



Università degli Studi di Cagliari

SCUOLA DI DOTTORATO IN TOSSICOLOGIA

TOSSICOLOGIA DEGLI ALIMENTI E DELL'AMBIENTE

CICLO XXIII

**RISCHIO IGIENICO-SANITARIO ASSOCIATO
AL CONSUMO DEI MOLLUSCHI EDULI
LAMELLIBRANCHI (M.E.L)**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

MED/42 IGIENE GENERALE E APPLICATA

Presentata da:

Dott.ssa Valentina Carraro

Coordinatore Dottorato:

Prof. Gaetano Di Chiara

Relatore:

Dott.ssa Valentina Coroneo

Esame finale anno accademico 2010 - 2011

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio innanzitutto il Prof. Sandro Dessì, per la fiducia e le opportunità che mi ha offerto e per la supervisione al mio lavoro.

Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Valentina Coroneo, Tutor di questo mio Dottorato, per l'ampia guida scientifica, per la disponibilità, per il sostegno, per aver contribuito alla mia maturazione scientifica e per il significativo aiuto nel conseguire alcuni dei risultati discussi in questa tesi.

Un grazie colmo di sincero affetto va alla Dott.ssa Valeria Brandas, alla Dott.ssa Antonella Pinna, a Gerolamo Carrucci, alla Dott.ssa Clara Sanna, alla Dott.ssa Francesca Ganga alla Dott.ssa Chiara Cabiddu alla Dott.ssa Marta Perra alla Dottoressa Adriana Sanna e ad Antonio Manca per avermi aiutato e sostenuto in questi anni e che considero più amici che semplici colleghi.

Ringrazio il Dott. Sebastiano Virgilio e la Dott.ssa Giuseppa Lorenzoni dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pregreffì" di Sassari per la loro stretta e fruttuosa collaborazione al progetto di ricerca.

Ringrazio anche la Dott.ssa Luciana Croci e la Dott.ssa Elisabetta Suffredini del Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per il controllo delle contaminazioni virali dei molluschi bivalvi del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma per l'aiuto nel conseguire alcuni dei risultati discussi in questa tesi.

Ringrazio il Dott. Germano Orrù del Laboratorio di Biotecnologie Orali (OBL) del Dipartimento di Chirurgia e Scienze Odontostomatologiche dell'Università degli Studi di Cagliari per la gentile collaborazione al progetto di ricerca.

Infine il ringraziamento più sentito va a Marco e alla mia famiglia per avermi sostenuto, sopportato e per essermi stati sempre vicino.

Un grazie di cuore anche a Pietro.

INDICE

1. INTRODUZIONE	6
1.1 I prodotti della pesca	6
1.2 Molluschi Eduli Lamellibranchi (M.E.L)	6
1.3 Flora microbica caratteristica dei M.E.L	7
1.3.1 Caratteristiche nutrizionali	7
1.3.2 Microflora caratteristica	8
1.4 Molluschicoltura in Italia	9
1.5 Molluschicoltura in Sardegna	10
2. FILIERA PRODUTTIVA E NORMATIVA	11
2.1 Raccolta e depurazione	13
2.2 Stabulazione	13
2.1 Idoneità al consumo	14
3. VIBRIONACEAE	15
3.1 Genere <i>Vibrio</i>	15
3.2 Caratteristiche ecologiche di crescita del genere <i>Vibrio</i>	17
3.3 Differenziazione biochimica delle specie patogene	18
4. I VIBRIONI PATOGENI	19
4.1 <i>Vibrio alginolyticus</i>	19
4.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	20
4.3 <i>Vibrio vulnificus</i>	22
4.4 <i>Vibrio cholerae</i>	24
4.4.1 Tassonomia ed ecologia	24
4.4.2 Genetica	26
5. IL COLERA	27
5.1. Patogenesi	28
5.2 Fattori di virulenza	29
5.2.1 La tossina colerica (CT)	29
5.2.2 La tossina ZOT (Zona Occludens)	31
5.2.3 Enterotossina colerica accessoria (Ace)	31
5.2.4 <i>Vibrio cholerae</i> citolisina (VCC)	31
6. EPIDEMIOLOGIA	31

6.1 Epidemiologia in Europa.....	32
6.2 Epidemiologia in Italia	32
7. VIBRIONI NON COLERICI (NCVs o NAG) <i>Vibrio cholerae</i> non-O1 non-O139.....	33
7.1 Epidemiologia	34
8 SCOPO DELLA RICERCA	36
9. MATERIALI E METODI	37
9.1. Metodiche diagnostiche di ricerca	37
9.1.2. Metodiche microbiologiche tradizionali	37
9.1.3 Procedure quantitative.....	37
9.1.4 Procedure qualitative	37
9.2. Metodiche molecolari	38
9.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction) classica	38
9.3. Contaminazione sperimentale Microbial Challenge Test (MCT).....	39
9.3.1. Tipi di challenge test.....	40
9.3.2. Scopo del challenge test nei M.E.L.....	40
9.4. Analisi microbiologiche.....	40
9.4.1 Preparazione del campione.....	42
9.4.2 Ricerca ed enumerazione di <i>E.coli</i> secondo la norma ISO TS 16649-3/2005.....	43
9.4.3 Ricerca di <i>Salmonella</i> spp mediante la norma UNI EN ISO 6579/2004.....	43
9.4.4 Isolamento ed identificazione di <i>Vibrio</i> spp mediante la norma ISO TS 21872-1:2007..	44
9.4.4.1 Tipizzazione di <i>Vibrio cholerae</i> O1 e O139 e <i>Vibrio cholerae</i> non-O1 e non-O139.....	47
9.5. Caratterizzazione molecolare mediante PCR	47
9.5.1 Protocollo di estrazione del DNA	47
9.5.2 Valutazione qualitativa del DNA estratto mediante elettroforesi sul gel d'agarosio	48
9.5.3 Programmi PCR.....	48
9.5.3.1 Identificazione di specie: ricerca gene ompW	48
9.5.3.2 Caratterizzazione tossicologica	49
9.5.3.2.1 PCR per la ricerca della tossina colerica (gene ctx)	49
9.5.3.2.2 PCR per la ricerca del gene stn/sto per la tossina termostabile NAG-ST.....	51
9.6 Microbial Challenge Test (MCT)	52
9.6.1 Materiali per il challenge test.....	52
9.6.2 Verifica dell'assenza del microrganismo Target nell'alimento	53

9.6.3 Preparazione della sospensione microbica	54
9.6.4 Verifica della vitalità dell'inoculo	55
9.6.5 Modalità di inoculo in campioni di Ostriche	55
9.6.6 Verifica carica microbica finale	55
9.7 Determinazione parametri ecologici	58
9.7.1 Determinazione dell'NaCl totale sugli alimenti (salinità) – Metodo di Volhard	58
9.8 Test statistici	59
10 RISULTATI	60
10.1 Caratterizzazione microbiologica	60
10.1.1 Parametri ambientali (temperatura, pH, salinità) acqua di allevamento dei M.E.L	60
10.1.2 Ricerca <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.....	60
10.1.3 Ricerca di <i>Vibrio</i> spp	64
10.2 Fattori ecologici di crescita	72
10.3 Correlazione con <i>Escherichia coli</i>	73
10.4 <i>Vibrio cholerae</i> : tipizzazione sierologica ed identificazione molecolare.....	75
10.5 Parametri chimici (pH, a_w , salinità) dei M.E.L.....	77
10.6 Challenge test	77
11 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	80
12 BIBLIOGRAFIA	83

1. INTRODUZIONE

1.1 I prodotti della pesca

La determinazione della distribuzione, della concentrazione e della prevalenza di uno o più microrganismi responsabili di tossinfezioni alimentari è lo strumento necessario per definire l'accettabilità dei prodotti alimentari in tutte le fasi della filiera produttiva e rappresenta contemporaneamente uno degli obiettivi primari per la sicurezza degli alimenti.

La definizione di modelli di gestione integrata del rischio in ambito alimentare è per diversi settori una realtà piuttosto concreta e fondata su numerose evidenze tecnico-scientifiche che hanno permesso l'elaborazione di indicazioni regolamentari specifiche.

Nel comparto della maricoltura, invece, le suddette acquisizioni risultano essere meno approfondite.

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 (Suffredini E., Croci L., 2001). Considerato l'aumento di richieste, in quest'ultimi anni si è assistito ad un intenso incremento delle attività di allevamento dei prodotti della pesca che ha coinvolto principalmente i paesi asiatici ma anche l'Europa (Italia, Spagna, Francia e Grecia).

La maggior parte del pesce commercializzato a livello internazionale proviene da Paesi non industrializzati, che spesso sono privi di adeguati sistemi di controllo degli alimenti. In tali Paesi, e spesso anche in quelli industrializzati, i prodotti della pesca destinati sia al mercato interno che a quello internazionale, provengono da zone marine non ben definite e sono trasportati in condizioni igieniche non idonee e a temperature non adeguate. Tutto ciò influisce notevolmente sulla qualità igienica di un prodotto di per sé già molto delicato e facilmente deperibile.

Emerge dunque l'esigenza di un controllo sanitario più rigoroso in modo tale da prevenire le malattie derivate dal consumo dei prodotti della pesca, per la maggior parte rappresentate da intossicazioni di origine microbiologica.

1.2 Molluschi Eduli Lamellibranchi (M.E.L)

I Molluschi Eduli Lamellibranchi (M.E.L) sono tra gli alimenti più frequentemente implicati in episodi di tossinfezioni alimentari di diversa gravità (Bryan, 1980; Davies *et al.*, 2001; Jaksic *et al.*, 2002).

I M.E.L sono animali scavatori sessili o sedentari che si nutrono di piccole particelle alimentari presenti nell'acqua o nei sedimenti mediante un meccanismo di filtrazione quasi ininterrotto (Croci L., Suffredini E., 2003). A seconda delle dimensioni, della specie e della temperatura di stabulazione i M.E.L sono capaci di filtrare grandi quantità di acqua ; ad esempio un mitilo a 14°C filtra circa 1,5 l di acqua /ora, un'ostrica 12 l/ora a 15°C (Richards GP., 1988).

Durante questa attività i molluschi trattengono nel loro organismo non solo le particelle alimentari necessarie al loro metabolismo (per lo più plancton) ma anche microrganismi naturalmente presenti nell'ambiente.

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.

1.3 Flora microbica caratteristica dei M.E.L

1.3.1 Caratteristiche nutrizionali

Dal punto di vista nutrizionale il tessuto muscolare degli animali acquatici, analogamente alle carni, ha un elevato contenuto in proteine e un basso contenuto in carboidrati.

La composizione in aminoacidi liberi della carne di pesce può influenzare l'andamento del deterioramento e assumere importanza dal punto di vista sanitario per la formazione di ammine biogene.

I molluschi presentano una composizione chimica differente dai pesci teleostei e dai crostacei per l'elevato contenuto di carboidrati ed il minore contenuto totale di azoto (James *et al*, 2009).

Il livello più elevato di carboidrati (soprattutto glicogeno) risulta responsabile della differenza tra i fenomeni alterativi caratteristici dei molluschi e quelli degli altri prodotti ittici. I molluschi raggiungono infatti valori di pH molto più bassi a causa della degradazione degli zuccheri da parte degli enzimi contenuti nei tessuti (Tab. 1 e Tab. 2).

Tab.1 - Composizione chimica Pesci teleostei.

	Acqua	Carboidrati	Proteine	Grassi	Ceneri
Pesce azzurro	74,6	0,0	20,5	4,0	1,2
Merluzzo	82,6	0,0	16,5	0,4	1,2
Eglefino	80,7	0,0	18,2	0,1	1,4
Ipoglosso	75,4	0,0	18,6	5,2	1,0
Aringa (Atlantico)	67,2	0,0	18,3	12,5	2,7
Sgombro (Atlantico)	68,1	0,0	18,7	12,0	1,2
Salmone (Pacifico)	63,4	0,0	17,4	16,5	1,0
Pesce spada	75,8	0,0	19,2	4,0	1,3

Tab. 2 - Composizione chimica Crostacei e Molluschi

	Acqua	Carboidrati	Proteine	Grassi	Ceneri
Granchio	80,0	0,6	16,1	1,6	1,7
Aragosta	79,2	0,5	16,2	1,9	2,2
Molluschi bi-valvi (polpa)	80,3	3,4	12,8	1,4	2,1
Ostriche	80,5	5,6	9,8	2,1	2,0
Cappesante	80,3	3,4	14,8	0,1	1,4

1.3.2 Microflora caratteristica

Il tipo di popolazione microbica associata con i prodotti ittici vivi riflette la microflora dell'ambiente nel quale essi sono stati catturati o allevati ma è subito modificata dalla capacità dei diversi microrganismi, per la maggior parte batteri, di moltiplicarsi nell'ambiente fornito dalla superficie esterna, pelle o conchiglia a seconda del tipo di organismo, dalle branchie e dal canale alimentare.

Ad esempio, i molluschi che crescono vicino agli insediamenti umani tenderanno ad avere cariche batteriche più elevate e qualitativamente diverse rispetto a quelli che si trovano in aree isolate.

Molti sono i fattori che influenzano il numero ed il tipo di microrganismi presenti nei prodotti ittici; fra questi si possono ricordare (Tiecco G., 2001):

- a) La stagione e la temperatura dell'acqua, le quali intervengono sui movimenti o rimescolamenti dell'acqua stessa e quindi influenzano la maggiore o minore distribuzione dei microrganismi.

Le popolazioni batteriche di pesci e molluschi provenienti da acque temperate per esempio sono prevalentemente psicrofile in funzione della temperatura dell'acqua che è di solito inferiore a 10 °C. I prodotti ittici provenienti dalle acque tropicali, al contrario, mostrano livelli più alti di microrganismi mesofili.

- b) Il grado d'inquinamento delle acque di allevamento o di pesca, particolarmente significativo in prossimità delle coste dove vengono immessi rifiuti urbani, influisce sulla composizione della flora microbica; nelle zone costiere, infatti, oltre alla normale flora psicrofila si rinvergono in abbondanza anche specie mesofile e microrganismi intestinali di derivazione umana ed animale.
- c) Zona di allevamento o di pesca.

Diversamente da quello che comunemente si pensa la microflora dei prodotti ittici non è prevalentemente alofila: nella maggior parte dei casi, infatti non si tratta di alofili ma di alotolleranti capaci di crescere in un ampio spettro di concentrazioni saline e con un optimum intorno al 2-3% di NaCl.

Nelle specie di origine marina prevalgono le specie appartenenti al genere *Vibrio*, alotolleranti mentre in quelle di acqua dolce prevalgono le *Aeromonas*.

I batteri che vivono sulla superficie degli organismi marini sfruttano come substrato di crescita gli aminoacidi, i peptidi e altre fonti diverse dai carboidrati; l'utilizzazione di queste sostanze porta alla produzione di condizioni leggermente alcaline del substrato. La flora microbica che si trova sulla pelle e sulle branchie è tipicamente aerobia o aerobia facoltativa come

nel caso del genere *Vibrio*. Batteri strettamente anaerobi si possono trovare solo nell'intestino. Da un punto di vista qualitativo prevale la flora Gram positiva nelle acque fredde e quella Gram negativa nelle acque più calde. I generi maggiormente rappresentati sono *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Micrococcus* e *Corynebacterium*.

La microflora tipica dei molluschi è anch'essa simile alle precedenti con una netta prevalenza del genere *Vibrio*; a causa dell'elevato contenuto in glicogeno l'alterazione dei molluschi è essenzialmente di tipo fermentativo (James *et al*, 2009). La normale flora dei molluschi è fondamentalmente costituita da forme bastoncellari Gram negative, asporigene appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Flavobacterium*; si rivengono anche *Enterobacter*, *Proteus* e alcuni microrganismi di origine fecale e microrganismi Gram positivi (Tiecco G., 2001).

Non va dimenticata la presenza di microrganismi patogeni quali *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni* che possono derivare sia dall'ambiente o essere presenti già nell'animale vivo o essere veicolati dalla contaminazione delle acque o ancora da una contaminazione post mortem dovuta alla manipolazione e trattamenti successivi.

Altri microrganismi, come l'*Aeromonas* e *Plesiomonas*, sono stati responsabili di infezioni occasionali e possono rappresentare un rischio per le persone immunodepresse. *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Shigella* e *Salmonella* sono stati isolati da pesci e molluschi provenienti da acque contaminate da scarichi umani. (Tab.3).

Tab. 3 – Microflora caratteristica dei prodotti ittici freschi ed alterati (J.M.Jay *et al.*,2009)

Batteri	Gram	Prevalenza	Lieviti	Prevalenza	Muffe	Prevalenza
<i>Acinetobacter</i>	-	X	<i>Candida</i>	XX	<i>Aspergillus</i>	X
<i>Aeromonas</i>	-	XX	<i>Cryptococcus</i>	XX	<i>Aureobasidium (Pullularia)</i>	XX
<i>Alcaligenes</i>	-	X	<i>Debaryomyces</i>	X	<i>Penicillium</i>	X
<i>Bacillus</i>	+	X	<i>Hansenula</i>	X	<i>Scopulariopsis</i>	X
<i>Corynebacterium</i>	+	X	<i>Pichia</i>	X		
<i>Enterobacter</i>	-	X	<i>Rhodotorula</i>	XX		
<i>Enterococcus</i>	+	X	<i>Sporobolomyces</i>	X		
<i>Escherichia</i>	-	X	<i>Trichosporon</i>	X		
<i>Flavobacterium</i>	-	X				
<i>Lactobacillus</i>	+	X				
<i>Listeria</i>	+	X				
<i>Microbacterium</i>	+	X				
<i>Moraxella</i>	-	X				
<i>Photobacterium</i>	-	X				
<i>Pseudomonas</i>	-	XX				
<i>Psychrobacter</i>	-	X				
<i>Shewanella</i>	-	XX				
<i>Vibrio</i>	-	XX				
<i>Weissella</i>	+	X				
<i>Pseudoalteromonas</i>	-	X				

X = presenza nota; XX = riportato con maggiore frequenza.

1.4 Molluschicoltura in Italia

È rilevante sottolineare come l'Italia sia il terzo Paese produttore Europeo di molluschi eduli lamellibranchi, dopo Spagna e Francia (IREPA, 2007); il nostro Paese è inoltre uno fra i maggiori produttori mondiali di specie pregiate di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) e di vongole veraci (*Tapes decussatus*).

La molluschicoltura è la principale voce produttiva dell'acquacoltura nazionale: nel 2006, il 70,6% della produzione totale da acquacoltura proveniva da allevamenti di molluschi e, in particolare, il comparto della mitilicoltura incidere per il 73% (ISMEA, 2007).

La produzione è basata quasi esclusivamente su mitili (*Mytilus galloprovincialis*) e vongole veraci filippine (*Tapes philippinarum*), a cui si aggiungono limitate quantità di vongole veraci (*Tapes decussatus*) ed ostriche (*Crassostrea gigas* e *Ostrea edulis*) (Prioli G., 2008).

La mitilicoltura ha una tradizione consolidata nel tempo in diverse regioni d'Italia e negli ultimi decenni del secolo scorso si è assistito al passaggio da una coltivazione nell'ambito delle lagune e degli stagni costieri a quello in mare aperto. Questo spostamento è stato determinato principalmente dal peggioramento delle caratteristiche igienico-sanitarie delle acque dei bacini che hanno scambi limitati con il mare.

Attualmente in Italia sono presenti tre sistemi di allevamento (Prioli G., 2008):

- il sistema fisso di più antica origine è adottato in aree lagunari o strettamente costiere e riparate. Le regioni con i maggiori insediamenti di questo tipo sono la Puglia e la Liguria.
- il longline a monoventia relativamente recenti, rappresentano la tipologia di allevamento più diffusa. Sono utilizzate in zone di mare aperto in quanto offrono un'ottima garanzia di resistenza a eventi meteo marini anche di forte intensità.
- longline triestino o a più ventie viene utilizzato in zone parzialmente o del tutto riparate in quanto la spinta elevata dei barili di sostentamento, in caso di mareggiate, causa notevoli ripercussioni sia sulle strutture di allevamento, sia sul prodotto appeso. Tale sistema di allevamento è diffuso principalmente in Friuli-Venezia Giulia, in Puglia, Liguria e Sardegna.

In Italia al consumo di molluschi sono attribuiti il 7% degli episodi tossinfettivi notificati (Parsi, 2004); tuttavia, si ritiene che i dati epidemiologici disponibili siano sottostimati e che il numero dei casi reali sia circa 20 volte superiore, in particolare nelle regioni meridionali, dove persiste la tradizione del consumo dei molluschi crudi (Normanno *et al.*, 2006): in molti casi, infatti, il consumo di molluschi provoca solo sintomi gastrointestinali di lieve entità che non richiedono alcun intervento medico.

1.5 Molluschicoltura in Sardegna

In Sardegna le prime attività legate all'allevamento di mitili risalgono al primo dopoguerra.

La mitilicoltura occupa una posizione di rilievo nell'economia Sarda: nel 2008 sono state prodotte in Sardegna circa 11.000 tonnellate di mitili, con un incremento del 60% rispetto al 1992 (Sardegna Agricoltura/Laore, 2009).

Gli allevamenti di mitili sono dislocati principalmente nelle province di Oristano, Cagliari, Ogliastra ed Olbia-Tempio; tuttavia, la maggior parte degli allevamenti è situata nel Golfo di Olbia, dove nel 1919, ad opera di alcuni imprenditori di La Spezia, venne installato il primo impianto di mitilicoltura in Sardegna (Dessi *et al.*, 2009).

In tale area i miticoltori hanno dato vita ad un'Organizzazione di Produttori (OP) ed hanno promosso interessanti iniziative finalizzate alla tutela della qualità e salubrità dei mitili ed alla difesa dell'ambiente marino. Sono stati, poi, realizzati progetti di valorizzazione del prodotto locale, tra cui la richiesta del marchio di origine IGP (Indicazione Geografica Protetta).

Gran parte della produzione e della commercializzazione degli allevamenti di mitili in Sardegna si concentra all'inizio del periodo estivo. Negli altri periodi dell'anno la produzione locale non è sufficiente a coprire la domanda di prodotto; per tale motivo soprattutto durante il periodo autunno-inverno è frequente il riscontro sul mercato regionale di prodotti prove-

nienti da allevamenti del Nord Italia o importati dalla Spagna, mentre nel periodo primavera-estate è presente in genere prodotto importato dalla Grecia.

La maggior parte degli allevamenti Sardi è classificato in base alla normativa Europea (Reg. CE 854/2004) in zone di produzione di classe B. I molluschi bivalvi vivi raccolti da queste zone possono essere immessi sul mercato ai fini del consumo umano soltanto dopo aver subito un trattamento di depurazione presso stabilimenti riconosciuti (Centro Depurazione Mitili - C.D.M) o presso una zona di stabulazione.

2. Filiera produttiva e normativa

Nell'ambito della sicurezza alimentare le attività di monitoraggio sulla molluschicoltura condotte lungo la filiera produttiva dei mitili e sull'ambiente in cui essi vivono hanno come obiettivo principale quello di garantire la salubrità alimentare attraverso la rispondenza di precisi requisiti Igienico Sanitari.

La filiera produttiva dei M.E.L 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 localizzazione ed 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 1441/2007.

Nello specifico il Reg. CE 854/2004 prevede una distinzione delle zone di produzione destinate alla mitilicoltura nelle classi A, B e C che differiscono da un punto di vista microbiologico 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 intravalvare;

- *Salmonella* spp : assente in 25 g di polpa di mollusco e di liquido intravalvare;

- 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 biologico.

- 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 MPN per 100 grammi di polpa e liquido intravalvare secondo il metodo MPN in cinque provette e tre diluizioni, o altro metodo alternativo e validato;
- 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 biologico.

- 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 MPN per 100 grammi di polpa e liquido intravalvare 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

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 (Fig.1).

2.1 Raccolta e depurazione

Secondo quanto stabilito dal Regolamento CE 853/2004 la depurazione avviene in stabilimenti C.D.M (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 i requisiti igienico-sanitari sufficienti a renderli idonei al consumo umano.

Prima della depurazione i molluschi vengono lavati, mediante acqua pulita, dal fango e dai detriti accumulati, quindi vengono collocati in specifici contenitori costruiti in modo da consentire il passaggio dell'acqua pulita. Devono essere posizionati in modo tale che gli strati di molluschi non ostacolino 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.

2.2 Stabulazione

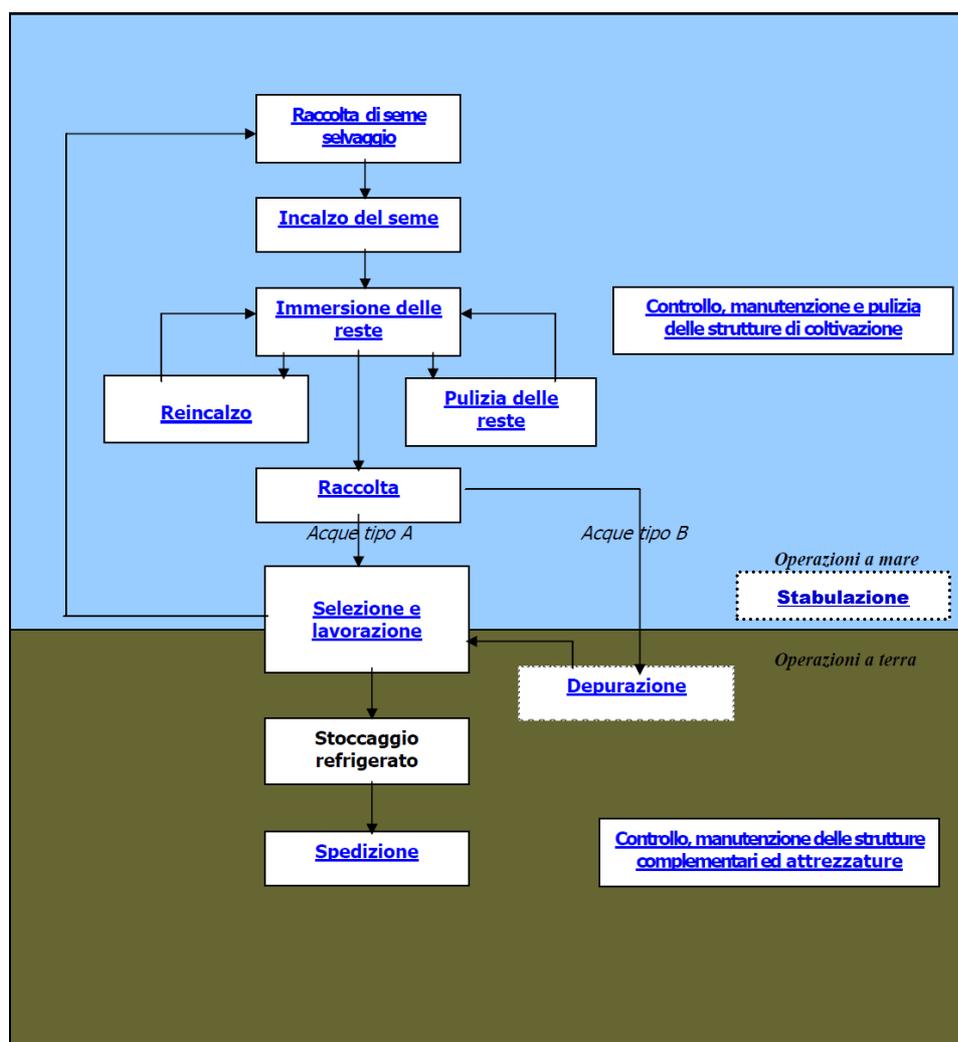
La fase di stabulazione ha le stesse finalità della fase di depurazione; la differenza riguarda gli stabilimenti che sono costituiti da parti di mare, di laguna o di estuario, chiaramente delimitate e segnalate, destinate esclusivamente alla depurazione naturale dei molluschi bivalvi vivi. A tal fine 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).

L'efficacia dei trattamenti di stabulazione o di depurazione viene valutata in relazione alla rispondenza di precisi criteri microbiologici di sicurezza alimentare previsti dal Reg. CE 2073/2005 così come modificato dalla 1441/2007 (assenza di *Salmonella* spp. e presenza di un numero di *E. coli* <230 MPN, rispettivamente in 25 e 100 g di polpa e liquido intravalvare).

Fig. 1 - Fasi del processo produttivo dei Molluschi (ISPEL., 2002).



2.3 Idoneità al consumo

Il giudizio di idoneità microbiologica al consumo (Reg CE 1441/2007) si basa solo su due parametri batteriologici (*E. coli*, *Salmonella* spp) rappresentativi di contaminazione fecale e non prevede la determinazione di altri microrganismi naturalmente presenti nell'ambiente marino e potenzialmente patogeni.

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.

Tali microrganismi possono essere frequentemente trattenuti dai molluschi e le comuni tecniche utilizzate per la loro depurazione risultano efficaci in poche ore solo nella eliminazione di batteri di origine fecale, come *Escherichia coli* (Serratore *et al.*, 2007) (Crocì L. *et al.*, 2002) (Mazzette R. *et al.*, 2010), mentre hanno uno scarso effetto nella riduzione di *Vibrio* spp che possono essere ritrovati anche in acque prive di batteri fecali.

Secondo i dati del Centers for Disease Control and Prevention – CDC (USA), le tossinfezioni connesse al consumo di molluschi sono causate principalmente (20%) da virus enterici (Corrain et al., 2007), in prevalenza virus dell'epatite A (HAV) e Norovirus (NV), e da patogeni abitualmente presenti nell'ambiente marino, come *Vibrio* spp.

I batteri di origine fecale (*Salmonella* spp. ed *Escherichia coli*), contaminanti accidentali delle acque, incidono invece solo per il 4% del totale (Serracca et al., 2007) (Lipp E.K., Rose J.B., 1997).

La normativa vigente basandosi dunque solo sul controllo di batteri fecali non assicura che tali prodotti siano esenti dalla presenza di altri agenti patogeni.

Nel regolamento CE 2073/2005 viene però evidenziata la necessità di sviluppare nuovi metodi di analisi per la determinazione di *Vibrio* patogeni; a livello Europeo tale necessità ha portato all'avvio di un progetto di ricerca "Health promoting safe seafood of high eating quality in a consumer driven fork-to-farm concept" (SEA-FOOD plus) in cui si è proposto la messa a punto di metodiche standardizzate per l'isolamento e la quantificazione di *Vibrio* spp e di altri patogeni legati alla qualità sanitaria dei prodotti ittici.

3. VIBRIONACEAE

I microrganismi appartenenti alla famiglia delle Vibrionaceae sono rappresentati principalmente dal genere *Vibrio* e da altri meno noti come *Catenococcus*, *Listonella*, *Moritella*, *Photobacter* e *Photobacterium* (NCBI Taxonomy browser).

È caratterizzata da microrganismi di forma bastoncellare, Gram-negativi di forma lineare o incurvata, mobili e asporigeni. Si tratta di organismi chemiorganotrofi, aerobi-anaerobi facoltativi con metabolismo respiratorio e fermentativo; molte specie sono ossidasi positive. Le Vibrionaceae sono diffuse negli ambienti acquatici (acqua dolce e marina), 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.

3.1 Genere *Vibrio*

Il genere *Vibrio* comprende microrganismi 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 che risulta avvolto da un involucro esterno continuo con la membrana esterna della parete cellulare (Croci L., Suffredini E., 2003).

Presentano un metabolismo sia fermentativo che aerobio e non producono spore. Molte specie sono ossidasi positive (tranne il *Vibrio metschnikovii*) fermentano il glucosio e sono organismi alofili poiché la loro crescita viene stimolata dalla presenza di NaCl elemento che per alcune specie risulta essere indispensabile (*Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*). Possono infatti essere classificati come alofili o non alofili, in base alla richiesta di NaCl per la crescita (Tab 4).

Tab 4 – Classificazione Vibrioni in base alla richiesta di NaCl (Winn W.jr et al, 2009)

Salinità	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
0%	+	+	-	-	-
3%	+	+	+	+	+
6%	-	-	+	+	+
8%	-	-	-	+	+
10%	-	-	-	-	+

I microrganismi del genere *Vibrio* (di cui attualmente si conoscono più di 67 specie ma la tassonomia è in continua evoluzione) sono molto diffusi negli ambienti acquatici, specialmente nelle acque degli estuari e nelle acque marine, nonché nei relativi sedimenti. I vibrioni si ritrovano anche sulla superficie e nel contenuto intestinale di molti animali marini sia vertebrati che invertebrati. Diverse specie fanno parte della flora batterica acquatica autoctona; 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 (Tab.5).

Le infezioni umane possono essere trasmesse per contatto diretto con l'ambiente acquatico o possono essere trasmesse indirettamente per ingestione di acqua o di alimenti contaminati per lo più prodotti della pesca e molluschi. I fattori che 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.

Alcune infezioni da Vibrioni rivestono una certa importanza, poiché comprese fra quelle malattie che richiedono quarantena ed obbligo di notifica alla World Health Organization (es. *Vibrio cholerae*), perché note per causare alta mortalità (es. *Vibrio vulnificus*) o perché causa di un alto numero di tossinfezioni in alcuni Paesi (es. *Vibrio parahaemolyticus* in Giappone). Oltre a queste, almeno altre nove specie sono riconosciute patogene per l'uomo. Fra queste *Vibrio mimicus*, così chiamato per la sua somiglianza con il *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio alginolyticus* e *Photobacterium damselae* (Tab.5) (West PA., 1989; Oliver JD., Kaper JB., 1997). Attualmente *Vibrio parahaemolyticus* è la specie più comunemente associata a tossinfezioni nell'uomo, seguito da *Vibrio cholerae* non O1, *Vibrio hollisae*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio fluvialis* (Butt AA., et al., 2004).

I vibrioni fanno parte inoltre di quell'insieme di batteri marini capace di produrre biotossine algali (in particolare biotossine di tipo PSP) responsabili di tossinfezioni alimentari dovute al consumo di mitili.

Tab. 5 - Associazione tra alcune sindromi cliniche e *Vibrio spp* (Elliot L. *et al.*,1992).

Specie	Sindrome clinica				
	Gastroenterite	Infezione ferite	Infezione orecchio	Sepsi primaria	Sepsi secondaria
<i>V. cholerae 01</i>	+++	+			
<i>V. cholerae non-01</i>	+++	++	+	+	+
<i>V. mimicus</i>	++		+		
<i>V. fluvialis</i>	++				
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	+		+
<i>V. alginolyticus</i>	(+)	++	++	+	
<i>V. hollisae</i>	++			+	
<i>V. vulnificus</i>	+	++		++	++
<i>V. furnissii</i>	(+)				
<i>V. damsela</i>		++			
<i>V. metschnikovii</i>	(+)			(+)	

+++ = riportato frequentemente; ++ = meno comune (6-100 rapporti); + = raro (1-5 rapporti); (+) = associazione non chiara.

Essendo microrganismi autoctoni dell'ambiente marino sono soggetti a repentini cambiamenti dell'ambiente in cui crescono dovuti a modificazioni di fattori ecologici come la temperatura, concentrazione di nutrienti, salinità, pH ecc. alle quali i Vibrioni reagiscono con adattamenti di carattere fisiologico e biochimico. Tra questi si ricorda una fase di quiescenza in cui i microrganismi rimangono vitali ma non coltivabili VBNC ("Viable But Non Culturable Cell") mantenendo però invariata la loro patogenicità. 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 (Cozzi *et al.*,2004).

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 (Arcangeli G., 2005). Questa capacità di adattamento è dovuta anche al fatto che i Vibrioni hanno un genoma composto da due cromosomi circolari.

3.2 Caratteristiche ecologiche di crescita del genere *Vibrio*.

I fattori ecologici estrinseci che influenzano maggiormente la loro vitalità sono:

- temperatura
- salinità
- pH.

Essi si trovano nelle migliori condizioni quando la temperatura dell'acqua è compresa tra 10 °C e 30 °C e quando la salinità è tra il 5‰ e il 30‰. In relazione a questi fattori è anche comprensibile l'andamento stagionale, ampiamente documentato, della loro presenza nell'ambiente, come pure l'incremento nei mesi estivi delle tossinfezioni da essi causate (Cozzi L., 2005).

I vibriani sono microrganismi mesofili, di raro isolamento quando la temperatura dell'acqua scende al di sotto di 10°C. Sono microrganismi sensibili all'acidità (a pH<5 lo sviluppo è inibito) ma in grado di crescere anche con valori di pH fino a 9 (Suffredini E., Croci L., 2001).

3.3 Differenziazione biochimica delle specie patogene

I vibriani isolati da campioni di interesse clinico e quelli patogeni veicolati da alimenti, sono divisibili in 5 gruppi sulla base di 7 test biochimici (Twedt R.M.,1989).

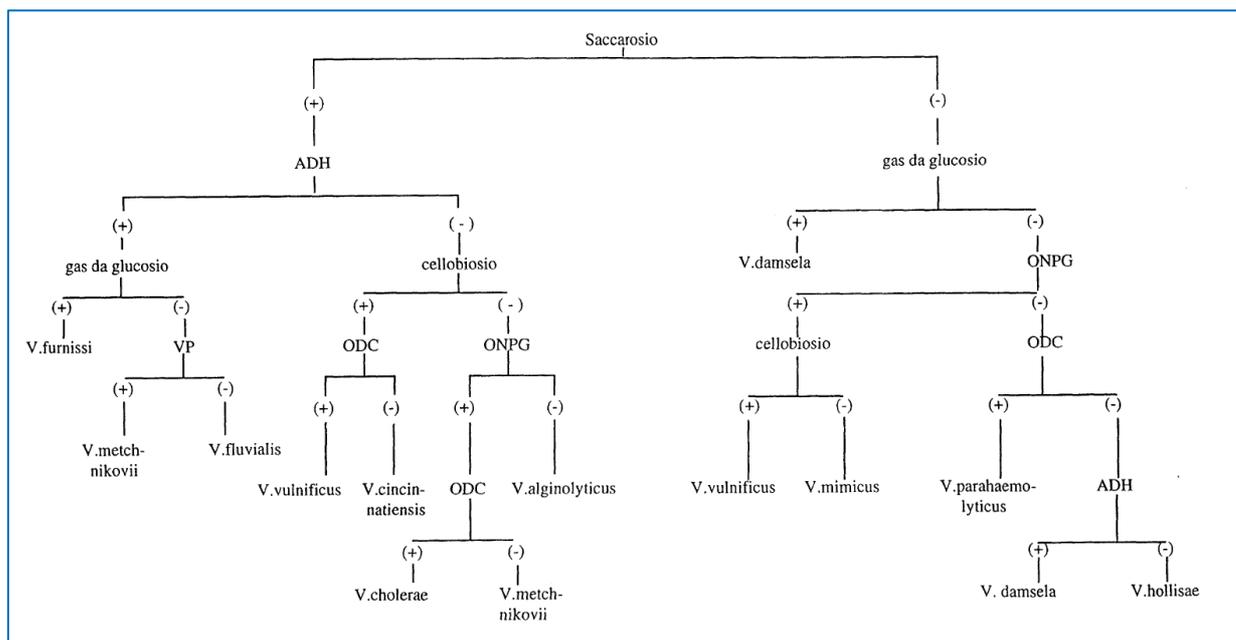
L'incapacità di crescere in brodo nutriente senza sale (0% di NaCl) differenzia le 8 specie alofile da *Vibrio cholerae* e da *Vibrio mimicus*; *Vibrio metschnikovii* è facilmente identificabile perché è ossidasi e nitrati negativo; *Vibrio hollisae* è lisina e ornitina decarbossilasi negativo e arginina deidrossilasi negativo; *Vibrio damsela*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii* sono tutti arginina deidrossilasi positivi (ADH+) , mentre i 3 rimanenti alofili (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*) sono negativi (ADH-) per questa reazione ma positivi per ornitina decarbossilasi (ODC +) (Tab.6).

Tab.6 -Test biochimici caratteristici delle specie patogene (Twedt R.M., 1989).

Test	Gruppo I (*)		Gruppo II	Gruppo III	Gruppo IV			Gruppo V		
	<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	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Nitrati	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Lisina	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Ornitina	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-

*microrganismi non alofili

** gli enzimi indicati sono: **ADH** (Arginina deidrossilasi), **ODC** (Ornitina decarbossilasi), **LDC** (Lisina decarbossilasi)

Fig 2 - Chiave diagnostica per il riconoscimento di *Vibrio* spp patogeni (Oliver J.D.,1989).

*ONPG: test utilizzato per evidenziare la produzione di β -galattosidasi

4 I VIBRIONI PATOGENI

Le specie appartenenti al genere *Vibrio* di maggiore interesse per l'uomo, poiché in grado di determinare patologie anche gravi, sono *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Vibrio cholerae*. (Mioni R. et al., 2008).

4.1 *Vibrio alginolyticus*

Inizialmente identificato come biotipo 2 del *Vibrio parahaemolyticus*, il *Vibrio alginolyticus* solo recentemente è stato elevato al rango di specie (Nicolosi V.M., Nicoletti G., 1998); fu riconosciuto inoltre per la prima volta come patogeno umano nel 1973 (Keusch G.T., et al., 2002). *Vibrio alginolyticus* è ritenuto un patogeno opportunisto soprattutto per gli animali acquatici e alcuni studi lo riportano come responsabile di vibriosi nei gamberetti (Uh Y., et al., 2001).

È il vibrione più resistente al sale, capace di crescere a concentrazioni superiori al 10% di NaCl (Keusch G.T. et al., 2002) e la sua presenza nei prodotti della pesca pare non rappresentare un serio pericolo per il consumatore in quanto la sua eziopatogenesi sarebbe eventualmente legata all'ingestione di cariche batteriche vitali molto elevate (Uh Y., et al., 2001). Si trova comunemente nelle acque di mare e negli alimenti di origine marina ed è causa di infezione ai tessuti molli e otiti all'orecchio medio, congiuntiviti purulente, encefaliti posttraumatiche, peritoniti e setticemie. Sembra tuttavia che i pazienti presentino tali sintomatologie solo in seguito a contatto con l'acqua di mare (Tiecco G., 2001). *Vibrio alginolyticus* viene talvolta isolato nei soggetti con diarrea ma non è stato stabilito con esattezza il suo eventuale ruolo patogeno.

4.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Identificato per la prima volta da ricercatori Giapponesi nel 1951 come agente di gastroenterite di origine alimentare, *Vibrio parahaemolyticus* viene oggi riconosciuto come importante patogeno intestinale in molte parti del mondo soprattutto in Giappone dove rappresenta il maggior agente eziologico di tossinfezioni intestinali forse a causa del consumo diffuso di pesce crudo (Keusch G.T. *et al.*, 2002).

Vibrio parahaemolyticus è un microrganismo alofilo (cresce con concentrazioni di NaCl $\geq 3\%$), aerobio-anaerobio facoltativo che cresce bene con valori di pH compresi tra 4,8 e 11 con un optimum tra 7,6-8,6 ed una temperatura compresa tra 5 e 44°C con un optimum a 30-37°C. Presenta una richiesta ottimale di a_w di 0,992 tuttavia può svilupparsi anche quando l' a_w scende a valori pari a 0,937 (J.M.Jay *et al.*, 2009) (Galli Volonterio A., 2005) (Tab.7).

Tab.7.- *Vibrio parahaemolyticus* condizioni limite di crescita (Galli Volonterio A., 2005).

Parametri	Optimum	Intervallo
Temperatura(C°)	37	5-44
pH	7,5-8,8	4,8-11,00
a_w	0,992	0,937-0,996
NaCl%	3	0,5-10

Vibrio parahaemolyticus è un microrganismo largamente diffuso in natura, autoctono dell'ambiente marino costiero (regioni tropicali e temperate) presente anche nei pesci, nei crostacei e nei molluschi. Tale Vibrione è responsabile di epidemie legate al consumo di prodotti ittici crudi (per lo più molluschi) o poco cotti. Nei paesi occidentali i principali veicoli alimentari di *Vibrio parahaemolyticus* sono costituiti da crostacei e molluschi, in particolare mitili ed ostriche(Tiecco G., 2001).

La distribuzione e la concentrazione di tale microrganismo è influenzata dall'azione delle diverse condizioni dell'ambiente di crescita, (valori di temperatura e salinità) ed è per questo motivo che viene maggiormente isolato nei mesi estivi più caldi e non in quelli invernali in cui la temperatura dell'acqua scende al di sotto dei 20°C (Suffredini E., Croci L., 2001).

Diversi studi hanno dimostrato che la presenza di *Vibrio parahaemolyticus* non è correlata con l'inquinamento fecale per cui la contaminazione di prodotti della pesca freschi come crostacei, molluschi e pesce è dovuta alla presenza naturale dei vibrioni nell'ambiente da cui i prodotti provengono (Koh EGL. *et al.*, 1994). La sua rapida proliferazione all'interno dei molluschi non correttamente conservati può determinare un incremento della sua concentrazione variabile fra 1 e 4 ordini di grandezza nel corso delle 24h,rendendo i molluschi notevolmente rischiosi, specie se consumati crudi (come avviene spesso per le ostriche) (Suffredini E., Croci L., 2001).

La concentrazione media nei prodotti della pesca è pari a 10^3 ufc/g ma può essere più alta se tali prodotti provengono da luoghi di raccolta con temperature elevate.

In condizioni ambientali ottimali tale microrganismo presenta tempi di replicazione brevi (8-13 minuti) a seconda della natura del substrato di crescita (Tiecco G., 2001) per cui in poco tempo è in grado di raggiungere la dose minima infettante che per un adulto sano è superiore a 10^5 ufc/g.

Le infezioni alimentari da *Vibrio parahaemolyticus* si presentano con episodi di gastroenterite acuta che si manifesta dopo un periodo di 4-92h di incubazione (24h media) con diarrea (a volte con presenza di sangue), dolore addominale, nausea e vomito (Suffredini E., Croci L., 2001).

La patogenicità di *Vibrio parahaemolyticus* sembra essere legata alla presenza di due tossine: TDH (Thermostable Direct Hemolysin) e TRH (TDH-Related Hemolysin). I ceppi patogeni sono quelli generalmente associati al fenomeno di Kanagawa, dato dalla capacità di indurre beta-emolisi su una piastra di agar sangue a partire da eritrociti freschi umani o di coniglio, indotto dalla tossina TDH (Arcangeli G., 2005).

Oltre alla citotossicità, nel meccanismo patogenetico concorrono anche i fattori di adesività che facilitano l'attacco alle cellule dell'intestino dell'uomo ed enterotossicità.

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 (Ward *et al.*, 2005).

Vibrio parahaemolyticus è stato per la prima volta identificato nel 1951 come causa di malattie alimentari in Giappone, dove furono registrati 272 casi di malattia e 20 decessi associati al consumo di sardine bollite e semiessiccate (J.M.Jay *et al.*, 2009). Venne poi indicato come comune agente eziologico di malattie associate al consumo di prodotti della pesca in molte regioni asiatiche.

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 (Liu X. *et al.*, 2004).

Vibrio parahaemolyticus fu per la prima volta identificato negli Stati Uniti nel 1971 come agente eziologico di 3 epidemie nel Maryland con 425 casi di gastroenterite associati al consumo di granchi sottoposti ad un inadeguato trattamento termico (J.M.Jay *et al.*, 2009).

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 casi di infezione dal CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (Daniels N.A. *et al.*, 2000): i più importanti episodi 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) (DePaola A. *et al.*, 2003); 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 associati 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 (McLaughlin J.B. *et al.*, 2005). 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 la contaminazione delle ostriche da *Vibrio parahaemolyticus* sia una problematica legata alla sicurezza alimentare negli Stati Uniti.

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 (Molero X. *et al.*, 1989), 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 casi, in occasione di un pranzo nuziale (Martinez-Urtaza J. *et al.*, 2005). 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.

4.3 *Vibrio vulnificus*

Sebbene rappresenti solo una minoranza delle specie di *Vibrio* rinvenute in natura, *Vibrio vulnificus* è considerato uno dei microrganismi patogeni più virulenti che si conoscano (Galli Volonterio A., 2005).

Assegnato in un primo momento alla specie *Vibrio parahaemolyticus* fu distinto negli anni '70 per la sua capacità di fermentare il lattosio e per il riconoscimento di specifiche sindromi cliniche che esso causa.

Vibrio vulnificus è un microrganismo alofilo che richiede concentrazioni di NaCl del 1-3%, strettamente aerobio che cresce ad un valore di temperatura ottimale di 37°C presentando, a tale temperatura, tempi di replicazione di 22-30'. È sensibile alle basse temperature perdendo la sua vitalità a 4°C; tale perdita però risulta notevolmente più lenta in matrici alimentari come le ostriche e molluschi in genere. (Tiecco G., 2001).

Vibrio vulnificus fa parte della flora batterica autoctona dell'ambiente marino; prolifera nei mesi caldi e richiede un ambiente salino per la crescita ma in concentrazioni inferiori rispetto a quelle richieste da *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio parahaemolyticus*.

Tale microrganismo viene trasmesso all'uomo fondamentalmente attraverso i prodotti ittici ed i molluschi in modo particolare le ostriche (specialmente se consumate crude) che rappresentano la principale fonte alimentare di questo microrganismo e si ritiene che siano responsabili del 95% circa di tutti i decessi legati al consumo di prodotti ittici negli Stati Uniti (J.M.Jay *et al.*, 2009).

Nei molluschi si trova solitamente in concentrazione inferiore rispetto a *Vibrio parahaemolyticus*, ma la sua concentrazione può raggiungere 10^5 ufc/g 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 (U.S.A) e della Nuova Scozia, nonché in acque costiere Olandesi. Esso è presente pure nel Mediterraneo ma in quantità inferiore rispetto ad altre aree geografiche; questa minore incidenza è probabilmente da imputare ad una maggiore salinità delle acque di questo mare (Tiecco G., 2001).

Vibrio vulnificus penetra nell'organismo umano attraverso due vie: orale, veicolato dagli alimenti, e cutanea, per la presenza di lesioni traumatiche, dando così origine a due forme differenti di malattia.

L'ingestione del microrganismo dà origine, dopo un periodo medio d'incubazione di 16-18 ore, ad una malattia nota come "setticemia primaria" la cui sintomatologia è caratterizzata da febbre, brividi, nausea, ipotensione e, meno frequentemente, dolori addominali, vomito e diarrea. Questa forma morbosa si manifesta in particolare nei soggetti immunocompromessi ed in quelli affetti da cirrosi; in essi la setticemia primaria si sviluppa generalmente molto velocemente con esiti fatali (più del 50% entro un giorno o due anche in presenza di terapie antibiotiche) (Keusch G.T., *et al.*, 2002).

La dose infettante per questa specie a differenza di altri vibroni è intorno a 10^3 ufc/g soprattutto in soggetti con patologie predisponenti (disturbi ematopoietici, malattie epatiche o renali croniche) o con comportamenti a rischio (es. abuso di alcol) (Chart H. *et al* 1985) (Johnson JM, McFarland LM., 1985).

Le infezioni sono molto comuni in diversi Paesi e si verificano per lo più nei mesi estivi; per la maggior parte i soggetti colpiti sono maschi di età superiore ai 40 anni.

Nella forma cutanea, che in un certo senso può considerarsi una malattia professionale in quanto colpisce per lo più soggetti che manipolano molluschi. Il microrganismo penetra attraverso lesioni cutanee preesistenti o provocate, appunto, manipolando molluschi, e dopo un periodo di incubazione di circa 12 ore, fanno la comparsa i primi sintomi rappresentati da dolori intensi, eritema ed edema nel punto d'ingresso del germe; compaiono quindi delle vescicole le quali sono spesso circondate da un alone blu-porpora. Nel giro di qualche giorno queste lesioni vanno incontro a necrosi; spesso sono presenti anche febbre e brividi (Tiecco G., 2001).

Questi microrganismi sono altamente invasivi e producono una citotossina litica per gli eritrociti che però non sembra essere un fattore di virulenza critico; viene anche prodotta una emolisina (J.M.Jay *et al.*, 2009).

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.

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 sottrarre questo elemento alle sieroproteine che lo legano, transferrina e lattoferrina.

A differenza degli altri vibroni *Vibrio vulnificus* non provoca di regola epidemie ma solo episodi sporadici. L'incidenza totale delle infezioni non risulta ancora determinata in modo preciso; è stato appurato che negli Stati Uniti tra il 1997 e il 1998 su un totale di 937 casi di malattie generate da vibroni, 141 casi (15%) erano dovuti alla presenza di *Vibrio vulnificus*; tra di essi 41 risultarono fatali e tale numero rappresentava la quasi totalità (96%) delle morti collegate a infezioni da vibroni (Suffredini E., Croci L., 2001).

Le ostriche crude rappresentano la principale fonte alimentare di questo microrganismo; nel 1996, a Los Angeles, *Vibrio vulnificus*, ha provocato 16 casi e 3 decessi associati al consumo di ostriche crude (CDC., 1996).

4.4 *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae è l'agente eziologico del colera, una malattia infettiva di importanza significativa per la salute pubblica per la sua rapida diffusione in aree con scarsa igiene ed improprio trattamento delle acque di scarico, nonché per le sue gravi conseguenze soprattutto in presenza di un sistema sanitario inadeguato.

Un organismo simile ad un vibrione fu descritto per la prima volta come il patogeno del colera già dal 1854 da Filippo Pacini anche se *Vibrio cholerae* non fu isolato che 30 anni dopo da Robert Kock nel 1884 (Suffredini E., Croci L., 2001).

La storia moderna del colera è caratterizzata da 7 pandemie, durante le quali *Vibrio cholerae* si diffuse in tutto il mondo. Il colera associato alla settima pandemia, che è quella corrente, è endemico di gran parte di Asia, Africa ed America Latina e nonostante il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie in alcune regioni di questi Paesi la malattia rimane una minaccia per la popolazione.

Si è tradizionalmente ritenuto che l'ospite naturale del *Vibrio cholerae* fossero gli esseri umani. Tuttavia, numerosi studi ambientali hanno dimostrato che organismi di questo tipo si trovano in associazione con ambienti marini, costieri o estuari (forse i copepodi e altro zooplancton possono essere serbatoi alternativi) (Tiecco G., 2001).

4.4.1 Tassonomia ed ecologia

Vibrio cholerae è un microrganismo Gram-negativo, ossidasi-positivo, asporigeno, aerobio-anaerobio facoltativo, avente forma bastoncina ricurva, provvisto di un singolo flagello, ad un polo della cellula, in grado di conferirgli motilità (Fig. 3).

Fig 3 - *Vibrio cholerae*: fotografia al microscopio elettronico



È in grado di fermentare alcuni zuccheri, come maltosio, saccarosio, destrosio e mannitolo, producendo acidi; è debolmente alofilo e, a livello ambientale, ha una variabile capacità di resistenza a seconda della temperatura, umidità e presenza di sostanze organiche. Nell'acqua potabile può sopravvivere da 7 a 13 giorni, mentre in quella non potabile soltanto 1 o 2 giorni. Negli alimenti refrigerati la sopravvivenza può essere anche di 28 giorni in funzione del pH e dell' a_w ; nei frutti di mare la sopravvivenza raggiunge i 14 giorni a temperatura di refrigerazione.

Le condizioni limite di crescita presentano i seguenti valori (Tab. 8):

Tab. 8 – *Vibrio cholerae* condizioni limite di crescita (Galli Volonterio A., 2005).

Parametri	Optimum	Intervallo
Temperatura(C°)	37	10-43
pH	7,6	5,0-9,6
a _w	0,984	0,97-0,998
NaCl%	0,5	0,1-4

Questo microrganismo può essere isolato dalle acque marine in vicinanza delle coste in genere nei mesi estivi e solo raramente in quelli invernali durante i quali sembra si localizzi nei sedimenti per risalire nelle acque superficiali quando la temperatura dell'acqua è favorevole (sopra i 14°C circa).

Qui *Vibrio cholerae* si insedia nello zooplancton e nei materiali ricchi di chitina dove si moltiplica; questa colonizzazione si verifica con maggiore efficacia nelle condizioni di salinità tipiche degli estuari.

Vibrio cholerae è diviso in sierogruppi in base all'antigene somatico O che, come in tutti i Gram negativi, è costituito da lipopolissaccaridi termostabili, presenti nella superficie della cellula, le cui frazioni lipopolissaccaridiche conferiscono specificità sierologica che permette di identificare sei sierogruppi (dall'1 al 6) (Nicolosi V.M., Nicoletti G., 1998).

Al sierogruppo 1 appartengono i vibriani colerici veri e propri detti quindi O1; ai sierogruppi dal 2 al 6 appartengono altri vibriani denominati impropriamente (poiché fanno sempre parte della specie *Vibrio cholerae*) come "Vibriani Non Colerici" o NCVs (Non Cholera Vibrios) o anche "Vibriani Non Agglutinabili" (Vibriani "NAG") in quanto non reagiscono con gli antisieri che agglutinano i vibriani del colera propriamente detti.

Analizzando più in dettaglio l'antigene O si è visto che esso è differenziabile in almeno 13 tipi differenti o partigeni, indicati come A, B, C, D, E, F, G+J, H+M, I+K, L.

La contemporanea presenza di questi partigeni e la loro varia combinazione permette un'ulteriore differenziazione dei 6 sierotipi di *Vibrio cholerae* in sottotipi sierologici. La classificazione in sottotipi sierologici risulta importante soprattutto per il gruppo sierologico O1; in esso sono stati distinti tre sottotipi: Ogawa (partigeni AB), Inaba (partigeni AC), Hikojima (partigeni ABC)

Il sierogruppo O1 è ulteriormente diviso, in base a caratteristiche bio-fisiologiche, in due biotipi: Classico ed El Tor, denominato così dal centro di quarantena ElTor nella penisola del Sinai, in cui venne isolato per la prima volta (Nicolosi V.M., Nicoletti G., 1998).

La differenza fondamentale tra i due biotipi è data dal fatto che il biotipo classico risulta non emolitico per gli eritrociti di montone mentre El Tor risulta esserlo.

Il biotipo classico è ritenuto responsabile delle prime sei pandemie verificatesi tra il 1817 ed il 1923. La settima pandemia che iniziò nel 1961 fu causata dal biotipo El Tor.

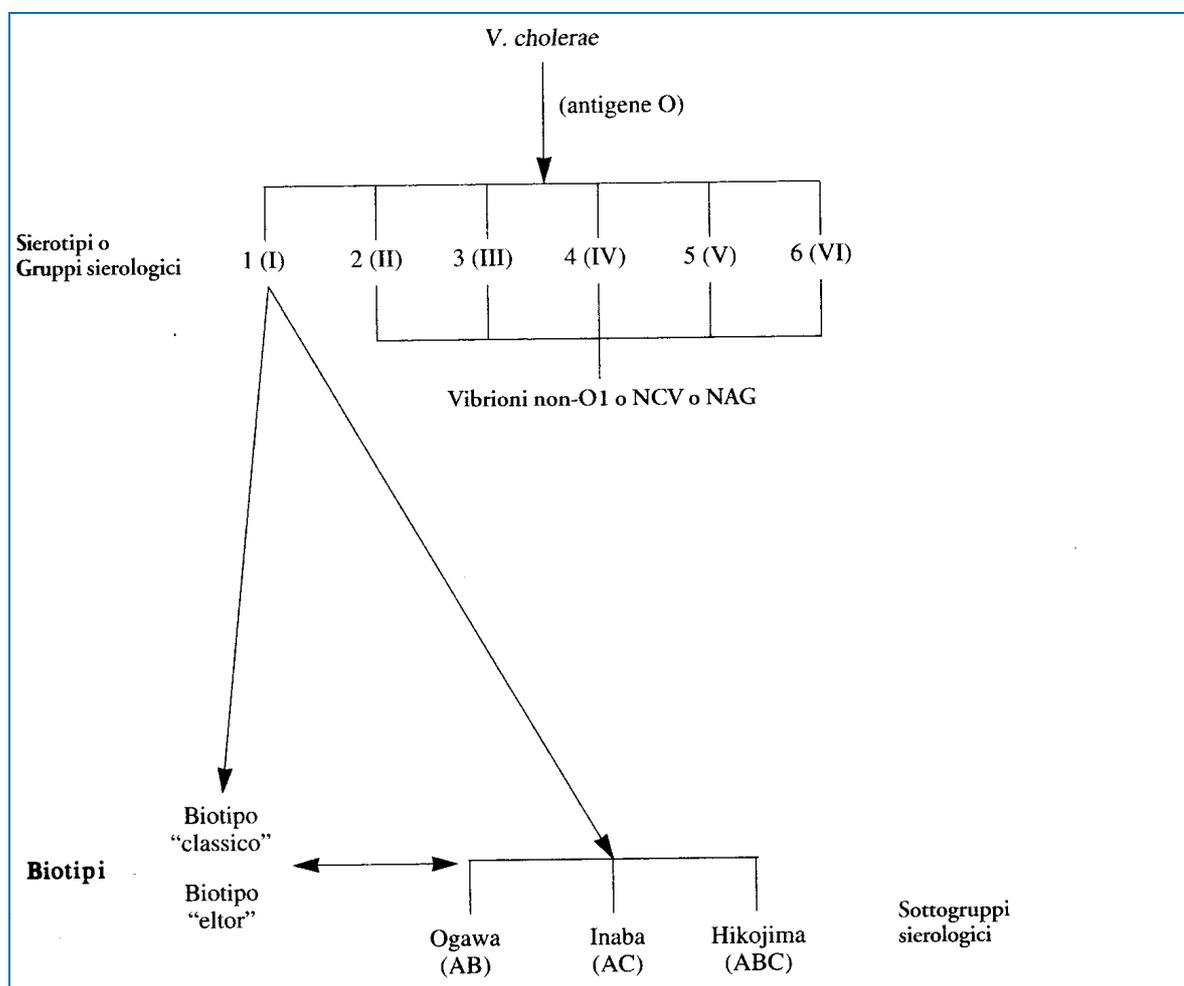
I due biotipi presentano altre caratteristiche differenziali da un punto di vista epidemiologico.

I vibriani "El Tor" sono responsabili di epidemie in cui generalmente i casi gravi sono in minor numero ed i casi di lieve entità risultano essere più frequenti e le infezioni asintomatiche; persistono più a lungo nell'uomo per cui esistono casi di portatori cronici che non si verificano per il biotipo "classico"; inoltre i vibriani "El Tor" risultano essere più resistenti agli

agenti chimici mostrando dunque maggiore capacità di sopravvivenza nell'ambiente naturale rispetto ai Vibrioni "Classici".

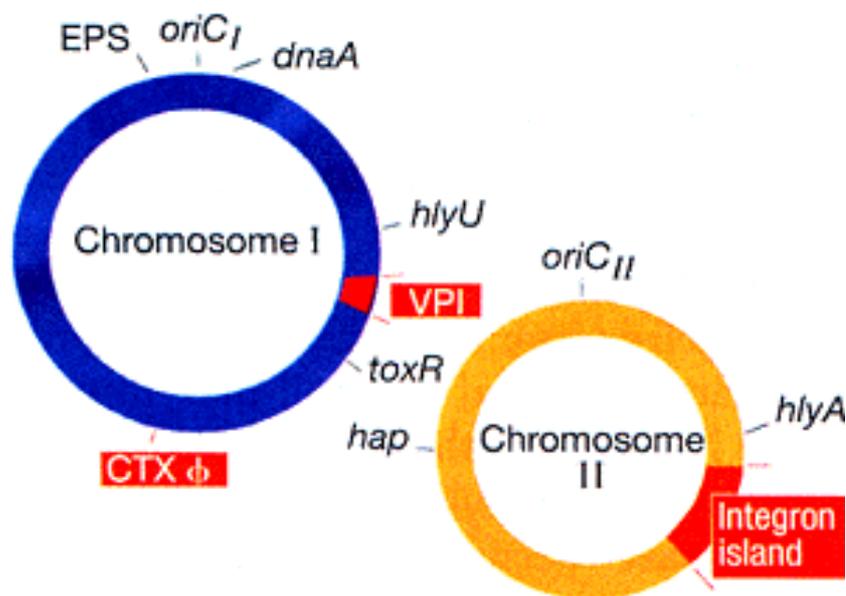
Come già accennato tutti i ceppi appartenenti a sierogruppi diversi da O1 sono collettivamente definiti come *Vibrio cholerae* non-O1; tali ceppi sono associati con casi sporadici di gastroenteriti e lievi forme di malattie simili al colera e fino a qualche tempo fa erano ritenuti incapaci di generare colera epidemico (Morris JG Jr., 1990) Tuttavia alcune epidemie di colera tipico sono state attribuite a ceppi di una specie recentemente isolata: il *Vibrio cholerae* O139 (o *Vibrio cholerae* Bengala) che rappresenta un nuovo sierogruppo emergente. Dalla sua comparsa in India e Bangladesh nel 1992, infatti O139 si è diffuso molto rapidamente in altre regioni tanto da indurre alcuni ricercatori a suggerire la presenza di un'ottava pandemia in corso (Suffredini E., Croci L., 2001) (Fig 4).

Fig.4 – Classificazione sierogruppi *Vibrio cholerae* (Nicolosi V.M., Nicoletti G., 1998)



4.4.2 Genetica

Il genoma di *Vibrio cholerae* è composto da due cromosomi. Il cromosoma più grande (cromosoma 1) contiene la maggior parte dei geni per le funzioni cellulari essenziali e per la virulenza. La maggior parte dei geni sul cromosoma 2 sono a funzione sconosciuta (Fig 5).

Fig.5 – Genoma *Vibrio cholerae*

5 IL COLERA

Il colera è una malattia a trasmissione oro-fecale che può essere contratta in seguito all'ingestione di acqua o alimenti contaminati da ceppi tossigeni di *Vibrio cholerae* O1 e O139.

Gli alimenti più a rischio per la trasmissione della malattia sono quelli crudi o poco cotti e, in particolare, i frutti di mare. Anche altri alimenti possono comunque fungere da veicolo. Il microorganismo può vivere anche in ambienti naturali, come i fiumi salmastri e le zone costiere: per questo il rischio di contrarre l'infezione per l'ingestione di molluschi è elevato.

Le scarse condizioni igienico-sanitarie di alcuni Paesi e la cattiva gestione degli impianti fognari e dell'acqua potabile sono le principali cause di epidemie di colera.

Senza la contaminazione di alimenti o acqua, il contagio diretto da persona a persona è molto raro in condizioni igienico-sanitarie normali. La carica batterica necessaria per la trasmissione dell'infezione è, infatti, superiore al milione: pertanto risulta molto difficile contagiare altri individui attraverso il semplice contatto.

Dopo un periodo di incubazione, variabile fra le 12 e le 72 ore si sviluppano i primi sintomi clinici tipici del colera ossia diarrea acquosa caratterizzata dall'evacuazione indolore di grandi volumi (0,5-1 litri/ora) di feci somiglianti ad acque di riso ed emananti un forte odore di pesce (Fig.6) (Suffredini E., Croci L., 2001); ad essa si possono aggiungere nausea, crampi addominali, febbre e vomito.

Fig.6 - Tipiche feci ad acqua di riso di un paziente affetto da colera

Questa massiva perdita d'acqua provoca, in assenza di una terapia adeguata, una severa disidratazione che può portare rapidamente ad acidosi metabolica (perdita di bicarbonato), ipocalemia e shock ipovolemico (perdita di potassio), aritmia cardiaca e morte.

Data la sensibilità del vibrione all'acidità gastrica la dose infettante è piuttosto alta (10^8 ufc/g/ml) anche se pazienti affetti da ipocloridria o problemi gastrici sono suscettibili a dosi infettanti inferiori (10^3 - 10^5 ufc/g). 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 (Suffredini E., Croci L., 2001).

In aree endemiche che presentano gravi carenze da un punto di vista igienico sanitario la via primaria di trasmissione è quella oro-fecale attraverso acqua contaminata. I pazienti nella fase acuta della malattia riescono ad espellere fino a 10^{13} cellule al giorno; le epidemie possono generare un inquinamento ambientale ed in tali casi, il cibo contaminato con l'acqua o direttamente con le feci può rappresentare un veicolo di trasmissione secondario.

Non sempre la via di contaminazione avviene attraverso le feci; casi di colera sono stati riscontrati infatti, in Paesi (U.S.A e Australia) dove il vibrione non è endemico.

Vibrio cholerae O1 può esistere in modo autoctono in ambienti privi di contaminazione fecale e l'ingestione di acqua di fiume fu la causa principale dei casi di colera domestico in Australia mentre i molluschi contaminati furono il veicolo primario negli USA (Nicolosi V.M., Nicoletti G., 1998).

5.1 Patogenesi

La patogenesi del colera è determinata da molteplici fattori di virulenza prodotti da ceppi tossigeni di *Vibrio cholerae* O1 e O139.

Dopo l'ingestione ed il suo passaggio attraverso la barriera gastrica, *Vibrio cholerae* colonizza la parte superiore dell'intestino tenue. L'adesione alla mucosa intestinale è mediata dalle fimbrie, strutture proteiche filamentose, poste ad un polo della cellula, chiamate TCP (Pili Corregolati alla Tossina). Grazie anche alla sua motilità il batterio riesce poi ad attraversare lo strato di muco che ricopre le pareti intestinali interne e a rilasciare un' enterotossina, la tossina colerica (CT), che viene elaborata durante la crescita esponenziale.

La tossina colerica CT attiva l'enzima adenil-ciclastasi presente nella membrana delle cellule della mucosa intestinale; questo enzima catalizza una reazione che favorisce la trasformazione dell'ATP cellulare in AMP-ciclico (c-AMP), 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 (Tiecco G., 2001).

Questa enterotossina, e possibilmente anche altre tossine, influiscono dunque sul trasporto ionico attraverso le cellule epiteliali intestinali e la conseguente perdita di acqua ed elettroliti porta così alla severa diarrea caratteristica del colera.

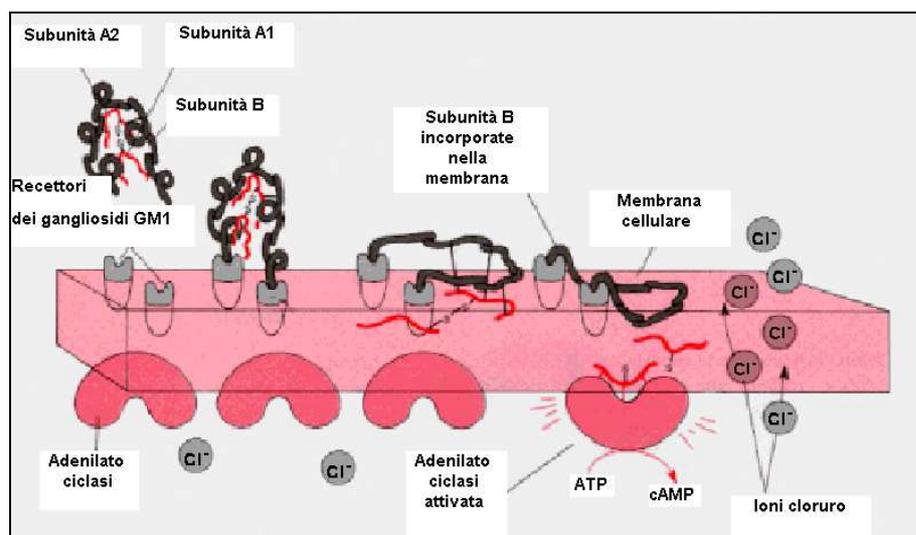
Studi eseguiti con ceppi di *Vibrio cholerae* mancanti del gene codificante la CT (soppressione genetica) hanno dimostrato che il vibrione era comunque in grado di causare diarrea seppur di minore entità (Levine MM. *et al.*, 1988) e ciò suggeriva quindi che *Vibrio cholerae* era in grado di esprimere altri fattori, oltre a CT, aventi attività secretoria.

5.2 Fattori di virulenza .

5.2.1 La tossina colerica (CT)

L'enterotossina colerica è una tossina multimerica composta da una sub unità A legata a 5 subunità B. Le subunità B legano rapidamente ed irreversibilmente l'enterotossina colerica ai recettori per i gangliosidi GM1 presenti nella superficie della cellula ospite, mentre la subunità A è responsabile della sua penetrazione nell'interno dell'enterocita. Si verifica a questo punto un'attivazione irreversibile dell'adenilato-ciclastasi all'interno della cellula ospite; l'incremento dell'adenilato-ciclastasi è seguito da un corrispondente aumento di c-AMP che inibisce nelle cellule epiteliali intestinali il sistema di trasporto e di assorbimento del sodio nelle cellule dei villi ed attiva il trasporto e la secrezione di ioni cloruro e bicarbonato nelle cellule delle cripte. Questi ioni provocano per richiamo osmotico un afflusso passivo di un elevato volume di liquidi che quando viene superata la capacità di riassorbimento dell'intestino genera la diarrea acquosa (Fig. 7).

Fig 7 - Meccanismo d'azione della tossina colerica



A) L'AC, localizzata a livello della membrana basolaterale delle cellule epiteliali intestinali, è regolata da proteine G. CT tramite la subunità B pentamerica lega il recettore GM1 inserito nel doppio strato lipidico. B) La subunità A entra all'interno della cellula, probabilmente per via endosomiale, viene tagliata proteoliticamente con conseguente riduzione del legame disolfuro tra i due peptidi A1 e A2. La subunità A1 attivata trasferisce un gruppo ADP-ribosio dal NAD alla subunità α della proteina GS. La subunità α si dissocia dal dimerico $\beta\gamma$ e attiva l'AC, aumentando la concentrazione del cAMP. C) cAMP attiva la proteina chinasi A. A livello delle cripte la conseguenza dell'attivazione della chinasi è un aumento della secrezione di cloruro, nelle cellule dei villi invece diminuisce l'assorbimento di sodio e quindi di cloruro

I geni che codificano per l'enterotossina colerica CT (ctxA e ctxB) risiedono nel genoma integrato di un batteriofago lisogenico filamentoso CTXΦ.

Il recettore per questo fago, localizzato nella superficie di *Vibrio cholerae* è il fattore TCP essenziale per la colonizzazione intestinale da parte del microorganismo. In seguito all'infezione del TCP- ctx AB delle cellule del vibrione il genoma del CTXΦ si integra in maniera stabile su un sito specifico del cromosoma di *Vibrio cholerae*. Poiché i ctxA e ctxB fanno parte di un elemento genico mobile, il trasferimento orizzontale di questo batteriofago è responsabile dell'emergenza di nuovi sierogruppi tossigeni di *Vibrio cholerae*.

Molti altri geni importanti per la patogenicità di *Vibrio cholerae* compresi quelli che codificano la biosintesi del TCP, i fattori di colonizzazione accessori e quelli che regolano l'espressione dei geni di altri fattori di virulenza (come l'emolisina-citolisina hlyA di E1Tor e una tossina simile alle shigattossine dei ceppi O1 e non O1) sono riuniti insieme in uno dei due cromosomi del vibrione. Questo gruppo di geni virulenti viene detto "Isola di Patogenicità di *Vibrio cholerae*" (VPI) che sembra sia stata acquisita dal vibrione per trasferimento genico orizzontale (Fig 8) (Fig 9) (Rivera I.N.G. et al 2001) (Morris G.J. Jr., 2003).

Fig. 8 - batteriofago lisogenico filamentoso CTXΦ

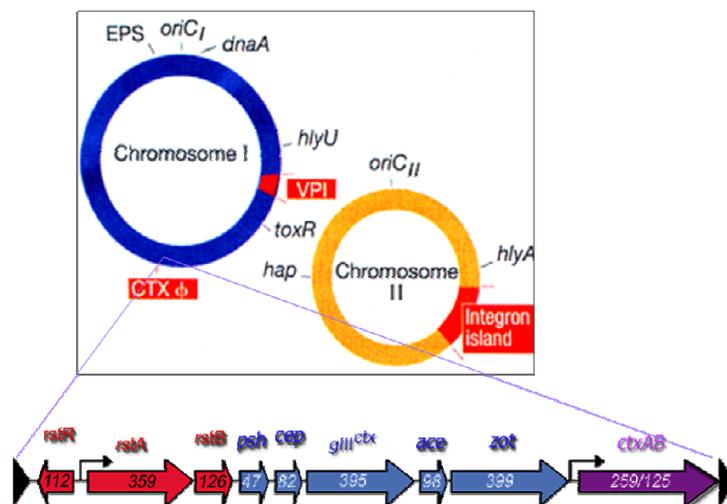
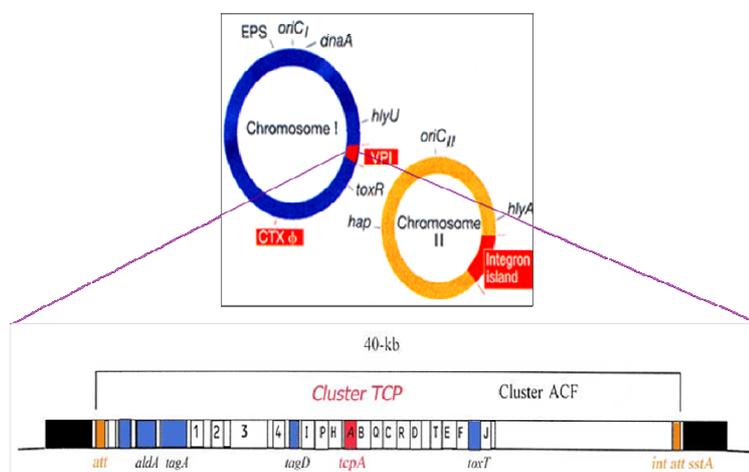


Fig.9 - Isola di Patogenicità di *Vibrio cholerae* (VPI)



5.2.2 La tossina ZOT (Zona Occludens)

La tossina zonula occludens (Zot) è una tossina in grado di aumentare la permeabilità della mucosa intestinale agendo sulle strutture delle giunzioni strette intercellulari, la Zonula occludens (pathway paracellulare); svolge quindi un'azione simile a quella svolta dalla CT ma quest'ultima genera una modificazione della permeabilità della mucosa intestinale tramite una variazione del trasporto ionico attraverso la membrana cellulare (pathway transcellulare) (Diamond JM., 1977).

5.2.3 Enterotossina colerica accessoria (Ace)

L'Enterotossina colerica accessoria (Ace) è una proteina che svolge un'azione analoga a quella della CT: essa è infatti capace di indurre un aumento della differenza di potenziale a livello della mucosa intestinale aumentando la secrezione di liquidi (Trucksis M., 1993).

Alcuni studi hanno suggerito che Ace potrebbe svolgere tale azione polimerizzando ed inserendosi nella membrana plasmatica delle cellule eucariote e formando un canale ionico.

5.2.4 *Vibrio cholerae* citolisina (VCC)

Molti ceppi di *Vibrio cholerae* appartenenti al sierotipo O1 biotipo El Tor ma anche ai sierotipi non-O1 e non-O139, producono una esotossina emolitica chiamata El Tor emolisina o *Vibrio cholerae* citolisina (VCC) (Honda T., 1979) (Yamamoto K., 1984).

La VCC è capace di legarsi alle membrane lipidiche e di formare dei canali, preferenzialmente permeabili agli anioni (Pantano S, 2006) che sono considerati responsabili di alcuni effetti citotossici della VCC come la lisi cellulare ed un'estesa vacuolizzazione.

6 EPIDEMIOLOGIA

L'assenza o la carenza di acqua potabile e le inadeguate condizioni sanitarie di alcune aree, spesso unite a un generale stato di povertà e di degrado, sono le principali cause di diffusione del colera. Le aree tipicamente a rischio sono le periferie urbane o i campi di rifugiati, dove la totale mancanza di infrastrutture rende completamente inadeguate le condizioni sanitarie, e dove l'assenza di sistemi fognari efficienti favorisce la contaminazione delle acque. Queste condizioni fanno dei Paesi in via di sviluppo le aree a maggior rischio di diffusione della malattia e il colera è spesso considerato tra gli indicatori di sviluppo sociale.

Il colera è stabilmente insediato nel delta del Gange nel subcontinente Indiano. Dal 1817 ad oggi si sono verificate sette pandemie.

L'attuale pandemia (la settima) la prima causata da *Vibrio cholerae* El Tor ha avuto origine dall'Indonesia, ha colpito l'India nel 1964; nel 1970 ha raggiunto l'Africa e l'Europa meridionale diffondendosi poi, nel 1991, fino in Sud America. Oggi la malattia è considerata endemica in molti Paesi e il microrganismo che la provoca non è ancora stato eliminato dall'ambiente (Keusch G.T., *et al.*, 2002).

Nei paesi sviluppati grazie al miglioramento delle condizioni igienico sanitarie i ceppi tossigeni di *Vibrio cholerae* non sono stati causa di problemi; tuttavia a causa delle riserve ambientali del microrganismo all'interno di pesci, molluschi e plancton, c'è il potenziale rischio per i ceppi patogeni di colonizzare nuove regioni anche attraverso alcune pratiche come lo scambio delle acque di zavorra delle navi in prossimità delle coste (Suffredini E., Croci L., 2001). Alcune epidemie di colera tipico sono state attribuite a ceppi di una specie recente-

mente isolata il *Vibrio cholerae* O139 (o *Vibrio cholerae* Bengala) che rappresenta un nuovo sierogruppo emergente. Dalla sua comparsa in India e Bangladesh nel 1992, infatti O139 si è diffuso molto rapidamente in altre regioni tanto da indurre alcuni ricercatori a suggerire la presenza di un’ottava pandemia. Il biotipo El Tor ed il Bengal continuano a causare grandi epidemie in India ed in Bangladesh dove, nella primavera del 2002, sono stati ritenuti i responsabili di circa 30000 casi di colera.

6.1 Epidemiologia in Europa

Il colera in Europa è una malattia di importazione. Secondo l’Eurostat, in Europa i casi di colera sono limitati e stabilizzati, dopo un picco di 40 casi nel 1998. Dal 1995 al 2004 i casi riportati sono stati infatti 237, per un’incidenza di 0,01 casi ogni 100 mila abitanti (Fig 10).

Fig 10 –Casi di colera in Europa (Weekly Epidemiological Record, No. 31, 29 July 2011)

Table 1 No. of cholera cases and deaths reported to WHO, and case-fatality rate (CFR), 2010 Tableau 1 Nombre de cas de choléra et de décès signalés à l’OMS, et taux de létalité (TL), 2010						
Continent	Country – Pays	Total no. of cases (including imported cases/deaths) – Nombre total de cas (incluant cas importés et décès)	No. of imported cases – Nombre de cas importés	No. of deaths – Nombre de décès	CFR % – TL (%)	
Africa – Afrique	Angola	1 484		30	2.02	
	Burundi	333		1	0.3	
	Benin – Bénin	983		8	0.81	
	Democratic Republic of the Congo – République Démocratique du Congo	13 884		182	1.31	
	Chad – Tchad	6 395		175	2.74	
	Côte d’Ivoire	32		0	0	
	Cameroon – Cameroun	10 759		657	6.1	
	Djibouti	2 047		19	0.93	
	Ethiopia – Ethiopie	1 682		21	1.25	
	Ghana	438		3	0.68	
	Kenya	3 188		63	1.98	
	Liberia – Libéria	1 546		0	0	
	Malawi	1 155		17	1.47	
	Mozambique	7 430		117	1.57	
	Niger	1 154		66	5.72	
	Nigeria – Nigéria	44 456		1 712	3.85	
	Senegal – Sénégal	3		0	0	
	Somalia – Somalie	3 510		103	2.93	
	Togo	72		3	4.17	
	United Republic of Tanzania – République-Unie de Tanzanie	4 469		59	1.32	
Uganda – Ouganda	2 341		78	3.33		
Zambia – Zambie	6 794		62	0.91		
Zimbabwe	951		21	2.21		
Total		115 106	0	3 397	2.951	
Asia – Asie	Afghanistan	2 369		10	0.42	
	China – Chine	157	5	0	0	
	India – Inde	5 155		9	0.17	
	Iraq	2		0	0	
	Cambodia – Cambodge*	588		1	0.17	
	Republic of Korea – République de Corée	1	1			
	Lao People’s Democratic Republic – République démocratique populaire du Laos	237		4	1.69	
	Malaysia – Malaisie	443	227	6	1.35	
	Nepal – Népal	1 790		9	0.5	
	Philippines	33		2	6.06	
	Pakistan*	164		0	0	
	Thailand – Thaïlande	1 974		15	0.76	
	Viet Nam	606				
	Yemen – Yémen	300		4	1.33	
	Total		13 819	233	60	0.434
	Europe	Germany – Allemagne	4	4	1	25
		United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland – Royaume-Uni de Grande Bretagne et d’Irlande du Nord	8	8		
Russian Federation – Fédération de Russie		3	3			
Total		15	15	1	6.667	
Americas – Amériques	Canada	2	1			
	Dominican Republic – République dominicaine*	191		3 990	2.22	
	Haiti – Haïti	179 379				
	Martinique	6				
	Mexico – Mexique	1				
	United States of America – Etats-Unis d’Amérique	15	15			
Total		179 594	16	3 990	2.222	
Oceania – Océanie	Australia – Australie	3	3			
	Papua New Guinea – Papouasie-Nouvelle-Guinée	8 997		95	1.06	
	Total	9 000	3	95	1.056	
Grand total		317 534	267	7 543	2.375	

CFR = Case-fatality rate. – TL = taux de létalité
* Laboratory-confirmed cases only. – Uniquement des cas confirmés en laboratoire.

6.2 Epidemiologia in Italia

In Italia, l’ultima importante epidemia di colera risale al 1973 quando in Campania e Puglia si svilupparono delle epidemie dovute al consumo di molluschi e pesce crudo; in quella occa-

sione i casi totali denunciati furono 278 e 25 di essi risultarono letali; un'altra epidemia si verificò in Sardegna nel 1979 (Suffredini E., Croci L., 2001).

Nel 1994 si è verificata a Bari un'epidemia di limitate proporzioni, in cui sono stati segnalati meno di 10 casi.

Secondo gli ultimi dati forniti dal Ministero della Salute tramite la banca delle Schede di Dimissione Ospedaliera (SDO) relative all'anno 2005 a livello Nazionale si sono verificati 8 casi di infezioni da *Vibrio cholerae* di cui 2 in Sardegna (Ministero della Salute., 2005). Da allora, l'unico caso descritto risale all'agosto del 2008 dove a Milano un uomo, di rientro dall'Egitto, morì di colera in ospedale. Gli accertamenti hanno mostrato che l'uomo aveva contratto la malattia all'estero e hanno escluso il rischio di epidemie per il nostro Paese (www.epicentro.iss.it/problemi/colera/epid.asp).

7. Vibrioni Non Colerici (NCVs o NAG): *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139

I ceppi di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 (NCVs o Vibrioni Non Agglutinanti- NAG) formano un gruppo eterogeneo di microrganismi indistinguibili dal punto di vista biochimico, attraverso test di routine, dai ceppi di *Vibrio cholerae* O1 e O139 (Ottaviani D. *et al.*, 2009).

Essi vengono tuttavia distinti da quest'ultimi per due importanti caratteristiche:

- a) non presentano reazione di agglutinazione con gli antisieri specifici per *Vibrio cholerae* (Vibrioni Non Agglutinanti o Vibrioni NAG).
- b) sono ritenuti incapaci di dare colera epidemico.

I Vibrioni NCVs sono stati considerati per molto tempo di trascurabile rilevanza microbiologica. Tuttavia, negli ultimi decenni è stato dimostrato che gli NCVs possono provocare casi sporadici o episodi occasionali di diarrea negli esseri umani (Blake P.A. *et al.*, 1980) (Faruque S.M. *et al.*, 2004), setticemia acuta (Namdari H. *et al.*, 2000) (Restrepo D. *et al.*, 2006) e infezioni della pelle (Blake P.A. *et al.*, 1980) attraverso l'ingestione di frutti di mare (CDC, 1982), (Namdari H. *et al.*, 2000), (Crump J.A. *et al.*, 2003) o l'esposizione all'ambiente acquatico in presenza di lesioni cutanee (Lukinmaa S. *et al.*, 2006).

Gli NCVs sono ampiamente diffusi nell'ambiente acquatico, ma a differenza della maggior parte dei vibrioni richiedono solo quantità trascurabili di NaCl per sopravvivere (non alofili) e per questo vengono maggiormente isolati in zone estuariche (Rhodes JB. *et al.*, 1986).

La malattia da essi generata è stata collegata, a livello globale, con la contaminazione delle acque e di una varietà di alimenti in particolare frutti di mare; tra essi le ostriche sembrano essere il veicolo principale di infezione negli Stati Uniti (Morris JG. *et al.*, 1981).

La gastroenterite causata dall'infezione di NCVs presenta un periodo di incubazione inferiore alle 48h ed è caratterizzata principalmente dalla comparsa di diarrea che occasionalmente può provocare grave disidratazione come nel colera.

Spesso si possono presentare crampi addominali, nausea, vomito e febbre e le feci possono essere anche sanguinolente. La durata della malattia varia dai 2 ai 7 giorni circa e di solito ha un esito favorevole (Namdari H. *et al.*, 2000).

Studi epidemiologici e studi condotti su volontari hanno associato l'insorgenza della gastroenterite da NCVs alla presenza di un'enterotossina termostabile (NAG-ST) (Ogawa *et al.*, 1990) (Guglielmetti *et al.*, 1994) simile a quella prodotta dai ceppi enterotossigenici di *Escherichia coli* (Morris JG Jr *et al.*, 1990) (Bagchi K *et al.*, 1993).

Diversi fattori di virulenza sono stati associati agli NCVs; tuttavia l'esatto meccanismo della patogenesi non è chiaro (Ottaviani D. *et al.*, 2009).

Circa il 10% delle forme morbose causate da *Vibrio cholerae* non-O1 è rappresentato da infezioni delle ferite e da otiti medie, mentre un altro 20% è rappresentato dalla setticemia che risulta essere più probabile in soggetti con epatopatie.

A differenza di *Vibrio cholerae* O1, che non è incapsulato (e che, con una o due possibili eccezioni, non causa sepsi), più del 90% di NCVs sono capaci di produrre una capsula polisaccaridica; ceppi maggiormente incapsulati hanno più probabilità di essere isolati in campioni provenienti da pazienti con setticemia rispetto a ceppi con incapsulamento minimo o nullo (Morris JG Jr., 2003).

7.1 Epidemiologia

Vibrio cholerae non-O1 e non-O139 fanno parte della normale flora batterica di estuari in tutto il mondo. In aree come gli Stati Uniti questi ceppi sono più diffusi rispetto ai ceppi di *Vibrio cholerae* epidemici. Dal 2000 ad oggi negli USA vengono riscontrati in media 44 casi l'anno di infezioni causate da NCVs (CDC, 2008); la trasmissione della malattia avviene principalmente attraverso il consumo di frutti di mare crudi o poco cotti, in particolare ostriche (Fig.11).

Fig.11 –Malattie causate da *Vibrio* spp (esclusi i *Vibrio cholerae* tossigeni) (*Vibrio* cases reported to CDC, 2008)

<i>Vibrio</i> Species	Complications ¹						Specimen Type					
	Patients		Hospitalized		Deaths		Isolates ²		Stool	Blood	Wound	Other ³
	N	%	n/N	%	n/N	%	N	%	n	n	n	n
Single species												
<i>V. alginolyticus</i>	99	17	23/90	26	1/93	1	99	16	3	5	64	27
<i>V. cholerae</i> (non-toxicogenic) ⁴	50	8	19/48	40	2/47	4	50	8	28	10	5	7
<i>V. fluvialis</i>	29	5	14/27	52	3/27	11	29	5	19	1	5	4
<i>V. hollisae</i>	4	1	1/4	25	1/4	25	4	1	2	0	1	1
<i>V. metschnikovii</i>	1	0	1/1	100	0/1	0	1	0	0	1	0	0
<i>V. mimicus</i>	32	5	20/29	69	0/30	0	32	5	24	1	2	5
<i>V. parahaemolyticus</i>	270	45	67/256	26	4/254	2	270	44	211	6	37	16
<i>V. vulnificus</i>	85	14	72/84	86	24/79	30	94	15	6	55	29	4
Species not identified	23	4	8/22	36	0/21	0	24	4	8	3	6	7
Multiple species⁵	6	1	2/5	40	0/5	0	13	2	4	3	6	0
Total	599	100	227/556	40	35/561	6	616	100	305	85	155	71

¹ Denominators indicate patients for whom information is known.
² The number of isolates is higher than the total number of patients for two reasons: one patient may yield an isolate of the same *Vibrio* species from more than one specimen source (e.g., the isolation of the same *Vibrio* species from 2 specimen sources in the same person is counted as 2 isolates) and more than one *Vibrio* species may be isolated from the same patient and each *Vibrio* species is counted as an isolate.
³ Includes ear, sputum, urine, and other.
⁴ Includes non-toxicogenic *V. cholerae* O1 (2 isolates) and other non-toxicogenic *V. cholerae* [non-O1 non-O139] (47 isolates).
⁵ The following were isolated from one patient: *V. alginolyticus* and *V. metschnikovii*; *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*; *V. mimicus* and *V. parahaemolyticus*; *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*; *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*; *V. fluvialis* and *V. parahaemolyticus*.

La rilevanza epidemiologica di questi microrganismi, è data dal fatto che gli NCVs sono coinvolti nella genesi di nuove varianti di *Vibrio cholerae* per trasferimento orizzontale di geni dai sierogruppi O1 ai non-O1 (Bik *et al.*, 1995). Alcuni studi hanno dimostrato infatti il trasferimento di geni *ctxA* e *TCPA* tossigeni da *Vibrio cholerae* O1 ai NCVs ambientali (Faruque S.M. *et al.*, 1998) (Karaolis D.K.R. *et al.*, 1999).

Per contro la possibile conversione dei non-O1 in sierotipo O1 ha fornito interesse aggiunto. È stato inoltre dimostrato che NCVs hanno una maggiore capacità di sopravvivenza e di moltiplicazione, in una vasta gamma di frutti di mare, rispetto ai *Vibrio cholerae* O1 e O139 (Roberts D., Gilbert R.J., 1979) (DePaola A. *et al.*, 1987) e questa capacità implica una potenziale estensione della gamma di possibili fonti di infezione umana.

In Italia nel corso degli ultimi decenni sono stati documentate piccole epidemie associate al consumo di frutti di mare crudi o poco cotti (CDC., 1981) (Piergentili P.*et al.*, 1984) (Piersimoni C. *et al.*, 1991). Nel 1997 si è verificato un caso di infezione cutanea da *Vibrio cholerae* non O1 su un turista al ritorno da un viaggio in Tunisia (Farina C. *et al.*, 2000).

Ciò nonostante la letteratura scientifica riporta pochi studi sulla presenza dei NCVs nei mitili provenienti da aree geografiche limitate (Ripabelli *et al.*, 1999), e nessuno studio di sorveglianza sulle malattie generate dai ceppi tossigeni e non tossigeni di *Vibrio cholerae*.

8 SCOPO DELLA RICERCA

I M.E.L sono considerati tra gli alimenti più frequentemente implicati in episodi di tossinfezioni alimentari in quanto essendo animali filtratori possono accumulare sostanze nocive presenti nell'ambiente in cui vivono (microrganismi e virus patogeni, metalli pesanti, biotossine e idrocarburi). I microrganismi del genere *Vibrio* sono comuni abitanti degli ecosistemi idrici per cui la loro presenza risulta essere associata maggiormente ai prodotti della pesca. Nel corso degli ultimi anni il numero di specie appartenenti al genere *Vibrio* capaci di provocare tossinfezioni alimentari nell'uomo legate al consumo soprattutto di prodotti ittici crudi o poco cotti è andato progressivamente aumentando. In Italia la produzione e la commercializzazione dei M.E.L sono disciplinate dal Decreto Legislativo 530/92 e dai Regolamenti (CE) 852/2004, 853/2004, 854/2004 e 1441/2007. Tale normativa prevede che la classificazione delle acque di allevamento dei M.E.L e l'idoneità microbiologica al consumo (Reg CE 1441/2007) si basi solo su due parametri batteriologici (*Escherichia coli* e *Salmonella* spp) rappresentativi di contaminazione fecale e non prevede la determinazione di altri microrganismi naturalmente presenti nell'ambiente marino e potenzialmente patogeni come quelli appartenenti al genere *Vibrio*. Secondo i dati del Centers for Disease Control and Prevention - CDC (USA), le tossinfezioni connesse al consumo di molluschi sono causate principalmente (20%) da virus enterici (Corrain C. *et al.*, 2007), in prevalenza virus dell'epatite A (HAV) e Norovirus (NV), e da patogeni abitualmente presenti nell'ambiente marino, come *Vibrio* spp. Per contro i batteri di origine fecale (*Salmonella* spp. ed *Escherichia coli*), contaminanti accidentali delle acque, incidono invece solo per il 4% del totale (Serracca *et al.*, 2007). In letteratura è stato inoltre più volte rilevato che non esiste una stretta correlazione tra la presenza nei M.E.L di microrganismi di origine fecale e la presenza di vibrioni potenzialmente patogeni per l'uomo (Tamplin *et al.*, 1982) (Kong R.Y.C. *et al.*, 2002). La normativa vigente basandosi dunque solo sul controllo di batteri fecali non assicura che tali prodotti siano esenti dalla presenza di altri agenti patogeni; nel regolamento CE 2073/2005 viene però evidenziata la necessità di sviluppare nuovi metodi di analisi per la determinazione di *Vibrio* patogeni. In relazione alle problematiche sanitarie ed alle indicazioni fornite dalla normativa vigente in materia lo scopo della ricerca è stato:

1. approfondire le conoscenze epidemiologiche sulla diffusione dei Vibrioni potenzialmente patogeni nei M.E.L allevati in Sardegna.
2. Valutare la correlazione tra la presenza dei suddetti vibrioni con la presenza di microrganismi di origine fecale.
3. Valutarne il comportamento (crescita/decremento) mediante simulazione di alcune condizioni di conservazione post-produzione primaria in funzione di fattori ecologici (temperatura, pH, salinità, a_w).
4. individuazione di strumenti preventivi (modalità di conservazione, rispetto della catena della catena del freddo) che possano incidere positivamente nel contenimento di malattie alimentari nell'uomo.

9 MATERIALI E METODI

9.1 Metodiche diagnostiche di ricerca

In questo lavoro sono state utilizzate sia metodiche microbiologiche tradizionali che tecniche molecolari.

9.1.2 Metodiche microbiologiche tradizionali

I metodi tradizionali per il rilevamento di microrganismi in campioni alimentari ed ambientali possono essere divisi in due gruppi:

1. *quantitativi o enumerativi*, nei quali viene determinato il numero di microrganismi presenti nel campione e il risultato viene espresso come numero di organismi presenti per unità in peso di campione.
2. *qualitativi o presenza/assenza*, nei quali viene richiesto semplicemente di rilevare se un particolare organismo è presente o assente in un dato campione.

9.1.3 Procedure quantitative

L'enumerazione dei microrganismi presenti nei campioni da analizzare viene generalmente eseguita mediante i metodi di conta vitale su piastra o del Most Probable Number (MPN).

a) Metodo della conta su piastra

Il metodo consiste nel dispensare aliquote del campione (o di una sospensione) su piastre Petri contenenti terreno nutritivo agarizzato che risulterà essere diverso a seconda del microrganismo da ricercare. Dopo uno specifico periodo di incubazione i microrganismi cresceranno sull'agar a formare colonie discrete che potranno poi essere contate.

b) Metodo MPN

Il Most Probable Number, permette la stima, su base statistica, del numero di microrganismi vitali e coltivabili presenti in un campione. La stima è ottenuta preparando diluizioni decimali del campione da analizzare e trasferendo i sub-campioni di ogni diluizione in tre o cinque tubi contenenti terreno nutritivo. Dopo l'inoculo i tubi vengono incubati alla temperatura appropriata per 24-48 ore, quindi valutando la torbidità (o l'acidificazione) del mezzo di coltura, si identificano i tubi nei quali c'è stata crescita microbica. Determinando il punto di estinzione (della crescita microbica) e utilizzando tabelle di calcolo specifiche si può calcolare il livello di contaminazione di un determinato campione arrivando ad un profilo numerico espresso come MPN.

9.1.4 Procedure qualitative

Le procedure qualitative vengono utilizzate quando si vuole valutare la presenza/assenza di un determinato microrganismo nel campione in analisi.

Tale procedimento prevede l'impiego di procedure di arricchimento lunghe e laboriose (arricchimento primario e secondario); ciò è giustificato dal fatto che alcuni microrganismi patogeni sono spesso presenti in basse concentrazioni nelle matrici alimentari e ambientali e potrebbero essere, quindi, difficilmente individuati utilizzando procedure di conta diretta.

L'arricchimento finale viene seminato su piastre di terreno selettivo agarizzato per ottenere colonie singole del microrganismo di interesse.

L'isolamento di colonie d'aspetto tipico su terreni selettivi deve essere considerato un segnale presuntivo della possibile presenza del microrganismo ricercato.

Su colture pure degli isolati microbici, a scopo di conferma, dovranno essere eseguiti ulteriori test biochimici e sierologici che permetteranno di discriminare il microrganismo di interesse da forme microbiche strettamente correlate.

9.2 Metodiche molecolari

Sono state utilizzate tecniche di PCR classica sia per l'identificazione rapida di specie sia per la ricerca dei fattori di virulenza.

La PCR offre molti vantaggi rispetto ai metodi basati sulle colture tradizionali ed altri metodi standard per il rilevamento di patogeni. I principali vantaggi sono specificità, sensibilità, rapidità, accuratezza e capacità di rilevare piccole quantità di un acido nucleico bersaglio in un campione complesso. Un altro vantaggio è dato dal fatto che la PCR amplifica l'acido nucleico di un organismo e questo permette, nel caso di alcuni microrganismi patogeni, di superare il problema di rilevamento di cellule vitali ma non coltivabili.

9.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction) classica

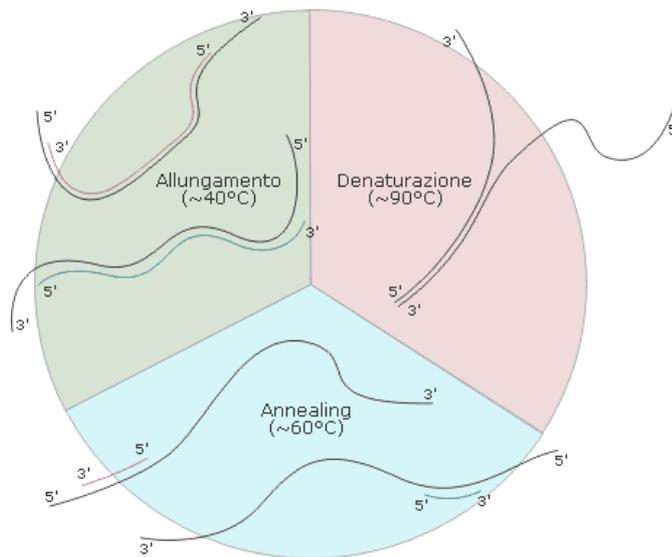
Il metodo della PCR usa una DNA polimerasi termostabile (per esempio l'enzima Taq) per sintetizzare copie multiple di un DNA bersaglio.

Il processo può essere diviso nei tre passaggi seguenti (che costituiscono un ciclo della reazione):

1. *Denaturazione* del DNA (a temperature superiori a 90°C)
2. *Appaiamento (annealing)* dei primers con il filamento complementare del DNA bersaglio,
3. *Estensione* ottimale del primer

La reazione di sintesi può essere condotta ripetendo il ciclo per molte volte (Fig 12).

Fig. 12 – Ciclo di reazione PCR



9.3 Contaminazione sperimentale Microbial Challenge Test (MCT)

Il Microbial Challenge Test è una prova di laboratorio eseguita per valutare la capacità di un alimento di sostenere lo sviluppo di microrganismi di riferimento (patogeni o indicatori di scarsa igiene), o per verificare gli effetti di un processo produttivo sulla sopravvivenza o mortalità di particolari microrganismi. Il test può essere utilizzato con una duplice finalità: la prima è quella dello studio delle caratteristiche chimico-fisiche del prodotto che possano permettere la crescita di determinati tipi di microrganismi; la seconda è quella dello studio della capacità di diversi microrganismi di crescere e di moltiplicarsi in un alimento con certe caratteristiche compositive e strutturali (Fontana M. *et al.*, 2007).

Il Challenge test può essere altresì utilizzato sia per valutare una curva di crescita di un determinato o di determinati microrganismi, ma anche per valutare l'evoluzione della carica quando, ad esempio, varino le caratteristiche intrinseche dell'alimento in funzione del tipo di lavorazione o delle condizioni di conservazione. I microrganismi utilizzati in questo tipo di test sono sia preparazioni di microrganismi di controllo liofilizzate (ATCC) a concentrazione nota sia di isolamento in laboratori ("ceppi selvaggi").

Queste prove servono anche per determinare la shelf life di un prodotto finito (nel caso ad esempio di un prodotto di nuova immissione nel mercato per il quale la shelf life sia ancora da verificare), o per rivalidare la shelf life precedentemente determinata di prodotti già in commercio che abbiano subito delle modificazioni nella composizione o nel processo produttivo. Per allestire un Challenge Test diventa fondamentale studiare e conoscere il più dettagliatamente possibile le caratteristiche del prodotto, la tecnologia del processo produttivo, le eventuali condizioni di maturazione, conservazione o stoccaggio del prodotto, le modalità di confezionamento, di distribuzione, di vendita, di preparazione e di consumo. Per effettuare un Challenge Test si possono utilizzare alimenti contaminati, naturalmente o artificialmen-

te (cioè inoculando i microrganismi di riferimento nelle materie prime o nei prodotti finiti) per poter stabilire se ed in quali condizioni possano arrivare a rappresentare un potenziale rischio per la qualità igienica dei prodotti e per la salute dei consumatori. Nel caso di contaminazione artificiale di alimenti altrimenti considerati e/o verificati esenti dal microrganismo target, è possibile stabilire con accettabile precisione l'entità dell'inquinamento di partenza, utilizzando materiale a titolo noto di microrganismi oggetto del test.

9.3.1 Tipi di challenge test

Si conoscono due tipi di Microbial Challenge Test (MCT):

- **MCT di processo** - Comporta l'inoculo, in condizioni ambientali controllate, di un numero rilevante del microrganismo oggetto dello studio *nella materia prima* e la valutazione dell'evoluzione della carica del microrganismo durante il processo produttivo.
- **MCT di prodotto** - Comporta l'inoculo, in condizioni ambientali controllate, di un numero rilevante del microrganismo oggetto dello studio *nel prodotto finito*, il confezionamento del prodotto nelle condizioni di commercializzazione e la valutazione dell'evoluzione della carica durante la shelf-life.

L'esecuzione di un MCT è preceduta da una fase di pianificazione, nel corso della quale vengono elaborate una serie di considerazioni relative allo specifico alimento oggetto del test. I fattori presi in esame in questa fase preliminare sono:

- *il processo produttivo* ed i suoi effetti sull'andamento della popolazione microbica nel prodotto finito,
- *il profilo microbiologico* delle materie prime e del prodotto finito,
- *l'identificazione dei rischi* di tossinfezioni e di alterazioni del prodotto in esame,
- *capacità di crescita* dei microrganismi potenzialmente pericolosi per il prodotto.

9.3.2 Scopo del challenge test nei M.E.L

Si è deciso di effettuare delle prove di inoculo sperimentale, al fine di verificare come le caratteristiche chimico-fisiche e i processi di conservazione (anche in condizioni di abuso termico) dei M.E.L potessero influenzare la sopravvivenza o moltiplicazione ed inattivazione dei microrganismi oggetto di studio.

9.4 Analisi microbiologiche

I campioni di M.E.L (Molluschi Eduli Lamellibranchi) utilizzati per la ricerca sono stati reperiti da Novembre 2008 ad Agosto 2010 presso la grande distribuzione locale e presso siti di campionamento ufficiali dislocati in diverse località della Regione Sardegna (Fig.13).

Sono stati esaminati complessivamente 440 campioni, di cui 297 (67,5%) rappresentati da mitili, 64 (14,5%) da ostriche e 79 (18%) da vongole (Tab. 9).

Di 440 campioni 250 (57%) provenivano da allevamenti della zona di Olbia, 83 (19%) da Oristano, 71 (16%) da Cagliari, 13 (3%) da Carbonia, 8 (2%) da Tortolì e 15 (3%) da Arborea

Fig 13 – Siti di prelievo campioni M.E.L analizzati



Tab.9 – Campioni di M.E.L analizzati e relative provenienze

Campioni di M.E.L analizzati e relative provenienze						
	Olbia	Oristano	Cagliari	Carbonia	Tortoli	Arborea
Mitili	230	53	71	13	7	9
Ostriche	18	-	-	-	-	-
Vongole	2	30	-	-	1	6
Totali	250	83	71	13	8	15

Nel corso di ciascun campionamento presso i siti ufficiali sono stati monitorati mediante appositi strumenti la temperatura, la salinità ed il pH dell'acqua in cui i M.E.L erano allevati.

I campioni prelevati trasportati in buste sterili ad una temperatura controllata (Reg. CE 853/04 All. III, Sez. VIII, Cap. VIII) sono stati sottoposti ad analisi microbiologiche presso il Laboratorio di Igiene degli Alimenti dell'Università degli Studi di Cagliari che opera in conformità alla normativa Europea UNI EN CEI ISO 17025/2005 sui "Requisiti generali per la competenza dei Laboratori di prova e taratura". Le analisi molecolari sono state eseguite sia presso il Laboratorio di Biotecnologie Orali (OBL) del Dipartimento di Chirurgia e Scienze Odontostomatologiche dell'Università degli Studi di Cagliari sia presso il *Laboratorio Nazionale di Riferimento delle contaminazioni virali dei molluschi bivalvi del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma.*

9.4.1 Preparazione del campione

Il campione è stato trattato secondo la norma ISO 6887-1/2000 (*preparazione del campione di prova, sospensione iniziale e diluizioni decimali per l'analisi microbiologica*) per ottenere la sospensione madre di partenza.

Prima di essere processati i M.E.L sono stati puliti e spazzolati con acqua potabile, specialmente attorno alla linea di adesione delle due valve; è stato eliminato il bisso con bisturi o forbici immediatamente prima dell'apertura. La polpa ed il liquido intravalvare sono stati raccolti in un contenitore sterile (Fig. 14).

Fig.14 – Preparazione del campione di M.E.L da analizzare



Sono stati omogenati 100 g di polpa e liquido intravalvare e successivamente si è proceduto alla determinazione dei parametri previsti dalla legge (Reg. CEE 1441/2007) ossia *Escherichia coli*, utilizzando la norma ISO TS 16649-3/2005 e *Salmonella* spp secondo la norma UNI EN ISO 6579/2004; contemporaneamente si è proceduto alla ricerca di *Vibrio* spp utilizzando la norma ISO/TS 21872-1:2007 (Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. - Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*) (Tab. 10).

Tab.10 Elenco specie ricercate e relativi metodi di prova utilizzati

Specie ricercata	Metodi di prova
<i>Escherichia coli</i>	UNI ISO 16649-3/2005
<i>Salmonella</i> spp	UNI ISO 6579/2004
<i>Vibrio</i> spp	UNI ISO TS 21872-1:2007

La sospensione madre di partenza è stata allestita ponendo 25g di omogenato (liquido intravalvare + polpa) in 225 ml di acqua peptonata protonata in un rapporto di 1/10.

9.4.2 Ricerca ed enumerazione di *E.coli* mediante la norma ISO TS 16649-3/2005 (*Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli - Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide*).

La ricerca e numerazione di *E. coli* è stata effettuata mediante una metodica in MPN (Must Probable Number) che si è articolata nelle seguenti fasi:

- semina di 3/5 provette contenenti un terreno liquido (Mineral-Modified Glutamate Medium (MMGM) a doppia (MMGDouble) e singola (MMGMono) concentrazione per la diluizione del campione utilizzando quelle necessarie per raggiungere livelli di rilevazione appropriati.
- Per i molluschi bivalvi vivi sono stati aggiunti 10 ml di sospensione iniziale (10^{-1}) a ciascuna delle 5 provette contenenti MMGD e 1 ml a ciascuna delle 5 provette contenenti MMGM. Sono stati poi aggiunti 1 ml delle diluizioni 10^{-2} 10^{-3} a ciascuna delle 5 provette di MMGM
- Le provette sono state incubate a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ore
- Dopo incubazione da ciascuna provetta in cui si è osservata produzione di acido, indicata dalla presenza di una colorazione gialla, è stata effettuata una subcoltura in agar TBX con incubazione a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 20-24 ore.
- Dopo incubazione, la crescita di colonie blu o verde-blu su TBX indica la presenza di *Escherichia coli* β -glucuronidasi positiva.
- Sono state considerate positive tutte le provette di MMGM, a doppia ed a singola concentrazione, che hanno dato origine a colonie blu o blu-verde sulle piastre di TBX.
- L'indice MPN è stato determinato dal numero di provette positive alle diluizioni selezionate; usando una tabella per l'MPN è stato ottenuto il numero di *Escherichia coli* per grammo o millilitro di campione.

9.4.3 Ricerca di *Salmonella* spp mediante la norma UNI EN ISO 6579/2004 (*Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Metodo orizzontale per la ricerca di Salmonella spp*).

La ricerca di *Salmonella* spp attraverso la suddetta norma internazionale ha previsto le seguenti fasi:

- Prearricchimento in terreno liquido non selettivo (Acqua Peptonata Tamponata)
- Arricchimento in terreno liquido selettivo (RVS o MKTTn)
- Isolamento in piastra (XLD, SS)
- Identificazione e conferma delle colonie riferibili a *Salmonella* spp mediante test biochimici (TSI, PPA, Indolo, sistema miniaturizzati API).
- Prove di conferma sierologica con siero onnivale per *Salmonella*

9.4.4 Isolamento e identificazione di *Vibrio* spp mediante la norma ISO TS 21872-1:2007

L'isolamento e l'identificazione biochimica dei *Vibrio* spp sono stati eseguiti secondo la norma internazionale ISO TS 21872-1/2007 "Metodo orizzontale per l'identificazione di potenziali *Vibrio* spp enteropatogeni" con alcune varianti apportate in fase analitica.

L'isolamento di *Vibrio* da campioni di alimento può presentare alcune difficoltà correlate alla scarsa concentrazione del microrganismo, alla presenza di flora batterica antagonista ed alle condizioni di stress alle quali i vibrioni possono essere sottoposti (congelamento, riscaldamento, acidità, trattamenti di depurazione ecc.) che ne diminuiscono la vitalità.

Pertanto, nella ricerca qualitativa di vibrioni in matrici alimentari è indispensabile una fase di prearricchimento che si compie in due momenti:

1. un'aliquota (25g) di polpa e di liquido intravalvare viene posta in 225 ml di brodo ASPW (Alcaline Peptone Water Saline) in proporzione 1:10, omogenata mediante Stomacher (Stomacher Lab Blender 400) ed incubata per 6-8 ore a $37\pm 1^\circ\text{C}$ per i prodotti surgelati e a $41,5\pm 1^\circ\text{C}$ per i prodotti freschi.

Al termine dell'incubazione si è proceduto ad una prima semina su TCBS (Tiosolfato Citrato Bile saccarosio) e su un terreno cromogeno (nel quale per l'identificazione non si utilizzano le fermentazioni degli zuccheri) altamente selettivo il CHROMagar™ *Vibrio* che a differenza degli altri terreni indicati nella metodica standard è risultato essere maggiormente selettivo nei confronti di *Vibrio* spp. Il terreno CHROMagar™ *Vibrio* consente di distinguere le varie specie di *Vibrio* in modo più specifico: le colonie formate dal microrganismo sono riconoscibili direttamente sulla piastra grazie alla specifica colorazione che assumono. Il terreno è costituito da una serie di componenti, tra cui specifici substrati composti da uno zucchero legato ad un cromoforo, i quali sono in grado di entrare nelle cellule microbiche dove vengono scissi da specifici enzimi. In questo modo i substrati incolori producono una colorazione caratteristica chiaramente visibile (Di Pinto A. *et al* 2011), (Hara-Kudo Y. *et al.*, 2001), (Nakashima Y. *et al.*, 2007). Sia le piastre di TCBS che di CHROMagar™ *Vibrio* sono state poi incubate per 18-24 ore a $37\pm 1^\circ\text{C}$.

2. un'aliquota di campione pari a 1 ml è stata poi addizionata a 9 ml di ASPW (Alcaline Peptone Water Saline) ed incubata per 16-18 ore a $37\pm 1^\circ\text{C}$; dopo incubazione si è proceduto ad un'ulteriore semina su TCBS e su CHROMagar™ *Vibrio*.

La presenza di colonie gialle opache di 2-3 mm di diametro (saccarosio positive) su TCBS è indicativa della presenza di *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fluvialis*, e *Vibrio metschnikovii* (Fig 15 a).

Fig.15 (a) - Colonie tipiche di *Vibrio cholerae* su TCBS.

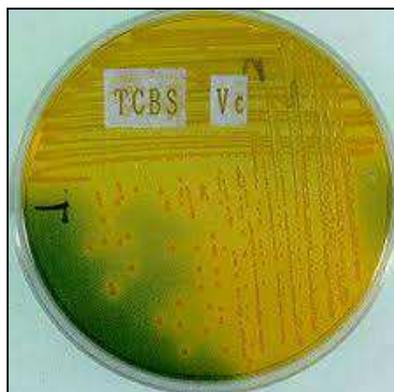


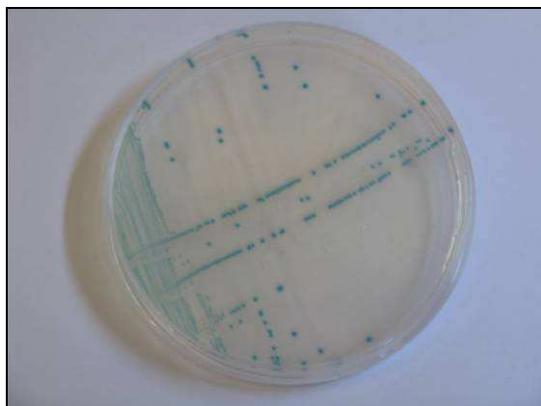
Fig. 15 (b) - Colonie tipiche di *Vibrio parahaemolyticus* su TCBS



La crescita di colonie verdi (saccarosio negative) è presuntiva di *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harvey*, *Vibrio mimicus* e *Vibrio damsela*. (Fig.15 b).

Su CHROMagar™ *Vibrio* le colonie lisce piatte e di colore blu indicano la presenza di *Vibrio cholerae* (Fig.16 a) e le colonie lisce piatte di colore rosa indicano presenza di *Vibrio parahaemolyticus* (Fig.16 b).

Fig 16 - Colonie tipiche di *Vibrio cholerae* (a) e di *Vibrio parahaemolyticus* (b) su CHROMagar™-*Vibrio*



(a)



(b)

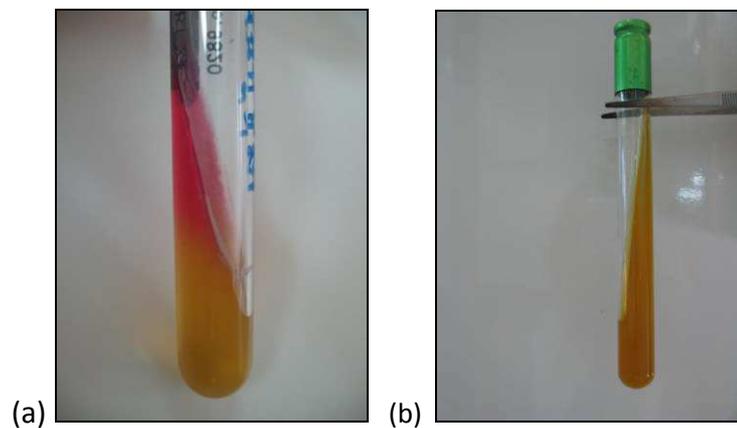
N° 5 colonie sospette vengono trapiantate in Nutrient agar+NaCl 2% ed incubate a 37±1°C per 24 ore; al termine dell'incubazione tali colonie vengono esaminate microscopicamente (colorazione Gram) e sottoposte ai seguenti test di identificazione biochimica:

1. determinazione dell'attività ossidasica (*Oxidase disc Mast Diagnostic*)
2. semina su Triple Sugar Iron Saline (TSI) ed incubazione a 37±1°C per 24 ore. Salvo eccezioni come nel caso di *Vibrio cholerae* e *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio* spp. produce una reazione alcalina (rossa) nel becco di clarino ed acida (gialla) nel fondo della provetta, senza produzione di gas e di idrogeno solforato.(Tab. 11)(Fig.17).
3. semina su Tryptofan broth per la prova dell'indolo.

Tab.11 – Differenziazione di *Vibrio* spp in base alla prova su TSI salino.

	Becco di clarino	Fondo provetta
<i>Vibrio cholerae</i>	A (K rara)	A
<i>Vibrio mimicus</i>	K (A rara)	A
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	K	A
<i>Vibrio alginolyticus</i>	A	A
<i>Vibrio vulnificus</i>	K (A rara)	A
K, alcalina; A,acida.		

Fig. 17 – crescita tipica su TSI salino di *Vibrio parahaemolyticus* (a) e di *Vibrio cholerae* (b).

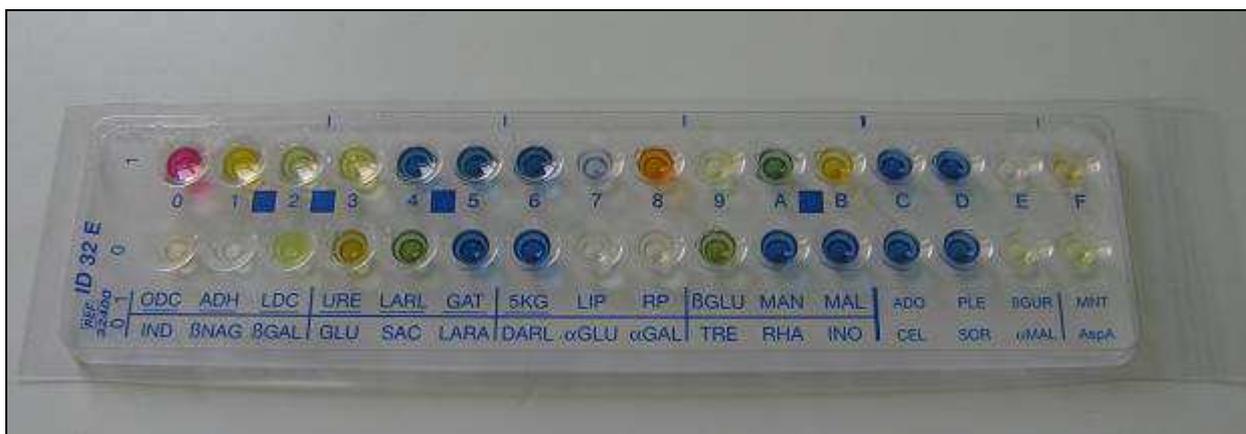


Le specie di *Vibrio* sono ossidasi e catalasi positive, riducono i nitrati, producono abbondantemente indolo e fermentano il glucosio. *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* e raramente *V.vulnificus* fermentano anche il lattosio ed il saccarosio.

I ceppi sono stati inoltre testati in micrometodo utilizzando strumentazione per identificazione automatizzata (*Mini Api* e *Vitek 2 bioMérieux*) e gallerie API20NE (*bioMérieux*) (Fig. 18).

Fig.18 – Test chiave galleria di identificazione biochimica API20NE



Fig.19 – Test chiave galleria ID32E (sistema miniaturizzato automatico *MiniApi bioMérieux*)

9.4.4.1 Tipizzazione di *Vibrio cholerae* O1 e O139 e *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139

I ceppi identificati biochimicamente come *Vibrio cholerae* sono stati caratterizzati per il sierotipo con antisieri polivalenti O1 e O139.

Culture di 16-24 ore di Nutrient Agar+NaCl 2% sono state testate con antisieri diagnostici di gruppo O1 e di gruppo O139 (Mast Assure Bacterial Agglutinating Antisera) (per ciascun antisiero sono stati eseguiti controlli con colture positive, con colture negative e con soluzione fisiologica). Le colture che hanno confermato un profilo biochimico di *Vibrio cholerae* e che non hanno agglutinato con antisiero polivalente O1 e O139 sono state identificate come *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139.

9.5 Caratterizzazione molecolare mediante PCR

Su un totale di 440 campioni di M.E.L, sono stati isolati 14 ceppi di *Vibrio cholerae*, sui quali sono state eseguite indagini molecolari atte a confermare l'effettiva presenza dei ceppi patogeni (Fig. 18).

I ceppi batterici identificati a livello biochimico come *Vibrio cholerae* sono stati sottoposti a caratterizzazione molecolare mediante PCR per l'identificazione di specie e per testare la presenza dei geni responsabili della virulenza utilizzando primers specifici per sequenze geniche codificanti per le principali tossine coleriche.

Le colture batteriche pure sono state seminate in Nutrient broth ed incubate a 37 °C overnight. Successivamente il DNA è stato estratto dalle cellule batteriche.

9.5.1 Protocollo di estrazione del DNA

Le cellule batteriche sono state coltivate overnight a 37° C su piastre di Tryptone soya broth (TSB) salino.

Successivamente 1 ml della brodocoltura è stato trasferito in una eppendorf da 1.5 ml. La coltura è stata centrifugata a 15000 g (~ 13000 rpm) per 5 min; è stato eliminato il surnatante ed è stato risospeso il pellet batterico in 1 ml di acqua distillata sterile.

È stata ripetuta la centrifugazione (5 min a 15000 g) ed è stato risospeso completamente il pellet in 200 ml di acqua distillata sterile. Le eppendorf sono state sigillate mediante parafilm e sono state poste in bagnomaria a 100 °C per 10 min.

I detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione (15000 g ~ 13000 rpm) per 1 min ed il surnatante contenente il DNA è stato prelevato e riposto in una provetta refrigerata per PCR.

9.5.2 Valutazione qualitativa del DNA estratto mediante elettroforesi su gel di agarosio

Per avere una conferma dell'avvenuta estrazione è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel d'agarosio allo 0.7%. Un volume di 6 µl di estratto di DNA di ciascun campione, è stato sospeso in una mix contenente 2 µl di SYBR Green I e 1 µl di Loading Buffer. In seguito 6 µl di tale sospensione sono stati caricati su ciascun pozzetto ed è stata applicata una tensione di corrente pari a 150 V. Dopo 30' il gel è stato posto su un transilluminatore a raggi UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) per poter valutare visivamente l'avvenuta estrazione.

9.5.3 Programmi PCR

9.5.3.1 Identificazione di specie : ricerca gene ompW.

L'identificazione di specie è stata eseguita utilizzando primers per la determinazione della presenza del gene ompW (Nandi *et al.*, 2000) che codifica una proteina di membrana esterna caratteristica del *Vibrio cholerae*.

L'utilizzo dei primers per la ricerca del gene ompW è risultato il metodo migliore per l'identificazione specie specifica di Vibrio cholerae a causa della presenza esclusiva in quest'ultimo di tale gene le cui sequenze rimangono invariate nel tempo.

I primers per l'amplificazione del gene della proteina di membrana sono riportati in Tab.12:

Tab.12 – Sequenza primers usati per l'identificazione di specie (Nandi B. *et al.*, 2000).

Gene target	Sequenza primers	bp
ompW	senso (5'-CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG-3') anti senso (5'-GAACTTATAACCCGCG-3')	588

La reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume di miscela di reazione di 25 µl contenente i seguenti componenti (Tab.13):

Tab. 13 – Composizione miscela di reazione

Reagente	Concentrazione
buffer 10x	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,75 µl
primer senso (50µM)	0,5 µl
primer antisenso (50µM)	0,5 µl
H ₂ O	16 µl
Taq (5U/ µl)	0,25 µl
Lisato	2,5 µl

Prima di iniziare i cicli di amplificazione la miscela è stata riscaldata a 94°C per 5 minuti per permettere la denaturazione completa dello stampo. I prodotti di PCR così ottenuti sono stati analizzati attraverso elettroforesi su gel 0,7% e visualizzati sotto luce UV. Successivamente la miscela di reazione è stata sottoposta ad una amplificazione di 30 cicli, ognuno dei quali costituito da tre fasi nel seguente ordine (Tab.14):

Tab.14 – Fasi del ciclo di reazione

Step	Temperature	Tempi
Denaturazione	94°C	30 sec
Appaiamento	55°C	30 sec
Estensione	72°C	30 sec
Estensione finale	72°C	10 min

9.5.3.2 Caratterizzazione tossicologica

9.5.3.2.1 PCR per la ricerca della tossina colerica (gene ctx)

La ricerca della tossina colerica è stata compiuta utilizzando i primers *Vibrio cholerae* O1 ctx⁺ per il gene ctx riportati in Tab.15.

La scelta di questo gene come obiettivo, risulta preferibile nell'ambito dell'analisi degli alimenti dove la presenza o meno di questo fattore di patogenicità risulta spesso determinante per la pericolosità di un determinato prodotto

Tab.15 – Sequenza primers usati per la ricerca del gene ctx della tossina colerica (*Vibrio cholerae* O1) (Ripabelli G. *et al.*, 1997)

Gene target	Sequenza primers	bp
ctx	senso (posizione 96 ± 115) 5'-TGAAATAAAGCAGTCAGGTG-3' antisenso (posizione 853 ± 873) 5'-GTGATTCTGCACACAAATCAG-3'	779

Un volume di miscela di reazione di 25 µl conteneva i seguenti componenti (Tab.16):

Tab. 16 – Composizione miscela di reazione

Reagente	Concentrazione
buffer 10x	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
primer senso (50µM)	0,5 µl
primer antisenso (50µM)	0,5 µl
H ₂ O	17,25 µl
Taq (5U/ µl)	0,25 µl
Lisato	2,5 µl

Prima di iniziare i cicli di amplificazione la miscela è stata riscaldata a 94 °C per 5 minuti per permettere la denaturazione completa dello stampo. I prodotti di PCR, così ottenuti, sono stati analizzati attraverso elettroforesi su gel 0,7% e visualizzati sotto luce UV. Successivamente la miscela di reazione è stata sottoposta ad una amplificazione di 35 cicli, ognuno dei quali costituito da tre fasi nel seguente ordine (Tab.17):

Tab.17 – Fasi del ciclo di reazione

Step	Temperature	Tempi
Denaturazione	94°C	1 min
Appaiamento	60°C	1 min
Estensione	72°C	1 min
Estensione finale	72°C	7 min

9.5.3.2.2 PCR per la ricerca del gene *stn/sto* per la tossina termostabile NAG-ST (*Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139)

Il NAG-ST è un peptide 17 aminoacidi, codificato dal gene *stn*, che mostra notevole somiglianza, soprattutto nel dominio carbossi-terminale della tossina, con l' enterotossina termostabile (STS) prodotta da ceppi di *Escherichia coli* enterotossigenici (ETEC). Il gene per NAG-ST è stato clonato e sequenziato (Ogawa *et al.*, 1990), e ciò ha permesso la costruzione di sonde di DNA per il rilevamento di NAG-ST nei ceppi di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 . La ricerca dell'enterotossina termostabile è stata condotta utilizzando i seguenti primers *Vibrio cholerae* non-O1 *stn/sto+* indicati in Tab.18:

Tab.18 - Sequenza primers usati per la ricerca del gene *stn/sto* della enterotossina termostabile NAG-ST (*Vibrio cholerae* non-O1) (Rivera I.N.G *et al.*, 2001).

Gene target	Sequenza primers	bp
<i>stn/sto</i>	Senso 5'-TCG CAT TTA GCC AAA CAG TAG AAA-3' Antisenso 5'-GCT GGA TTG CAA CAT ATT TCG C-3'	172

Un volume di miscela di reazione di 25 µl conteneva i seguenti componenti indicati in Tab.20:

Tab. 19 – Composizione miscela di reazione

Reagente	concentrazione
buffer 10x	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
primer senso (50µM)	0,5 µl
primer antisenso (50µM)	0,5 µl
H ₂ O	16,75 µl
Taq (5U/ µl)	0,25 µl
Lisato	2,5 µl

Prima di iniziare i cicli di amplificazione la miscela è stata riscaldata a 94 ° C per 5 minuti per permettere la denaturazione completa dello stampo. I prodotti di PCR, così ottenuti, sono stati analizzati attraverso elettroforesi su gel 0,7% e visualizzati sotto luce UV. Successivamente la miscela di reazione è stata sottoposta ad una amplificazione di 30 cicli, ognuno dei quali costituito da tre fasi nel seguente ordine (Tab.20).

Tab.20 – Fasi del ciclo di reazione

Step	Temperature	Tempi
Denaturazione	94°C	2 min
Appaiamento	55°C	1 min
Estensione	72°C	1 min
Estensione finale	72°C	10 min

9.6 Microbial Challenge Test (MCT)

Per verificare l'evoluzione della concentrazione di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 nei M.E.L è stato allestito un challenge test di prodotto le cui fasi principali sono riassunte in Fig.23.

Sono stati contaminati complessivamente 50 campioni di ostriche utilizzando ceppi "selvaggi" isolati nel corso della ricerca e simulando il processo di conservazione.

La scelta di utilizzare come matrice per il challenge test le ostriche fresche (*Crassostrea gigas*) è stata compiuta per i seguenti motivi:

- *Elevata frequenza di isolamento* di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 (24% dei vibrioni isolati in questa matrice) nei campioni di ostriche analizzati durante la ricerca.
- *Modalità di consumo*: le ostriche sono una categoria di molluschi che viene consumata per la maggior parte dei casi cruda e ciò rende questa categoria di M.E.L più a rischio rispetto alle altre.
- *Letteratura scientifica* che correla la presenza di *Vibrio cholerae* non-O1 non O-139 con la matrice ostrica (Morris JG. *et al.*, 1981) (Morris JG *et al.*, 1990).

Nell'allestire il challenge test sono stati valutati:

- caratteristiche organolettiche dell'alimento oggetto di studio;
- processo produttivo e conservazione del dato alimento;
- caratteristiche ecologiche (a_w , pH, salinità%, T°) del microrganismo oggetto di studio, nel nostro caso *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139
- comportamento e capacità di crescita del microrganismo in base al substrato alimentare in esame

9.6.1 Materiali per il challenge test

- *Ostriche (Crassostrea gigas)*: sono state utilizzate ostriche fresche provenienti dalla grande distribuzione e stabulate in allevamenti siti nel territorio di Oristano. La zona di allevamento è stata scelta in relazione all'elevata frequenza d isolamento dei *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 durante la fase preliminare della ricerca (11% per Oristano e 18% per Arborea)

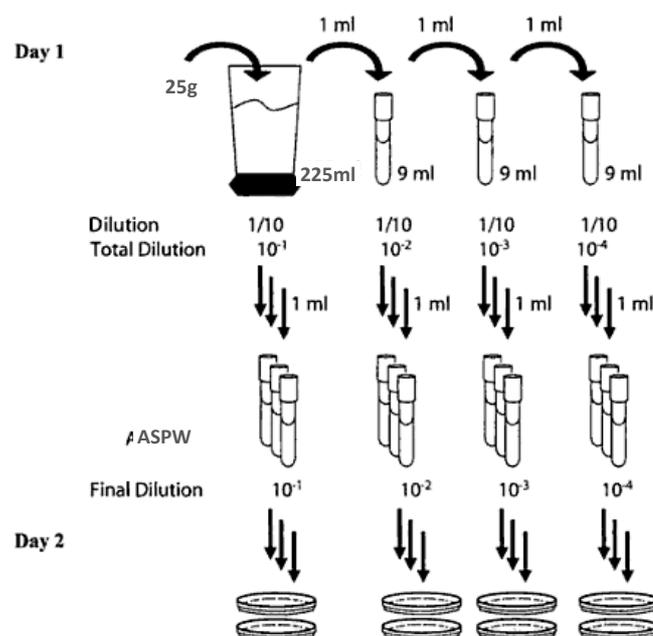
Le confezioni di ostriche sono state trasportate a temperatura controllata (Reg. CE 853/04 All. III, Sez. VIII, Cap. VIII) in laboratorio mantenendo la catena del freddo fino al momento dell'inoculo sperimentale.

9.6.2 Verifica dell'assenza del microrganismo Target nell'alimento

Prima di procedere alla contaminazione sperimentale si è verificata l'assenza del germe target sui campioni da infettare. La presenza e l'enumerazione di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 è stata effettuata mediante la metodica del MPN (McLandsborough L., 2004) che ha previsto le seguenti fasi (Fig.20):

1. Allestimento di una sospensione madre ottenuta ponendo 25g di omogenato (polpa+liquido intravalvare) in 225ml di ASPW (al 2% di NaCl) in un rapporto di 1/10.
2. Semina di 1 ml della suddetta sospensione madre in 3 provette contenenti ciascuna 10 ml di ASPW (al 2% di NaCl) utilizzando le diluizioni necessarie per raggiungere livelli di rilevazione appropriati.
3. Incubazione di tali provette a $37\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore
4. Da ciascuna provetta in cui si è osservata torbidità, è stata effettuata una subcoltura in CHROMagar™ *Vibrio* o TCBS con incubazione a $37\pm 1^\circ\text{C}$ per 20-24 ore.
5. Dopo incubazione, la crescita di colonie blu o verde-blu su CHROMagar™ *Vibrio* ha indicato la presenza di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139. Sono state considerate positive tutte le provette di ASPW che hanno dato origine a colonie blu o blu-verde sulle piastre di CHROMagar™ *Vibrio*.
6. È stato determinato l'indice MPN dal numero di provette positive alle diluizioni selezionate utilizzando la tabella per l'MPN e calcolo del numero di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 per grammo o millilitro di campione.

Fig.20 – Fasi della metodica in MPN per l'analisi quantitativa dei *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 (McLandsborough L., 2004).



9.6.3 Preparazione della sospensione microbica

Per l'inoculo sperimentale sono stati utilizzati ceppi "selvaggi" di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 isolati dai M.E.L (ostriche, vongole, e mitili), nel corso della ricerca, presso il Laboratorio di Igiene degli Alimenti.

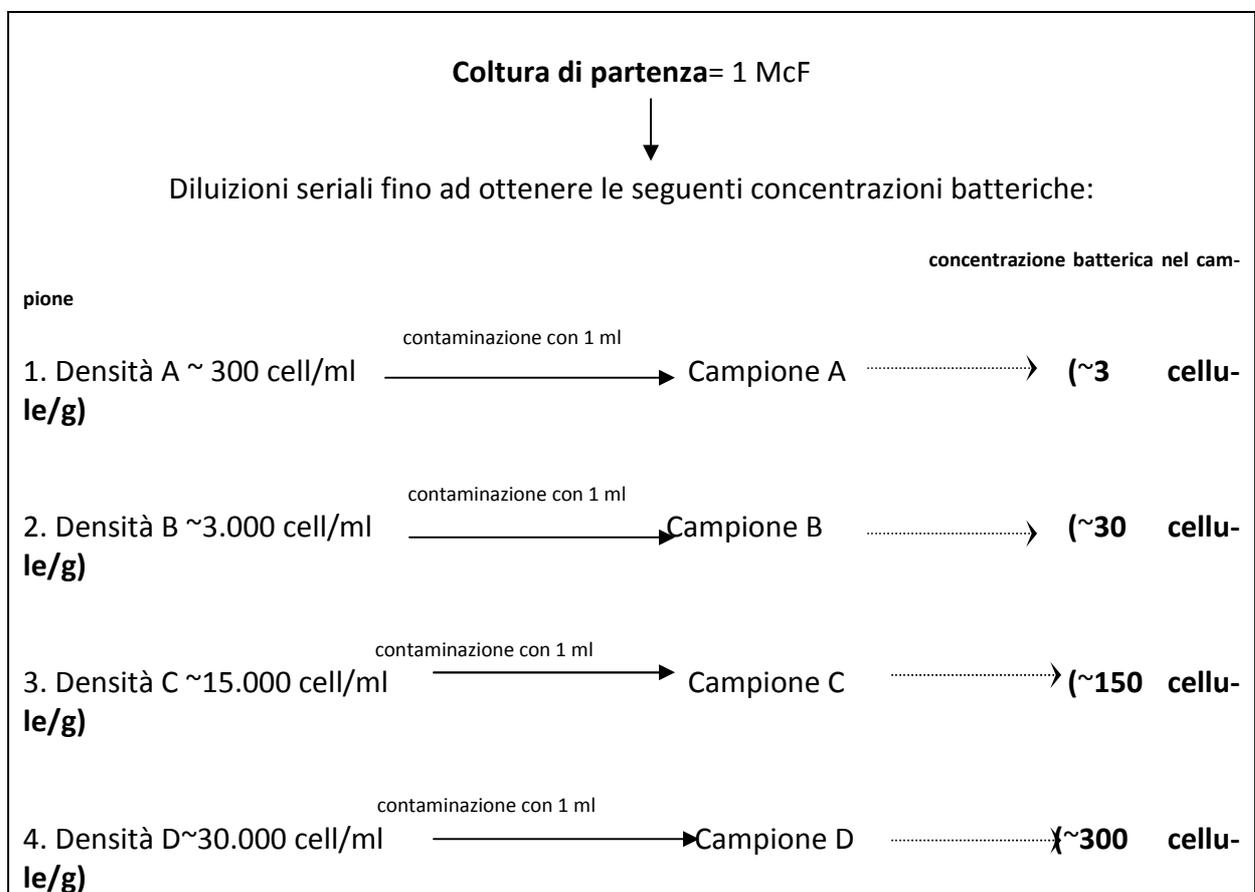
È stata allestita, mediante l'utilizzo di un Nefelometro (*Densimat bioMérieux*), una coltura batterica a titolo noto pari a 1 McFarland (corrispondente ad una concentrazione di circa 3×10^8 ufc/ml del germe target).

L'inoculo è stato preparato nel seguente modo:

- Semina su Agar Nutrient salino del ceppo di *Vibrio Cholerae* non-O1 e non-O139 e incubazione a 37°C per 24 ore;
- Allestimento della sospensione batterica
- Allestimento della diluizione decimale scalare ritenuta più opportuna per raggiungere nei campioni inoculati la carica microbica voluta. Si è stabilito di inoculare una sospensione batterica con concentrazione pari a 10^3 ufc/ml corrispondete alla concentrazione massima del microrganismo target riscontrata nei M.E.L durante la fase preliminare della ricerca.

10^3 UFC/ml = "inoculo base"

Fig.21 – Fasi di preparazione della sospensione microbica



9.6.4 Verifica della vitalità dell'inoculo

Per verificare la vitalità dei microrganismi nella sospensione microbica, è stata effettuata una conta mesofila totale (CMT) seminando l'inoculo base con carica nota in ottemperanza alla norma UNI EN ISO 4833/2004.

9.6.5 Modalità di inoculo in campioni di Ostriche

Sono stati selezionati 50 campioni di ostriche lavate e private delle valve (polpa+ liquido intravalvare) del peso di 10 g ciascuno.

Ciascun campione, depositato in un sacchetto sterile per alimenti, è stato contaminato con 1 ml di inoculo e ed è stato conservato secondo due modalità:

1. a temperatura ambiente (25°C) per 2 h
2. a temperatura di 8°C per 24 h

in modo tale da simulare condizioni di conservabilità di abuso termico riferite in particolar modo all' ambiente domestico.

In entrambe i casi la temperatura di conservazione è stata costantemente monitorata mediante l'utilizzo di termometri tarati.

Dopo i suddetti intervalli di tempo sia i campioni conservati a temperatura ambiente (2 h) sia quelli conservati a 8°C (24 h) sono stati sottoposti ad analisi per verificare l'evoluzione delle cariche e le loro dinamiche.

9.6.6 Verifica carica microbica finale

Per verificare l'effettiva evoluzione delle cariche è stata utilizzata la metodica dell'MPN.

È stata allestita una sospensione madre utilizzando:

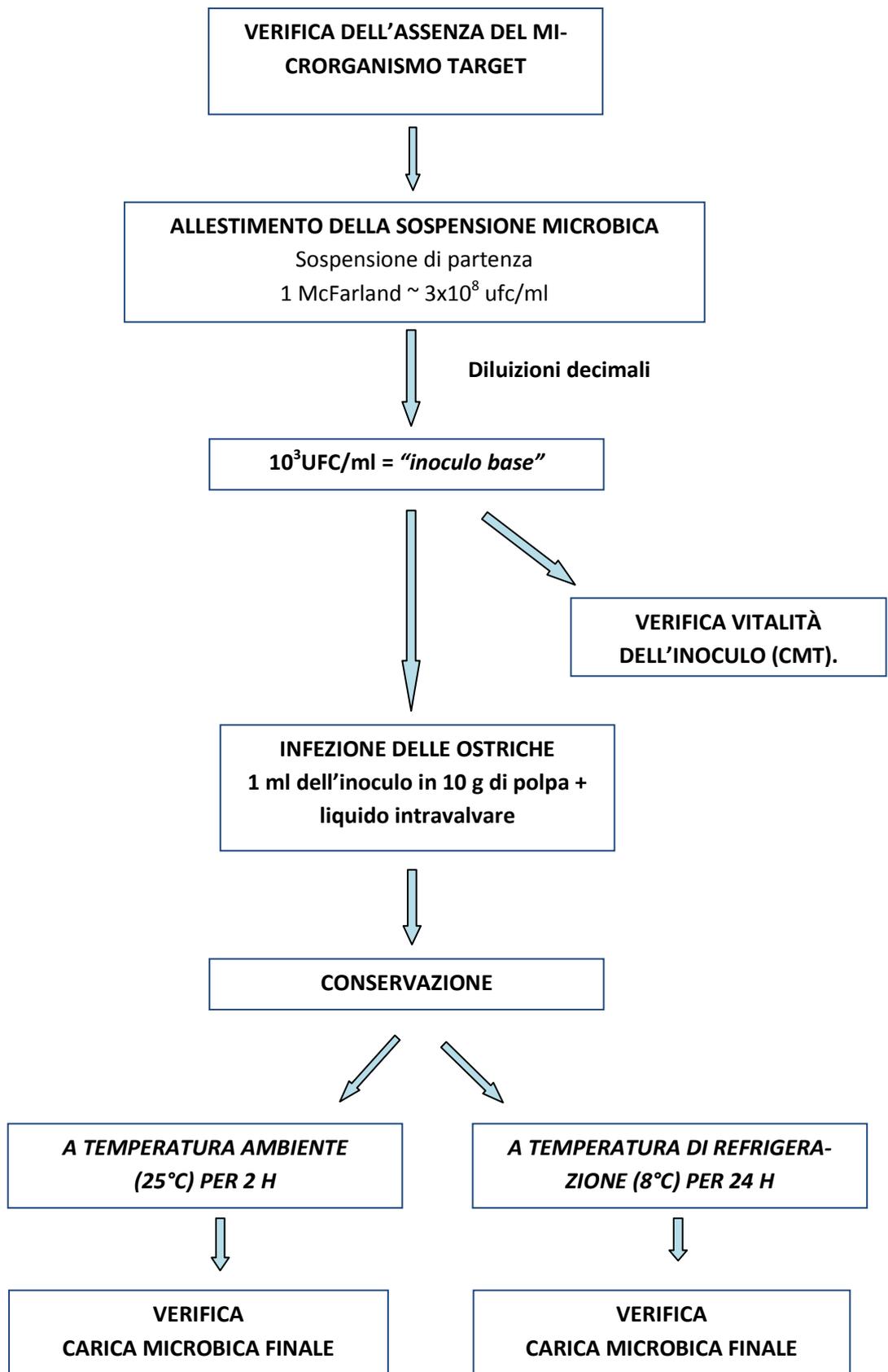
- 10 g di campione precedentemente contaminato e conservato a temperatura ambiente (T= 25°C) per 2h
- 10 g di campione contaminato conservato a temperatura di refrigerazione (T= 8°C) per 24h

A ciascuno di essi sono stati aggiunti 90 ml di ASPW 2% NaCl e la sospensione è stata omogenata tramite Stomacher per 2 minuti. Il calcolo del numero più probabile di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 per grammo o millilitro di campione è stato ottenuto utilizzando le apposite tabelle statistiche per l'MPN (Fig.22); in tale tabelle viene riportato anche l'intervallo, con il valore massimo e minimo, entro il quale cade il 95% degli altri valori possibili per una specifica combinazione dei risultati.

Fig 22 - Determinazione del numero più probabile (MPN) (Da de Man JC., 1983)

3) Diluizione 0,1 - 0,01 - 0,001g			
Combinazioni positive	MPN/g	limite di al confidenza 95%	
		Inferiore	-Superiore
0-0-0	<3	<0.5	<9
0-0-1	3	<0.5	9
0-1-0	3	<0.5	13
0-2-0	—	—	—
1-0-0	4.0	<0.5	20
1-0-1	7.0	1.0	21
1-1-0	7.0	1.0	23
1-1-1	11	3.0	36
1-2-0	11	3.0	36
2-0-0	9.0	1.0	36
2-0-1	14	3.0	37
2-1-0	15	3.0	44
2-1-1	20	7.0	89
2-2-0	21	4.0	47
2-2-1	28	10	150
2-3-0	—	---	—
3-0-0	23	4.0	120
3-0-1	39	7.0	130
3-0-2	64	15	380
3-1-0	43	7.0	210
3-1-1	75	14	230
3-1-2	120	30	380
3-2-0	93	15	380
3-2-1	150	30	440
3-2-2	210	35	470
3-3-0	240	36	1300
3-3-1	460	71	2400
3-3-2	1100	150	4800
3-3-3	>1100	>150	>4800

Fig.23 – Diagramma di flusso fasi challenge test



9.7 Determinazione parametri ecologici

Su ogni campione è stata effettuata preventivamente mediante strumenti elettronici la misura del pH e dell' a_w ; è stata determinata anche la salinità mediante retro titolazione (Tab.21).

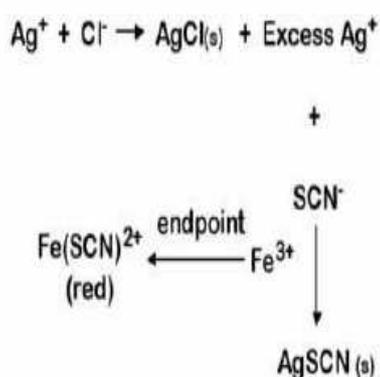
Tab.21 – Parametri ecologici determinati e relative metodiche

Indagine analitica	Metodica utilizzata
pH	Mediante pHmetro (pH 510 Eutech Instruments) tarato con soluzioni standard
a_w	Igrometro (HygroPalm AW- DIO) tarato con soluzioni standard
Salinità %	Metodo di Volhard

9.7.1 Determinazione dell'NaCl totale sugli alimenti (salinità) – Metodo di Volhard

Il metodo di Volhard si basa sull'utilizzo di una retrotitolazione mediante tiocianato di potassio (KSCN). Prima della titolazione si utilizza una quantità di nitrato di argento superiore alla concentrazione degli ioni cloruro da esaminare; in questo modo tutto il cloruro reagisce per formare cloruro di argento. L'indicatore utilizzato è il ferro ferrico (Fe^{3+}). L'argento in eccesso reagisce con lo ione tiocianato (SCN^-) per formare tiocianato di argento ($AgSCN$) che è di colore giallo; una volta esaurito l'eccesso di ione argento avviene una reazione tra il titolante e l'indicatore a formare $Fe(SCN)^{2+}$ e comparirà il colore marrone del viraggio. Per determinare la concentrazione del cloro si sottrae dalla quantità di nitrato di argento inserito in soluzione il numero di moli che hanno reagito per formare tiocianato di argento (Fig.24).

Fig. 24 – Reazioni metodo di Volhard



9.8 Test statistici

Per l'analisi dei dati ottenuti nel corso della ricerca ci si è avvalsi dei seguenti test statistici:

1. Test del Chi quadrato (χ^2) di Pearson che valuta le differenze tra le proporzioni
2. Test del t di Student che valuta le differenze tra le medie
3. Coefficiente di correlazione utilizzato per quantificare la correlazione tra due variabili

10. RISULTATI

10.1 Caratterizzazione microbiologica.

10.1.1 Parametri ambientali (temperatura , pH, salinità) acqua di allevamento dei M.E.L.

Dalle misurazioni effettuate nel campionamento presso i siti ufficiali è risultato che il valore medio della temperatura dell'acqua era pari a $+20 \pm 5^\circ\text{C}$ mentre i valori medi di pH e salinità sono risultati essere rispettivamente pari a $8,5 \pm 0,10$ e $30 \pm 1\text{‰}$ (Tab.22).

Tab.22 Valori medi \pm ds dei parametri ambientali dell'acqua di allevamento dei M.E.L analizzati

Indagine analitica	Valori medi
pH	$8,5 \pm 0,10$
Temperatura	$20 \pm 5^\circ\text{C}$
Salinità ‰	$30 \pm 1\text{‰}$

10.1.2 Ricerca di *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*

Dalle analisi colturali effettuate sui 440 campioni di M.E.L per la ricerca dei microrganismi fecali 91 campioni (20,7%) sono risultati contaminati da *Escherichia coli*; i restanti 349 (79,3%) hanno presentato valori al di sotto del limite di rilevabilità della metodica ($<0,2\text{MPN/g}$) (Grafico 1).

La presenza di *Escherichia coli* è risultata, per la maggior parte dei campioni positivi (63 su 91) (69%), contenuta entro i limiti previsti dal Reg. CE 1441/2007 (230 MPN/100g) ; solamente 28 campioni (6,4%) hanno presentato una concentrazione superiore al limite di Legge di 230 MPN/100g (Tab.23) (Grafico 2). Per quanto riguarda *Salmonella spp* solo un campione di vongole su 440 campioni analizzati risultava essere contaminato.

Tab.23 - Campioni di M.E.L contaminati da *E.coli*.

Campioni	<i>E.coli</i> 20MPN	20 MPN \leq <i>E.coli</i> \leq 229 MPN	<i>E.coli</i> \geq 230 MPN
M.E.L	33 (7,5%)	30 (6,8%)	28 (6,4%)
Totale positivi 91 (20,7%)			

Grafico 1

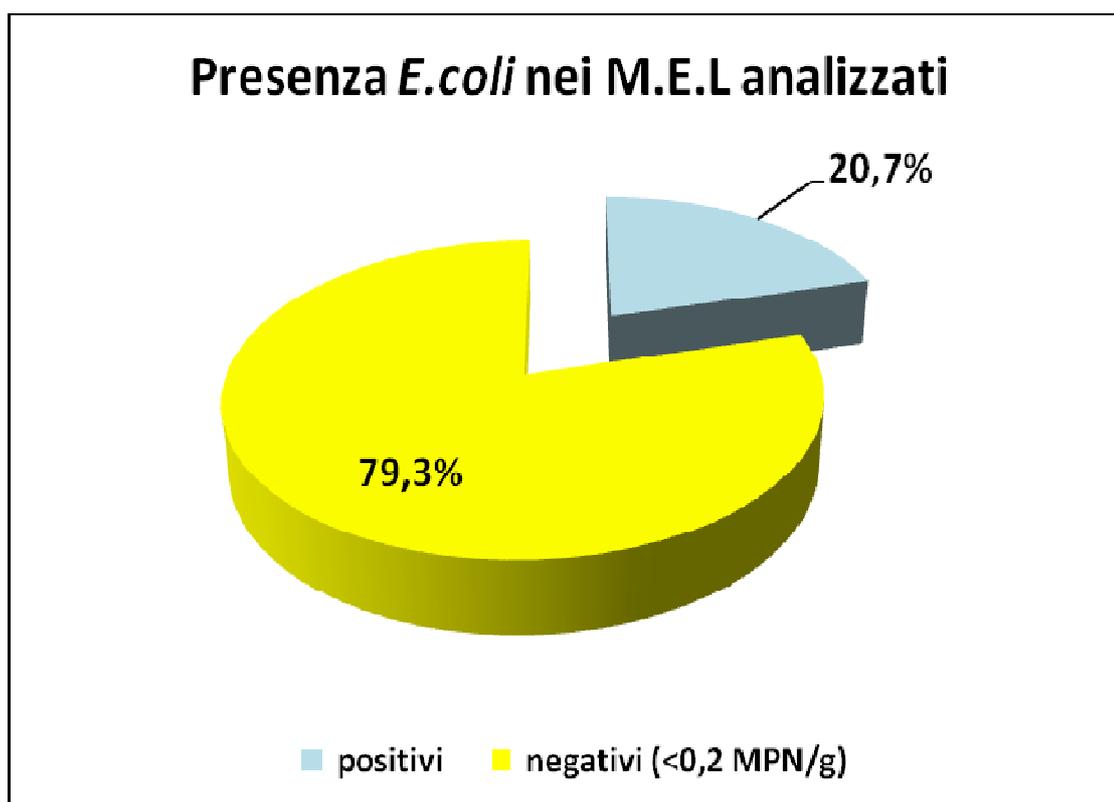
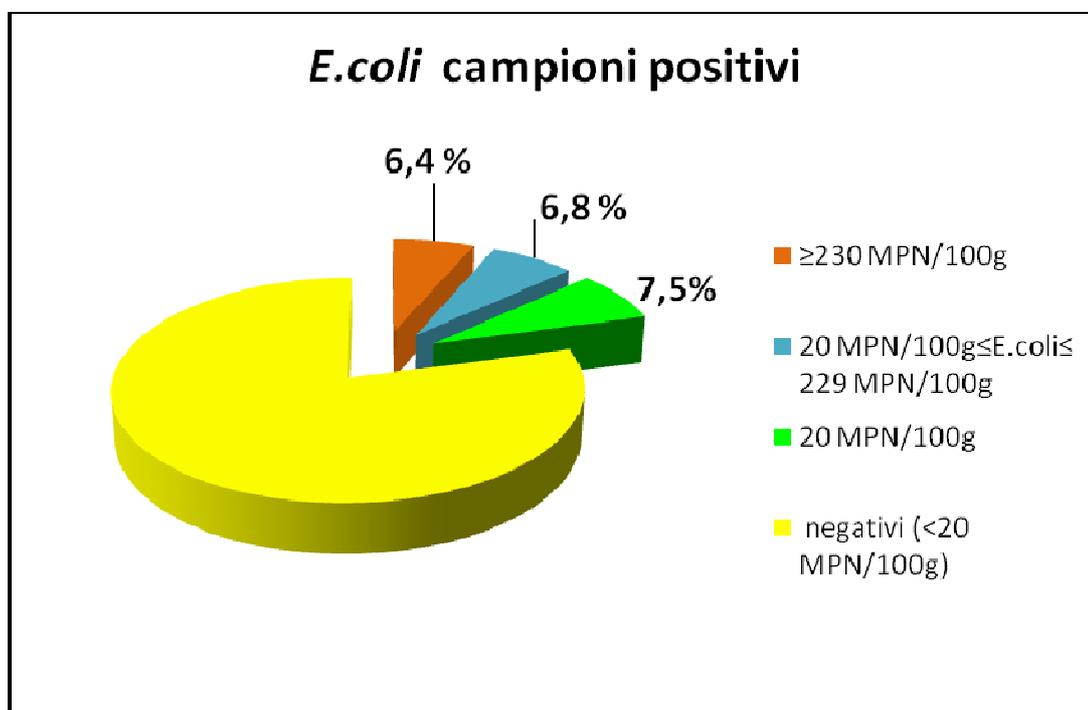
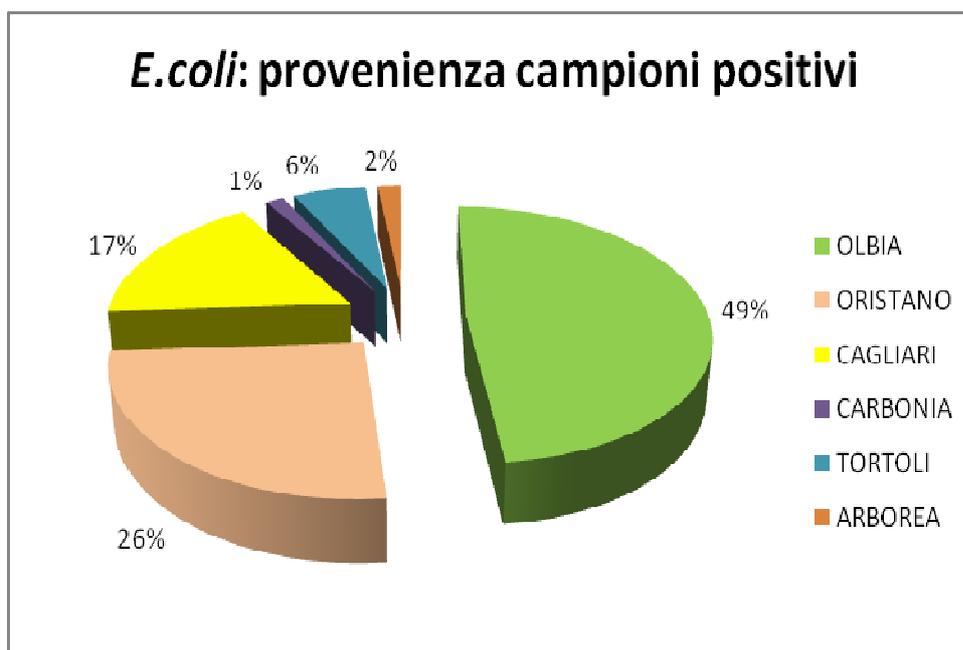


Grafico 2



I campioni positivi provenivano per il 49% da Olbia per il 26% da Oristano per il 17% da Cagliari per l'1% da Carbonia per il 6% da Tortolì e per il 2% da Arborea (Grafico 3).

Grafico 3



Relativamente alle tipologie di M.E.L. analizzate le vongole sono risultate la matrice maggiormente contaminata da *Escherichia coli* con una frequenza d'isolamento del 38% (Tab.24) (Grafico 4). Le Ostriche hanno presentato una frequenza di campioni positivi per *Escherichia coli* del 36% e infine i mitili una frequenza di isolamento del 18% (Grafico 5 a, b).

Tab.24 – Tipologie M.E.L. positivi per *E.coli*.

Tipologia campioni M.E.L. positivi per <i>Escherichia coli</i>			
	Positivi	Negativi	Frequenza %
Mitili	54	243	18%
Vongole	30	49	38%
Ostriche	23	41	36%

Grafico 4

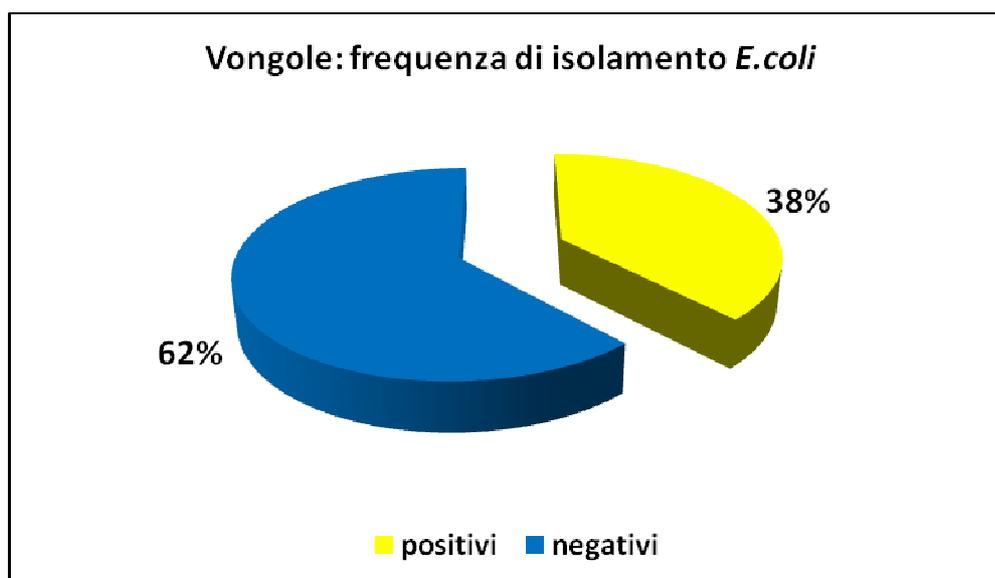
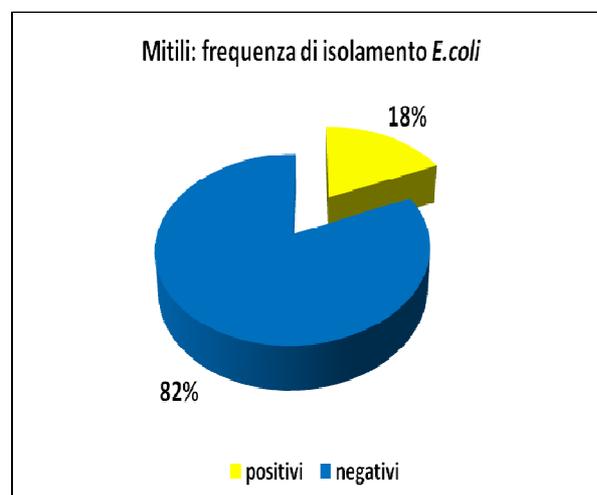
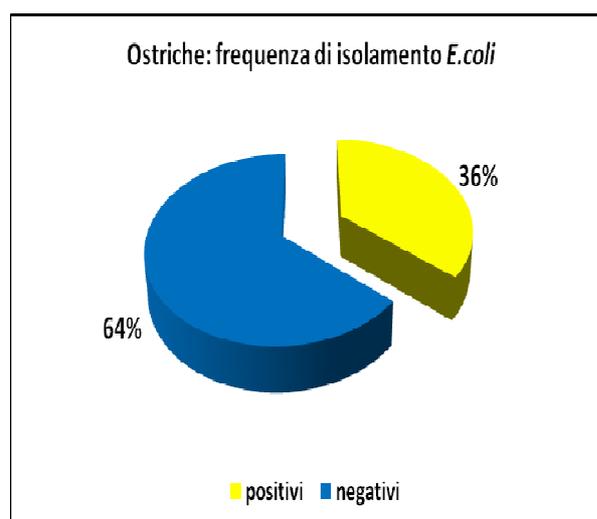


Grafico 5 (a) (b).



10.1.3 Ricerca di *Vibrio* spp.

Dei 440 campioni di M.E.L esaminati 176 (40%) sono risultati positivi per *Vibrio* spp (Tab.25) (Grafico 6).

Grafico 6



Tab.25 – Presenza di *Vibrio* spp nei M.E.L analizzati

Risultati della ricerca di <i>Vibrio</i> spp nei M.E.L della Sardegna		
Totale campioni esaminati	Totale campioni positivi per <i>Vibrio</i> spp	% campioni positivi per <i>Vibrio</i> spp
440	176	40%

I campioni di M.E.L positivi per *Vibrio* spp erano rappresentati dal 57% di mitili dal 27% di vongole e 16% di ostriche (Grafico 7 e Grafico 8).

Grafico 7

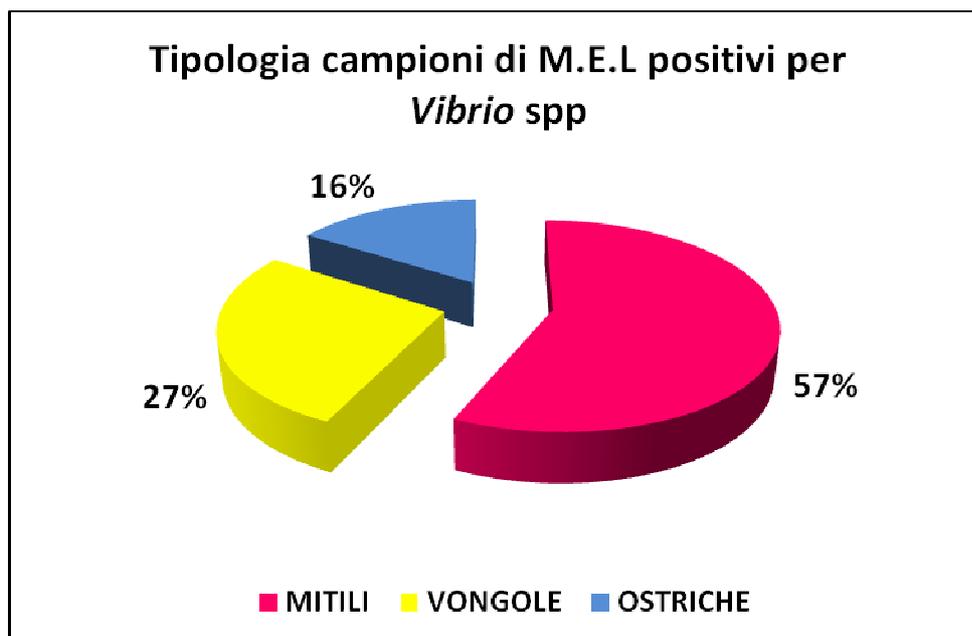
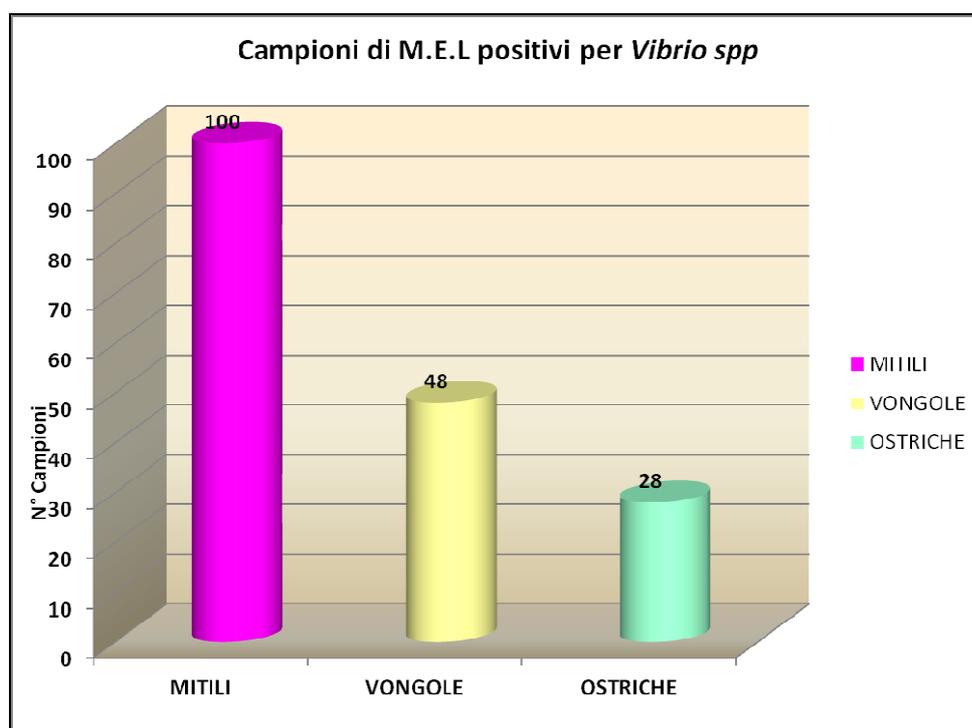
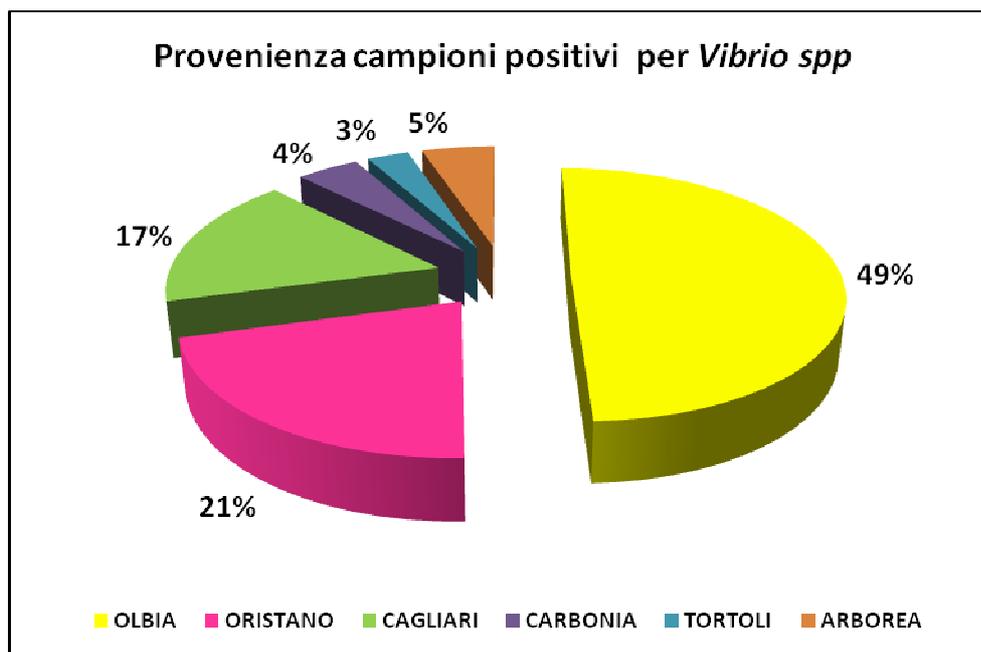


Grafico 8



Relativamente alla provenienza dei campioni di M.E.L positivi per *Vibrio spp* il 49% proveniva dalla zona di Olbia, il 21% da Oristano il 17% da Cagliari il 4% da Carbonia, il 3% da Tortolì ed il 5% da Arborea (Grafico 9).

Grafico 9



Tra i campioni di M.E.L analizzati le vongole si sono rivelate la matrice più a rischio con 48 campioni positivi sui 79 totali analizzati (61%). Le ostriche hanno presentato positività per *Vibrio spp* con 28 campioni positivi su 64 totali (44%) e i mitili con 100 campioni positivi su 297 totali (34%) (Tab.26)(Grafico 10, 11 e 12).

È stata riscontrata una notevole variabilità a seconda della tipologia di M.E.L analizzata; la differenza tra le percentuali di campioni positivi per *Vibrio spp* nei mitili e nelle vongole è risultata statisticamente significativa così come tra mitili ed ostriche ($p < 0.05$).

Tab.26 – Presenza *Vibrio spp* nei M.E.L analizzati.

Presenza di <i>Vibrio spp</i> nei M.E.L analizzati			
	Mitili	Vongole	Ostriche
Positivi per <i>Vibrio spp</i>	100	48	28
Negativi per <i>Vibrio spp</i>	197	31	36
Fequenza % campioni positivi	34%	61%	44%

Grafico 10

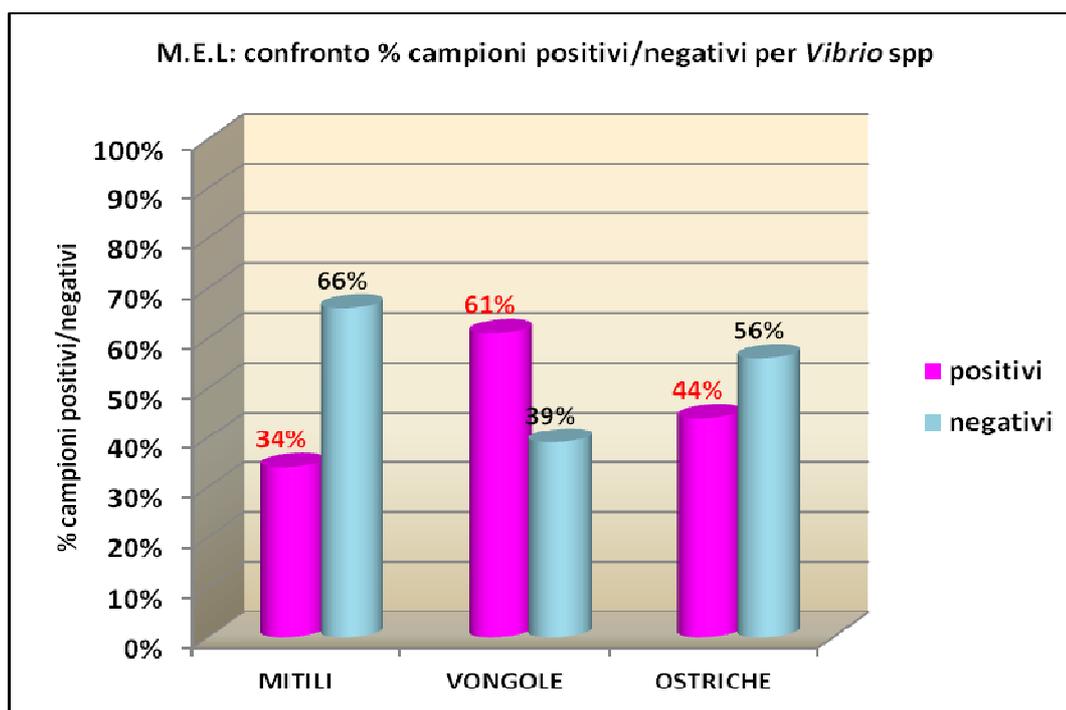


Grafico 11

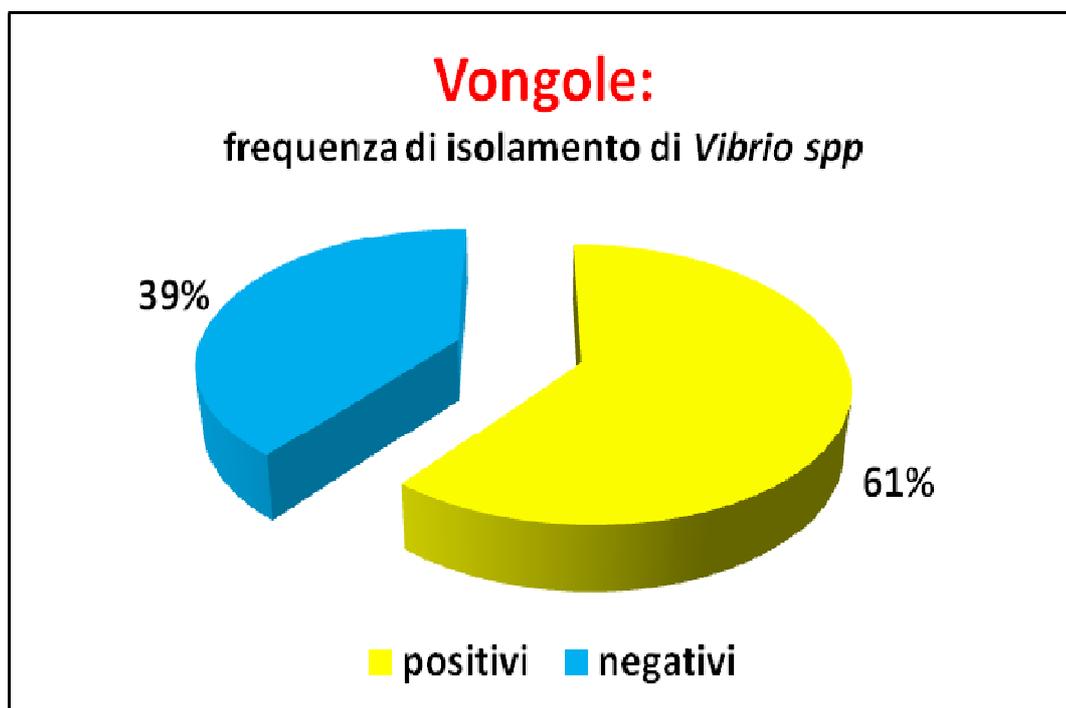
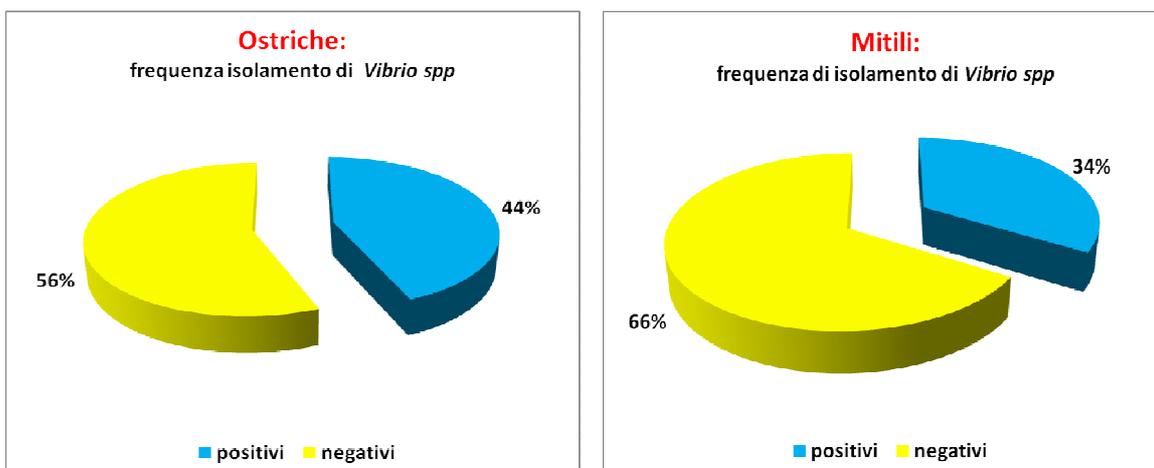
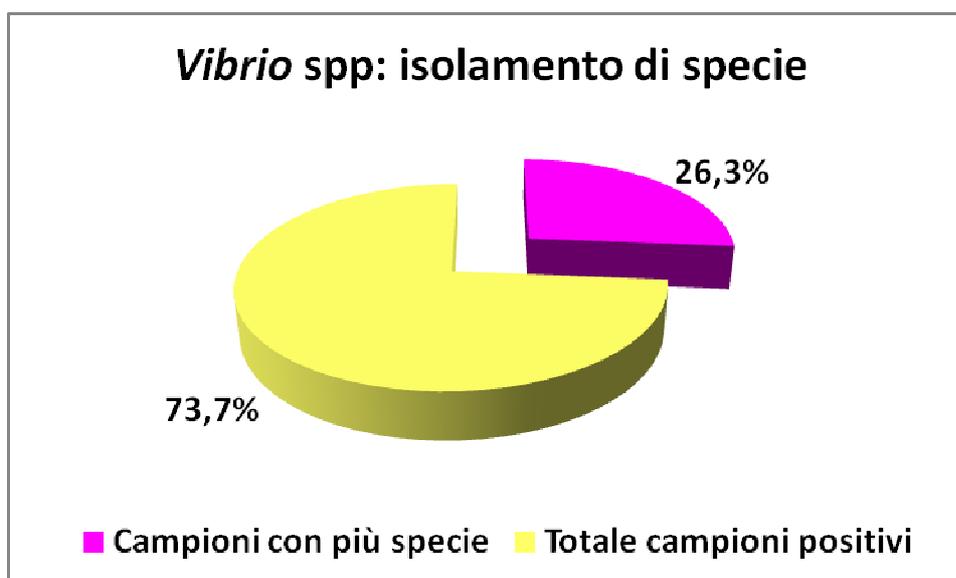


Grafico 12



Per ciò che riguarda l'isolamento delle specie nel 26,3% dei campioni positivi sono state isolate due o più specie di vibrioni dal medesimo campione (Grafico 13).

Grafico 13

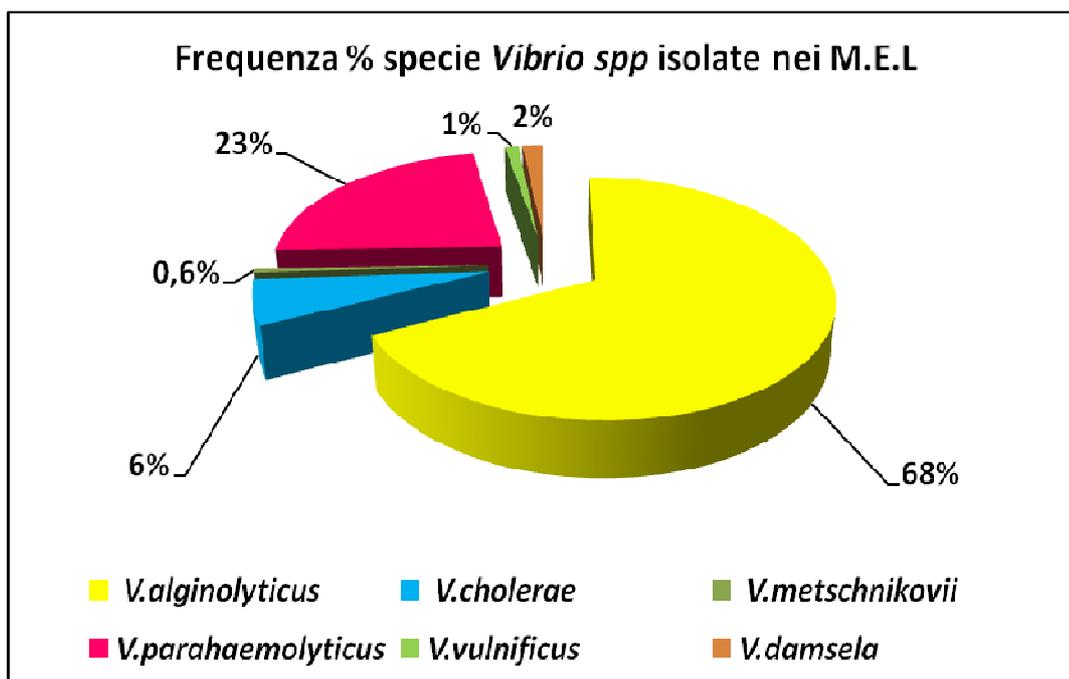


Sono stati isolati in totale 218 ceppi ed il vibrione maggiormente frequente è risultato essere *Vibrio alginolyticus* (68%). *Vibrio parahaemolyticus* ha presentato una frequenza del 23%, *Vibrio cholerae* del 6% e *Vibrio vulnificus* dell'1% ; altri Vibrioni "minori" quali *Vibrio metschnikovii* e *Vibrio damsela* hanno presentato una frequenza di isolamento rispettivamente dello 0,6% e del 2% (Tab.27) (Grafico 14).

Tab. 27 – Frequenza di isolamento specie *Vibrio* spp

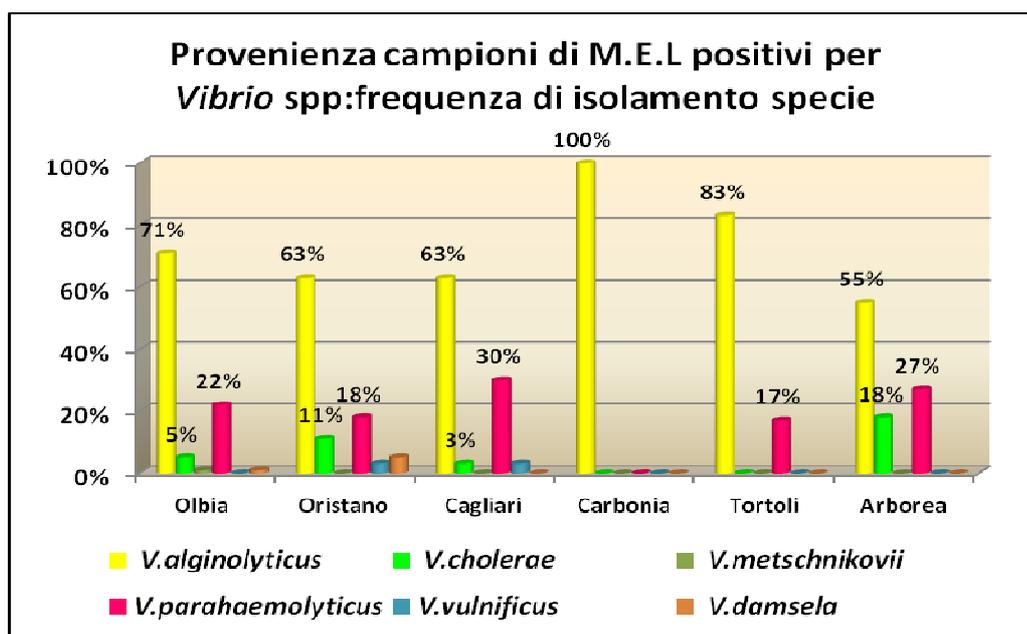
Specie <i>Vibrio</i> spp isolate dai M.E.L						
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio metschnikovii</i>	<i>Vibrio damsela</i>
N° ceppi	148	49	14	2	1	4
Freq %	68%	23%	6%	1%	0,6%	2%
Totale ceppi isolati						
218						

Grafico 14



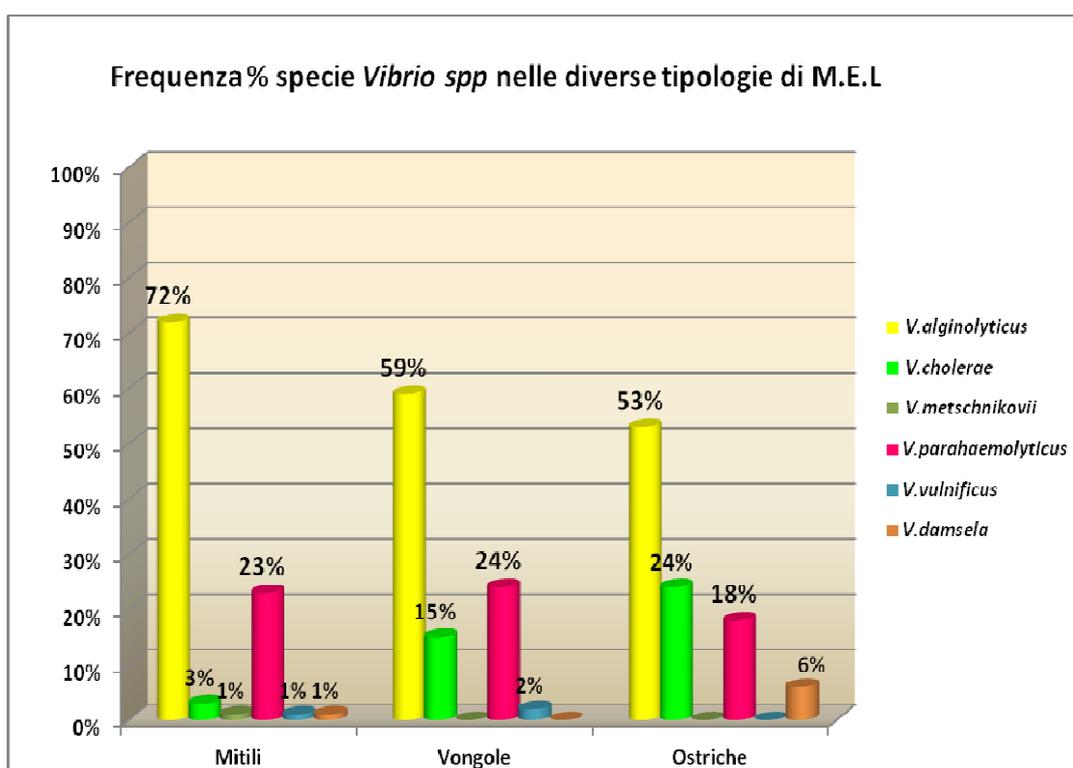
Vibrio alginolyticus è stata la specie più frequentemente isolata in tutte le zone di allevamento considerate (Olbia, Oristano, Cagliari, Carbonia, Tortolì ed Arborea) seguita da *Vibrio parahaemolyticus*, da *Vibrio cholerae* da *Vibrio vulnificus* e da gli altri Vibrioni "minori" (*Vibrio metschnikovii* e *Vibrio damsela*) (Grafico 15).

Grafico 15



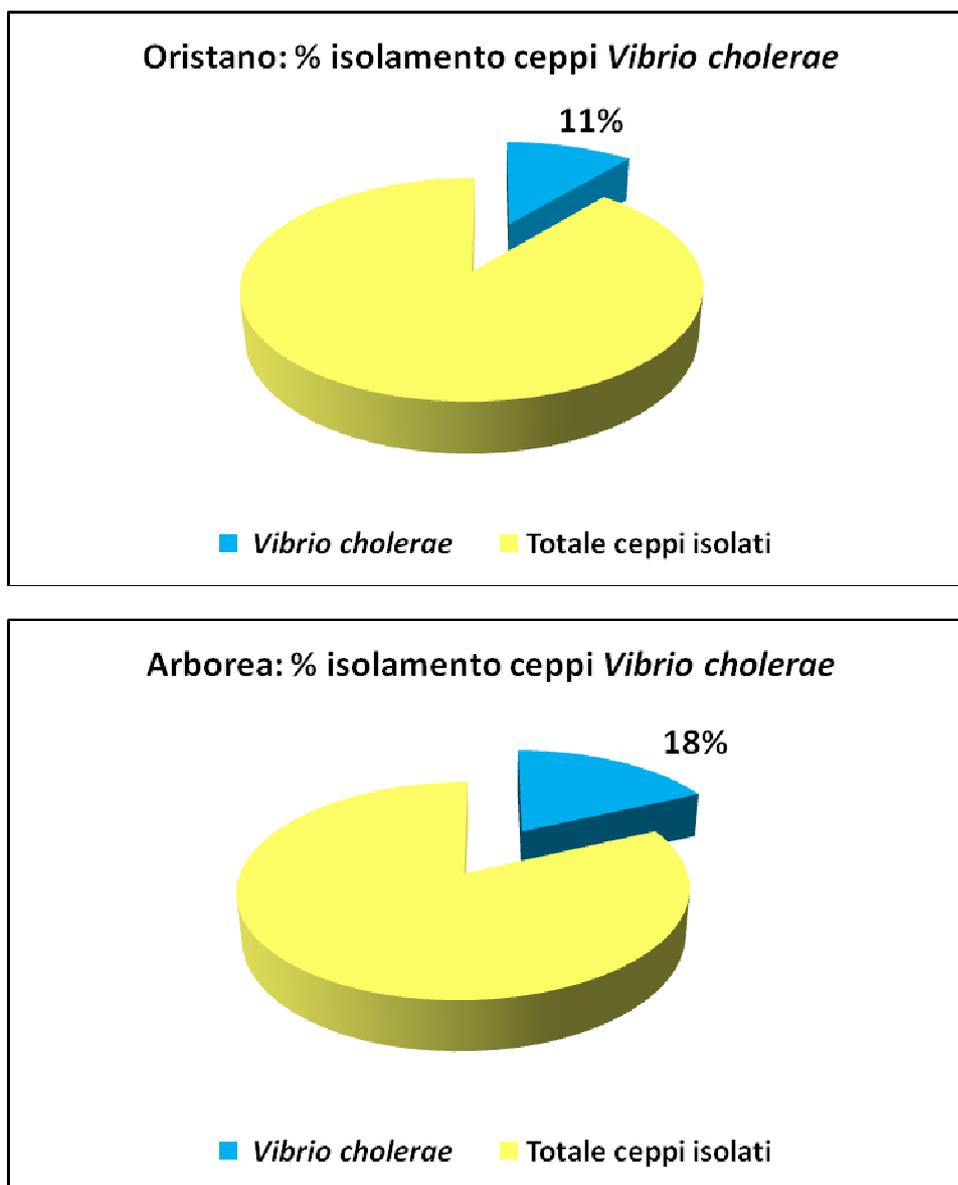
La specie prevalente in tutte le tipologie di M.E.L analizzate (mitili, vongole ed ostriche) è sempre *Vibrio alginolyticus* seguito da *Vibrio parahaemolyticus* per quanto riguarda i mitili (23%) e le vongole (24%) e da *Vibrio cholerae* per quanto riguarda le ostriche (24%) (Grafico 16).

Grafico 16



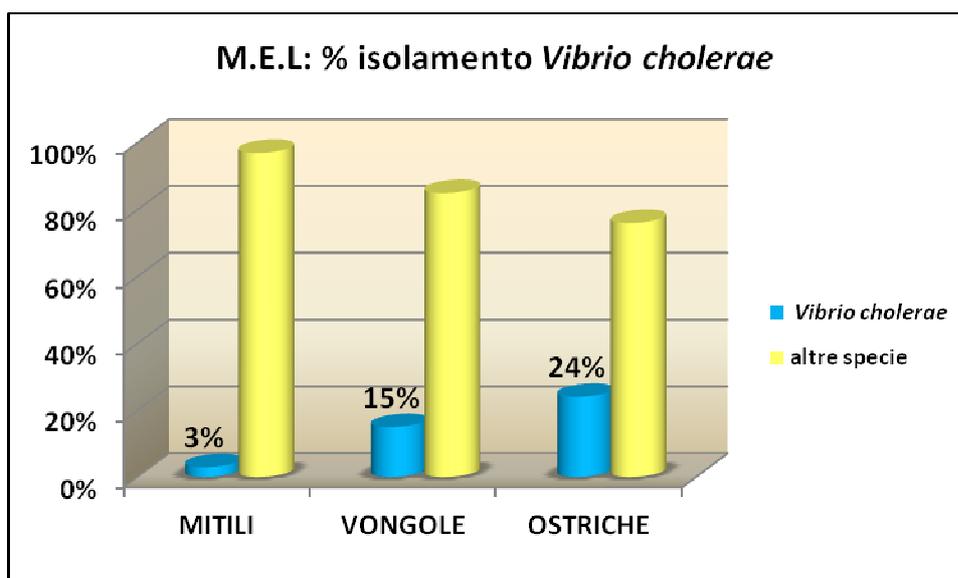
Vibrio cholerae è risultato presente soprattutto nella zona di Oristano e di Arborea dove il microrganismo raggiunge una frequenza di isolamento rispettivamente dell'11% ed del 18% dei vibrioni isolati (Grafico 17)

Grafico 17



Relativamente alle tipologie di M.E.L la matrice maggiormente contaminata dal vibrione è rappresentata dalle ostriche con una frequenza di isolamento del 24%. Le vongole hanno presentato una frequenza di isolamento del 15% ed i mitili del 3% (Grafico 18).

Grafico 18



10.2 Fattori ecologici di crescita

La maggior parte dei ceppi (81% dei campioni positivi) è stata isolata nei mesi estivi (soprattutto Luglio ed Agosto) (Tab. 28) durante i quali i fattori ecologici, primo fra tutti la temperatura dell'acqua, necessari per la crescita dei Vibrioni raggiungono valori ottimali (intorno ai 25°C) (Grafico 19 e 20).

Tab. 28 – Isolamento campioni positivi per *Vibrio* spp in base alla T° media dell'acqua.

Mesi	T° media acqua	N° campioni positivi per <i>Vibrio</i> spp
Novembre	18	-
Dicembre	12	-
Gennaio	12	-
Febbraio	11	-
Marzo	13	2
Aprile	16	4
Maggio	21,5	25
Giugno	24	41
Luglio	25	48
Agosto	26,5	56

Grafico 19

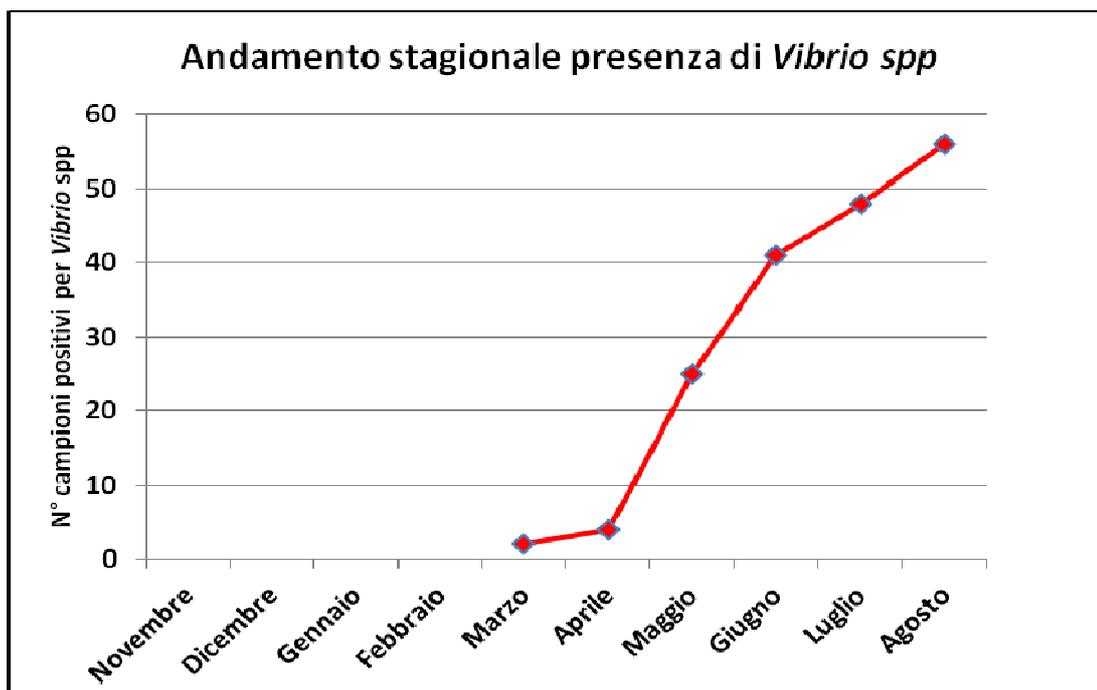
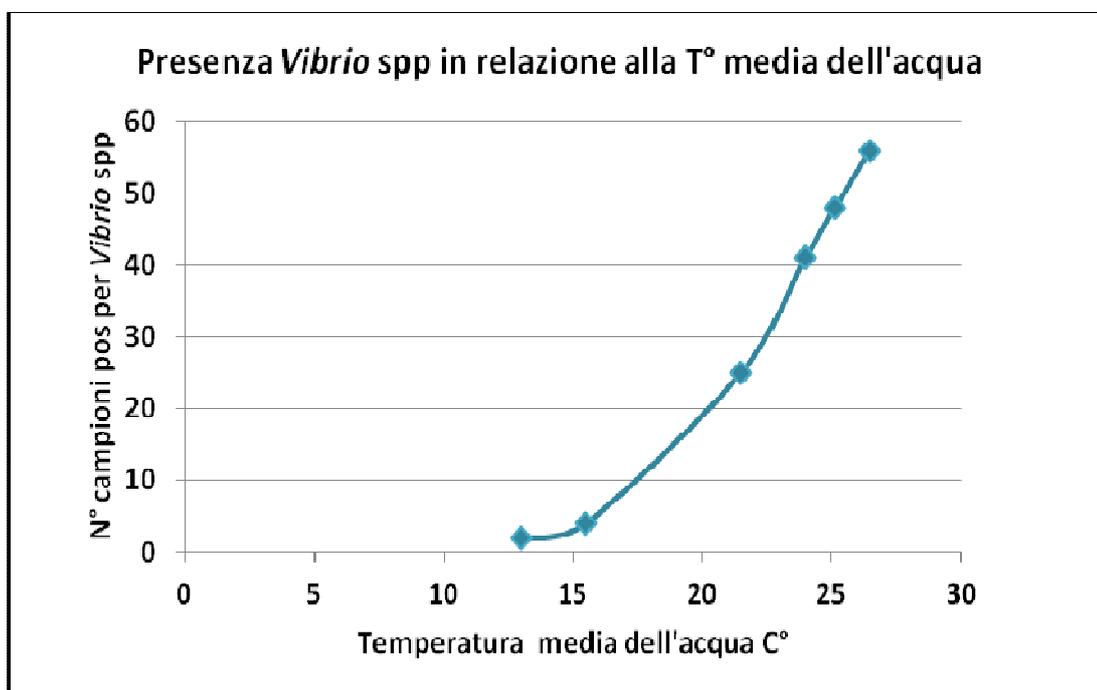


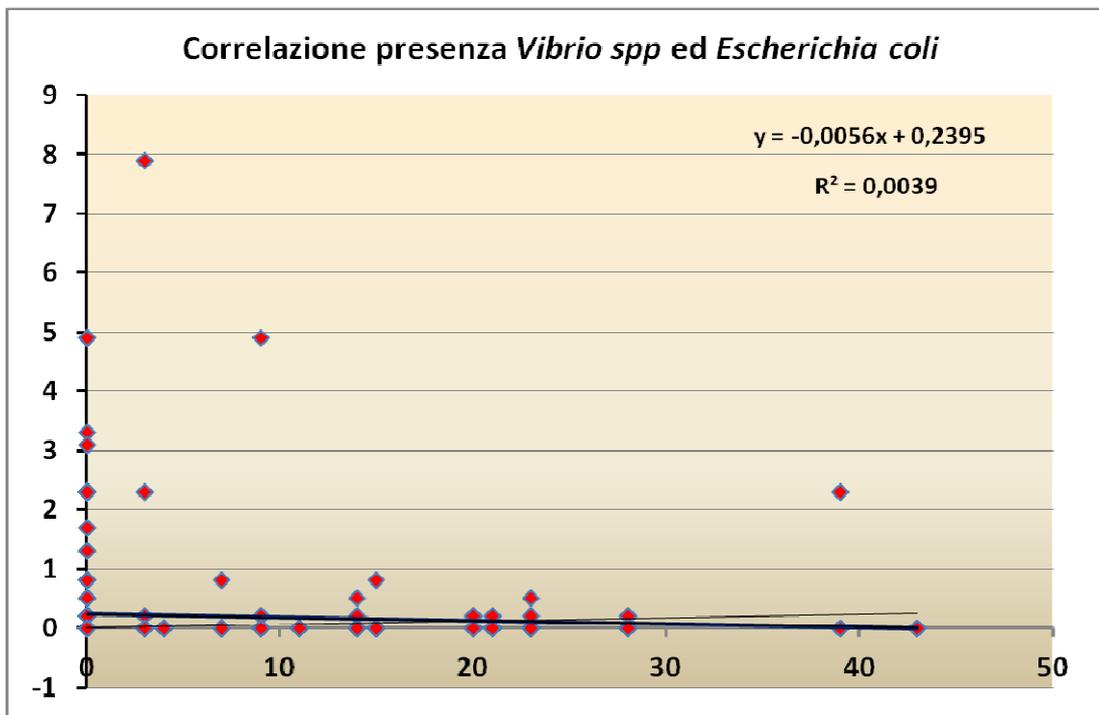
Grafico 20



10.3 Correlazione con *Escherichia coli*.

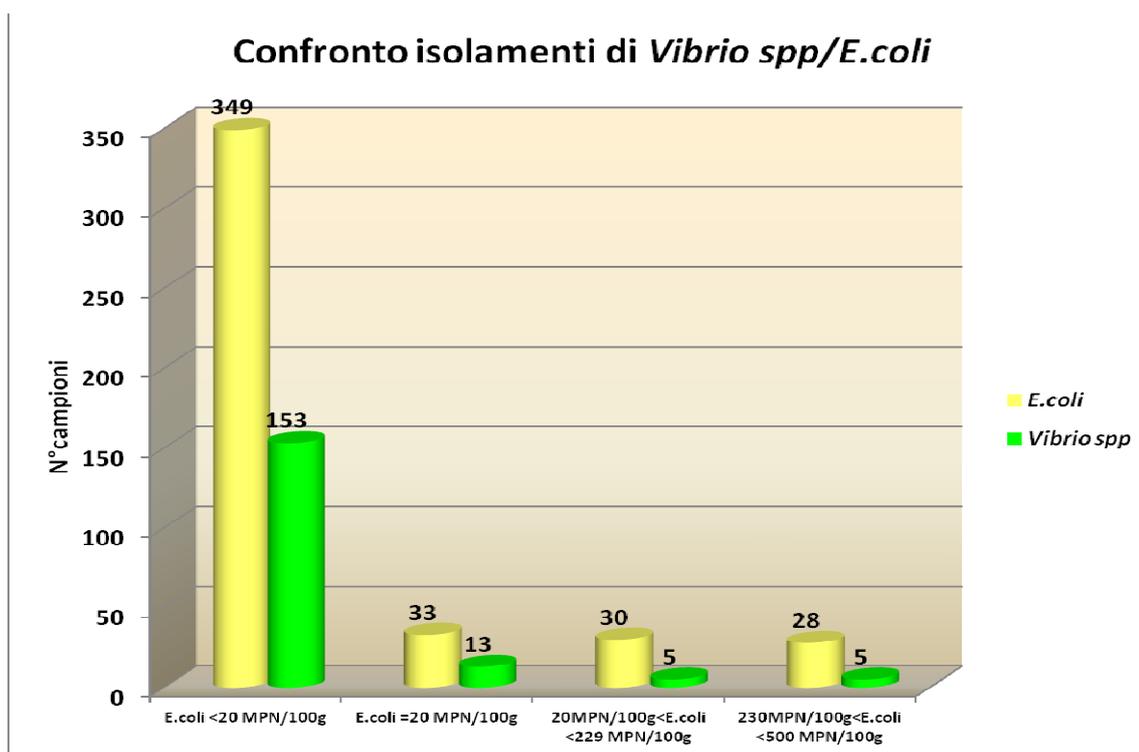
Nei 440 campioni di M.E.L. analizzati non è stata evidenziata alcuna correlazione ($r < 1$) tra la presenza di *Vibrio spp* e la presenza di indicatori di contaminazione fecale (nello specifico *Escherichia coli*) (Grafico 21).

Grafico 21



La maggior parte degli isolamenti per *Vibrio spp* (87%) si è ottenuta da campioni con assenza o con concentrazione minima di *Escherichia coli* (Grafico 22)

Grafico 22

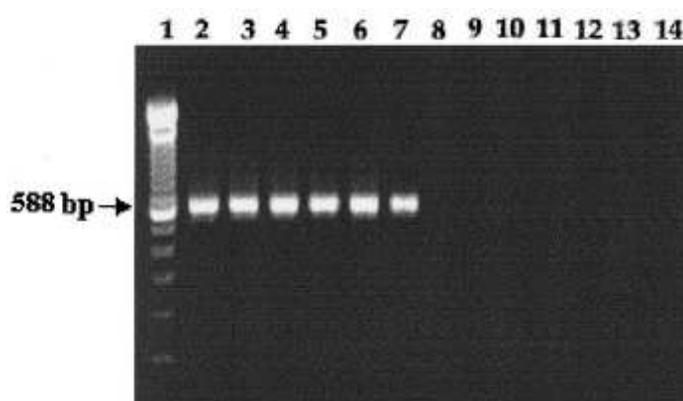


10.4 *Vibrio cholerae*: tipizzazione sierologica ed identificazione molecolare

Tutti i 14 ceppi batterici identificati biochimicamente come *Vibrio cholerae* sono stati ulteriormente studiati al fine di determinare con certezza l'appartenenza alla specie e la presenza dei geni codificanti i principali fattori di virulenza.

I suddetti ceppi sottoposti ad identificazione sierologica con i sieri mono specifici (anti-O1 e anti-O139) sono risultati essere dei *Vibrio cholerae* non agglutinanti (NAG) non-O1 e non O-139. Gli stessi ceppi sono stati sottoposti anche ad un'identificazione molecolare di specie mediante PCR; tutti i 14 campioni sono stati confermati come *Vibrio cholerae* mediante amplificazione del gene specie specifico ompW. (Fig.25).

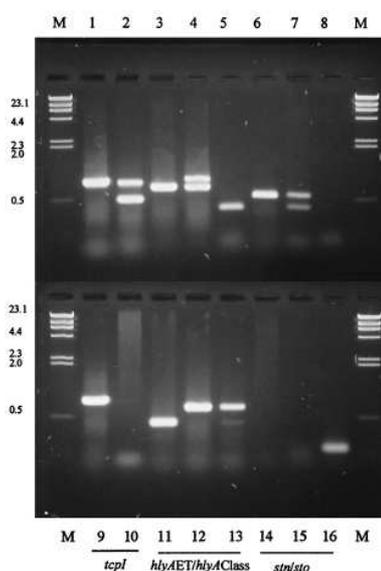
Fig.25 – Risultati PCR per la ricerca del gene ompW.



I microrganismi inoltre, sempre mediante PCR, non sono risultati produttori della tossina colerica CT.

Tutti i 14 vibroni identificati sierologicamente come Vibroni NAG (non colerici) non sono risultati produttori dell'enterotossina termostabile NAG-ST (Fig.26)

Fig.26 - Risultati PCR per la ricerca del gene stn/sto



Tab.29 – Tipizzazione sierologica e identificazione molecolare ceppi *Vibrio cholerae*

Ceppi identificati biochimicamente come <i>Vibrio cholerae</i>	Identificazione sierologica (sieri monospecifici)	PCR Identificazione di specie (ompW)	PCR Gene tossina colerica CT (ctxAB)	PCR Gene enterotossina termostabile(stn/sto)
Ceppo N°1	non-O1;non-O139	+	-	-
Ceppo N°2	non-O1;non-O139	+	-	-
Ceppo N°3	non-O1;non-O139	+	-	-
Ceppo N°4	non-O1;non-O139	+	-	-
Ceppo N°5	non-O1;non-O139	+	-	-
Ceppo N°6	non-O1;non-O139	+	-	-
Ceppo N°7	non-O1;non-O139	+	-	-
Ceppo N°8	non-O1;non-O139	+	-	-
Ceppo N°9	non-O1;non-O139	+	-	-
Ceppo N°10	non-O1;non-O139	+	-	-
Ceppo N°11	non-O1;non-O139	+	-	-
Ceppo N°12	non-O1;non-O139	+	-	-
Ceppo N°13	non-O1;non-O139	+	-	-
Ceppo N°14	non-O1;non-O139	+	-	-

10.5 Parametri chimici (pH, a_w , salinità) dei M.E.L

I valori medi di pH, a_w e salinità sono risultati essere per le diverse tipologie di M.E.L analizzate come descritto nella tabella seguente (Tab 30):

Tab.30 – Valori medi \pm ds dei parametri chimici dei M.E.L.

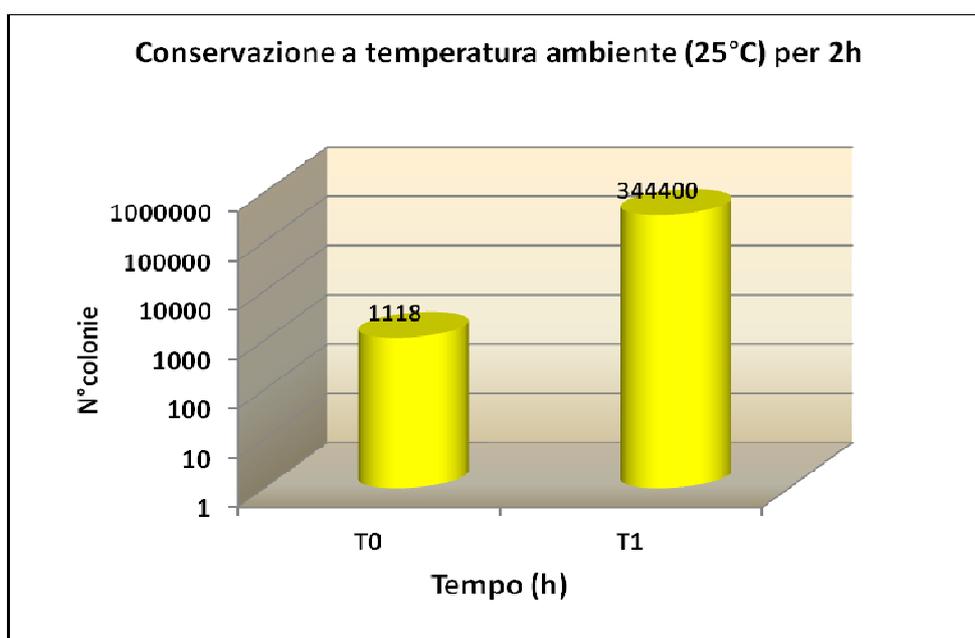
Parametri (valori medi \pm ds)	Ostriche	Vongole	Mitili
pH	6,40 \pm 0,07	6,76 \pm 0,01	6,46 \pm 0,02
a_w	0,994 \pm 0,02	0,963 \pm 0,02	0,959 \pm 0,003
Salinità%	10,30 \pm 0,1	9,64 \pm 0,2	10,7 \pm 0,1

10.6 Challenge test

Analizzando i dati relativi alle contaminazioni sperimentali tutti i 50 campioni contaminati hanno mostrato un aumento della carica, rispetto all'inoculo iniziale avente una concentrazione pari a 10^3 ufc/ml, pari ad un incremento di due unità logaritmiche decimali.

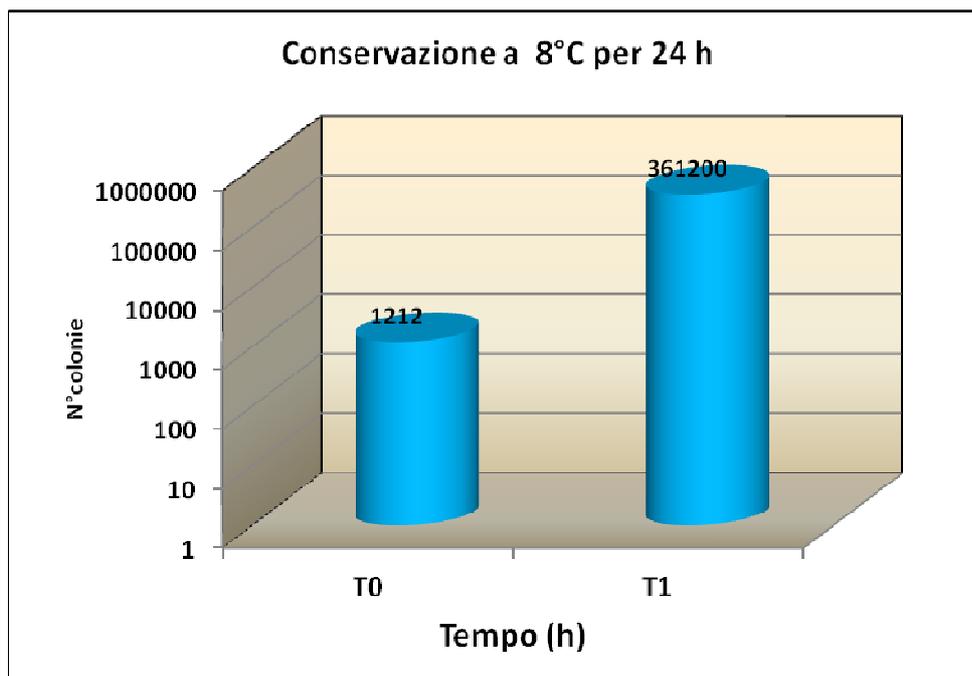
Dalla conta delle colonie eseguita sui campioni di Ostriche infettate con *Vibrio cholerae* non-O1 e non O-139 con concentrazione iniziale pari a 10^3 ufc/g è stato riscontrato un aumento medio del numero delle colonie stesse da 1118 ufc/g al T_0 a 344.400 ufc/g al $T_1=2h$ quando la temperatura di conservazione è stata mantenuta ad temperatura ambiente pari a 25°C (Grafico 23).

Grafico 23 – Evoluzione della carica di *Vibrio cholerae* non-O1 non O-139 in ostriche infette conservate a temperatura ambiente (25°C) per 2h



Nei campioni di ostriche contaminati con *Vibrio cholerae* non-O1 e non O-139 e conservati ad una temperatura pari a 8°C, il numero di colonie è variato da 1212 ufc/g al T₀ a 361200 ufc/g al T₁=24h partendo sempre da una concentrazione iniziale dell' inoculo pari a 10³ ufc/g (Grafico 24).

Grafico 24 – Evoluzione della concentrazione di *Vibrio cholerae* non-O1 non O-139 in ostriche infette conservate a temperatura di 8°C per 24h

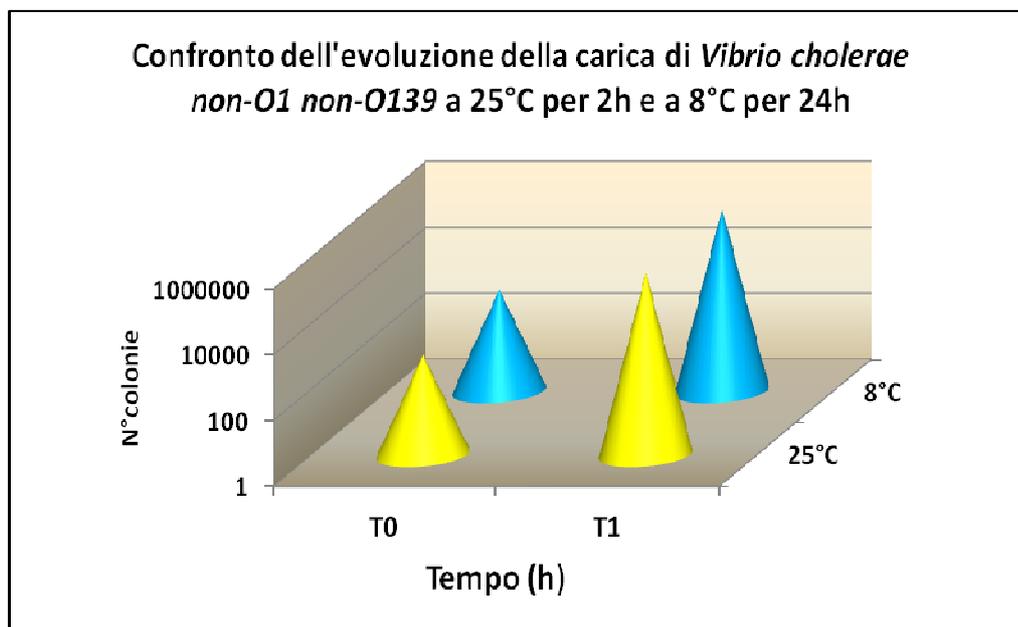


Tab.31 - Valori medi delle colonie contate di *Vibrio cholerae* non-O1 non O-139 (sviluppo a 25°C per 2h e a 8°C per 24h).

Concentrazione iniziale dell'inoculo	Tempeatura di conservazione	N° delle colonie al T ₀	N° delle colonie al T ₁
10 ³ ufc/g	25°C	1118	344400
10 ³ ufc/g	8°C	1212	361200

L'andamento dell'evoluzione della carica di *Vibrio cholerae* non-O1 non O-139 è risultato dunque sovrapponibile per le due diverse tipologie di conservazione considerate: a temperatura ambiente (25°C) per 2h e a T=8°C per 24h anche se per quest'ultima la durata del tempo di conservazione risultava essere più elevata (Grafico 25).

Grafico 25



Il dato si è dimostrato essere ripetibile poiché è stato ottenuto il medesimo risultato nella quasi totalità dei campioni analizzati.

Inoltre la variazione di carica riscontrata nei 50 campioni contaminati con *Vibrio cholerae* non-O1 non O-139 è risultata essere statisticamente significativa ($p < 0,05$) sia per i campioni conservati a temperatura ambiente (25°C) per 2h sia per i campioni conservati ad una temperatura di 8°C per 24h.

11. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il rischio di trasmissione di patogeni associato al consumo di M.E.L rappresenta attualmente una problematica sanitaria.

Dati epidemiologici riferiti agli Stati Uniti riportano che negli ultimi 25 anni la contaminazione delle acque da parte di microrganismi di derivazione fecale sono stati responsabili solo del 4% delle tossinfezioni dovute al consumo di molluschi bivalvi, mentre altri tipi di microrganismi naturalmente presenti nelle acque marine, tra cui *Vibrio* spp., sono risultati responsabili del 20% degli episodi morbosi (Suffredini E., Croci L., 2001). Le indagini microbiologiche effettuate nella fase preliminare della ricerca hanno confermato tale tendenza.

La normativa vigente (Regolamento CE 2073/05 aggiornato dal Reg CE 1441/2007) indica come criteri di sicurezza da considerare su questa tipologia di prodotti esclusivamente *Escherichia coli* e *Salmonella* spp microrganismi indicatori di contaminazione fecale.

Relativamente ai parametri di sicurezza, nello specifico *Escherichia coli*, solo il 20,7% dei campioni di M.E.L esaminati sono risultati contaminati da tale microrganismo; di essi solo il 6,4% ha mostrato valori di concentrazione superiore al limite massimo indicato in normativa pari a 230 MPN/100g di prodotto (polpa e liquido intravalvare). Un solo campione (di vongole) su 440 è risultato essere positivo per *Salmonella* spp

Per ciò che concerne i suddetti parametri, i campioni di M.E.L analizzati hanno dunque evidenziato una accettabile qualità igienica essendo risultati conformi per l'80% nei riguardi di *Escherichia coli* e per il 99,7% nei riguardi di *Salmonella* spp.

Per contro il 40% dei campioni di M.E.L analizzati è risultato essere contaminato da *Vibrio* spp. L'87 % degli isolamenti per *Vibrio* spp si è ottenuta da campioni con assenza o con concentrazioni minime di *Escherichia coli*.

L'assenza di correlazione tra la presenza di microrganismi di origine fecale (*Escherichia coli*) e vibrioni potenzialmente patogeni per l'uomo, evidenzia che *la sola determinazione dei parametri microbiologici richiesti dalla normativa sanitaria vigente non è in grado di fornire garanzie sulla sicurezza del prodotto.*

Inoltre dall'analisi dei risultati emerge che l'allevamento di "tipo A" (in cui i molluschi possono essere immessi direttamente sul mercato senza essere sottoposti a trattamenti di depurazione) ed i comuni trattamenti di depurazione sono sistemi non sempre validi per rendere i M.E.L privi dei rischi sanitari dovuti alla presenza dei vibrioni (Barile N.B. *et al.*, 2009), (Croci L. *et al.*, 2002), (Mazzette R. *et al.*, 2010). È noto infatti che alcune specie di *Vibrio* si concentrano nell'intestino di questi molluschi nei quali si possono moltiplicare e rendere quindi inefficaci i sistemi di depurazione (Hlady W.G, 1997), (Desmarchelier P.M, 2000). A questo si aggiunga che l'eventuale presenza nei M.E.L di forme vitali non coltivabili (VBNC) non evidenziabili con le comuni tecniche di laboratorio potrebbe portare ad una sottostima dei valori d'isolamento. Tale riscontro pone serie problematiche igienico-sanitarie, in quanto, in presenza di inadeguate misure di conservazione dei M.E.L nelle fasi successive alla depurazione, si potrebbe assistere ad un incremento del rischio associato alla presenza di vibrioni

potenzialmente patogeni che potrebbero raggiungere concentrazioni critiche per la salute del consumatore.

Relativamente all'isolamento di specie nel 26,3% dei campioni positivi per *Vibrio spp* sono state isolate due o più specie di vibrioni dal medesimo campione.

Vibrio alginolyticus è stata la specie più frequentemente isolata (68%) nei campioni di M.E.L analizzati. *Vibrio alginolyticus* è un vibrione alofilo raramente coinvolto in focolai tossinfettivi e in casi sporadici di diarrea.

Le specie di *Vibrio spp* isolate che rivestono un ruolo sanitario sono state *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Vibrio cholerae*.

Vibrio parahaemolyticus, è stato isolato nel 23% dei campioni ed in tutte le specie di M.E.L analizzate (mitili, vongole ed ostriche); ciò ha evidenziato un'ampia distribuzione del microrganismo nei M.E.L allevati in Sardegna ed il potenziale rischio sanitario associato soprattutto al consumo di prodotti ittici crudi contaminati.

Vibrio vulnificus è stato isolato solo nell'1% dei campioni di M.E.L e ciò ha confermato la bassa diffusione del microrganismo come contaminante alimentare.

Interrogativi di ordine sanitario emergono dalla presenza di *Vibrio cholerae* nel 6% dei campioni di M.E.L analizzati.

Gli isolati sono risultati essere, tramite identificazione sierologica, ceppi di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139 (NCVs) dunque non capaci di dare colera epidemico.

Per confermare l'effettiva presenza di *Vibrio cholerae*, sono state utilizzate tecniche molecolari, e l'analisi ha dimostrato come tutti i campioni esaminati appartengano alla specie *Vibrio cholerae*. Per quanto riguarda le sequenze relative alle tossine, i campioni positivi per *Vibrio cholerae* non presentavano sequenze codificanti né per la tossina colerica CT né per l'enterotossina termostabile NAG-ST. Tuttavia l'isolamento di *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 rappresenta un rischio sanitario ambientale sia per l'utilizzo delle acque sia per il consumo dei molluschi in esse allevati. Questo perché tali microrganismi sono dotati, all'interno del loro genoma, di un elemento genetico mobile che contiene la maggior parte dei geni per le funzioni cellulari essenziali e per la virulenza.

Tali microrganismi hanno dunque la capacità di acquisire materiale genetico esogeno a causa della possibile diffusione degli elementi genetici mobili tra le differenti specie di *Vibrio* ambientali (Rao M.B., Surendran P.K., 2010). Inoltre all'interno dell'elemento genetico mobile è stata individuata una vera e propria isola di patogenicità (VPI) nella quale i fattori di virulenza possono ricombinarsi (anche con il materiale genetico esogeno) per dare origine a varianti patogene del microrganismo.

Per studiare il comportamento (crescita/decremento) dei NCVs nei M.E.L è stato effettuato il challenge test attraverso inoculi sperimentali su campioni di ostriche (*Crassostrea gigas*).

Analizzando i risultati ottenuti nella contaminazione sperimentale si può evidenziare che i *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 sono dei microrganismi che crescono facilmente nelle ostriche. Lo studio, che è stato condotto a due diverse temperature per mettere in evidenza il comportamento di *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 a temperature di conservazione di abuso termico (T = 25°C e T = 8°C), ha evidenziato che il microrganismo è in grado di moltiplicarsi in entrambi i casi, più lentamente (24h) a temperatura di refrigerazione (8°C) e più velocemente (2h) a temperatura ambiente (25°C).

Il fatto di avere riscontrato un elevato aumento del numero di colonie sia nei campioni conservati a 25°C sia in quelli conservati a 8 °C porta ad una serie di considerazioni:

- Le ostriche rappresentano un substrato favorevole alla crescita di *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139

Quasi sempre l'uomo sano va incontro a malattia alimentare in seguito ad ingestione di un alimento con una dose infettante consistente (superiore a 10^3 - 10^4 ufc/g), di conseguenza, è necessario che il microrganismo trovi il substrato e le condizioni ideali per potersi moltiplicare. Le ostriche, per le peculiari caratteristiche chimico-fisiche, in particolar modo il valore medio di a_w pari a 0,994 ed il valore medio di pH a 6,37, rappresentano un alimento favorevole per lo sviluppo di *Vibrio cholerae* non-O1 e non-O139.

- la temperatura di refrigerazione di 8°C, per la conservazione delle ostriche, non è sufficiente ad arrestare lo sviluppo di *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139;

Da questo studio emerge l'importanza di un rigoroso rispetto della catena del freddo in fase di produzione, commercializzazione e conservazione dei M.E.L al fine di limitare la proliferazione dei patogeni eventualmente presenti così come l'opportunità che il prodotto venga consumato previa cottura. La stessa attenzione deve essere riservata anche a livello domestico da parte dei consumatori che dovrebbero avere cura di trasportare e conservare adeguatamente i M.E.L.

Lo studio condotto sui M.E.L attraverso la caratterizzazione microbiologica e molecolare e attraverso gli esperimenti di contaminazione con microrganismi target ha confermato che i rischi igienico-sanitari legati al loro consumo sono da imputare non solo ai microrganismi patogeni di derivazione fecale ma anche ai patogeni naturalmente presenti nell'ecosistema idrico come *Vibrio* spp.

Ciò potrebbe rappresentare un importante elemento di avanzamento delle conoscenze in materia di sicurezza dei M.E.L allevati, specie in relazione a quanto riportato nel Reg. CE 1441/2007 relativamente alla ricerca dei Vibrioni alofili per i quali, anche in accordo con il CSMVSP (Comitato Scientifico per le Misure Veterinarie in relazione con la Salute Pubblica; parere adottato nel 19-20 settembre 2001), sono necessari ulteriori ricerche al fine di introdurre opportuni criteri di sicurezza.

Al fine di garantire un più efficace controllo sanitario dei M.E.L sarebbe auspicabile:

- prevedere la ricerca di microrganismi indicatori della presenza di vibrioni potenzialmente patogeni per l'uomo ed effettuare la ricerca e la tipizzazione degli stessi.
- Condurre uno studio di tipo quantitativo delle concentrazioni con cui le specie patogene di *Vibrio* spp. sono presenti nei M.E.L al fine di elaborare una metodologia standard indispensabile per un'analisi dei rischi associati al consumo di questi prodotti.

12. BIBLIOGRAFIA

Arcangeli G., 2005. "Il problema dei virus enterici e dei *Vibrio*". Eurofishmarket 1,4-10.

Bagchi K., Echeverria P., Arthur JD., Sethabutr O., Serichantalergs O., Hoge CW., 1993. "Epidemic of diarrhea caused by *Vibrio cholerae* non-O1 that produced heat-stable toxin among Khmers in a camp in Thailand". Journal Clinical Microbiology 31, 1315–1317.

Barile N.B., Scopa M., Nerone E., Mascilongo G., Recchi S., Cappabianca S., Antonietti L., 2009 "Studio sull'efficacia di un sistema di depurazione a ciclo chiuso su molluschi bivalvi". Vet Ital, 45(4), 541-566.

Bik EM., Bunschoten AE., Gouw RD., Mooi FR., 1995. "Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strains: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. EMBO Journal 14, 209–216.

Blake, P.A., Weaver, R.W., Hollins, D.G., 1980. "Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios". Annual Review of Microbiology 34, 341–367.

Bryan F.L., 1980 "Epidemiology of foodborne diseases transmitted by fish, shellfish and marine crustaceans in United States, 1970 – 1978". Journal of Food Protection 43, 859-876.

Butt AA, Aldridge KE, Sanders C., 2004. "Infections related to the ingestion of seafood, Part I: viral and bacterial infections. Lancet 4, 201-212.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1981. "Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 gastroenteritis: Italy". Morbidity and Mortality Weekly Report, 30, 374–375.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1982. "Epidemiologic notes and reports non-O1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis—New Hampshire". Morbidity and Mortality Weekly Report, 31, 538–539.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1996. "*Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters Los Angeles 1996". Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 45,621-624.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1998. "Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters, Pacific Northwest, 1997". Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 47, 457–462.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1999. "Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters or clams harvested from Long Island Sound, Connecticut, New Jersey, and New York, 1998". Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 48,48–51.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2006. "*Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption of raw shellfish—three states, 2006". Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 55, (Dispatch), 1–2.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2008. "Summary of human *Vibrio* cases reported to CDC, 2008". http://www.cdc.gov/national-surveillance/PDFs/CDC5279_COVISvibriosis.pdf.

Chart H, Griffiths E., 1985. "The availability of iron and the growth of *Vibrio cholerae* in the sera of patients with haemochromatosis". Federation of European Microbiological societies (FEMS) Microbiol Lett;26:2227-31.

Corrain C., Arcangeli G., Fasolato L., Manfrin A., Rossetti E., Piazzini E., Mioni R., Pavoni E., Losio N., Sanavio G., Suffredini E., Croci L., 2007. "Influenze climatico-ambientali sulla presenza di virus enterici in molluschi bivalvi", Industrie Alimentari, 467, 277-283.

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,.

Croci L., Suffredini E., 2003. "Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici". Annali Istituto Superiore di Sanità;39 (1), 35-45.

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.

Crump, J.A., Bopp, C.A., Greene, K.D., Kubota, K.A., Middelndorf, R.L., Wells, J.G., Mintz, E.D., 2003. Toxigenic *Vibrio cholerae* serogroup O141-associated cholera-like diarrhea and blood-stream infection in the United States. Journal of Infectious Disease 187, 866-868.

Daniels N.A., MacKinnon L., Bishop R., Altekruze 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". Journal of Infectious Diseases, 181, 1661-1666,

Davies A.R., Capell C., Jehanno D., Nychas G.J.E., 2001. "Incidence of foodborne pathogens on European fish". Food Control 12, 67-71.

Decreto Legislativo 30 dicembre 1992, n. 530, "Attuazione della direttiva 91/492/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi. GU n.7 del 11-1-1993 - Suppl. Ordinario n. 5

De Felip G., 2001. "Recenti sviluppi di Igiene e microbiologia degli alimenti". Ed. Tecniche nuove.

DePaola, A., Kaysner, C.A., McPhearson, R.M., 1987. "Elevated temperature method for recovery of *Vibrio cholerae* from oysters (*Crassostrea gigas*). Applied and Environmental Microbiology 53, 1181-1182.

Desmarchelier P.M., 2000. "*Vibrio*". In Robinson R., Batt C., Patel P. "Encyclopedia of Food Microbiology". Academy Press, USA, 2237-2242.

Dessì M.A., 2009. "Le cozze di Olbia vanno verso la Igp", Il Pesce 1, 78-82.

Diamond J.M., 1977. "The epithelial junction: bridge, gate and fence". Physiologist 20, 10-18.

Di Pinto A., Terio V., Novello L., Tantillo G., 2011. "Comparison between Thiosulphate-Citrate-Bile Salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar Vibrio for isolating *Vibrio parahaemolyticus*". Food Control 22, 124-127.

Elliot L.E., Kaysner C.A., Tamplin M.L., 1992. "V. cholerae, V. parahaemolyticus, V. vulnificus and other *Vibrio* spp". Bacteriological Analytical Manual 7th ed., Food and Drug Administration, AOAC International, Arlington, 111-140.

Farina C., Gnechi F., Luzzi I., Vailati F., 2000. "*Vibrio cholerae* O2 as a cause of a skin lesion in a tourist returning from Tunisia" Journal of Travel Medicine 7,92–94.

Faruque S.M., Chowdhury N., Kamruzzaman M., Dziejman M., Rahman M.H., Sack D.A., Nair G.B., Mekalanos J.J., 2004. "Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area". Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America 101, 2123–2128.

Faruque S.M., Albert, M.J., Mekalanos, J.J., 1998. "Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*". Microbiology and Molecular Biology Reviews 62, 1301–1314.

Fasano A., Baudry B., Pumpin DW., Wasserman S S., Tall BD., Ketley JM., Kaper JB., 1991. "*Vibrio cholerae* produces a second entero-toxin, which affects intestinal tight junctions". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88, 5242–5246.

Fontana M., Bisotti S., Ariotti R., 2007. "Il Regolamento 2073 CE e la valutazione dei criteri di processo e di sicurezza alimentare attraverso il Challenge test". Il progresso Veterinario 8, 343-347.

Galli Volonterio A., 2005. "Microbiologia degli alimenti" CEA editore.

Guglielmetti, P., Bravo, L., Zanchi, A., Montè, R., Lombardi, G., Rossolini, G.M., 1994. "Detection of the *Vibrio cholerae* heat-stable enterotoxin gene by polymerase chain reaction". Molecular and Cellular Probes 8, 39–44.

Hara-Kudo Y., Nishina T., Nakagawa H., Konuma H., Hasegawa J., Kumagai A.S., 2001. "Improved Method for Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood". Applied and Environmental Microbiology 67, 5819–5823.

Hlady W.G., 1997. "*Vibrio* infections associates with raw oysters consumption in Florida, 1981-1994". Journal of Food Protection 60, 353-357.

Honda T, Finkelstein RA., 1979. "Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: another toxic substance produced by cholera vibrios". Infection and Immunity 26, 1020-1027.

ISO/TS 16649-3:2005. "Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* -- Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide".

ISO/TS 21872-1:2007. "Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. - Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*."

Istituto Ricerche Economiche per la Pesca e l'Acquacoltura (IREPA) 2007 – Analisi del settore., 2007 – www.irepa.org (2007)

Jaksic S., Uhitil S., Petrak T., Bazluic D., Karolyi L.G., 2002. "Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps, and bivalve mollusks harvested from Adriatic sea". Food Control 13, 491-493.

Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A., 2009. "Microbiologia degli alimenti". Ed. Springer-Verlag Italia.

Johnson JM, McFarland LM., 1985. "Vibrio vulnificus: man and the sea". The Journal of the American Medical Association 253, 2580-2583.

Karaolis, D.K.R., Somara, S., Maneval, D.R., Johnson, J.A., Kaper, J.B., 1999. "A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria". Nature 399 375–379.

Keusch G.T., Deresiewicz R.L., Waldor M.K., 2002. "Colera e altre malattie da Vibrioni". Harrison Principi di medicina interna, ed. McGraw-Hill Vol. 1; parte 7, sez.6, cap.159, 1150-1157.

Koh EGL, Huyn JH, LaRock PA., 1994. "Pertinence of indicator organisms and sampling variables to *Vibrio* concentrations". Applied and Environmental Microbiology 60, 3897-3900.

Kong R.Y.C., Lee S.K.Y., Law T.W.F., Law S.H.W., Wu R.S.S., 2002. "Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR". Water Research 36, 2802-2812.

Levine MM., Kaper JB., Herrington D., Losonsky G., Morris JG., Clements ML., Black RE., Tall B., Hall R., 1988. "Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques". Infection and Immunity 56, 161-167.

Lipp E.K., Rose J.B., 1997. "The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America". Revue Scientifique et Technique 16, 620-640.

Liu X., Chen Y., Wang X., Ji R., 2004. "Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001—National foodborne disease surveillance system". Journal of Hygiene Research, 33, 725–727.

Lukinmaa, S., Mattila, K., Lehtinen, V., Hakkinen, M., Koskela, M., Siitonen, A., 2006. "Territorial waters of the Baltic Sea as a source of infections caused by *Vibrio cholerae* non-O1,

non-O139: report of 3 hospitalized cases". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 54, 1–6.

Man J.C., 1983. "MPN tables, corrected". *European Journal of applied Microbiology and Biotechnology* 17:5, 301-305.

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". *Emerging Infectious Disease* 11, 1319–1320.

Mazzette R., Virgilio S., Piras A., Tempesta A., Serra S., Sferlazzo G., Pisanu M., Mureddu A., Meloni D., 2010. "Valutazione dell'efficacia dei sistemi di depurazione nei confronti di *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp. in mitili allevati nel golfo di Olbia". *Il Pesce* 5, 165-167.

McLandsborough L., 2004. "Food Microbiology Laboratory - Enrichment MPN of *Vibrio parahaemolyticus* from shrimp". *Lab* 8, 67-75, ed. CRC press.

McLaughlin J.B., DePaola A., Bopp C.A., Martinek K.A., Napol N.P., 2005. "Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters". *The New England Journal of Medicine* 353, 1463–1470.

Ministero della Salute- banca dati: <http://www.salute.gov.it/ricoveriOspedalieri>

Mioni R., Comin D., Fornasiero E., Carrara G., Boffo L., Fuselli P., Bordin P., Grimaldi M., 2008. "Molluschi bivalvi vivi. Prevalenza di *Vibrio* spp. nei molluschi bivalvi allevati nella Regione Veneto". IV Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria Epidemiologia Strumenti per conoscere, agire e decidere in Sanità Pubblica Veterinaria. Università degli Studi "La Sapienza" di Roma l'11 e 12 dicembre 2008.

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". *Medicina Clínica (Barc)* 92, 1–4.

Morris JG Jr, Takeda T, Tall BD, Losonsky GA, Bhattacharya SK, Forrest BD, Kay BA, Nishibuchi M., 1990. "Experimental non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in humans". *The Journal of Clinical Investigation* 85, 697-705.

Morris JG Jr., 2003. "Cholera and other types of Vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell". *Clinical Infectious Diseases* 37, 272–280.

Morris JG Jr., Wilson R., Davis BR., Wachsmuth IK., Riddle CF., Wathen HG., Pollard RA., Blake PA., 1981. "Non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in the United States: clinical, epidemiologic, and laboratory characteristics of sporadic cases". *Annals of Internal Medicine* 94 (5), 656-658.

Morris JG Jr., Takeda T., Tall BD., Losonsky GA., Bhattacharya SK., Forrest BD., Kay BA., Nishibuchi M., 1990. "Experimental non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in humans. The Journal of Clinical Investigation 85, 697–705.

Namdari, H., Klaips, CR., Hughes, JL., 2000. "A cytotoxin-producing strain of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 as a cause of cholera and bacteremia after consumption of raw clams". Journal of Clinical Microbiology 38, 3518–3519.

Nakashima Y., Oho M., Kusaba K., Nagasawa Z., Komatsu O., Manome I., Araki K., Oishi H., Nakashima M., 2007. "A chromogenic substrate culture plate for early identification of *Vibrio vulnificus* and isolation of other marine Vibrios". Annals of Clinical & Laboratory 37:4, 330-334.

NCBI Taxonomy browser; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>

Nandi B., Nandy R K., Mukhopadhyay S., Nair G. B., Shimada T., Ghose AC., 2000. "Rapid Method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein ompW". Journal Of Clinical Microbiology 38 (11), 4145–4151.

Nicolosi V.M., Nicoletti G., 1998. "Dizionario di batteriologia umana normale e patologica" Ed. Momento Medico, 401-408.

Normanno G., Parisi A., Addante N., Quaglia N.C., Dambrosio A., Montagna C., Chiocco D., 2006. "*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy)". International Journal of Food Microbiology, 106, (2), 219-222.

Ogawa, A., Kato, J., Watanabe, H., Nair, B.G., Takeda, T., 1990. "Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable enterotoxin gene from *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from a patient with traveller's diarrhea". Infection and Immunity 58, 3325–3329.

Oliver JD., 1989. "*V. vulnificus*, "Foodborne Bacterial Pathogenes", ed. M.P. Doyle, Marcel Dekker Inc., New York pp. 569-600.

Oliver JD., Kaper JB., 1997. "*Vibrio* species". In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (Ed.). Food Microbiology. Fundamentals and frontiers. Washington (DC): ASM Press;. pp. 228-64.

Ottaviani D., Leoni F., Rocchegiani E., Santarelli S., Masini L., Di Trani V., Canonico C., Pianetti A., Tega L., Carraturo A., 2009. "Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy". International Journal of Food Microbiology 132, 47–53.

Pantano S, and Montecucco C., 2006. "A molecular model of the *Vibrio cholerae* cytolysin transmembrane pore". Toxicon 47, 35-40.

Parisi A.,2004. "Qualità igienica e presenza di vibroni in ostriche, vongole e modiole", Industrie Alimentari 43 (432), 28-32.

Prioli G.,2008. "La molluschicoltura in Italia". In Lovatelli A., Farias A., Uriarte I. "Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyeccion futura: factores que afectan su sustentabilidad en America Latina", taller tecnico regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. 12. Roma,FAO. pp. 159-176.

Piergentili, P., Castellani-Pastoris M., Fellini R.D., Frisano G., Bonello C., Rigoli E.,Zampieri A., 1984. "Trasmission of non O group 1 *Vibrio cholerae* by raw oysters consumption". International Journal of Epidemiology 13, 340–343.

Piersimoni, C., Morbiducci, V., Scalise, G.,1991. "Non-O1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis and bacteraemia". Lancet 337, 791–792.

Poda G.,1997. "*Vibrio*". In "Metodi microbiologici per lo studio delle matrici alimentari". Regione Emilia-Romagna CDS Aziende USL Città di Bologna e Ravenna ARPA Dossier 30, 97-116.

Rao MB., Surendran PK.,2010. "Genetic heterogeneity of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from shrimp aquaculture system: a comparison of RS-, REP- and ERIC-PCR fingerprinting approaches". Letters in Applied Microbiology 51, 65–74.

Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29-04-2004 (GU-CE 30-04-2004) che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.

Regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29-04-2004 (GU-CE 30-04-2004) che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.

Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15-11-2005 (GUCE 22-12-2005) sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.

Reg. (CE) N. 1441/2007 DELLA COMMISSIONE del 5 dicembre 2007 che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

Restrepo, D., Huprikar SS., VanHorn K., Bottone EJ., 2006." O1 and non-O1 *Vibrio cholerae* bacteremia produced by haemolytic strains". Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 54, 145–148.

Rhodes JB., Smith HL Jr, Ogg JE.,1986. "Isolation of Non-O1 *Vibrio cholerae* serovars from surface Waters in Western Colorado". Applied and Environmental Microbiology 51, 1216-1219.

Richards GP., 1988. "Microbial purification of shellfish". Journal of Food Protection 51, 218-251.

Rivera I.N.G., Chun J., Huq A., Brad Sack R., Colwell R.R.,2001. "Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*" Applied and environmental Microbiology 67 (6), 2421–2429.

Ripabelli G., Grasso G.M., Sammarco M.L., Luzzi I.,1997. "Procedure di isolamento e caratterizzazione di *Vibrio* spp. di importanza clinica". Istituto Superiore di Sanità; Rapporti ISTISAN 97/31 , pp. 55.

Ripabelli G., Sammarco M.L., Grasso G.M., Fanelli I., Caprioli A., Luzzi, I.,1999. "Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy". International Journal of Food Microbiology 49, 43–48.

Roberts, D., Gilbert, R.J., 1979. "Survival and growth of non-cholerae vibrios in various foods". Journal of Hygiene 82, 123–131.

http://www.seafoodplus.org/SEAFOODplus_org.1+M56da29d640e.0.html?&backPid=6&begin_at=0&encryptionKey=SEAFOODplus

Serracca L., Gallo F., Magone L., Preparo M., Ercolini C., Orlandi M.,2007. "Caratterizzazione biochimica e tossicologica di *Vibrio* patogeni in prodotti ittici". Industrie Alimentari 472 (46), 881-886.

Serratore P., Rosmini R., Bignami G.,2007. "Miglioramento della qualità e della shelf-life di molluschi bivalvi vivi. Messa a punto di sistemi innovativi di vendita al dettaglio". Atti XVII Convegno Nazionale AIVI, pp. 411-415.

Suffredini E., Croci L., 2001 .“Vibrioni patogeni veicolati da alimenti”. In “Recenti sviluppi di Igiene e microbiologia degli alimenti” cap.24; pp.663-689, Ed. Tecniche nuove.

Tamplin M., Rodrick G.E., Blake N.J., Cuba T.,1982. "Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries". Applied and Environmental Microbiology 44, 1466-1470.

Tiecco G., 2001. "Igiene e Tecnologia alimentare". Calderini ed agricole edition.

Trucksis M., Galen JE., Michalski J., Fasano A., Kaper JB., 1993. "Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 5267–5271.

Twedt R.M.,1989. "*Vibrio parahaemolyticus*, "Foodborne Bacterial Pathogenes", ed. M.P. Doyk Marcel Dekker Ine., New York, pp. 543-568.

Uh Y., Park J.S., Hwang G.Y., Jang I.H., Yoon K.J., Park H.C., Hwang S.O., 2001. "*Vibrio alginolyticus* acute gastroenteritis: report of two cases". Clinical Microbiology and infection, 7 (2), 104-106.

UNI EN ISO/IEC 17025:2005, “ Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura”.

UNI EN ISO 6887-1:2000 *Microbiologia di alimenti e mangimi per animali -Preparazione dei campioni di prova, sospensione iniziale e diluizioni decimali per l'analisi microbiologica - Regole generali per la preparazione della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali”*

UNI EN ISO 6579:2004. “*Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Metodo orizzontale per la ricerca di Salmonella spp*”.

UNI EN ISO 4833:2004. *Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Metodo orizzontale per la conta di microrganismi - Tecnica della conta delle colonie a 30 °C*

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.

Winn W.jr , Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G., 2009. “Koneman’s - Testo atlante di microbiologia diagnostica” 6a edizione . Delfino Editore.

West PA., 1989. “The human pathogenic *Vibrios*. A public health update with environmental perspectives”. *Epidemiology and Infection* 103, 1-34.

www.epicentro.iss.it/problemi/colera/epid.asp

www.ispesl.it/profilo_di_rischio/Acquacoltura/Mitilicoltura/testo.pdf. 2002

World Health Organization, 2011. “Cholera, 2009”. *Weekly epidemiological record* 31 (86), 325-340.

www.sardegnaagricoltura.it/assistentatecnica/laore, 2009. “Il comparto dell’acquacoltura in Sardegna alla luce dei risultati dell’indagine conoscitiva”.

www.ismea.it - Analisi del settore., 2007.

Yamamoto K., Al-Omani M., Honda T., Takeda Y., Miwatani T.,1984. “Non-O1 *Vibrio cholerae* hemolysin: purification, partial characterization, and immunological relatedness to El Tor hemolysin”. *Infection and Immunity* 45, 192-196.