

INDAGINE SULLA DIFFUSIONE DI *V. CHOLERAE*, *V. VULNIFICUS* E *V. PARAHAEMOLYTICUS*, IN MOLLUSCHI BIVALVI DELL'ADRIATICO E PROPOSTA DI UN PROTOCOLLO ANALITICO

SURVEY ON V. CHOLERAE, V. VULNIFICUS AND V. PARAHAEMOLYTICUS IN BIVALVE MOLLUSCS OF THE ADRIATIC SEA AND PROPOSAL OF AN ANALYTICAL PROTOCOL

Serratore, P., Piano, A., Piraccini, S., Trentini, M., Zavatta, E., Grodzki, M., Valeri, M.L.
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale Università di Bologna

SUMMARY

Bivalve molluscs from Adriatic sea were analyzed for *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus* presence. The isolates on TCBS Agar and m-CPC Agar were selected on the basis of a new biochemical screening, that showed a good performance, because among 2344 strains from primary culture only 237 (10%) were presumptively assigned to the species of interest. The PCR analyses was performed for the target genes *toxR hlyA*, *ctxA*, *tcpI* (*V. cholerae*), *toxR*, *tl*, *tdh*, *trh* (*V. parahaemolyticus*), *vvhA* and *viuB* (*V. vulnificus*). Among the 9 strains confirmed to belong to *V. parahaemolyticus* specie, 6 were sucrose positive. On 215 samples of molluscs only 5 resulted positive for *V. parahaemolyticus* being *toxR+*, *tl+*, although non pathogenic (*tdh-*, *trh-*), and none for *V. cholerae* e *V. vulnificus*.

Key words

Bivalve molluscs, Adriatic sea, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*.

INTRODUZIONE

Grazie al miglioramento delle indagini epidemiologiche su scala mondiale, si ritiene attualmente che le zoonosi alimentari batteriche più diffuse in seguito al consumo di molluschi bivalvi siano sostenute da batteri marini quali *Vibrio* spp. (6), ed in particolare *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Nonostante ciò, la normativa Comunitaria, sia quella in vigore fino al 2005 che quella del "Pacchetto Igiene" entrato in vigore il 1° gennaio 2006, il controllo per la idoneità al consumo umano dei molluschi bivalvi è incentrato sulla quantificazione di *E. coli* e *Salmonella* spp. (19, 20). Poiché è ampiamente noto che la concentrazione degli indicatori fecali non è correlata a quella dei batteri marini, si può dire che i criteri microbiologici in uso per il giudizio sanitario sulle aree di produzione dei molluschi bivalvi non garantiscono un

controllo delle zoonosi da patogeni emergenti (14).

Nei nuovi Regolamenti la mancata introduzione di standard per *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*, viene giustificata dal legislatore 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 micrometodo API (bioMerioux). Sulla base dei dati in possesso del laboratorio, il metodo API per l'identificazione dei vibrieni marini mostra una percentuale di falsi positivi che può raggiungere il 30% (23), confermando quanto riportato da numerosi altri autori riguardo l'inadeguatezza del metodo per tali microrganismi (7, 10, 13, 17). Numerosi studi confermano la presenza in ogni parte del mondo compreso il mare Adriatico, di ceppi apatogeni di *V. parahaemolyticus*, ovvero sprovvisti dei geni *tdh* e/o *trh*, così come di *V. cholerae*, ovvero sprovvisti dei geni *ctxA* e *tcpI*, (23),

pertanto nel giudicare l' idoneità al consumo di un prodotto della pesca, non si può prescindere dalla opportuna conferma degli isolati sia a livello di specie che di possesso dei tratti di patogenicità.

Per quanto riguarda in particolare il *V. parahaemolyticus*, il Ministero della Salute, consapevole dei danni economici conseguenti alla perdita di commerciabilità di prodotti oggetto di erronee identificazioni, ha fatto proprie le indicazioni di uno studio appositamente commissionato (9), emanando la circolare DVGA-III.IX/32799/P-I/11 del 15/09/2005, con la quale è stabilito che solamente in caso di accertamento di *V. parahaemolyticus tdh+* e/o *trh+*, può essere emesso un giudizio di non idoneità al consumo del prodotto.

MATERIALI E METODI

Un totale di 215 lotti di molluschi appartenenti alle specie *Mytilus galloprovincialis*, *Tapes philippinarum* e *Chamelea gallina*, tutti provenienti dall' areale Adriatico, è stato sottoposto ad analisi per la quantificazione di *Vibrio* spp. e la ricerca mirata di *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*.

Le semine sono state effettuate su TCBS agar, terreno selettivo di elezione per la quantificazione e l'isolamento dei vibrieni marini, in particolare con l'aggiunta di NaCl fino alla concentrazione finale del 3% (22, 26) ed m-CPC Agar, terreno non formulato indicato per l'isolamento di *V. vulnificus* (11). Tutti i passaggi successivi sono stati effettuati in terreni con concentrazione finale NaCl 3%.

Le semine sono state incubate per 3-5 giorni a 20°C, poi un congruo numero di colonie è stato trasferito per la propagazione su TSA NaCl 3%. I ceppi sono stati quindi sottoposti ai test di conferma per l'appartenenza di genere, secondo quanto già sperimentato (22, 23): colorazione di GRAM, citocromoossidasi, riduzione dei nitrati, sensibilità al vibriostatico O/129 (150 e 10 mg). Per procedere alla identificazione fenotipica di *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*, in aggiunta ai test precedentemente indicati, è stato utilizzato un protocollo che definiamo come metodo Alsina modificato (1, 2), sulla scorta di indicazioni ricavate dal metodo FDA (11) e dal Bergey's Manual (4): alofilia (crescita in Acqua peptonata 1%, NaCl 0, 6%, 8%, 12%), mobilità produzione di indolo e di solfuri (SIM medium, Oxoid, NaCl 3%), assimilazione del citrato (Simmons Citrate Agar, Oxoid, NaCl 3%), fermentazione del glucosio ed utilizzazione del lattosio (Kligler Iron Agar, Oxoid, NaCl 3%), arginina deidrolasi, lisina e ornitina decarbossilasi (DBM, DIFCO, NaCl 3%).

Inoltre sono state utilizzate le gallerie del micrometodo API NE (bioMérieux), in particolare per la lettura dei test: idrolisi dell'urea e della gelatina, utilizzo di d-glucosammina (NAG), caprato (CAP), arabinosio (ARA), verifica della presunta identificazione secondo i codici API.

Sui ceppi presuntivamente ascritti alle specie di interesse sono state effettuate analisi con tecniche di PCR, mediante amplificazione di tratti specie-specifici e di patogenicità, mediante un protocollo base già sperimentato (23). I geni target, le sequenze dei primers utilizzati, le dimensioni degli ampliconi, le condizioni di PCR e le fonti bibliografiche, sono riassunti in tabella 1.

Per identificare *V. cholerae* a livello di specie sono state utilizzate due coppie di primers che amplificano rispettivamente un tratto del gene *toxR* e un tratto del gene *hlyA*, entrambi presenti in tutti i membri della specie. La potenziale patogenicità dei ceppi identificati come *V. cholerae* è stata valutata amplificando una porzione del gene *ctxA*, che codifica la subunità A della tossina colerica ed un tratto del gene *tcpI*, il gene per la regolazione del pilo che rappresenta un importante fattore di colonizzazione.

Per identificare *V. parahaemolyticus* a livello di specie sono state utilizzate due coppie di primers, che amplificano rispettivamente un tratto del gene di regolazione *toxR* presente in tutti i membri della specie, ed una porzione del gene della tossina termolabile *tl*. La potenziale patogenicità dei ceppi identificati come *V. parahaemolyticus* è stata valutata amplificando un tratto del gene *tdh* ed un tratto del gene *trh*, che codificano rispettivamente per l'emolisina diretta termostabile e l'emolisina TDH-relativa.

Per identificare *V. vulnificus* è stata utilizzata una coppia di primers che amplifica una regione di *vhA*, un gene che codifica per l'emolisina citotossica, un importante fattore di patogenicità presente in tutti i membri della specie *V. vulnificus*. Inoltre è stato valutato il gene *viuB*, alla cui espressione viene attribuito un ruolo patogenetico specifico.

In particolare i marcatori *toxR* per *V. cholerae*, *toxR* per *V. parahaemolyticus* e *vhA* per *V. vulnificus*, sono stati sagggiati su tutti i ceppi sottoposti a PCR.

Il protocollo utilizzato è suddiviso in 3 parti: preparazione dei campioni, amplificazione di geni target mediante PCR, controllo del prodotto di PCR mediante elettroforesi.

Preparazione dei campioni - Le colonie pure isolate sono state risospese in 100 l di acqua mQ sterile. Le cellule sono state lisate bollendo per 15 minuti e successivamente poste in ghiaccio per 3-5 mi-

nuti e precipitate tramite centrifugazione a 5000 x g a 4°C per 15 minuti. Il sovrantante è stato prelevato e riposto in un tubo sterile. I lisati batterici così ottenuti sono stati conservati a -20°C. **Amplificazione di geni target** - Per le reazioni di PCR sono state preparate miscele con un volume finale di 25 µl contenente 2,5 µl Buffer 10X (Invitrogen, USA), 1-1,5 µl MgCl₂ (50 µM) (Invitrogen, USA), 0,5 µl dNTPs (10 µM ciascuno) (Invitrogen, USA), 0,5-1 µl di ciascun primer (50 µM) e 0,2 µl di Taq Polimerasi (5 U/µl) (Invitrogen, USA) e H₂O fino a volume. I primers sono stati sintetizzati dalla ditta MWG. Le reazioni sono state condotte alle seguenti condizioni: 94°C per 5 minuti, 30 cicli a 94°C per 1 minuto, 55-63°C per 30-60 secondi (vedi tabella, colonna: T°-tempo di annealing), 72°C 1 minuto con un'estensione finale a 72°C per 10 minuti. Tutte le reazioni sono state messe a punto e ottimizzate sui ceppi di riferimento *V. cholerae* 70/28 Target Diagnostica, *V. parahaemolyticus* ATCC-17802 e ATCC-43996, *V. vulnificus* ATCC-27562, e in seguito testate sugli isolati ambientali. I ceppi di riferimento sono stati utilizzati come controlli positivi/negativi in tutte le

reazioni di PCR. Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando il ciclizzatore termico PX2 (Thermo Hybaid). **Controllo del prodotto di PCR mediante elettroforesi** - I prodotti di amplificazione sono stati controllati mediante elettroforesi su gel di agarosio (1,5%), utilizzando TBE come tampone di corsa. Come colorante è stato utilizzato il SYBR-SAFE (Invitrogen, USA), un fluorocromo che agisce intercalandosi tra i frammenti del DNA ed emettendo fluorescenza se esposto a raggi UV. A ciascun campione è stato addizionato il tampone di caricamento contenente il blu di bromofenolo, un tracciante colorato che permette di seguire la migrazione sul gel, e glicerolo, un addensante che facilita il caricamento dei campioni nei pozzetti. Per poter stabilire le dimensioni dei frammenti di PCR, assieme ai campioni è stato caricato il Marker molecolare TrackIt 100 bp DNA ladder (Invitrogen, USA). L'alimentatore per l'elettroforesi è stato impostato a 130 V per un tempo di circa 30 minuti. Al termine della corsa, la lettura è avvenuta tramite un transilluminatore con un'emissione di raggi UV di 450 nm (Invitrogen, USA).

Tab.1. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Geni target, sequenze dei primers utilizzati, dimensioni degli ampliconi, condizioni di PCR (tempo di annealing e numero di cicli) e fonti bibliografiche

TARGET		SEQUENZA DEI PRIMERS	DIM.	CONDIZIONI		REFERENZE
SPECIE	GENE		(pb)	T° e tempo di annealing	n°cicli	
<i>V. cholerae</i>		F: CCTTCGATCCCCTAAGCAATAC R: AGGGTTAGCAACGATGCGTAAG	779	60°C - 1 minuto	30	Rivera et al., 2001
<i>V. cholerae</i>	<i>toxR</i>	F: GGCAAACAGCGAAACAATACC R: CTCAGCGGGCTAATACGGTTTA	738 727	60°C - 1 minuto	30	Shangkuan et al., 1995; Rivera et al., 2001
<i>V. cholerae</i>	<i>hlyA</i>	F: CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG R: CGATGATCTGGAGCATTCCCAC	564	60°C - 1 minuto	30	Fields et al., 1992
<i>V. cholerae</i>	<i>ctxA</i>	F: TAGCCTTAGTTCTCAGCAGGCA R: GGCAATAGTGTCTGAGCTGTTA	862	60°C - 1 minuto	30	Panicker et al., 2004
<i>V. cholerae</i>	<i>tcpI</i>	F: GTCTTCTGACGCAATCGTTG R: ATACGAGTGGTTGCTGTCATG	368	63°C - 1 minuto	20	Kim et al., 1999
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>toxR</i>	F: AAAGCGGATTATGCAGAAGCAGCTG R: GCTACTTCTAGCATTTTCTCTGC	450	58°C - 1 minuto	30	Taniguchi et al., 1985; Bej et al., 1999
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tl</i>	F: GTAAAGGTCTCTGAC TTTTGGAC R: TGGAATAGAACCTTC ATCTTCACC	269	58°C - 1 minuto	30	Bej et al., 1999
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	F: TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT R: CATACAAAC ATATGCCCATTTCCG	500	58°C - 1 minuto	30	Bej et al., 1999
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>trh</i>	F: TTCCAACCTCAAACCGAACTATGAC R: ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG	205	60°C - 30 secondi	30	Brasher et al., 1998; Panicker et al., 2004
<i>V. vulnificus</i>	<i>vvhA</i>	A: GGTTGGGCACTAAAGGCAGATATA R: CGGCAGTGGACTAATACGCAGC	504	60°C - 30 secondi	30	Brasher et al., 1998; Panicker et al., 2004
<i>V. vulnificus</i>	<i>viuB</i>					

RISULTATI E DISCUSSIONE

In considerazione dell'elevato numero di campioni di molluschi analizzati nel corso di due anni, pari a 215, per brevità i risultati delle indagini re-

lative alla quantificazione di *Vibrio* spp. vengono riportati in questa sede unicamente come valori medi per specie di mollusco (Tab. 2).

Come si può vedere, le cariche batteriche riferite a *Vibrio* spp. sono risultate dello stesso ordine di

grandezza, pari a 10^5 , in tutte le specie considerate. Il dato conferma sostanzialmente quanto già documentato in precedenti indagini svolte nello stesso areale, ove *Vibrio* spp. è risultato in media dell'ordine di 10^2 nelle acque (UFC/ml) e 10^4 - 10^5 nei molluschi (UFC/g) (16, 22, 23).

Tab. 2. Valori di *Vibrio* spp., rilevati nel corso dell'indagine

Specie	<i>Vibrio</i> spp. UFC/g
<i>Tapes philippinarum</i>	209.382
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	347.004
<i>Chamelea gallina</i>	270.834

Un totale di 2344 ceppi da colonie di primo isolamento di TCBS Agar ed m-CPC Agar sono stati sottoposti a screening fenotipico. Di questi ceppi 237, ovvero circa il 10%, sono stati selezionati come presuntivamente appartenenti alle specie di interesse. Questo dato di prevalenza, che risulta in linea con quanto riferito da altri autori per *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (8), conferma anche la validità dello screening proposto quale via per ridurre notevolmente il numero di isolati da sottoporre a conferma con PCR. Inoltre l'introduzione del test su SIM Agar (mobilità, produzione di indolo e H_2S) prima della esecuzione di altre prove biochimiche più costose e complesse, ha consentito di ridurre notevolmente il numero di ceppi sui quali eseguire l'intero protocollo, con notevole risparmio di tempo e di costi. I ceppi selezionati sono stati sottoposti ad analisi molecolare utilizzando come controlli positivi i ceppi di collezione *V. cholerae* 70/28 Target Diagnostica, *V. parahaemolyticus* ATCC-17802, *V. parahaemolyticus* ATCC-43996, *V. vulnificus* ATCC-27562. Tra i ceppi presuntivamente ascritti alla specie *V. cholerae* nessuno è risultato positivo ai marcatori di specie *toxR* e *hlyA* e di patogenicità *ctxA* e *tcpI*. Analogamente tra i ceppi presuntivamente ascritti alla specie *V. vulnificus* nessuno è risultato positivo ai marcatori *vvhA* e *viuB*. Diversamente 9 ceppi isolati da 5 campioni di molluschi, 3 di *Tapes philippinarum* e 2 di *Chamelea gallina*, sono stati identificati come *V. parahaemolyticus* apatogeno in quanto sono risultati *toxR+* e *tl+*, ma negativi ai marcatori di patogenicità *tdh-* e *trh-*.

I risultati della identificazione presunta sulla base dei codici API, che si omettono, hanno fornito oltre il 30% di falsi negativi, in linea con quanto segnalato nell'ambito di altre indagini (23).

I risultati della caratterizzazione completa degli

isolati confermati a livello di specie è riportata in tabella 3.

Giova sottolineare che la scelta di eseguire la ricerca simultanea delle specie di interesse e di utilizzare tutti i marcatori di specie principali, ovvero *toxR* per *V. cholerae*, *toxR* per *V. parahaemolyticus* e *vvhA* per *V. vulnificus*, su tutti i ceppi sottoposti a PCR, ha consentito di confermare come *V. parahaemolyticus* ben 6 su 9 ceppi saccarosio positivi. Questo risultato conferma quanto già riscontrato in precedenti indagini, relativamente alla esistenza di varianti saccarosio positive di questa specie (23).

Considerando la prevalenza della specie, essa è risultata pari al 3,8% riguardo ai ceppi selezionati con lo screening fenotipico (9 su 237), e 0,4% riguardo al numero totale di ceppi sottoposti ad indagine (9 su 2344), teoricamente rappresentativi di tutta la popolazione di *Vibrio* spp. contenuta nei molluschi e risultata vitale e coltivabile. Il discreto riscontro di *Vibrio parahaemolyticus* in assenza di conferme per *V. cholerae* e *V. vulnificus*, risulta in linea con quanto segnalato anche in altre indagini, relativamente alla minore diffusione di queste specie in proporzione alla prima (23).

Considerando il numero di campioni di molluschi analizzati, 215, la percentuale di quelli positivi, 5 per *V. parahaemolyticus*, è risultata pari al 2,3%, ovvero piuttosto bassa anche se non trascurabile, comunque gli isolati sono risultati apatogeni e dunque si conferma la necessità di abbandonare definitivamente la diagnostica relativa a *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus* basata unicamente sull'approccio fenotipico, non solo perchè 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 filtratori.

Di qui la necessità di promuovere trial interlaboratori per l'ulteriore studio e messa a punto di protocolli identificativi affidabili per *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*.

N° Ceppo/origine	TCBS	m-CFC	Ox	Nit	OF	KIA	arg	lis	orn	O/129 150/10µg	42°C	urea	gel	mob	ind	H ₂ S	cit	NaCl 0%	NaCl 6%	NaCl 8%	NaCl 12%	NAG	CAP	ARA	PCR
10566 T. philippinarum	sacc-	NC	+	+	F	KA-	-	+	+	SS	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	toxR+, tl+, tdlh-, trh-
12714 C. gallina	sacc+	NC	+	+	F	KA-	-	+	+	SR	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	toxR+, tl+, tdlh-, trh-
12726 C. gallina	sacc+	NC	+	+	F	KA-	-	+	+	SR	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	toxR+, tl+, tdlh-, trh-
12727 C. gallina	sacc+	NC	+	+	F	KA-	-	+	+	SR	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	toxR+, tl+, tdlh-, trh-
12729 C. gallina	sacc-	NC	+	+	F	KA-	-	+	+	SR	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	toxR+, tl+, tdlh-, trh-
131/1 C. gallina	sacc+	NC	+	+	F	KA-	-	+	+	SS	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	toxR+, tl+, tdlh-, trh-
137/55 T. philippinarum	sacc-	NC	+	+	F	KA-	-	+	+	SR	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	toxR+, tl+, tdlh-, trh-
138/14 T. philippinarum	sacc+	NC	+	+	F	KA-	-	+	+	SR	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	toxR+, tl+, tdlh-, trh-
138/44 T. philippinarum	sacc+	NC	+	+	F	KA-	-	+	+	SR	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	toxR+, tl+, tdlh-, trh-
V. parahaemolyticus ATCC 17802	sacc-	NC	+	+	F	KA-	-	+	+	SR	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	toxR+, tl+, tdlh-, trh+
V. parahaemolyticus DSMZ 43996	sacc-	NC	+	+	F	KA-	-	+	+	SR	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	toxR+, tl+, tdlh-, trh-
V. vulnificus ATCC 27562	sacc-	cell+	+	+	F	KA-	-	+	+	SS	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	vvhA+, vibB+
V. cholerae Inaba Target 70/28	sacc+	cell-	+	+	F	KA-	-	+	+	SS	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	toxR+, hlyA+, ctxA+, tcpA+

Tab. 3. Risultati della caratterizzazione fenotipica e molecolare degli isolati e dei ceppi di riferimento utilizzati. Sacc = saccarosio, cell = cellobiosio, NC = non cresce, Ox = ossidasi, Nit = riduzione del nitrato, OF = ossido fermentazione, KIA = Kligler Iron Agar, KA - - = alcalino acido no H₂S, no gas, arg = arginina, lis = lisina, orn = ornitina, gel = idrolisi gelatina, mob = mobilità, ind = produzione di indolo, cit = utilizzo del citrato, NAG = utilizzo di d-glucosammina, CAP = utilizzo di caprato, ARA = utilizzo di arabinosio.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Alsina M. and Blanch A.R. 1994a. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 79-85.
- 2) Alsina M. and Blanch A.R. 1994b. Improvement and update of a set of key for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 719-721.
- 3) Bej A. K., Patterson D. P., Brasher, C. W., Vickery, M. C., Jones, D. D. and Kaysner, C. A., 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods.* 36: 215-25
- 4) Bergey's Manual, 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1984
- 5) Brasher C.W., DePaola A., Jones D.D. and Bej A.K. 1998. Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR, *Curr. Microbiol.*: 37, 101–107.
- 6) Chamberlain N.R. 2003. Foodborne Diseases.
URL: <http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/Website/foodborne.htm>
- 7) Colodner R., Raz R., Meir I., Lazarovich T., Lerner L., Kopelowitz, J., et al. 2004. Identification of the emerging pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 3 by commercially available phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 42: 4137-4140.
- 8) Croci L., Serratore P., Cozzi I., Stacchini S., Milandri S., Suffredini E., Toti L. 2001. Detection of Vibrionaceae in mussels and in their growing area. *Letters in Applied Microbiology*: 32, 57-61.
- 9) Croci L., Suffredini E., Cozzi L., Toti L., Ottaviani D., Pruzzo C., Serratore P., Fischetti R., Goffredo E., Loffredo G., Mioni R., and *Vibrio parahaemolyticus* Working Group. 2007. "Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*". *Journal of Applied Microbiology* 102 (1): 229-237
- 10) Dalsgaard A., Frimodt-Moller N., Bruun B., Høi L. and Larsen J.L. 1996. Clinical manifestations and epidemiology of *Vibrio vulnificus* infections in Denmark. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 227-231.
- 11) FDA-BAM, 2004. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and Other *Vibrio* spp., Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 9. Substantially rewritten and revised May 2004
- 12) Fields P.I., Popovic T., Wachsmuth K., Olsvik O. 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J Clin Microbiol.* 30:2118-2121
- 13) Israil A.M., Balotescu C. and Alexandru I. 2003. Comparative study of classical and commercial microtest API galleries in the diagnosis of cholera infection. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol* 48: 145-148.
- 14) Jackson K.L. and Ogburn D.M. 1999. Review of depuration and its role in shellfish quality assurance. FRDC Project No. 96/355. NSW Fisheries Final Report Series No. 13. ISSN 1440-3544.
- 15) Kim Y.B., Okuda J., Matsumoto C., Takahashi N., Hashimoto S. and Nishibuchi M. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1173–1177
- 16) Milandri A., Poletti R., Pompei M., Serratore P. 2000. Indagini biotossicologiche e batteriologiche in molluschi ed acque marine costiere dell'Emilia Romagna. Risultati dei programmi di sorveglianza dal 1989 al 1999 e razionalizzazione del sistema di monitoraggio. Atti del XIII Congresso Internazionale dell'Ordine Nazionale dei Biologi. Sessione Poster, N° 25. Sanremo (IM) 5-7 ottobre 2000.
- 17) O'Hara C.M., Sowers E.G., Bopp C.A., Duda S.B. and Strockbine N.A. 2003. Accuracy of six commercially available systems for identification of members of the family Vibrionaceae. *J Clin Microbiol* 41: 5654-5659.
- 18) Panicker G., Vickery M.C., Bej A.K. 2004. Multiplex PCR detection of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in shellfish. *Can J Microbiol.* Nov;50(11):911-22.
- 19) Reg. CE 854/2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. (rettifica in GUUE n. L226 del 25/06/2004).
- 20) Reg. CE 2073/2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari". (GUUE n. L 338 del 22/12/2005).
- 21) Rivera I. N. G., Chun, J., Huq A., Sack, R. B. and Colwell, R. R., 2001. Genotypes Associated with Virulence in Environmental Isolates of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol.* 67: 2421-2429
- 22) Serratore P., Turtura G.C., Rinaldini E., Milandri S., Presepi D. 1999. Phenotypic characterization of some bacterial populations belonging to the genus *Vibrio*. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*: 49, 79-88.
- 23) Serratore P., Piano A., Milandri S., Buda D., Zoffoli, S. 2006. Studio sulla diffusione di batteri patogeni opportunisti nel Mare Adriatico. Atti del workshop "Valutazione del Rischio Ambientale e Sanitario Associato a microrganismi patogeni in Ambienti Costieri. 12 maggio 2006, Centro Ricerche Marine, Cesenatico: 14-16.
- 24) Shangkuan Y. H., Show Y. S., Wang T. M. 1995. Multiple polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* and to biotype *Vibrio cholerae* O1. *J Appl Bacteriol.* 79 (3): 264-273.
- 25) Taniguchi H., Ohta H., Ogawa M. and Mizuguchi Y. 1985. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes, *J. Bacteriol.*, 162: 510–515.
- 26) Toro A., Gonzalez N., Torres J., Dvorsky E., Toranzos G.A. 1995. Modified culture methods for the detection of *Vibrio* spp. from estuarine waters. *Water Science and Technology*, 31 (5): 283-290.