

I due lavori premiati dalla SIMeVeP

Come nelle precedenti edizioni del PROFEA (Programma di Formazione in Epidemiologia Applicata), anche quest'anno la Società Italiana di Medicina Veterinaria Preventiva ha premiato, tra quelli presentati al IV Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria *Epidemiologia Strumenti per conoscere, agire e decidere in Sanità Pubblica Veterinaria* che si è tenuto all'Università degli Studi "La Sapienza" di Roma l'11 e 12 dicembre 2008, i due lavori ritenuti più significativi per originalità, metodologia e possibile ricaduta pratica nelle attività di Sanità Pubblica Veterinaria.

Il primo dei lavori premiati è stato presentato dal

Centro Studi per la Ricerca Epidemiologia e Biostatistica in Sicurezza Alimentare (Ce.R.S.Al.) di Orvieto e della ASL 4 di Terni su *"Un modello per la validazione del processo di filatura nella produzione di mozzarella di bufala da latte crudo per il rischio microbiologico"*. Il secondo, *ex aequo*, è stato quello presentato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie in collaborazione con i Servizi Veterinari delle Aziende ULSS 12, 14 e 19 della Regione Veneto sulla *"Prevalenza di Vibrio spp. in molluschi bivalvi allevati nella Regione Veneto"*. Si ringraziano gli Autori per il contributo fornitoci attraverso le pagine di Argomenti che, ben volentieri, ospita i loro lavori.

EPIVET 2008

MOLLUSCHI BIVALVI VIVI

Prevalenza di *Vibrio* spp. nei molluschi bivalvi allevati nella Regione Veneto

Renzo Mioni¹, Damiano Comin¹, Elena Fornasiero¹, Giuseppe Carrara²
Luciano Boffo³, Piergiorgio Fuselli⁴, Paola Bordin¹, Maria Grimaldi¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

² Azienda ULSS 12 - Veneziana

³ Azienda ULSS 14 - Chioggia

⁴ Azienda ULSS 19 - Adria

I microrganismi del genere *Vibrio* sono molto diffusi nelle acque costiere di tutto il mondo e possono contaminare la maggior parte delle specie ittiche costiere: pesci, molluschi eduli come i cefalopodi e i bivalvi e anche i crostacei. Attualmente sono conosciute circa 40 specie appartenenti alle vibriomacee di cui circa la metà è stata collegata in modo più o meno definitivo con malattia di tipo gastroenterico nell'uomo o negli animali acquatici [1]. In particolare, rappresentano un serio pericolo per la salute pubblica le infezioni sostenute da *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnifi-*

cus perché responsabili di episodi tossinfettivi, dovuti principalmente al consumo di molluschi e prodotti ittici crudi, acqua e altri alimenti [1].

I vibriomacee patogeni costituiscono una problematica sanitaria emergente anche nella Regione Veneto, dove la molluschicoltura rappresenta un settore di notevole rilevanza economica e sociale, che negli ultimi anni ha registrato una crescita costante. Il Veneto rappresenta infatti il principale produttore nazionale di vongole filippine, e una delle principali regioni produttrici di mitili. Gli impianti di molluschicoltura (foto 1) sono concentra-

ti prevalentemente nella Laguna di Venezia e in Polesine (RO), le cui acque presentano caratteristiche di temperatura e salinità idonee per la sopravvivenza e lo sviluppo dei vibriomacee, che possono pertanto bioaccumularsi nei molluschi eduli lamellibranchi.

Vibrio cholerae

Vibrio cholerae sierogruppo O1 include i ceppi responsabili del colera epidemico e comprende il biotipo Classico, responsabile di sei pandemie verificatesi tra il 1817 e il 1923 e il biotipo El Tor, responsabile della settima pandemia che iniziò nel 1961. Tra i ceppi di *Vibrio*

cholerae non-O1 è stato segnalato il sierogruppo emergente O139 (*Vibrio cholerae* Bengala) isolato in India nel 1992.

I fattori di virulenza principali di tali ceppi sono: l'enterotossina colerica (CT) e il pilo coregolato con la tossina (TCP), che media la colonizzazione dell'intestino tenue [1].

Vibrio parahaemolyticus

Il *Vibrio parahaemolyticus* fa parte della flora batterica autoctona nell'ambiente marino costiero nelle regioni tropicali e temperate di tutto il mondo. La sua distribuzione e concentrazione in un certo luogo è influenzata da fattori ambientali (salinità e temperatura dell'acqua) e dalla sua interazione con forme di vita superiori dell'ambiente marino. Nelle regioni temperate l'andamento stagionale registra una proliferazione di tali batteri nei mesi estivi più caldi, mentre tali germi non sono rintracciabili durante i mesi invernali, quando la temperatura delle acque è inferiore a 20°C. Vista la scarsa correlazione di questi microrganismi con l'inquinamento fecale, la contaminazione dei prodotti della pesca freschi, es. crostacei, molluschi e pesce, è strettamente legata alla presenza naturale dei vibrioni nell'ambiente da cui i prodotti sono stati raccolti. Le concentrazioni di *Vibrio parahaemolyticus* nei prodotti della pesca sono generalmente inferiori a 10³ ufc/g, ma possono essere più alte quando la raccolta avviene da acque molto calde. Tale eventualità, unita con i rapidi tempi di replicazione di questo microrganismo (8-9 minuti), risulta essere particolarmente pericolosa poiché permetterebbe di raggiungere rapidamente concentrazioni in grado di indurre malattia negli adulti sani, nei quali la dose infettante è superiore alle 10⁵ unità [1].

Studi di caratterizzazione sierologica e biomolecolare dei ceppi di *Vibrio parahaemolyticus* isolati dai casi di tossinfezione, iniziati negli anni '90 hanno permesso di individuare alcuni caratteri che accomunano i ceppi patogeni. È stato

ricontrato che i ceppi implicati nelle tossinfezioni producono due tipi di tossine, l'emolisina termostabile diretta (ceppi Kanagawa +) e quella ad essa correlata (ceppi Kanagawa -) codificate dai geni *tdh* e *trh* [2]. Inoltre, a partire dal 1996 è stato isolato un nuovo clone di *Vibrio parahaemolyticus* sierotipo O3:K6 con potenziali caratteristiche pandemiche la cui incidenza è aumentata in questi anni in Asia,

Africa e America. A partire dal 2005 questo sierotipo è stato isolato anche in Europa con segnalazioni della sua presenza in Francia, Russia, Spagna e ora anche Italia [3].

Vibrio vulnificus

Il *Vibrio vulnificus* è comunemente isolato dai molluschi; i sporadici casi di infezione sono associati prevalentemente al consumo di ostrici



Foto 1. Impianto di molluschicoltura.

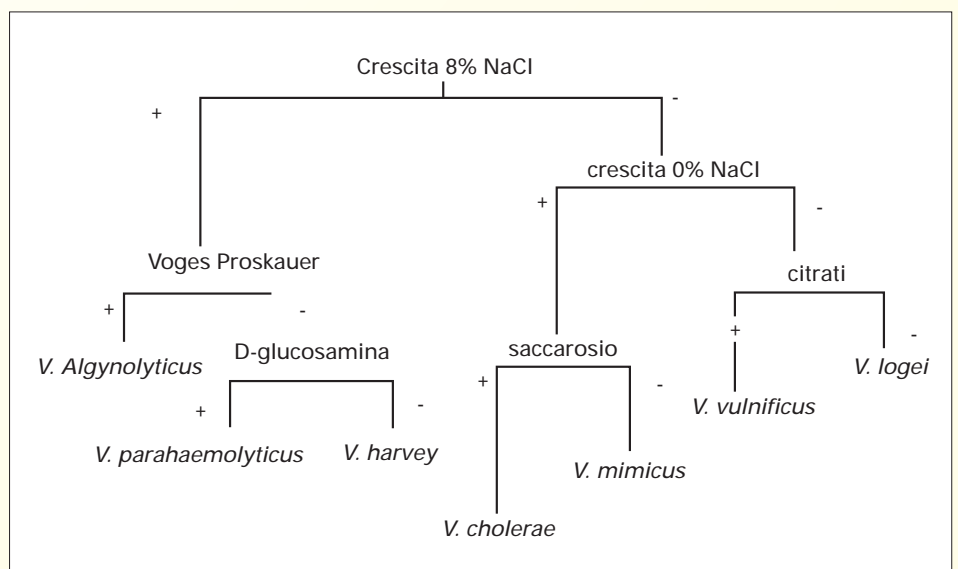


Figura 1. Chiave dicotomica per l'identificazione di *Vibrio* spp. proposta da Alsina et al.

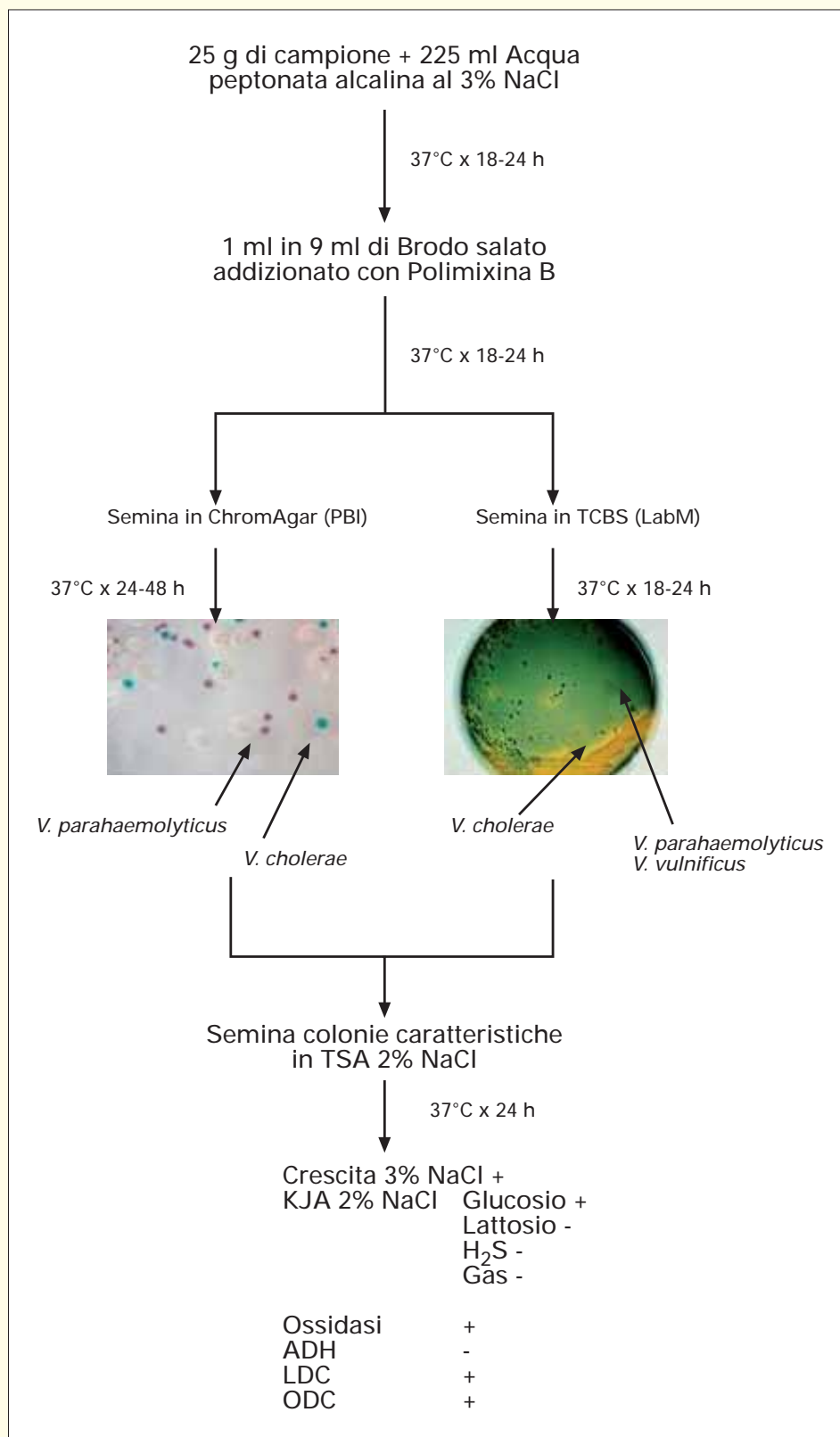


Figura 2. Metodica di isolamento e identificazione delle colonie di *Vibrio* spp..

Tabella 1. Risultati della ricerca di *Vibrio* spp. nei molluschi bivalvi nel Veneto.

Totale campioni esaminati	Totale campioni positivi per <i>Vibrio</i> spp.	Totale campioni con più specie di <i>Vibrio</i>	Totale ceppi di <i>Vibrio</i> isolati nei molluschi
164	122 (74.4%)	44	176

che. La bassa dose infettante (10^3 unità) lo rende particolarmente pericoloso per i consumatori con deficit immunitari [1].

Materiali e Metodi

Nel periodo febbraio-dicembre 2007 il Laboratorio di Microbiologia Alimentare dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ha svolto, in collaborazione con le Aziende ULSS 12 - Veneziana, 14 - Chioggia e 19 - Adria, un piano di monitoraggio al fine di stimare la prevalenza di *Vibrio* spp. nei molluschi bivalvi allevati nella Regione Veneto e ricavare informazioni utili per una valutazione del rischio associato al loro consumo.

Sono stati esaminati 164 campioni di molluschi (*Ruditapes philippinarum*, *Ruditapes decussatus*, *Mytilus galloprovincialis*, *Chamelea gallina*, *Cerastoderma* spp.) prelevati in diversi allevamenti dai veterinari ufficiali.

Per l'isolamento dei vibrioni è stato utilizzato un metodo interno che prevedeva l'omogeneizzazione di 25 g di campione con 225 ml di Acqua Peptonata Alcalina con il 3% di NaCl seguita dall'incubazione in termostato a 37°C per 18-24 ore; successivamente 1 ml dell'arricchimento veniva trasferito in 9 ml di Brodo salato addizionato con Polimixina B che veniva incubato a 37°C per 18-24 ore. Un'ansata della brodocoltura veniva distribuita in una piastra di ChromAgar e in una piastra di TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar*) che venivano incubate rispettivamente a 37°C per 24-48 ore e a 37°C per 18-24 ore. Per l'identificazione di specie sono state sottoposte a conferma biochimica tutte le colonie sospette per essere *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus*. L'identificazione della specie di *Vibrio* è stata eseguita secondo le chiavi dicotomiche proposte da *Alsina M. et al.* [4] attraverso una serie di prove biochimiche (figura 1). Le prove biochimiche di conferma comprendevano la crescita in Acqua Peptonata Alcalina con il 3% di NaCl

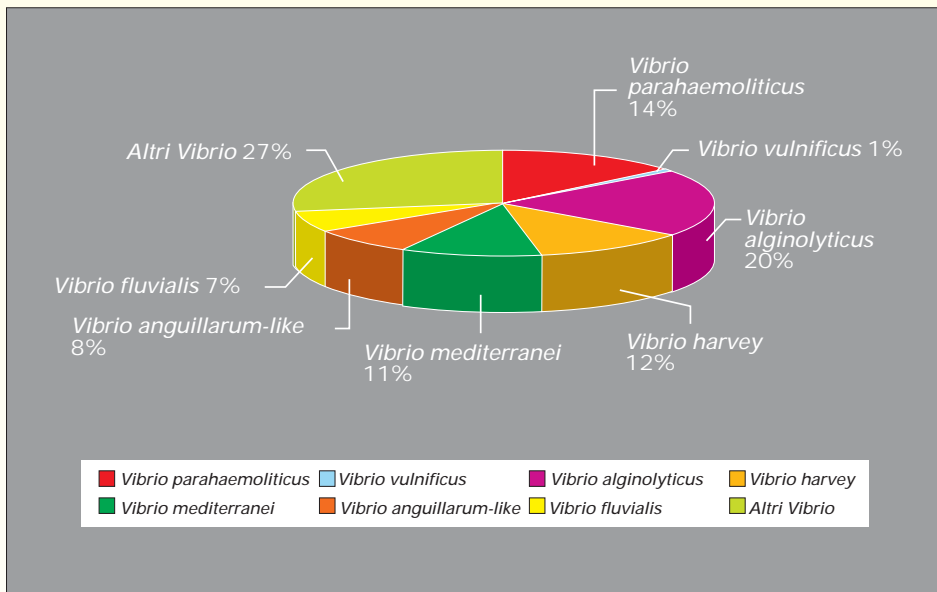


Figura 3. Risultati delle identificazioni dei Vibrio isolati da molluschi bivalvi vivi.

che doveva risultare positiva, la combinazione delle fermentazioni in Kligler Iron Agar con il 2% di NaCl (glucosio positivo, lattosio negativo, nessuna produzione di idrogeno solforato e di gas) e il test dell'ossidasi che doveva essere positivo. A questo punto venivano valutate l'utilizzazione di arginina, lisina e ornitina che dovevano risultare rispettivamente negativa, positiva e positiva. Tutte le fasi descritte sono schematizzate in figura 2.

I ceppi identificati come *Vibrio parahaemolyticus* sono stati ulteriormente studiati al fine di determinare la presenza dei geni codificanti per i principali fattori di virulenza del patogeno, quali l'emolisina termostabile (*tdh*) e il gene correlato alla tossina termostabile (*trh*) mediante multiplex PCR (5,6,7) al fine di individuare i ceppi patogeni.

Risultati

Dei 164 campioni di molluschi esaminati, 122 (74,4%) sono risultati positivi e in 44 casi (26,8% dei campioni) sono state isolate due o più specie di vibriani da un medesimo campione (tabella 1). In totale sono stati isolati 176 ceppi di cui sono risultati positivi per *Vibrio parahaemolyticus* il 14% dei campioni, per *Vibrio vulnificus* l'1%, per *Vibrio alginolyticus* il 20%, per *Vibrio harvey* il 12%, per *Vibrio*

mediterranei l'11%, per *Vibrio anguillarum-like* l'8%, per *Vibrio fluvialis* il 7% e per vibrio minori il 27% (figura 3). Solo 3 dei 23 ceppi di *Vibrio parahaemolyticus* isolati sono risultati portatori dei fattori di virulenza *tdh* e *trh*.

Conclusioni

Il molluschi bivalvi eduli sono implicati da sempre nella trasmissione di malattie gastroenteriche di diversa gravità come febbri tifoidi e colera. Nel corso del tempo, i miglioramenti delle tecniche per il trattamento delle acque di scarico e la classificazione delle aree di allevamento e raccolta molluschi hanno determinato un abbassamento della prevalenza di tali patologie nei Paesi industrializzati; ciò nonostante il rischio di trasmissione di patogeni associato al consumo di molluschi bivalvi filtratori rappresenta una problematica sanitaria ancora molto attuale. In attesa di ulteriori approfondimenti sul significato sanitario della presenza di vibriani e virus enterici nei molluschi bivalvi, il Reg. (CE) 2073/05 indica come criteri di sicurezza da considerare su questa tipologia di prodotti esclusivamente *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

Dati epidemiologici riferiti agli Stati Uniti riportano che negli ultimi 25 anni i batteri patogeni associabili a

contaminazione delle acque di tipo fecale sono stati responsabili solo del 4% delle tossinfezioni dovute al consumo di molluschi bivalvi, mentre altri tipi di batteri naturalmente presenti nelle acque marine, tra cui *Vibrio* spp., sono risultati responsabili del 20% degli episodi morbosi e del 99% di quelli letali [8]. Una serie di studi condotti a partire dagli anni '90 su molluschi bivalvi vivi allevati nel Mare Adriatico hanno dimostrato contaminazioni da *Vibrio* spp. con prevalenze anche del 46,86%, con picchi nel periodo estivo [1].

I risultati ottenuti dalla presente indagine confermano questa tendenza, con un riscontro di prevalenze di *Vibrio* spp. fino al 74,4%. Se da un lato appare confortante l'assenza di *Vibrio cholerae* tra i ceppi isolati, la presenza di un 14% di *Vibrio parahaemolyticus* deve tuttavia indurre una certa cautela, anche se solo tre dei ceppi isolati sono risultati portatori dei geni per la emolisina termostabile (*tdh*) e per quella correlata alla tossina termostabile (*trh*). Di rilievo anche la percentuale di *Vibrio alginolyticus* (20%), segnalato finora come responsabile di infezioni cutanee [1].

Da questi dati emerge l'importanza di una stretta osservanza delle buone pratiche di igiene e di un rigido rispetto della catena del freddo in fase di produzione e di commercializzazione del prodotto, al fine di limitare la proliferazione dei patogeni eventualmente presenti, così come l'opportunità che il prodotto sia consumato esclusivamente previa cottura.

È inoltre auspicabile un ulteriore approfondimento di questa indagine, finalizzato a una determinazione di tipo quantitativo delle cariche con cui le specie patogene di *Vibrio* spp. sono presenti nei molluschi bivalvi, al fine di ottenere ulteriori dati indispensabili per un'analisi dei rischi associati al consumo di questi prodotti.

La bibliografia è disponibile presso la redazione: argomenti@sivemp.it