

Costa A., Sciortino S., Alio V., Nicastro L., D'Angelo I., Giotti E., Filippi S., Ciravolo C.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo, Area Microbiologia degli Alimenti

Summary

The aim of this study was to value the prevalence of enteropathogenic *Vibrio* spp. in fish products, collected in the last two years. A total of 100 samples (75 bivalve molluscs, 6 shrimps, 12 teleosts and 7 cephalopods) were analysed according to the ISO 21872-1:2017. *Vibrio* strains were characterised by molecular analysis (PCR). Enteropathogenic *Vibrio* spp were isolated in the 11% of fish products, particularly in shellfish. *V. parahaemolyticus* was identified in 4/75 (5.3%) and in 2/12 (16.7%) samples of bivalve molluscs from production areas and teleosts respectively. The isolates of *V. parahaemolyticus* were tested by PCR for the presence of specie-specific gene (*toxR*) and for the *tdh* and *trh* genes: 1 sample of teleosts (*Sardina pilchardus*) had the *trh* gene. *V. vulnificus* was isolated in 5/75 (6.7%) samples of bivalve molluscs (only in oysters). This is the first report of *V. vulnificus* identification in bivalve molluscs in our area.

Introduzione

Vibrio patogeni (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*) possono essere responsabili di patologie gastroenteriche, in particolare legate al consumo di molluschi bivalvi (1,2). Attualmente tale ricerca non è inserita nel Reg (CE) n. 2073/2005 e s.m.i. sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari: viene comunque evidenziata dalla Comunità Europea la necessità di raccogliere dati sulla diffusione dei ceppi di *Vibrio* potenzialmente patogeni nei prodotti della pesca. Il Ministero della Salute, su parere dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), ha evidenziato l'importanza di verificare nei ceppi isolati la presenza di geni tossigeni, mediante PCR, allo scopo di stabilire l'eventuale non conformità (3,4). Alcuni studi evidenziano la diffusione di *V. parahaemolyticus* tossigeni nei mari italiani con basse prevalenze (5): ceppi pandemici tuttavia sono stati isolati in casi di gastroenterite associati al consumo di mitili locali (6). In letteratura sono riportati isolamenti di *V. cholerae* non-O1 non-O139 (NCV) da campioni ittici e clinici. Le infezioni da *V. vulnificus* sono sporadiche, solitamente associate al consumo di ostriche e con dose infettante più bassa (10^3), a differenza di altri vibrieni (4). *V. alginolyticus* ha manifestato occasionalmente patogenicità (1). Scopo dello studio è stato valutare la diffusione di ceppi di *Vibrio* spp potenzialmente patogeni, identificati mediante tecniche batteriologiche e confermati mediante PCR, in campioni di prodotti ittici prelevati al commercio ed in campioni di molluschi bivalvi vivi, prelevati anche alla produzione. Nella regione Sicilia sono attualmente attivi impianti di molluschicoltura presso Siracusa (mitili) e Messina (vongole) e siti di stabilizzazione e centri di depurazione/spedizione di mitili (CDM/CSM) (Messina). I campioni di ostriche al commercio hanno in prevalenza provenienza estera (Francia). Il presente lavoro riporta nuovi dati sulla diffusione di *Vibrio* spp patogeni nella nostra zona. In particolare sono stati identificati per la prima volta ceppi di *V. vulnificus* da campioni di ostriche al commercio.

Materiali e metodi

Nel periodo Gennaio 2018-Giugno 2019 sono stati analizzati un totale di 100 campioni di alimenti ittici dei quali 75 di molluschi bivalvi vivi (47 mitili, 20 vongole e 8 ostriche), 7 di molluschi cefalopodi (2 calamari, 3 totani e 2 polpi), 6 di gamberi e 12 di teleostei freschi di varie specie provenienti da peschiere della Sicilia occidentale (Tab 1). I molluschi bivalvi vivi erano stati prelevati nell'ambito dei controlli sanitari veterinari, indicati in normativa, prelevati sia al commercio che alla produzione e/o stabilizzazione (impianti di molluschicoltura, CSM/CDM). La ricerca di *Vibrio* enteropatogeni è stata eseguita mediante metodica ISO 21872-1:2017, che prevede diverse fasi: primo e secondo arricchimento in terreno liquido selettivo (APAs), isolamento ed identificazione in terreni solidi (TCBS Agar e CHROMagar *Vibrio*) (Fig 1-2) e conferma delle colonie sospette mediante test presuntivi (ossidasi, esame microscopico), prove biochimiche (LDC, ADC, β -galattosidasi, indolo e test di alotolleranza) e/o sistemi biochimici miniaturizzati (API 20NE, BioMerieux). I ceppi isolati sono stati confermati in PCR mediante ricerca dei geni specie-specifici (regioni target) (Fig 3) quali: *toxR* per *V. parahaemolyticus*, *vvha* (regione dell'emolisina) per *V. vulnificus* e *prVC* per *V. cholerae*. La metodica PCR comprende le fasi di: estrazione del DNA, preparazione della master mix, fase di amplificazione (Thermal Cycler 2720 Applied Biosystem) e fase di elettroforesi orizzontale su gel di agarosio seguita da visualizzazione mediante trasilluminatore UV (GelDoc-It Imaging System). Per ciascun target viene preparato il DNA controllo, estratto da ceppi di riferimento certificati (*V. parahaemolyticus* NTCT 10884; *V. vulnificus* ATCC 27562; *V. cholerae* ATCC 1473A). Gli isolati di *V. parahaemolyticus* sono stati inoltre sottoposti a metodiche molecolari (PCR) per la ricerca dei geni di virulenza *tdh* e *trh*, correlati alla capacità di produrre tossine (Fig 4).

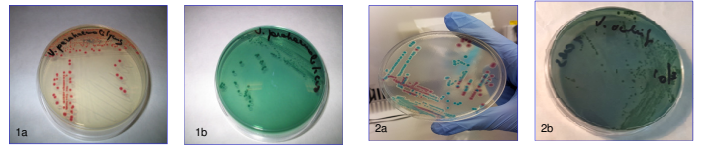


Fig 1. Colonie riferibili a *V. parahaemolyticus*: rosse su CHROMagar (1a) e verdi su TCBS agar (1b) Fig 2. Colonie riferibili a *V. vulnificus*: blu-turchese su CHROMagar (2a) e verdi su TCBS agar (2b)

Tipologia campioni	Totale esaminati	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
mitili	47	2	-	10
vongole	20	2	-	4
ostriche	8	-	5	2
Totale molluschi bivalvi	75	4 (5.3%)	5 (6.7%)	-
gamberi	6	-	-	1
teleostei	12	2 (16.7%)	-	1
molluschi cefalopodi	7	-	-	-
TOTALE	100	6	5	18

Tab 1 Tipologia campioni esaminati e *Vibrio* spp isolati

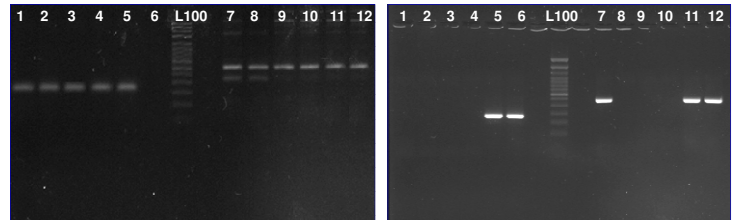


Fig 3 PCR geni specie-specifici: ToxR:1-4 campioni positivi per *V. parahaemolyticus*; 5 Controllo Positivo per *V. parahaemolyticus*; 6 Controllo negativo; VH: 7-11 campioni positivi per *V. vulnificus*; 12 Controllo Positivo per *V. vulnificus*.L100 DNALadder

Fig 4 PCR geni tossigeni *V. parahaemolyticus*:Tdh: 1-4 campioni Tdh positivi; 5-6 controlli Tdh positivi; Trh: 7 Campione Tdh positivo ; 8-10 Campioni Tdh negativi; 11-12 controlli Trh positivi. L100 DNALadder

Risultati e conclusioni

Ceppi di *Vibrio* spp potenzialmente patogeni (*V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*) sono stati isolati nell'11% dei prodotti ittici esaminati, in prevalenza nei molluschi bivalvi. *V. parahaemolyticus* è stato identificato (presenza gene specie-specifico ToxR) nel 6.0% dei campioni testati, dei quali 4/75 (5.3%) da campioni di molluschi bivalvi (2 di mitili e 2 di vongole) prelevati presso aree di produzione e 2/12 (16.7%) da campioni di teleostei (n. 1 da triglie e n. 1 da sarde) al commercio (Fig 3); i ceppi sono risultati tutti non tossigeni (assenza di geni *tdh* e *trh*) tranne un isolato dal campione di sardine fresche, risultato *trh+* (Fig 4). *V. vulnificus* è stato identificato in 5 campioni di ostriche al commercio (5.0%) (Fig 3). Nel 18% dei campioni esaminati è stato identificato *V. alginolyticus*. Riguardo *V. parahaemolyticus*, i nostri risultati confermano quanto riportato in precedenti lavori mostrando una bassa prevalenza (1%) di ceppi tossigeni; tale positività era stata già rilevata in mitili e vongole allevati nella stessa zona. Infatti un nostro studio precedente sulla diffusione di *Vibrio* spp in prodotti ittici aveva permesso di identificare *V. parahaemolyticus* nel 13,8% di prodotti ittici di cui 10 ceppi isolati da mitili (1 ceppo *tdh+* e 1 *trh+*) e 1 non tossigeno in un campione di teleostei (sarde) (7); in seguito, abbiamo rilevato una prevalenza del 17,8% di *Vibrio* patogeni in campioni di molluschi bivalvi (11,7% di *V. parahaemolyticus* di cui 1 ceppo *trh+* e 6,1% di *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139, risultati non tossigeni) (8). Nel presente studio è stato identificato per la prima volta *V. vulnificus* con il metodo batteriologico, confermato dalla metodica PCR, in campioni di ostriche. La presenza di *Vibrio* spp potenzialmente patogeni nei prodotti ittici ed in particolare nei molluschi bivalvi, rappresenta una problematica sempre attuale. L'applicazione di test di patogenicità degli agenti infettivi trasmessi dagli alimenti, compreso *Vibrio* spp., è indicata nell'Intesa Stato-Regioni "Linee guida per il controllo ufficiale ai sensi del Reg (CE) 882/2004 e 854/2004" (Rep n. 212/2016). Il presente studio pertanto ha permesso di aggiungere nuovi dati sulla diffusione di specie potenzialmente patologiche di *Vibrio*, in particolare nei molluschi bivalvi vivi, ampiamente noti per la loro capacità filtrante e per concentrare microrganismi patogeni e/o tossine. Nel contempo è importante confermare gli isolati di *Vibrio* e determinare l'eventuale presenza dei geni di virulenza, allo scopo di identificarne il possibile ruolo patogeno e tossigeno per la protezione della salute pubblica.

1) Austin B. (2010) Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet Microbiol* 140 (2010):310-317; 2) Croci L., Suffredini E. (2003) Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici *Ann Ist Sup Sanità*; 39 (1): 35-45; 3) Ministero della Salute comunicazione Prot. DGVA III del 15/09/2005 - Parere dell'ISS a seguito conclusione del gruppo di lavoro sul *V. parahaemolyticus* nei prodotti della pesca; 4) Ministero della Salute ex DGVA - comunicazione del 5/10/2006 relativa al parere dell'ISS sull'identificazione dei fattori tossici di *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139, *V. alginolyticus* e *V. vulnificus* nei prodotti della pesca; 5) D. Ottaviani, F. Leoni, E. Rocchegiani, R. Mioni, A. Costa, S. Virgilio, L. Serracca, D. Bove, C. Canonico, A. Di Cesare, L. Masini, S. Potenziani, G. Caburlo, V. Ghidini, M. M. Lleo (2013) An extensive investigation into the prevalence and the genetic and serological diversity of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* in Italian marine coastal waters *Environmental Microbiology* 2013 May;15(5):1377-1386; (6) Ottaviani D., Leoni F., Rocchegiani E., Canonico C., Potenziani S., Santarelli S., Masini L., Scuto A., Carraro A. (2010) *Vibrio parahaemolyticus*-associated gastroenteritis in Italy: persistent occurrence of O3:K6 pandemic clone and emergence of O1:KUT serotype. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 66:452-455; 7) Costa A., Alio V., Canonico C., Potenziani S., Russo Alesi E.M., Di Noto A.M. (2010) Prevalenza di *Vibrio* spp isolati da prodotti ittici con particolare riferimento a *Vibrio parahaemolyticus*. *Atti XII Congresso Nazionale S.I.D.I.L.V.*: 74-75; 3; 8) Costa A., Alio V., Ottaviani D., Leoni F., Russo Alesi E.M., Sciortino S., Di Noto A.M. (2015) Studio sulla prevalenza di *Vibrio* spp potenzialmente patogeni in molluschi bivalvi in Sicilia. *Atti XVI Congresso S.I.D.I.L.V.*; 286-287