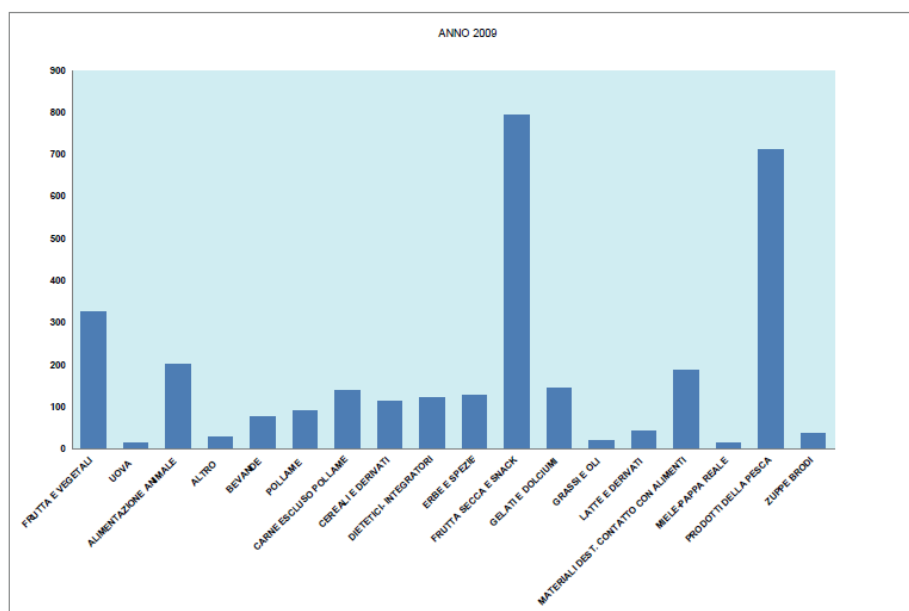


Grafico 3: notifiche pervenute alla Commissione Europea nell'anno 2009 riferite alle diverse categorie di prodotti (42).

Le principali irregolarità sono state riscontrate nella frutta secca, nei prodotti della pesca, seguiti da frutta e vegetali, prodotti per l'alimentazione animale e materiali destinati a venire a contatto con gli alimenti (42).

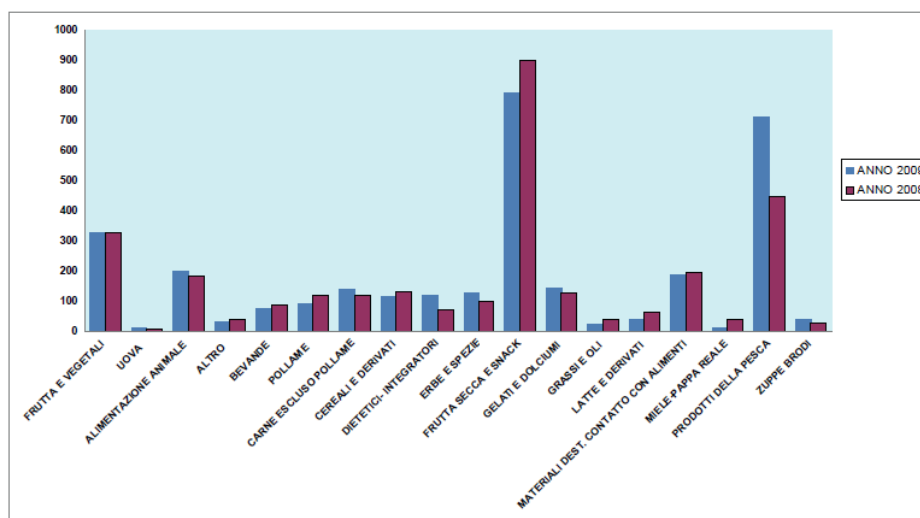


Grafico 4: notifiche pervenute alla Commissione Europea: confronto tra il 2008 e il 2009 (42).

In relazione alle notifiche pervenute sono riassunti nella Tabella 9 i principali contaminanti microbiologici e biologici, spesso riscontrati contemporaneamente.

Le frecce indicano il confronto rispetto alle segnalazioni dell'anno precedente (42):

| CONTAMINANTE                            | NOTIFICHE |
|-----------------------------------------|-----------|
| <i>Bacillo Cereus/Subtilis/Pumilius</i> | 19 ↑      |
| <i>Biotossine Algali</i>                | 8         |
| <i>Campylobacter</i>                    | 5 ↓       |
| <i>Shigella</i>                         | 1         |
| <i>E. Coli- Coliformi Fecali</i>        | 37 ↑      |
| <i>ISTAMINA (casi di Istaminosi)</i>    | 60 ↑      |
| <i>Listeria</i>                         | 78 ↑      |
| <i>Larve di Anisakis</i>                | 50        |
| <i>Norovirus</i>                        | 7         |
| <i>Altri parassiti</i>                  | 77        |
| <i>Salmonelle</i>                       | 314 ↓     |
| <i>Stafilococchi</i>                    | 2         |
| <i>Vibrio Cholerae</i>                  | 1         |

Tab. 9: Notifiche relative ai principali contaminanti biologici e microbiologici – anno 2009 (42).

Nel grafico sottostante si riporta il confronto tra gli anni 2009 e 2008.

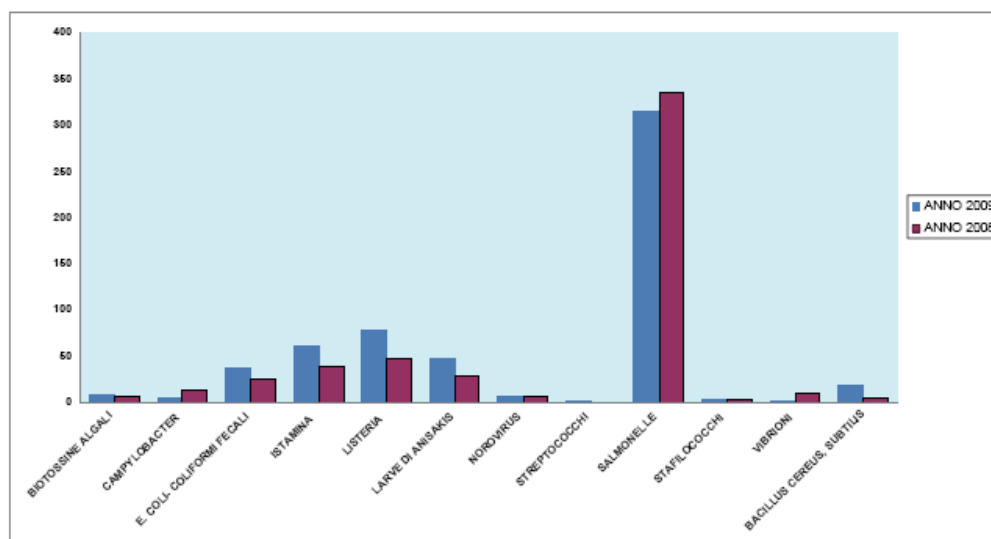


Grafico 5: principali contaminanti biologici e microbiologici: confronto tra il 2008 e il 2009 (42).

## 2. Scopo

Le tossinfezioni alimentari causate da *Vibrio parahaemolyticus* rientrano nel gruppo di malattie a trasmissione alimentare per le quali in Europa è stata stabilita una rete di sorveglianza con relativo obbligo di denuncia (Reg. (CE) 178/2002: Sistema di allerta comunitario).

La possibilità che alcuni cloni patogeni di *Vibrio parahaemolyticus*, adattati particolarmente a dare malattia nell'uomo possano diffondersi causando delle vere e proprie epidemie, rende indispensabile la standardizzazione dei sistemi di tipizzazione in grado di caratterizzare gli isolati in corso di focolai di tossinfezione alimentare, o di aggiungere informazioni relative all'ecologia di questi microrganismi negli ambienti marini (50).

Il Reg. (CE) 2073/2005 raccomanda l'istituzione di codici di condotta per garantire l'applicazione di buone prassi igieniche, la standardizzazione e l'armonizzazione delle tecniche di isolamento e numerazione di *Vibrio parahaemolyticus* al fine di garantire la sicurezza dei prodotti destinati al consumo umano, anche non considerandolo tra i criteri microbiologici applicabili agli alimenti.

Nonostante l'esistenza di linee guida per *Vibrio parahaemolyticus* in vari prodotti elaborati da diversi paesi e organismi (Olanda, 1994; Regno Unito; FDA americana, 1998; ICMSF, 1986), la determinazione del carico batterico di questo microrganismo costituisce un serio problema tecnico, a causa dell'assenza di un metodo standardizzato e della diversa sensibilità dei metodi in uso, che rendono difficoltoso il confronto dei risultati.

Il metodo ISO/TS 21872-1:2007 prevede l'assenza in 25 grammi di prodotto, ma ciò comporterebbe l'esclusione dal mercato di molte partite non conformi di prodotti della pesca importati dal nostro paese. Da questo è emersa la necessità di limitare le non conformità ai soli casi di *Vibrio parahaemolyticus* tossigeno, che presentano cioè i geni *toxR*, *trh* e *tdh* (17).

In questo lavoro di tesi ho valutato l'efficacia di un protocollo biomolecolare da applicare direttamente sugli alimenti per verificare la presenza di ceppi di *Vibrio parahaemolyticus* tossigeni. La valenza di tale metodica vuole

essere quella di disporre di uno strumento di screening diretto che, pur non prescindendo dalle tecniche colturali tradizionali, consenta l'individuazione rapida degli alimenti potenzialmente a rischio.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Isolamento e identificazione di *Vibrio*

##### ***parahaemolyticus* secondo il metodo ISO/TS 21872-1:2007**

L'isolamento di *Vibrio parahaemolyticus* da campioni di alimento può presentare alcune difficoltà dovute essenzialmente alla scarsa concentrazione del microrganismo, alla presenza di flora batterica concomitante ed alle condizioni di stress alle quali i vibrioni possono essere sottoposti (congelamento, riscaldamento, acidità, ecc.) che ne diminuiscono la vitalità. Pertanto, nella ricerca di vibrioni in campioni “non clinici” è indispensabile un prearricchimento in Acqua Peptonata Alcalina (APA), che viene svolto in due fasi: la prima fase richiede un'incubazione di 6 ore a 41,5°C per i prodotti freschi, e a 37°C per quelli surgelati, la seconda fase un'incubazione di 18 ore a 41,5°C. Un'aliquota di campione pari a 1 ml viene poi addizionata a 9 ml di Phosphate Buffered Saline (PBS) ed incubata per 16-18 ore a 35-37°C.

Dopo incubazione si procede a semina per strisciamento su piastre di TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose) agar, poi incubate per 18-24 ore a 35-37°C. Il TCBS agar favorisce la crescita di numerose specie appartenenti al genere *Vibrio*, mentre inibisce la maggior parte dei microrganismi non-*Vibrio*.

Le colonie di *Vibrio parahaemolyticus* sono rotonde, con diametro di 2-3 mm, di colore verde o verde-blu.

Da ogni piastra si prelevano tre o più colonie sospette e si trapiantano in piastre di TSA (Trypticase Soy Agar) con una concentrazione di NaCl pari al 2%; le piastre vengono poi incubate per 18-24 ore a 35-37°C. La semina in terreno non selettivo è necessaria per poter disporre di colture pure da sottoporre alle prove biochimiche.

A volte su TCBS agar può essere difficile l'identificazione delle colonie di *Vibrio parahaemolyticus*, a causa della fermentazione del saccarosio che porta allo sviluppo di una colorazione giallastra. In associazione al TCBS agar si può impiegare un terreno cromogeno, nel quale per l'identificazione non si utilizzano le fermentazioni degli zuccheri. Sul terreno CHROMagar *Vibrio* (CV) (CHROMagar Microbiology, Paris, France), *Vibrio parahaemolyticus* forma

colonie viola, dopo incubazione a 35-37°C per 20 ore; gli altri *Vibrio* non danno sviluppo di colonie o formano colonie di colori diversi. *Vibrio mimicus* e *Vibrio vulnificus*, che su terreno TCBS sono difficilmente distinguibili da *Vibrio parahaemolyticus*, danno origine a colonie verdi, mentre le colonie di *Vibrio cholerae* e *Vibrio alginolyticus* sono rispettivamente blu chiaro e bianche (52).

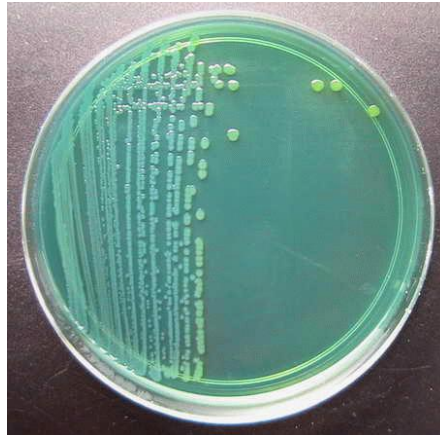


Fig.5: Colonie di *V. parahaemolyticus* su TCBS agar

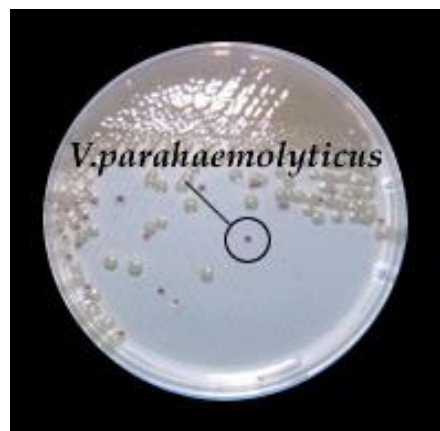


Fig.6: Colonie di *V. parahaemolyticus* su CV agar



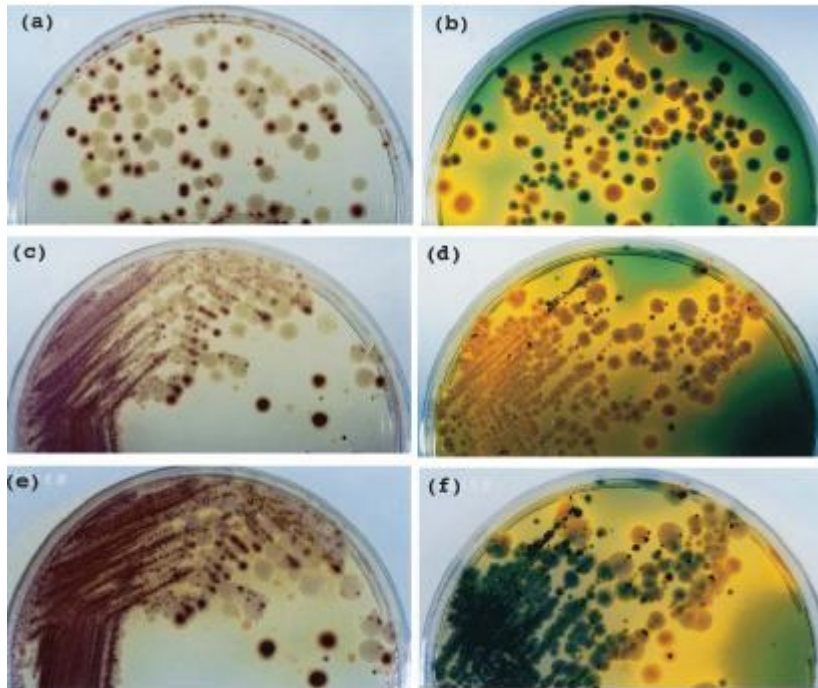


Fig. 7: piastre di CV agar (a, c, e) e di TCSB agar (b, d, f) dove sono visibili colonie caratteristiche di *Vibrio parahaemolyticus* (viola su CV agar e verdi su TCBS agar).

Le piastre a, b, c, d sono state incubate a 37°C per 18 ore, mentre la piastre e ed f sono state lasciate a temperatura ambiente per 24 ore, poi incubate a 37°C per 18 ore.

Nelle piastre di TCBS, è evidente lo sviluppo di microrganismi fermentanti il saccarosio che portano a viraggio del terreno da verde a giallo, e che possono modificare il colore delle colonie di *Vibrio parahaemolyticus*, che risultano così di difficile identificazione.

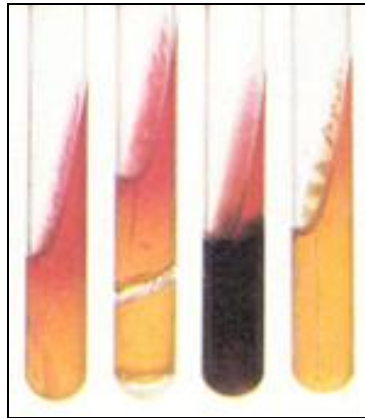
Con il CV agar, però, non si distinguono i ceppi di *Vibrio parahaemolyticus* patogeni (produttori di TDH o TRH), dai ceppi non patogeni (29).

Partendo dalle colture in TSA si eseguono le seguenti prove di conferma:

- a.** Infissione in Kligler Iron Agar;
- b.** Test dell'ossidasi;
- c.** Gallerie commerciali (es. API 20E® (Biomerieux), API 20NE® (Biomerieux)).

**a.** Colonie singole vengono seminate per infissione in Kligler Iron Agar (KIA) ed incubate per 18- 24 ore a 35-37°C.

Salvo eccezioni, *Vibrio* spp. da reazione alcalina (rossa) nel becco di clarino ed acida (gialla) nel cilindro, senza produzione di gas e di idrogeno solforato. Nessun *Vibrio* spp. (tra quelli indicati) produce  $H_2S$  o gas dal glucosio in quantità apprezzabile in KIA e TSI.



**b.** Un tampone sterile precedentemente imbibito con alcune gocce di reagente per ossidasi viene messo a contatto con una colonia su piastra di TSA. La reazione è positiva quando, entro pochi secondi, la carta assume un colore rosso scuro o blu; ad eccezione di *V. metschnikovii*, tutti i vibroni patogeni sono ossidasi positivi.

**c.** Per la caratterizzazione biochimica è possibile usare test commerciali come le gallerie API 20E® (Biomerieux) e API 20NE® (Biomerieux), impiegando come diluente NaCl al 2%.



API 20E® (Biomerieux)



API 20NE® (Biomerieux)

Utilizzando l'API 20NE® si hanno più frequentemente identificazioni corrette (maggiore sensibilità rispetto all'API 20E®); l'API 20E®, anche se ha minore sensibilità, non dà risultati falsi positivi (100% specificità), che sono invece possibili con l'API 20NE®.

Vista la bassa efficienza, è consigliabile confermare l'identificazione biochimica con metodi biomolecolari (22).

### 3.2 Ceppo utilizzato e terreni culturali impiegati

Per il presente lavoro è stato utilizzato il ceppo ATCC di *Vibrio parahaemolyticus* numero 43996.

Dal punto di vista genotipico e relativamente alla tossigenicità questo ceppo è caratterizzato dal gene *tox-R* e dai geni *tdh* e *trh* che codificano rispettivamente per la tossina termostabile TDH e per i fattori correlati alla produzione di TDH.

Tuttavia questo lavoro non intende studiare il rilevamento del gene *trh*, per il quale è prevista una successiva ottimizzazione della specifica metodica biomolecolare.

Tale ceppo è stato ripreso in acqua peptonata alcalina (APA, Oxoid) al 2% di NaCl e incubato a 37°C.

#### Acqua peptonata alcalina

Composizione:

- Peptone.....10g/l
- Sodio cloruro.....20g/l

L'acqua peptonata alcalina è stata utilizzata per il mantenimento del ceppo e per l'allestimento delle diluizioni da utilizzare nei saggi di sensibilità e di arricchimento della tecnica biomolecolare oggetto di studio.

Per la valutazione del titolo delle brodocolture è stato utilizzato il TCBS Agar, caratterizzato dalla seguente composizione:

*Tiosolfato Citrato Bile Saccarosio Agar*

- Estratto di lievito..... 5.0 g/l
- Peptone batteriologico.....10.0 g/l
- Sodio tiosolfato.....10.0 g/l
- Sodio citrato..... 10.0 g/l
- Bile di bue.....8.0 g/l
- Saccarosio.....20.0 g/l
- Sodio cloruro.....10.0 g/l
- Ferrino citrato.....1.0 g/l
- Blu di bromotimolo.....0,04 g/l
- Blu timolo.....0,04 g/l
- Agar.....14.0 g/l

Questo terreno favorisce la crescita di numerose specie appartenenti al genere *Vibrio*, mentre inibisce la maggior parte dei microrganismi non-*Vibrio*.

Dopo incubazione per 18-24 ore a 35-37°C, le colonie di *Vibrio parahaemolyticus* appaiono rotonde, con diametro di 2-3mm, di colore verde o blu-verde.

### **3.3 Determinazione del titolo delle colture batteriche**

La valutazione quantitativa del carico microbico presente nelle colture impiegate nelle varie prove sperimentali è stata condotta mediante conta su TCBS agar ed espresso in ufc/ml.

Dopo avere allestito una serie di diluizioni seriali decimali delle colture da titolare, aliquote di 0,1 ml di ciascuna sono state seminate per spatolamento, in doppio, su piastre TCBS agar e poste ad incubare a 35-37°C per 24 ore.

Dopo incubazione si è proceduto al conteggio delle colonie ed al calcolo del titolo, espresso in ufc/ml, ricavato applicando la seguente formula:

$$N \text{ ufc/ml} = \Sigma / [V (n_1 + 0,1 n_2) d]$$

$\Sigma$  : sommatoria colonie alle diluizioni considerate

V : volume inoculo

$n_1$  : numero piastre 1<sup>a</sup> diluizione considerata

$n_2$  : numero piastre 2<sup>a</sup> diluizione considerata

d : prima diluizione considerata

intervallo di validità lettura: 5 – 300 colonie

### 3.4 Protocollo di estrazione del DNA batterico

Per l'estrazione del DNA batterico è stata impiegata una tecnica che prevede l'impiego di una resina chelante, Chelex 6%, ad alta affinità per ioni metallici (InstaGene™ Matrix-BIO RAD). Il protocollo adottato era conforme a quello indicato dalla ditta produttrice.

Aliquote di 500 µl delle brodocolture da analizzare sono state centrifugate a 11.000 rpm per 6 minuti allo scopo di separare il pellet batterico. Dopo l'eliminazione del surnatante si è proceduto ad un lavaggio, aggiungendo 500 µl di acqua sterile. Le cellule sono state quindi risospese mediante agitazione su vortex e centrifugate a 11.000 rpm per 6 minuti.

Il surnatante è stato nuovamente allontanato e al sedimento sono stati aggiunti 200 µl di resina chelante. I campioni sono stati posti in bagno termostatico a 56°C per 30 minuti e successivamente vortexati per 10 secondi;

quindi sono stati sottoposti a trattamento termico a 100°C per 8 min in termoblocco

Infine la resina è stata sedimentata mediante centrifugazione a 7000 rpm per 5 minuti ed il surnatante (170-180 µl) raccolto. Gli estratti così ottenuti sono stati quindi subito sottoposti a PCR oppure stoccati a -20°C. Prima di procedere alla successiva analisi mediante PCR, gli estratti sono stati ulteriormente centrifugati allo scopo di sedimentare ogni eventuale residuo di resina che potesse determinare fenomeni di interferenza con il metodo biomolecolare.

### **3.5 PCR (Polymerase Chain Reaction)**

La PCR è un metodo in vitro rapido e versatile che consente di ottenere numerose copie di una specifica sequenza di DNA bersaglio presente nel campione da analizzare quando sono note le sue estremità. Durante la reazione di PCR viene replicata e amplificata selettivamente la sequenza target delimitata da due oligonucleotidi sintetici detti primers, i quali sono complementari alle sue terminazioni 3' e 5'.

Nel presente lavoro, per l'amplificazione dei frammenti genici in esame sono state applicate due diverse metodiche di PCR che consentono il rilevamento di due specifici geni, rispettivamente il gene *tox-R*, che identifica solo la specie *Vibrio parahaemolyticus* (32) e il gene *tdh* caratteristico dell'emolisina termostabile prodotta da *Vibrio parahaemolyticus*, determinando quindi la tossigenicità della specie in esame (6).

#### **3.5.1 Primers utilizzati**

Per ogni metodica PCR è stata impiegata una coppia di primers, ciascuna specifica per l'amplificazione del gene *tox-R* e *tdh*:

- 1)      *toxR* for: 5' GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG 3'  
         *toxR* rev: 5' ATA CGA GTG GTT GCT GTC ATG 3'

specifici per la regione codificante per *tox-R* e avente dimensioni di 368 bp

- 2)      *tdh* for: 5' GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC 3'  
           *tdh* rev: 5' TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC 3'

specifici per la regione codificante per *tdh* e avente dimensioni di 269 bp.

### 3.5.2 Protocollo di amplificazione del DNA mediante PCR per il gene *toxR* (32)

Un' aliquota di 2,5 µl di ciascun campione di DNA estratto da analizzare è stata aggiunta a 22,5 µl di master mix avente un volume finale di 25 µl e la composizione riportata in tabella 10.

L'amplificazione è stata effettuata in termocicizzatore Eppendorf (MasterCycler) secondo il profilo termico riportato in tabella 11.

| Reagente                                                    | Concentrazione iniziale | Concentrazione finale |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Taq buffer con KCl e privo di MgCl <sub>2</sub> (Fermentas) | 10X                     | 1X                    |
| dNTPs mix (Fermentas)                                       | 10 mM                   | 0,2 mM                |
| <i>Tox-R</i> rev                                            | 10 µM                   | 0.4 µM                |
| <i>Tox-R</i> for                                            | 10 µM                   | 0.4 µM                |
| Taq DNA Polymerase (Fermentas)                              | 5 U/µl                  | 0,025 U/µl            |
| MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)                               | 25 mM                   | 3mM                   |
| Water nuclease free (Fermentas)                             |                         |                       |

Tab.10: Composizione master mix (*tox-R*).

| Step                   | Temperature | Tempi          | Cicli    |
|------------------------|-------------|----------------|----------|
| Denaturazione iniziale | 94°C        | 5 min          | 1 ciclo  |
| Denaturazione          | 94°C        | 1 min          | 20 cicli |
| Annealing              | 63°C        | 1 min e 30 sec | 20 cicli |
| Estensione             | 72°C        | 1 min e 30 sec | 20 cicli |
| Estensione finale      | 72°C        | 7 min          | 1 ciclo  |

Tab.11: Profilo termico del gene *tox-R*.

### 3.5.3 Protocollo di amplificazione del DNA mediante PCR per il gene *tdh* (6)

Un' aliquota di 2,5 µl di ciascun campione di DNA estratto da analizzare è stata aggiunta a 22,5 µl di master mix avente un volume finale di 25 µl e la composizione riportata in tabella 12.

L'amplificazione è stata effettuata in termocicizzatore Eppendorf (MasterCycler) secondo il profilo termico riportato in tabella 13.

| Reagente                                                    | Concentrazione iniziale | Concentrazione finale |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Taq buffer con KCl e privo di MgCl <sub>2</sub> (Fermentas) | <b>10X</b>              | <b>1X</b>             |
| dNTPs mix (Fermentas)                                       | 10 mM                   | 0,2 mM                |
| <i>Tdh</i> rev                                              | 10 µM                   | 1 µM                  |
| <i>Tdh</i> for                                              | 10 µM                   | 1 µM                  |
| Taq DNA Polymerase (Fermentas)                              | 5 U/µl                  | 0,05 U/µl             |
| MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)                               | 25 mM                   | 2 mM                  |
| Water nuclease free (Fermentas)                             |                         |                       |

Tab.12: Composizione master mix (*tdh*).



| Step                   | Temperature | Tempi | Cicli    |
|------------------------|-------------|-------|----------|
| Denaturazione iniziale | 94°C        | 3 min | 1 ciclo  |
| Denaturazione          | 94°C        | 1 min | 30 cicli |
| Annealing              | 58°C        | 1 min | 30 cicli |
| Estensione             | 72°C        | 1 min | 30 cicli |
| Estensione finale      | 72°C        | 5 min | 1 ciclo  |

Tab.13: Profilo termico del gene *tdh*.

### 3.6 Corsa elettroforetica

La corsa elettroforetica per il rilevamento dei risultati dell'amplificazione genica è stata eseguita utilizzando un gel di agarosio (Sigma) al 2,5% allestito in TAE ed addizionato di etidio bromuro (AppliChem).

Aliquote di 10 µl dei campioni sottoposti a PCR sono state addizionate con 2 µl di colorante (6X Mass Ruler™ Loading Dye, Fermentas) e caricate sul gel insieme al marker di corsa (MassRuler™ DNA ladder, Low Range, Fermentas); la corsa è stata condotta a 120 volt per circa 1 ora e mezza. Successivamente si è proceduto alla lettura al transiluminatore a raggi UV per il rilevamento delle bande amplificate e i risultati sono stati registrati mediante documentazione fotografica.

### 3.7 Prove di sensibilità

Per entrambe le metodiche adottate inizialmente sono state condotte inizialmente prove di sensibilità allo scopo di saggiare la soglia di rilevamento delle metodiche di PCR applicate.

A partire da una coltura batterica del ceppo impiegato incubata a 37°C per circa 24 ore in Acqua Peptonata Alcalina sono state allestite nello stesso brodo colturale diluizioni decimali fino a 10<sup>-8</sup>, poi utilizzate per la determinazione del

titolo della coltura. La brodocoltura iniziale (tal quale) e le diluizioni decimali sono state sottoposte ad estrazione del DNA e quindi ad amplificazione mediante PCR secondo i protocolli già descritti.

### **3.8 Prove di arricchimento**

Le prove di arricchimento sono state condotte utilizzando le stesse diluizioni seriali impiegate per le prove di sensibilità; queste sono state incubate a 37°C per tempi predefiniti e da ognuna sono stati prelevati 500 µl da sottoporre a PCR.

I campionamenti sono stati condotti dopo 6 e 24 ore di incubazione in una prima serie di prove.

I campioni ottenuti sono poi stati sottoposti a PCR per entrambi i geni in esame.

Alla luce dei risultati ottenuti dalla prima serie di prove di sensibilità e arricchimento condotte, si è ritenuto interessante introdurre nella metodica di sensibilità l'esecuzione di una seconda PCR relativa al gene *tox-R* per valutare l'eventuale miglioramento della soglia di rilevamento della specie *Vibrio parahaemolyticus*.

Una scelta analoga è stata fatta anche per le prove di arricchimento; in questo caso però si è proceduto riducendo anche i tempi ed eseguendo una seconda serie di prove con campionamento dopo 4 ore di incubazione.

## 4. Risultati

Al fine di ottimizzare i protocolli biomolecolari finalizzati alla ricerca del gene *tox-R*, specifico per l'identificazione di *Vibrio parahaemolyticus* e del gene *tdh*, caratteristico dell'emolisina termostabile prodotta dal microrganismo, sono state eseguite delle prove sperimentali per testare diverse concentrazioni di  $\text{MgCl}_2$  delle master mix in uso (1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM).

Dai risultati è emerso che con una concentrazione finale di questo reagente pari a 3 mM per la ricerca del *tox-R* e di 2 mM per la ricerca del *tdh*, era possibile ottenere risultati più affidabili sia in termini di intensità che di specificità del segnale. Concentrazioni diverse comportavano assenza di rilevamento o presenza di prodotti aspecifici.

Queste concentrazioni di  $\text{MgCl}_2$  sono state, quindi, adottate nelle master mix delle metodiche già descritte.

### 4.1 Prove di sensibilità *tox-R*

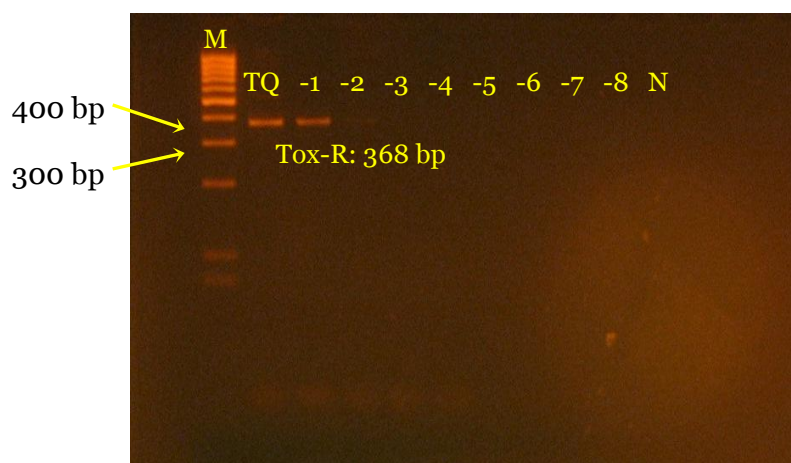
Nelle prove condotte, sono state utilizzate brodoculture di *Vibrio parahaemolyticus* aventi titoli compresi tra  $1,05 \times 10^8$  ufc/ml e  $7,72 \times 10^8$  ufc/ml; l'ordine di grandezza è sempre stato di 8 unità logaritmiche e mediamente corrispondente a  $2,80 \times 10^8$  ufc/ml.

Relativamente al gene *tox-R*, i risultati ottenuti hanno mostrato una soglia di rilevamento piuttosto alta; infatti nel 93,3% delle prove sono state rilevate positività solo per i primi campioni testati (campione tal quale e diluizione  $10^{-1}$ ) con un titolo corrispondente all'ordine di  $10^7$  ufc/ml. Solo in una prova è risultata positiva anche la diluizione  $10^{-2}$  con un titolo corrispondente all'ordine di  $10^6$  ufc/ml (Tabella 14).

Vista la coerenza dei risultati delle altre prove, in particolar modo delle prove 6 e 7 con titoli di partenza più alti, il dato di sensibilità relativo alla prova 1 è attribuibile ad una variabilità del tutto casuale.

| <b>N° prova</b> | <b>Titolo<br/>(ufc/ml)</b> | <b>Soglia di<br/>sensibilità<br/>Ultima diluizione rilevata</b> | <b><i>tox-R</i></b> |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1               | $3,62 \times 10^8$         | $10^{-2}$                                                       | +                   |
| 2               | $1,52 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |
| 3               | $2,19 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |
| 4               | $2,15 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |
| 5               | $1,40 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |
| 6               | $7,72 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |
| 7               | $6,09 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |
| 8               | $1,05 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |
| 9               | $1,63 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |
| 10              | $1,49 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |
| 11              | $3,11 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |
| 12              | $1,75 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |
| 13              | $2,31 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |
| 14              | $2,59 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |
| 15              | $3,34 \times 10^8$         | $10^{-1}$                                                       | +                   |

Tab.14: Risultati delle prove di sensibilità relative al gene *tox-R* condotte in acqua peptonata alcalina al 2% di NaCl.



M: marker, N: controllo negativo, TQ:  $10^8$  ufc/ml, -1:  $10^7$  ufc/ml, -2:  $10^6$  ufc/ml, -3:  $10^5$  ufc/ml, -4:  $10^4$  ufc/ml, -5:  $10^3$  ufc/ml, -6:  $10^2$  ufc/ml, -7:  $10^1$  ufc/ml, -8:  $10^0$  ufc/ml.

Fig.8: Rilevamento fotografico degli amplificati in una delle prove (n.2) di sensibilità eseguite.

La figura 8 mostra, a titolo esemplificativo, l'immagine della corsa elettroforetica relativa alla prova 2.

## 4.2 Prove di incubazione *tox-R*

I risultati delle prove di incubazione testate a 6 e 24 ore, eseguite sulle diluizioni negative delle prove di sensibilità, sono riportati in tabella 15.

| N° prove | Titolo             | Soglia di sensibilità a diversi tempi di incubazione<br>Ultima diluizione rilevata |           |           |
|----------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|
|          |                    | To                                                                                 | T6        | T24       |
| 1        | $3,62 \times 10^8$ | $10^{-2}$                                                                          | $10^{-6}$ | $10^{-8}$ |
| 2        | $1,52 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| 3        | $2,19 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| 4        | $2,15 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| 5        | $1,40 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| 6        | $7,72 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| 7        | $6,09 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| 8        | $1,05 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| 9        | $1,63 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| 10       | $1,49 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| 11       | $3,11 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| 12       | $1,75 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| 13       | $2,31 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| 14       | $2,59 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| 15       | $3,34 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                                                          | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |

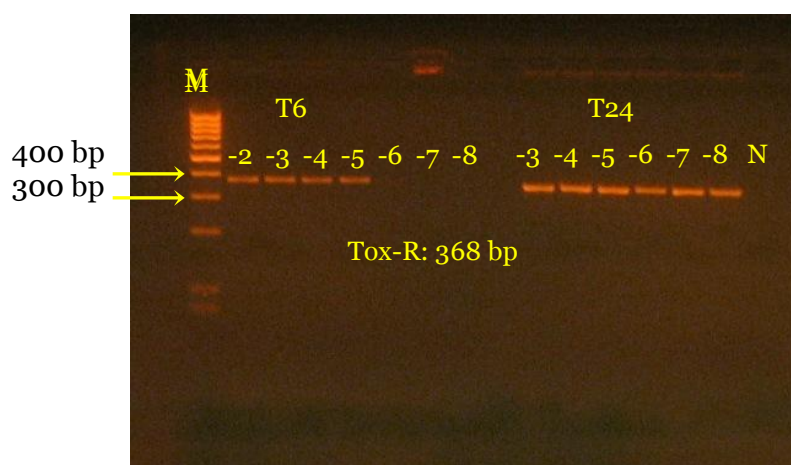
Tab.15: Risultati delle prove di incubazione relative al gene *tox-R*, valutazione della soglia di sensibilità.

Come prevedibile, si è verificata una progressiva positivizzazione dei campioni all'aumentare del tempo di incubazione.

Dopo 6 ore di incubazione, in quattordici prove il limite di rilevabilità è risultato dell'ordine di  $10^3$  ufc/ml e solo nella prova 1, che ha dato una migliore sensibilità già in assenza di incubazione, il limite di rilevabilità è risultato dell'ordine di  $10^2$  ufc/ml.

Dopo 24 ore di incubazione si è, invece, avuta una completa positivizzazione di tutte le diluizioni applicate alle brodoculture in esame.

La figura 9 mostra, a titolo esemplificativo, l'immagine della corsa elettroforetica relativa alla prova 4.



M: marker, N: controllo negativo, -2:  $10^6$  ufc/ml, -3:  $10^5$  ufc/ml, -4:  $10^4$  ufc/ml, -5:  $10^3$  ufc/ml, -6:  $10^2$  ufc/ml, -7:  $10^1$  ufc/ml, -8:  $10^0$  ufc/ml.

Fig. 9: Rilevamento fotografico degli amplificati in una delle prove (n.4) di incubazione eseguite a 6 e a 24 ore.

### 4.3 PCR booster *tox-R*

Dai risultati ottenuti si deduce che la sensibilità della metodica PCR relativamente al gene *tox-R* risulta essere bassa, soprattutto in assenza di incubazione; è sembrato quindi interessante verificare l'effetto di una PCR booster allo scopo di migliorare il risultato in termini di rilevabilità della specie *Vibrio parahaemolyticus*.

Sono state condotte cinque prove sperimentali, utilizzando brodocolture di *Vibrio parahaemolyticus* aventi titoli compresi tra  $1,05 \times 10^8$  ufc/ml e  $7,72 \times 10^8$  ufc/ml; l'ordine di grandezza è sempre stato di 8 unità logaritmiche e mediamente corrispondente a  $3,21 \times 10^8$  ufc/ml.

La PCR booster è stata studiata sia sulla soglia di sensibilità al tempo 0, sia dopo incubazione di arricchimento, in questo caso riducendo i tempi di incubazione a 4 ore.

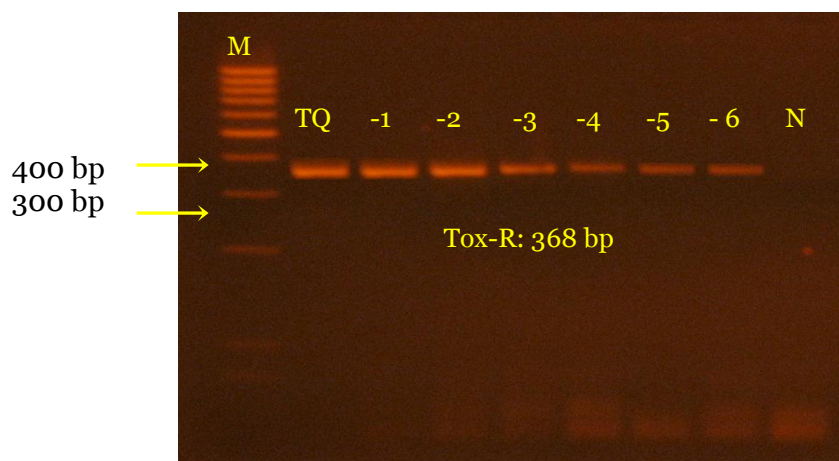
La tabella 16 mostra l'effetto di aumento della sensibilità a seguito della realizzazione della doppia amplificazione con un rilevamento di positività anche alle alte diluizioni.

In particolare, in tutte le prove sono risultati positivi i campioni aventi titoli dell'ordine di  $10^2$  ufc/ml, con la sola eccezione della prova 3 dove è stata rilevata la completa positività per tutte le diluizioni considerate.

| N° prova | Titolo (ufc/ml)    | Soglia di sensibilità<br>Ultima diluizione rilevata |            |
|----------|--------------------|-----------------------------------------------------|------------|
|          |                    | To                                                  | To booster |
| 1        | $1,25 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                           | $10^{-6}$  |
| 2        | $1,05 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                           | $10^{-6}$  |
| 3        | $1,40 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                           | $10^{-8}$  |
| 4        | $7,72 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                           | $10^{-6}$  |
| 5        | $6,09 \times 10^8$ | $10^{-1}$                                           | $10^{-6}$  |

Tab.16: Risultati delle prove di sensibilità con singola e doppia amplificazione.

La figura 10 mostra, a titolo esemplificativo, l'immagine della corsa elettroforetica relativa alla prova 4.



M: marker, N: controllo negativo, TQ:  $10^8$  ufc/ml, -1:  $10^7$  ufc/ml, -2:  $10^6$  ufc/ml, -3:  $10^5$  ufc/ml, -4:  $10^4$  ufc/ml, -5:  $10^3$  ufc/ml, -6:  $10^2$  ufc/ml.

Fig.10: Rilevamento fotografico del gene *tox-R* in una delle prove di sensibilità (n.4) con doppia amplificazione.

Come riportato in tabella 17 dopo 4 ore di incubazione, eseguendo una singola amplificazione sono state rilevate positività fino alla diluizione di  $10^{-3}$  (a partire da un titolo dell'ordine di  $10^8$ ) in tre delle cinque prove eseguite.

Relativamente alle prove 4 e 5, i cui titoli iniziali risultavano più elevati, avvicinandosi alla soglia di  $10^9$  ufc/ml, sono state rilevate positività fino alla diluizione di  $10^{-5}$ .

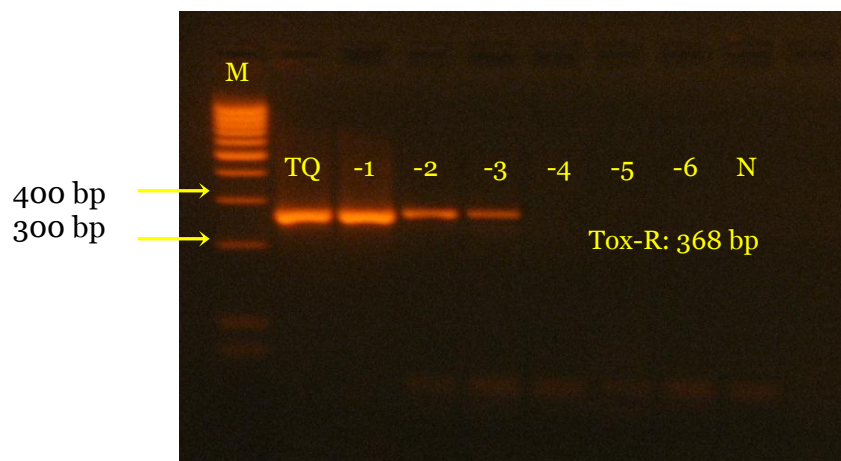
La doppia amplificazione ha portato alla positivizzazione di tutte le diluizioni in esame.

| N° prova | Titolo (ufc/ml)    | Soglia di sensibilità      |            |
|----------|--------------------|----------------------------|------------|
|          |                    | Ultima diluizione rilevata |            |
|          |                    | T4                         | T4 booster |
| 1        | $1,25 \times 10^8$ | $10^{-3}$                  | $10^{-8}$  |
| 2        | $1,05 \times 10^8$ | $10^{-3}$                  | $10^{-8}$  |
| 3        | $1,40 \times 10^8$ | $10^{-3}$                  | $10^{-8}$  |
| 4        | $7,72 \times 10^8$ | $10^{-5}$                  | $10^{-8}$  |
| 5        | $6,09 \times 10^8$ | $10^{-5}$                  | $10^{-8}$  |

Tab. 17: Risultati delle prove di sensibilità con singola e doppia amplificazione

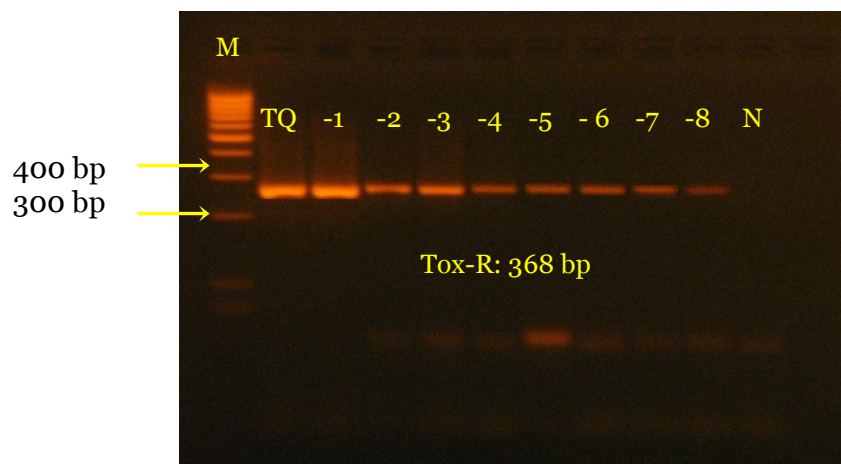


Le figure 11 e 12 mostrano, a titolo esemplificativo, le immagini delle corse elettroforetiche relative alla prova 2.



M: marker, N: controllo negativo, TQ:  $10^8$  ufc/ml, -1:  $10^7$  ufc/ml -2:  $10^6$  ufc/ml, -3:  $10^5$  ufc/ml, -4:  $10^4$  ufc/ml, -5:  $10^3$  ufc/ml, -6:  $10^2$  ufc/ml.

Fig. 11: Rilevamento fotografico del gene *tox-R* della prova n°2 dopo 4 ore di incubazione.



M: marker, N: controllo negativo, TQ:  $10^8$  ufc/ml, -1:  $10^7$  ufc/ml -2:  $10^6$  ufc/ml, -3:  $10^5$  ufc/ml, -4:  $10^4$  ufc/ml, -5:  $10^3$  ufc/ml, -6:  $10^2$  ufc/ml, -7:  $10^1$  ufc/ml, -8:  $10^0$  ufc/ml.

Fig.12: Rilevamento fotografico del gene *tox-R* della prova n°2 dopo 4 ore di incubazione e con doppia amplificazione.

#### 4.4 Prove di sensibilità *tdh*

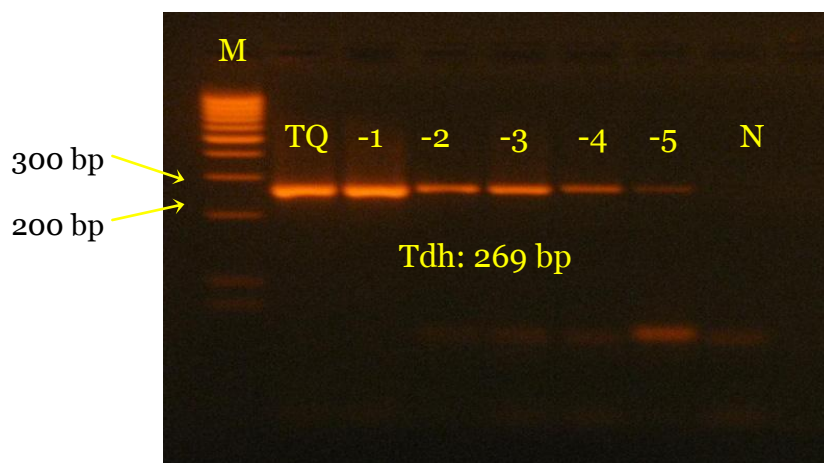
Nelle quindici prove condotte sono state utilizzate brodocolture di *Vibrio parahaemolyticus* aventi titoli compresi tra  $1,40 \times 10^8$  ufc/ml e  $3,71 \times 10^8$  ufc/ml; l'ordine di grandezza è sempre stato di 8 unità logaritmiche.

In nove prove su quindici sono state rilevate positività fino alla diluizione corrispondente al titolo dell'ordine di  $10^3$  ufc/ml, tre prove hanno prodotto una soglia di sensibilità dell'ordine di  $10^2$  ufc/ml e tre dell'ordine di  $10^0$  ufc/ml come riportato in Tabella 18.

Il limite di rilevamento della metodica è dell'ordine di  $10^3$ - $10^2$  ufc/ml, nettamente migliore rispetto a quello ottenuto relativamente al gene *tox-R*.

| <b>N° prova</b> | <b>Titolo<br/>(ufc/ml)</b>           | <b>Soglia di<br/>sensibilità<br/>Ultima diluizione<br/>rilevata</b> | <b><i>Tdh</i></b> |
|-----------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------|
| <b>1</b>        | <b><math>3,62 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-8}</math></b>                                         | +                 |
| <b>2</b>        | <b><math>1,52 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-5}</math></b>                                         | +                 |
| <b>3</b>        | <b><math>2,19 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-6}</math></b>                                         | +                 |
| <b>4</b>        | <b><math>2,15 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-5}</math></b>                                         | +                 |
| <b>5</b>        | <b><math>1,40 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-5}</math></b>                                         | +                 |
| <b>6</b>        | <b><math>2,07 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-5}</math></b>                                         | +                 |
| <b>7</b>        | <b><math>2,36 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-6}</math></b>                                         | +                 |
| <b>8</b>        | <b><math>1,67 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-5}</math></b>                                         | +                 |
| <b>9</b>        | <b><math>3,54 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-8}</math></b>                                         | +                 |
| <b>10</b>       | <b><math>3,71 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-8}</math></b>                                         | +                 |
| <b>11</b>       | <b><math>1,83 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-5}</math></b>                                         | +                 |
| <b>12</b>       | <b><math>2,41 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-6}</math></b>                                         | +                 |
| <b>13</b>       | <b><math>1,98 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-5}</math></b>                                         | +                 |
| <b>14</b>       | <b><math>1,77 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-5}</math></b>                                         | +                 |
| <b>15</b>       | <b><math>1,58 \times 10^8</math></b> | <b><math>10^{-5}</math></b>                                         | +                 |

Tab.18: Risultati delle prove di sensibilità relative condotte in acqua peptonata alcalina al 2% di NaCl.



M: marker, N: controllo negativo, TQ:  $10^8$  ufc/ml, -1:  $10^7$  ufc/ml -2:  $10^6$  ufc/ml, -3:  $10^5$  ufc/ml, -4:  $10^4$  ufc/ml, -5:  $10^3$  ufc/ml.

Fig.13: Rilevamento fotografico degli amplificati in una delle prove (n.5) di sensibilità eseguite.

La figura 13 mostra, a titolo esemplificativo, l'immagine della corsa elettroforetica relativa alla prova 5.

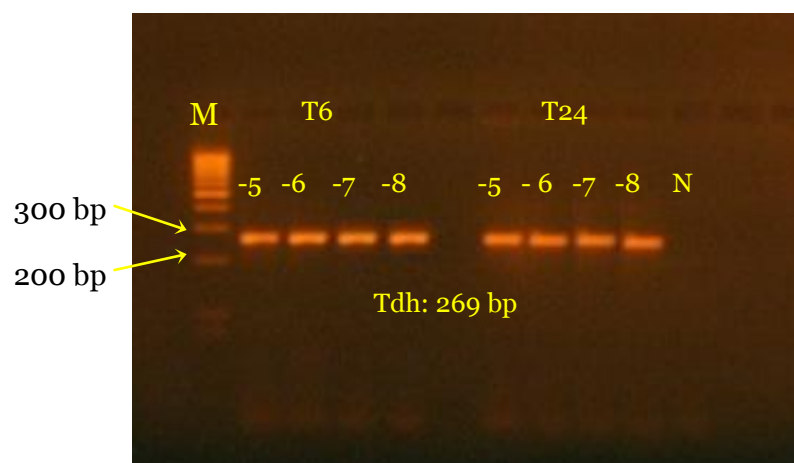
#### 4.5 Prove di incubazione *tdh*

Anche le prove di incubazione hanno fornito risultati migliori rispetto a quelli ottenuti relativamente al gene *tox-R*; è stata infatti osservata, in tutte le prove, una completa positivizzazione delle diluizioni analizzate già dopo 6 ore di incubazione (tabella 19).

| N° prove | Titolo             | Soglia di sensibilità a diversi tempi di incubazione<br>Ultima diluizione rilevata |           |           |
|----------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|
|          |                    | To                                                                                 | T6        | T24       |
| 1        | $3,62 \times 10^8$ | $10^{-8}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 2        | $1,52 \times 10^8$ | $10^{-5}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 3        | $2,19 \times 10^8$ | $10^{-6}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 4        | $2,15 \times 10^8$ | $10^{-5}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 5        | $1,40 \times 10^8$ | $10^{-5}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 6        | $2,07 \times 10^8$ | $10^{-5}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 7        | $2,36 \times 10^8$ | $10^{-6}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 8        | $1,67 \times 10^8$ | $10^{-5}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 9        | $3,54 \times 10^8$ | $10^{-8}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 10       | $3,71 \times 10^8$ | $10^{-8}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 11       | $1,83 \times 10^8$ | $10^{-5}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 12       | $2,41 \times 10^8$ | $10^{-6}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 13       | $1,98 \times 10^8$ | $10^{-5}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 14       | $1,77 \times 10^8$ | $10^{-5}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |
| 15       | $1,58 \times 10^8$ | $10^{-5}$                                                                          | $10^{-8}$ | $10^{-8}$ |

Tab. 19: Risultati delle prove di incubazione, valutazione della soglia di sensibilità.

La figura 14 mostra, a titolo esemplificativo, l'immagine della corsa elettroforetica relativa alla prova 5.



M: marker, N: controllo negativo, -5:  $10^3$  ufc/ml, -6:  $10^2$  ufc/ml, -7:  $10^1$  ufc/ml, -8:  $10^0$  ufc/ml.

Fig. 14: Rilevamento fotografico degli amplificati in una delle prove (n.5) di incubazione eseguite a 6 e a 24 ore.

## 5. Discussione dei risultati

In questo lavoro di tesi si sono volute ottimizzare due metodiche biomolecolari per l'identificazione rapida e precisa di *Vibrio parahaemolyticus* ed in particolare per determinarne la tossigenicità, dal momento che non tutti i ceppi sono in grado di produrre tossine e quindi di risultare patogeni per l'uomo.

Le prove sperimentali eseguite rappresentano il primo passo per l'applicazione di un approccio biomolecolare diretto sugli alimenti che fornisca un'indicazione in tempi contenuti dell'eventuale presenza di ceppi patogeni di *Vibrio parahaemolyticus*.

Sono state messe a punto due metodiche biomolecolari: una per la determinazione del gene *tox-R* (32) che caratterizza la specie ed una per la determinazione del gene *tdh* (6), che codifica per l'emolisina termostabile e fornisce quindi informazioni sulla tossigenicità del ceppo.

Nella prima parte del lavoro le metodiche sono state applicate a brodocolture di *Vibrio parahaemolyticus* per testare diverse concentrazioni di  $MgCl_2$  nelle master mix in uso. Da queste prime prove è sembrato più idoneo l'utilizzo di una concentrazione finale del reagente pari a 3 mM per la ricerca del gene *tox-R* e di 2 mM per la ricerca del gene *tdh*, in modo da ottenere risultati più affidabili in termini di intensità e di specificità del segnale.

In seguito si sono allestite prove sperimentali per ottenere informazioni sulla sensibilità delle metodiche per la determinazione dei geni *tox-R* e *tdh*.

Relativamente al gene *tox-R* sono state condotte quindici prove utilizzando brodocolture di *Vibrio parahaemolyticus* aventi un titolo compreso tra  $1,05 \times 10^8$  ufc/ml e  $7,72 \times 10^8$  ufc/ml.

I risultati ottenuti hanno mostrato una soglia di rilevamento piuttosto alta, corrispondente ad un titolo dell'ordine di  $10^7$  ufc/ml: appare quindi evidente la necessità di ricorrere a tecniche colturali di arricchimento per poter evidenziare anche i carichi contaminanti più bassi.

A tale scopo sono state eseguite prove di arricchimento sulle brodocolture in esame. Le brodocolture sono state incubate a 37°C per 6 e 24 ore, in modo da

valutare l'eventuale positivizzazione delle diluizioni risultate negative durante le prime prove di sensibilità.

Dopo 6 ore di incubazione si è registrato un costante aumento della sensibilità, con una riduzione della soglia di rilevamento di 4 unità logaritmiche ed un limite di rilevabilità dell'ordine di  $10^3$  ufc/ml.

Dopo 24 ore di incubazione si è invece avuta una completa positivizzazione di tutte le diluizioni considerate, con una riduzione della soglia di rilevamento di 7 unità logaritmiche.

La metodica relativa all'individuazione della specie *Vibrio parahaemolyticus* ha mostrato, quindi, l'evidente necessità di lunghi tempi di incubazione per la determinazione di titoli contaminanti bassi. Per ovviare a questo inconveniente è parso interessante verificare l'effetto di una PCR booster a partire da brodocolture aventi mediamente un titolo corrispondente a  $3,21 \times 10^8$  ufc/ml.

L'effetto della doppia amplificazione è stata studiata sia sulla soglia di sensibilità al tempo 0, sia dopo incubazione di arricchimento, in questo caso però riducendo i tempi di incubazione a 4 ore.

Dopo 4 ore di incubazione delle colture batteriche, eseguendo una singola PCR, si è osservata una soglia di rilevamento intermedia tra il tempo 0 e le 6 ore di incubazione, pari all'ordine di  $10^5$  ufc/ml.

Il potenziamento dell'amplificazione ha dato buoni risultati in termini di sensibilità della metodica già in assenza di incubazione: grazie all'effetto booster, infatti, si è osservata una riduzione della soglia di rilevamento di 5 unità logaritmiche rispetto all'applicazione di un singola PCR e già con una concentrazione dell'ordine di  $10^2$  ufc/ml la specie *Vibrio parahaemolyticus* risulta rilevabile.

Dopo 4 ore di incubazione la doppia amplificazione ha portato alla positivizzazione di tutte le diluizioni, con una riduzione della soglia di rilevamento di 3 unità logaritmiche rispetto all'applicazione di un singola PCR.

Questo risultato sembra indicare che l'uso di una PCR booster nella ricerca di *Vibrio parahaemolyticus* consente di contenere ulteriormente i tempi di

incubazione di arricchimento e nello stesso tempo di rilevare bassi carichi contaminanti; diversamente, lo stesso risultato sarebbe ottenibile solo con tempi di incubazione protratti a 24 ore.

Per quanto riguarda la ricerca del gene *tdh*, sono state eseguite quindici prove utilizzando brodoculture di *Vibrio parahaemolyticus* aventi un titolo compreso tra  $1,40 \times 10^8$  ufc/ml e  $3,71 \times 10^8$  ufc/ml.

La metodica biomolecolare oggetto di studio ha fornito risultati nettamente migliori rispetto a quella relativa al gene *tox-R*: in nove prove su quindici sono state rilevate positività fino alla diluizione corrispondente al titolo dell'ordine di  $10^3$  ufc/ml, tre prove hanno prodotto una soglia di sensibilità dell'ordine di  $10^2$  ufc/ml e tre dell'ordine di  $10^0$  ufc/ml. Le soglie di sensibilità più basse sono state rilevate a partire da brodoculture aventi titoli lievemente più alti.

In assenza di incubazione, è stato determinato un limite di rilevamento della metodica di  $10^3$ – $10^2$  ufc/ml e in tutte le prove eseguite è stata osservata una completa positivizzazione delle diluizioni analizzate già dopo 6 ore di incubazione.

La metodica biomolecolare presa in esame consente quindi individuazione di ceppi tossigeni con bassi carichi contaminanti anche in assenza di incubazione di arricchimento.



## 6. Conclusioni

*Vibrio parahaemolyticus* è considerato un patogeno emergente facente parte della microflora autoctona delle acque marine costiere; i prodotti ittici, ed in particolare i molluschi bivalvi, ne rappresentano il principale veicolo di trasmissione e sono i più importanti substrati di crescita per il microrganismo.

La trasmissione all'uomo di vibrioni patogeni, o potenzialmente patogeni, viene considerata tra i problemi emergenti all'attenzione della Comunità Europea che nel 2001 ha stilato il documento "Opinion of the Scientific Committee on Veterinari Measures relating to Public Health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in raw and undercooked seafood".

Il documento metteva in evidenza l'insufficienza dei dati disponibili per la valutazione del rischio e l'utilizzo di differenti metodi per la ricerca ed il conteggio che rendevano difficile la comparazione dei dati.

Nell'incontro (Call for data) nel 2010 tra FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) e WHO (World Health Organization) dove vengono evidenziati gli aspetti importanti da approfondire al fine di una reale valutazione del rischio per l'uomo derivante da *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, emerge ancora la necessità di raccogliere dati per validare un metodo, tradizionale o biomolecolare, per la determinazione ed il conteggio di vibrioni patogeni e non patogeni. Risultano carenti anche le informazioni relative alla prevalenza di vibrioni patogeni e non, alla correlazione tra fattori ambientali (temperatura, salinità, pH, ecc.) e presenza di vibrioni, alle modalità di consumo delle diverse specie di molluschi bivalvi (tipo di cottura, frequenza con cui vengono consumati). Anche i dati epidemiologici (numero di casi, età e stato di salute dei soggetti colpiti, altre informazioni relative agli effetti individuali, alimenti interessati), le informazioni relative ai ceppi batterici ed alle specie di molluschi bivalvi coinvolti sono ancora insufficienti.

Il Regolamento CE 2073/2005, pur non considerando *Vibrio parahaemolyticus* tra i criteri microbiologici applicabili agli alimenti, raccomanda la standardizzazione e l'armonizzazione delle tecniche di isolamento

e numerazione di questo microrganismo al fine di garantire la sicurezza dei prodotti destinati al consumo umano.

Queste problematiche rendono ragione dell'obiettivo di questo lavoro di tesi che intende ottimizzare delle metodiche al fine di individuare, in tempi brevi, matrici alimentari potenzialmente a rischio per la presenza di *Vibrio parahaemolyticus* e, in particolare, di ceppi capaci di produrre tossine. La necessità di contenere i tempi di rilevamento ha indirizzato le scelte verso l'utilizzo di metodiche biomolecolari andando a valutare la loro applicabilità direttamente sull'alimento, senza prescindere da eventuali conferme con metodiche microbiologiche tradizionali.

Queste ultime, tuttavia, risultano essere meno efficienti per un primo rapido screening degli alimenti in quanto procedure di lunga esecuzione che prevedono, prima l'isolamento e poi la caratterizzazione microbica. Inoltre, presentano dei limiti in termini di specificità e sensibilità basandosi su caratteristiche morfologiche e biochimiche che per loro natura sono molto soggette a variazioni ambientali.

Relativamente ai vibroni, questi sono in grado, in condizioni ambientali avverse, di entrare in uno stato di quiescenza: subiscono modificazioni morfologiche e fisiologiche, pur mantenendo la loro patogenicità; in questo stato (VBNC) non risultano rilevabili con i metodi colturali tradizionali (60).

La tecnica PCR è un metodo in vitro molto rapido e versatile che consente il superamento di questo problema. Inoltre, presenta vantaggi in termini di sensibilità e di specificità, in quanto consente l'amplificazione di specifiche sequenze geniche.

Si conferma dunque la necessità di abbandonare la diagnostica relativa a *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Vibrio cholerae* basata unicamente sull'approccio fenotipico, non solo perché scarsamente attendibile sul piano scientifico, ma soprattutto al fine di ridurre il numero di referti falsamente positivi, ed i conseguenti immotivati allarmismi o penalizzazioni del consumo di animali marini, in particolare i molluschi bivalvi (59).

In questo lavoro sono state messe a punto due metodiche biomolecolari: una in grado di rilevare una sequenza del gene *tox-R* (32), caratteristica della specie, e una per il rilevamento del gene *tdh* (6), che codifica per l'emolisina termostabile e fornisce quindi un dato di tossigenicità.

La sensibilità della metodica biomolecolare oggetto di studio, relativa al gene *tox-R*, è risultata contenuta, mostrando una soglia di rilevamento corrispondente ad un titolo dell'ordine di  $10^7$  ufc/ml.

*Vibrio parahaemolyticus* si ritrova nei pesci e nei molluschi normalmente in concentrazioni inferiori a  $10^3$  ufc/gr, ma se provenienti da acque particolarmente calde, la contaminazione può arrivare fino a  $10^6$  ufc/gr (8); è quindi sembrato opportuno ottimizzare questa metodica in modo da migliorarne la soglia di rilevamento.

A tal fine sono state eseguite delle prove di incubazione di arricchimento a diversi tempi: dopo 6 ore di incubazione è stato registrato un limite di rilevabilità dell'ordine di  $10^3$  ufc/ml, non ancora sufficiente al rilevamento dei carichi microbici presenti in pesci e molluschi, come sopra riportato. Solo dopo 24 ore di incubazione è stato registrato un limite di rilevabilità dell'ordine di 1 ufc/ml.

Data la necessità di ricercare la specie *parahaemolyticus* in tempi brevi è sembrato interessante verificare l'effetto di una PCR booster in modo da rilevare bassi carichi contaminanti riducendo i tempi: già in assenza di incubazione è stato registrato un limite di rilevabilità dell'ordine di  $10^2$  ufc/ml e, con 4 ore di incubazione dell'ordine di 1 ufc/ml.

Definita, in maniera specifica, l'eventuale presenza di *Vibrio parahaemolyticus*, occorre indagare sulla sua tossigenicità per dimostrare la pericolosità del substrato alimentare oggetto di studio.

A tal proposito, la metodica utilizzata in questi lavoro di tesi per ricerca del gene *tdh* ha dato buoni risultati, consentendo l'individuazione di ceppi tossigeni con bassi carichi contaminanti senza richiedere incubazione di arricchimento, con un limite di rilevamento della metodica di  $10^3$ – $10^2$  ufc/ml.

Integrando le due metodiche biomolecolari può essere proposta a livello applicativo un'incubazione di 4 ore, che consenta di rilevare la specie *parahaemoliticus* anche con bassi carichi contaminanti, attraverso una doppia amplificazione. Successivamente, sui campioni risultati positivi, potrà essere condotto lo studio della tossigenicità del ceppo in esame.

Il limite di questo lavoro è che non è stato ricercato il gene *trh*, un altro fattore di patogenicità caratteristico della specie *parahaemolyticus*, contenente le informazioni per i “fattori correlati alla produzione di TDH” (nominati TRH). Studi epidemiologici hanno rilevato una forte associazione tra i due geni nei ceppi isolati da casi clinici; ciò ha dimostrato come TRH sia un importante fattore di virulenza al pari di TDH. Tuttavia, *Vibrio parahaemolyticus* è definibile patogeno anche con l'individuazione di uno solo dei due fattori.

Le prove sperimentali eseguite rappresentano un primo passo per l'applicazione di un approccio biomolecolare diretto sugli alimenti che fornisca un'indicazione in tempi molto brevi dell'eventuale presenza di ceppi patogeni di *Vibrio parahaemolyticus*.

## 7. Bibliografia

1. Alam M.J., Tomochika K.I., Miyoshi S.I., Shinoda S. (2002). **Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan.** FEMS Microbiol. Lett. **208**, 83–87.
2. Arcangeli G. (2005). **Il problema dei virus enterici e dei *Vibrio*.** Eurofishmarket n.1, 06.04.2005, 4-10.
3. Baffone W., Casaroli A., Campana R., Citterio B., Vittoria E., Pierfelici L., Donelli G. (2005). **‘In vivo’ studies on the pathophysiological mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* TDH<sup>+</sup> - induced secretion.** Microbial Pathogenesis, **38**, 133-137.
4. Baine W., Mazzotti M., Pocchiari F., et al. (1974). **Epidemiology of colera in Italy in 1973.** Lancet, **2**, 1370-4.
5. Barbuti S., Belelli E., Fara G. M., Giammanco G. (1996). **Igiene.** Monduzzi Editore, 539.
6. Bej K, Donald P.Patterson, Cynthia W. Brasher, Michael C.L. Vickery, Daniel D. Jones, Charles A. Kaysner. (1999). **Detection of total and hemolysin-producion *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*.** Journal of Microbiological Methods, **36**, 215-225.
7. Bhattacharya M., Choudhury P., Kumar R. (2000). **Antibiotic- and metal-resistant strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimps.** Microb Drug Resist, **6**, 2, 171-172.
8. Blackie Academic & Professional. **Micro-organism in Foods.** Characteristics of Microbial Pathogens, **5**, 426-428.
9. Brauns L.A., Hudson M.C., and Oliver J. (1991). **Use of the Polymerase Chain Reaction in Direction of Culturable and Nonculturable *Vibrio Vulnificus* Cells.** Applied and Environmental Microbiology, 2651-2655.
10. Carraturo A., Raieta K., Ottavini D., Russo G.L. (2006). **Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* by a bacteriocin-like inhibitory**

- substance (BLIS) produced by *Vibrio mediterranei*.** Journal of applied Microbiology, **101**, 234-241.
11. Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2005. ***Vibrio* illnesses after Hurricane Katrina—Multiple States, August–September 2005.** Morb. Mortal. Wkly. Rep. 54, 928–931.
  12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2006. ***Vibrio parahaemolyticus* Infections Associated with Consumption of Raw Shellfish—Three States, 2006.** Morb. Mortal. Wkly. Rep. 55 (Dispatch), 1–2.
  13. Chen, S., Liu, S., Zhang, L. (1991). **Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in seawater and some seafoods in the coastal area of Qingdao.** J. Ocean Univ. Qingdao, **21**, 43–50.
  14. Cherwonogrodzky J., Clark A.G. (1981). **Effect oh pH on the Production of the Kanagawa Hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus*.** Infection and Immunity, **34**, 1, 115-119.
  15. Cherwonogrodzky J., Clark A.G. (1982). **Production of the Kanagawa Hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus* in a Synthetic Medium.** Infection and Immunity, **37**, 1, 60-63.
  16. Chun D., Chung J.K., Tak R., Seol S.Y. (1975). **Nature of the Kanagawa Phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*.** Infection and Immunity, **12**, 1, 81-87.
  17. Cozzi L., Ciccaglioni G. (2004). **Vibrioni patogeni veicolati dai prodotti della pesca.** Workshop di aggiornamento su problematiche emergenti nel settore dei prodotti ittici. Rapporti ISTISAN 05/24, 90-96 .
  18. Croci L. (2004). **Iniziative comunitarie per la prevenzione delle contaminazioni biologiche dei molluschi.** Workshop di aggiornamento su problematiche emergenti nel settore dei prodotti ittici. Rapporti ISTISAN 05/24, 8-16.
  19. Croci L., De Medici D., Fiore A. (2001). **Virus enterici veicolati da alimenti.** Recenti Sviluppi di Igiene e Microbiologia degli Alimenti. 487-514.

- 
20. Croci L., Suffredini E. (2003). **Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici.** Annali Istituto Superiore di Sanità, **39**, 1, 35-45.
  21. Croci L., Suffredini E., Cozzi L., Toti L. (2002). **Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*.** Journal of Applied Microbiology, **92**, 460-465.
  22. Croci L., Suffredini E., Cozzi L., Toti L., Ottavini D., Pruzzo C., Serratore P., Fischetti R., Goffredo E., Loffredo G., Mioni R. (2007). **Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*.** Journal of Applied Microbiology, **102**, 229-237.
  23. Daniels N.A., MacKinnon L., Bishop R., Altekruse S., Ray B., Hammond R.M., Thompson S., Wilson S., Bean N.H., Griffin P.M., Slutsker L. (2000). ***Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998.** J. Infect. Dis., **181**, 1661–1666.
  24. Deepanjali A., Kumar H.S., Karunasagar I., Karunasagar I. (2005). **Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India.** Appl. Environ. Microbiol., **71**, 3575–3580.
  25. De Paola A., Ulaszek J., Kaysner C.A., Tenge B.J., Nordstrom J.L., Wells J., Puhf N., Gendel S.M. (2003). **Molecular, Serological, and Virulence Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Environmental, Food, and Clinical Sources in North America and Asia.** Applied and Environmental Microbiology, **69**, 7, 3999-4005.
  26. Fabbri A., Falzano L., Frank C., Donelli G., Matarrese P., Raimondi F., Fasano A., Fiorentini C. (1999). ***Vibrio parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin Modulates Cytoskeletal Organization and Calcium Homeostasis in Intestinal Cultured Cells.** Infection and Immunity, **67**, 3, 1139-1148.

- 
27. Ghosh AR., Sehgal SC (1998). **Detection of *tdh* and *trh* Genes in a Urea-hydrolysing Environmental Isolate of *Vibrio parahaemolyticus* from the Andamans.** J Diarrhoeal Dis. Res., **16**, 2, 87-90.
28. Gonzàles-Escalona N., Blackstone M., De Paola A. (2006). **Characterization of a *Vibrio alginolyticus* Strain, isolated from Alaskan Oyster, Carryng a Hemolysin Gene Similar to the Thermostable Direct Hemolysin-Related Hemolysin Gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus*.** Applied and Enviromental Microbiology, 7925-7929.
29. Hara-Kudo Y., Sugiyama K., Nishibuchi M., Chowdhury A., Yatsuyanagi J., Ohtomo Y., Saito A., Nagano H., Nishina T., Nakagawa H., Konuma H., Miyahara M., Kumagai S. (2003). **Prevalence of Pandemic Thermostable Direct Hemolysin Producing *Vibrio parahaemolyticus* o3:K6 in Seafood and the Coastal Environment in Japan.** Applied and Environmental Microbiology, 3883-3891.
30. Hara-Kudo Y., Nishina T., Nakagawa H., Konuma H., Hasegawa J., Kumagai S. (2001). **Improved Method for Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood.** Applied and Environmental Microbiology, **67**, 12, 5819-5823.
31. Kaysner C.A., Abeyta C., JR., Trost P.A., Wetherington J.H., Jinneman K.C., Hill W.E., Wekell M.M. (1994). **Urea Hydrolysis Can Predict the Potential Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated in the Pacific Northwest.** Applied and Environmental Microbiology, **60**, 8, 3020-3022.
32. Kim Y. B., Okuda J., Matsumoto C., Takahashi N., Hashimoto S., Nishicuchi M. (1999). **Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Strains at the Species Level by PCR Targeted to the *toxR* Gene.** Journal of Clinical Microbiology, **37**, 4, 1173-1177.
33. Lee S.E., Kim S.Y., Kim S.J., Kim H.S., Shin J.H., Choi S.H., Chung S.S., Rhee J.H. (1998). **Direct Identification of *Vibrio***



- parahaemolyticus* in Clinical Specimens by Nested PCR.** Journal of Clinical Microbiology, 2887-2892.
34. Lee C., Pan S., Chen C. (1995). **Sequence of a Cloned pR72H Fragment and Its Use for Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish with the PCR.** Applied and Environmental Microbiology, **61**, 4, 1311-1317.
35. Lees D. (2000). **Virus and Bivalves Shellfish.** International Journal Of Food Microbiology, **59**, 117-126.
36. Li J., Yie J., Foo R. W. T., M. L. Ling J., Xu H., Woo N. Y. S. (1999). **Antibiotic Resistance and Plasmid Profiles of *Vibrio* Isolates from Cultured Silver Sea Bream, *Sparus sarba*.** Marine Pollution Bulletin, **39**, 1, 245-249.
37. Liu X., Chen Y., Wang X., Ji R. (2004). **Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001—National foodborne disease surveillance system.** J. Hygiene Res., **33**, 725-727.
38. Lynch T., Livingstone S., Buenaventura E., Lutter E., Fedwick J., Buret A.G., Graham D., De Vinney R (2005). ***Vibrio parahaemolyticus* Disruption of Epithelial Cell Tight Junctions Occurs Independently of Toxin Production.** Infection and Immunity, **73**, 3, 1275-1283.
39. Maggi P., Carbonara S., Fico C., et al. (1997). **Epidemiological, clinical and therapeutic evaluation of the Italian cholera epidemic in 1994.** Eur J. Epidem, **13**, 95-7.
40. Martinez-Urtaza J., Simental L., Velasco D., DePaola A., Ishibashi M., Nakaguchi Y., Nishibuchi M., Carrera-Flores D., Rey-Alvarez C., Pousa A. (2005). **Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe.** Emerg. Infect. Dis., **11**, 1319-1320.
41. McLaughlin J.B., DePaola A., Bopp C.A., Martinek K.A., Napol N.P. (2005). **Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters.** New Engl. J. Med., **353**, 1463-1470.
42. Ministero della Salute. **Relazione sul sistema di allerta comunitario 2009.**

- 
43. Molero X., Bartolome' R.M., Vinuesa T., Guarner L., Accarino A., Casellas F., Garcí'a R. (1989). **Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain: presentation of 8 cases.** Med. Clin. (Barc), **92**, 1-4.
44. Nishibuchi M., Kaper J.B. (1995). **Thermostable Direct Hemolysin Gene of *Vibrio Parahaemolyticus*: a Virulence Gene Acquired by a Marine Bacterium.** Infection and Immunity, **63**, 6, 2093-2099.
45. Okuda J., Nishibuchi M. (1998). **Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct haemolysin gene.** Molecular Microbiology, **30**, 3, 499-511.
46. Oliver J.D., Kaper J.B. (1997). ***Vibrio* species.** Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers. ASM Press. 228-264.
47. Osawa R., Yamai S. (1996). **Production of Thermostable Direct Hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus* Enhanced by Conjugated Bile Acids.** Applied and Environmental Microbiology, **62**, 8, 3023-3025.
48. Osawa R., Okitsu T., Morozumi H., Yamai S. (1996). **Occurrence of Urease-Positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with Specific Reference to Presence of Thermostable Direct Hemolysin (TDH) and the TDH-Related-Hemolysin Genes.** Applied and Environmental Microbiology, **62**, 2, 725-727.
49. Panicker G., Bej A.K. (2005). **Real-Time PCR Detection of *Vibrio vulnificus* in Oyster: Comparison of Oligonucleotide Primer and Probes Targeting *vvhA*.** Applied and Environmental Microbiology, 5702-5709.
50. Parisi A. Paglionico N., Montagna C., Ottavini D., Masini L., Susca A., Chiocco D. (2005). **Caratterizzazione tassonomica ed epidemiologica di *Vibrio parahaemolyticus* mediante amplified fragment lenght polymorphism.** V Workshop Nazionale Enter-Net Italia, Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche, 63.

- 
51. **Piano Sicurezza Alimentare 2005-2007 della Regione Veneto.** Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.
  52. Poda G. ***Vibrio***. Metodi microbiologici per lo studio delle matrici alimentari. Dossier 30. 97-116.
  53. Raimondi F., Kao J.P.Y., Kaper J.B., Guandalini S., Fasano A. (1995). **Calcium-Dependent Intestinal Chloride Secretion by *Vibrio parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin in a Rabbit Model.** Gastroenterology, **109**, 381-386.
  54. Raimondi F., Kao J.P.Y., Fiorentini C., Fabbri A., Donelli G., Gasparini N., Rubino A., Fasano A. (2000). **Enterotoxicity and Cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin in In Vitro Systems.** Infection and Immunity, **68**, 6, 3180-3185.
  55. Reg.(CE) 854/2004. “Norme specifiche per l’organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano”. Gazzetta Ufficiale dell’Unione europea del 30.04.2004.
  56. Reg.(CE) 2073/2005. “Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari”. Gazzetta Ufficiale dell’Unione europea del 22.12.2005.
  57. Robert-Pillot A., Gue’nole’ A., Lesne J., Delesmont R., Fournier J.M., Quilici M.L. (2004). **Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France.** Int. J. Food Microbiol., **91**, 319–325.
  58. Rondanelli E.G., Fabbri M., Marone P. ***Vibrio* spp., *Aeromonas* e *Plesiomonas* spp.** Trattato sulle Infezioni e Tossinfezioni Alimentari. Selecta Medica. 333-356, Pavia.
  59. Serratore P., Piano A., Piraccini S., Trentini M., Zavatta E., Grodzki M., Valeri M.L. (2009). **Indagine sulla diffusione di *V. cholerae*, *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*, in molluschi bivalvi dell’Adriatico e proposta di un protocollo analitico.** Rivista dell’Associazione Italiana Veterinari Igienisti, **4**, 2/09.
  60. Suffredini E. **Problematiche legate ai patogeni emergenti nei prodotti della pesca.** Focus su sicurezza d’uso e nutrizionale degli

- alimenti. Roma, 21-22 novembre 2005. Istituto Superiore di Sanità – CNQRA.
61. Toti L. (2004). **Rischi igienico-sanitari connessi al consumo dei prodotti della pesca**. Workshop di aggiornamento su problematiche emergenti nel settore dei prodotti ittici. Rapporti ISTISAN 05/24, 1-7.
62. Twedt R.M. (1989). ***Vibrio parahaemolyticus***. In: Foodborne Bacterial Pathogenes. M.P. Doyk Marcel Dekker Inc, New York, 543-568.
63. Uh Y., Park J.-S., Hwang G.-Y., Jang I.-H., Yoon K.-J., Park H.-C., Hwang S.-O. (2001). ***Vibrio alginoliticus* acute gastroenteritis: report of two cases**. Clinical Microbiology and infection, 7, 2.
64. Venkateswaran K., Dohmoto N., Harayama S. (1997). **Cloning and Nucleotide Sequence of the *gyrB* Gene of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Application in Detection of This Pathogen in Shrimp**. Applied and Environmental Microbiology, 64, 2, 681-687.
65. Ward L.N., Asim K.Bej. (2005). **Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by Use of Multiplexed Real-Time PCR with TaqMan Fluorescent Probes**. Applied and Environmental Microbiology, 2031-2042.
66. Wong H.C., Liu S.H., Ku L.W., Lee I.Y., Wang T.K., Lee Y.S., Lee C.L., Kuo L.P., Shin D.Y.C. (2000). **Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan**. J. Food Prot., 63, 900–906.
67. Zulkifli Y., Alitheen N.B., Son R., Yeap S.K., Lesley M.B., Raha A.R. (2009). **Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by PCR targeted to the *toxR* gene and detection of virulence genes**. International Food Research Journal, 16, 289-296.