

PREVALENZA E IDENTIFICAZIONE DI VIBRIO SPP. IN ORATE DI ALLEVAMENTO

PREVALENCE AND IDENTIFICATION OF VIBRIO SPP. ISOLATED ON AQUACULTURED GILTHEAD SEA BREAM

Scarano C.¹, Dalmasso A.², Spanu C.¹, Spanu V.¹, Cossu F.¹, Mura E.¹, Penna C.¹, Viridis S.¹, De Santis EPL¹

¹Dipartimento di Biologia Animale – Sassari

²Dipartimento di Patologia Animale - Torino

SUMMARY

The aim of the study was to investigate the prevalence of *Vibrio* spp isolated from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) farmed on sea cages and to identify and characterize the pathogen by molecular techniques. Eighty fish were collected from two hatcheries located on the North-Est Sardinian Mediterranean coast, and microbiological analysis were performed on different body parts such as skin, gills, muscle and intestinal tract. Subsequently 100 pure colonies with typical morphology and phenotypic characteristics were selected and submitted to the molecular identification. The analysis on the prevalence of *Vibrio* spp showed the effect of the hatchery rearing system ($P<0.001$), of the date of sampling ($P<0.001$), and of the body part ($P<0.001$). All the strains selected were confirmed to be members of the genus *Vibrio* spp by the molecular method/technique/identification, whereas the *rpoA* gene sequence analyses allowed to identify 89 strains belonging to the species *Vibrio harveyi*, 6 to *V. diabolicus*, 2 to *V. parahaemolyticus* and 1 to *V. mediterranei*.

KEYWORDS

Vibrio spp, *Sparus aurata*, sequenziamento.

INTRODUZIONE

I batteri del genere *Vibrio* sono diffusi nell'ambiente marino (1), nelle acque salmastre costiere e nei sedimenti (2). Le caratteristiche dell'ambiente e delle tecniche di allevamento, i processi di lavorazione e le modalità di conservazione, influenzano le specie microbiche presenti ed il livello di contaminazione dei prodotti ittici (3;4). Nelle specie ittiche allevate, la Carica Batterica Totale (CBT) è compresa tra 10^2 ufc e 10^6 ufc sulla cute (valore per cm^2) e sulle branchie (per grammo). Nell'intestino, la CBT può arrivare a valori di 10^8 ufc/g (5). Le specie batteriche prevalenti sono rappresentate dagli psicrotrofi e psicrofili (6). Tra questi microrganismi vengono isolati frequentemente *Vibrio* spp, responsabili di patologie negli animali e nell'uomo (7;8). L'uomo può contrarre malattia da *Vibrio* spp in alcuni casi (*V. vulnificus* e *V. harveyi*), in conseguenza

all'esposizione di ferite aperte all'acqua di mare contaminata (9;10), oppure attraverso l'ingestione di prodotti della pesca contaminati. Alcune delle circa 60 specie comprese nel genere *Vibrio* (8) sono infatti, responsabili di tossinfezione alimentare (13). *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*, sono prevalentemente associati a gastroenteriti (11), *V. vulnificus*, considerato la maggior causa di morte da ingestione di prodotti della pesca crudi o poco cotti negli USA (12), è responsabile di gastroenteriti e forme setticemiche. I dati epidemiologici sulle tossinfezioni alimentari mostrano che i prodotti ittici hanno importanza rilevante solo nei paesi dove è diffuso il consumo di prodotti della pesca crudi o poco cotti (1;9;11;12). In ambito nazionale l'isolamento di *Vibrio* spp è frequente a livello ambientale, nel plancton e nei molluschi bivalvi. Il presente lavoro rappresenta un contributo alla definizione della prevalenza ed

alla identificazione di *Vibrio* spp in orate (*Sparus aurata*) allevate in gabbie a mare.

MATERIALI E METODI

La ricerca si è svolta presso due aziende che si occupano dell'allevamento a mare di specie ittiche pregiate e della loro immissione sul mercato. Presso gli impianti di maricoltura, situati nel versante Nord Orientale della Regione Sardegna, sono stati prelevati 20 soggetti della specie *Sparus aurata* in normale stato fisiologico in due successivi campionamenti effettuati nei mesi di marzo-aprile e settembre-ottobre, per un totale di 80 campioni. Il primo allevamento (A) era situato a ridosso della costa, mentre il secondo (B) presentava la tipica struttura off-shore. Per ciascun soggetto sono state effettuate le determinazioni quantitative e qualitative di *Vibrio* spp sulle matrici cute, branchie e contenuto intestinale. Sui campioni di muscolo è stata effettuata esclusivamente la determinazione qualitativa. La conta e l'identificazione presuntiva delle colonie con caratteristiche tipiche di *Vibrio* spp, è stata condotta previa omogeneizzazione e diluizione (1:10) in PBS (Phosphate Buffered Saline) e successiva semina di 0,1 mL su TCBS Colera Medium (+30°C/24h). Parallelamente, si è proceduto all'incubazione dell'omogenato (+30°C/24h) e quindi alla semina di 100 µL su TCBS (+30°C/24h). Le colonie con caratteristiche tipiche, sono state isolate e sottoposte ai seguenti test di conferma: colorazione di Gram, reazione dell'ossidasi, crescita su TSA addizionato con NaCl al 3%, fermentazione di glucosio e lattosio, produzione di idrogeno solforato e sensibilità al fattore vibriostatico O129 (2,4-diamino-6,7-di-isopropilpteridina fosfato). Sui ceppi riferibili a *Vibrio* spp, la conferma di genere, è stata eseguita mediante PCR amplificante una porzione conservata del gene *rpoA*. Il DNA è stato estratto mediante bollitura e la reazione di amplificazione è stata eseguita secondo il protocollo precedentemente pubblicato (16;17). Il frammento amplificato è stato successivamente sottoposto a sequenziamento al fine di identificare la specie. E' stata eseguita una preliminare purificazione del prodotto di amplificazione mediante Exo-SAP (USB Europe GmbH), seguita da una reazione di cycle sequencing mediante BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem). Il prodotto di estensione è stato purificato mediante DyeEx 2.0 Spin kit (Qiagen), denaturato a 95°C per 5 min. con Hi-Di Formammide (Applied Biosystem) e sottoposto

a elettroforesi capillare (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystem). Gli elettroferogrammi sono stati analizzati mediante il software Chromas 2.22 (Technelysium). Le sequenze sono state confrontate con quelle depositate in GenBank mediante il software BlastN. Il confronto dei dati sulla prevalenza, di *Vibrio* spp, riscontrata mediante ricerca quantitativa o qualitativa nei due campionamenti e nelle differenti matrici, è stata effettuata mediante Fisher's Exact Test. L'effetto delle variabili sperimentali sulla probabilità di rilevare *Vibrio* spp è stato valutato per ciascuna delle due metodiche di ricerca utilizzate (quantitativa e qualitativa), con l'ausilio del modello $\log [\pi_i/(1-\pi_i)] = \beta_0 + \beta_1 H_t + \beta_2 L_k + \beta_3 S_m + e_{tkm}$, dove: $[\pi_i/(1-\pi_i)]$ è la funzione logit di osservare campioni positivi per *Vibrio* spp, β_0 è l'intercetta, $\beta_1 H_t$ è l'effetto dell'allevamento, $\beta_2 L_k$ è l'effetto della data, $\beta_3 S_m$ è l'effetto matrice ed e_{tkm} è l'effetto residuo. Il modello lineare generalizzato $Y_{tkm} = \mu + H_t + L_k + S_m + H_t * L_k + S_m * H_t + L_k * S_m + e_{tkm}$, è stato utilizzato per valutare l'effetto sulla variabile dipendente \log ufc/mL *Vibrio* spp (Y_{tkm}) delle variabili allevamento (H_t), data (L_k), matrice (S_m) e delle rispettive interazioni ($H_t * L_k$, $S_m * H_t$, $L_k * S_m$), mentre e_{tkm} rappresenta l'effetto residuo. La stima delle componenti della varianza per le determinazioni quantitative di *Vibrio* spp in relazione alle variabili sperimentali, è stata effettuata secondo la metodologia della massima verosimiglianza ristretta (REML). L'elaborazione statistica dei risultati è stata effettuata mediante software Statgraphics Plus 5.1 (Centurion, USA).

RISULTATI

I due impianti da cui provenivano gli esemplari di *S. aurata* presentavano un management differente: il primo (A) adottava una tecnica di allevamento che prevedeva la gestione all'interno della stessa gabbia di pesci di taglie differenti. La struttura è rappresentata da un totale di 21 gabbie galleggianti, posizionate all'interno di un golfo a ridosso della costa, su un fondale di 13-18 metri. Il piano di alimentazione *ad libitum* adottato teneva conto delle esigenze dei soggetti di grossa taglia (600-1.500g), di quelle dei soggetti in taglia commerciale (300-500g) e dei soggetti in crescita (< 250g). Il secondo allevamento (B), di tipo off-shore, situato su un fondale di circa 40 metri, presentava invece un tipo di management classico. Si attua una fase di pre-ingrasso della durata di 3-4 mesi, nella quale avannotti di 3-5g posti all'interno di 3 gabbie di 600 m³ ciascuna, raggiungono il peso di 15-20g,

e una fase di ingrasso, della durata di 12-14 mesi, dove orate poste in 6 gabbie della capacità di 1.800 m³ raggiungi mentono la taglia commerciale di circa 300g. In totale sono stati analizzati 80 soggetti di *Sparus aurata*. Per ciascuno dei parametri morfometrici sono riportati la media \pm ds ed il range (min-max) relativi ai soggetti prelevati: a) allevamento A: peso pari a 411,6 \pm 74,6 g (520,0-275,3g); lunghezza 26,6 \pm 2,2 cm (30-23 cm); altezza 9,2 \pm 0,69 cm (10-7,7 cm); b) allevamento B: peso 331,5 \pm 52,8 g (403-202g), lunghezza 26,0 \pm 1,5 (29-22,5 cm) e altezza 8,6 \pm 0,5 (9,5-8 cm). I risultati relativi alla ricerca quantitativa

(Tabella 01) e qualitativa (Tabella 02) di *Vibrio* spp sono riportati considerando le colonie che presentavano tipiche su TCBS. I risultati si riferiscono ai 20 soggetti analizzati per ciascun campionamento e sono riportati in relazione all'allevamento, per ciascuna delle matrici analizzate. I risultati della ricerca effettuata mediante metodo quantitativo (Tabella 01) e con metodo qualitativo (Tabella 02) mostrano che, nella maggior parte delle matrici analizzate, la prevalenza % di *Vibrio* spp è influenzata dall'allevamento di provenienza dei campioni (Fischer's Exact Test).

Tabella 1. Determinazioni quantitative di *Vibrio* spp su cute, branchie e intestino (20 campioni).

campionamento	matrice	Allevamento A		Allevamento B		P value*
		positivi	media \pm ds	positivi	media \pm ds	
primo	cute	9 (45%)	1,00 \pm 0,57	1 (5%)	0,48 \pm 0,00	<0.05
	branchie	15 (75%)	1.25 \pm 0.47	1 (5%)	1.30 \pm 0.00	<0.001
	intestino	5 (25%)	1.20 \pm 0.77	1 (5%)	1.88 \pm 0.00	ns
secondo	cute	20 (100%)	2.61 \pm 0.16	8 (40%)	2.09 \pm 0.72	<0.001
	branchie	20 (100%)	2.67 \pm 0.23	20 (100%)	2.39 \pm 0.25	ns
	intestino	19 (90%)	1.96 \pm 0.75	2 (10%)	0.67 \pm 0.52	<0.001

* P<0.05: indica una differenza significativa nella prevalenza di *Vibrio* spp tra i due allevamenti; ns: non significativo

Tabella 2. Determinazioni qualitative di *Vibrio* spp su cute, muscolo, branchie e intestino.

campionamento	matrice	Allevamento A	Allevamento B	P value*
primo	cute	20 (100%)	1 (5%)	<0.001
	muscolo	10 (50%)	0 (0%)	<0.001
	branchie	19 (95%)	11 (55%)	<0.05
	intestino	18 (90%)	8 (40%)	<0.05
secondo	cute	20 (100%)	20 (100%)	ns
	muscolo	12 (60%)	0 (0%)	<0.001
	branchie	20 (100%)	20 (100%)	ns
	intestino	20 (100%)	3 (15%)	<0.001

* P<0.05: indica una differenza significativa nella prevalenza di *Vibrio* spp tra i due allevamenti; ns: non significativo

La prevalenza di *Vibrio* spp determinata con le due metodiche di analisi è influenzata dall'allevamento di provenienza ($P < 0.001$), dalla data di campionamento ($P < 0.001$) e dalla matrice analizzata ($P < 0.001$). Il numero di *Vibrio* spp (log ufc/mL), analogamente a quanto osservato per la prevalenza, è influenzato dall'allevamento, data di campionamento e matrice ($P < 0.001$), con interazioni significative fra allevamento per data di campionamento, matrice per data di campionamento ($P < 0.001$) e matrice per allevamento ($P < 0.05$). La varianza osservata relativamente ai dati della conta di *Vibrio* spp è per il 41,4% determinata dalla data di campionamento, per il 23,4% dalla matrice e per il 17,2% dall'allevamento. Dai campioni risultati positivi e dalle colonie con caratteristiche tipiche sono stati isolati complessivi 100 ceppi, di cui 78 provenivano

dall'allevamento A (38 dal primo campionamento e 40 dal secondo campionamento) e 23 dall'allevamento B (rispettivamente 22 e 1). Sulla base dei test fenotipici di identificazione mostravano caratteristiche tipiche di *Vibrio* spp il 100% dei ceppi isolati, di cui 31 ottenuti da campioni di cute, 18 dal tessuto muscolare, 20 dal contenuto intestinale e 31 dalle branchie. L'identificazione biomolecolare mediante PCR ha confermato nel 100% dei casi l'appartenenza dei ceppi al genere *Vibrio* spp. Il sequenziamento del frammento del gene *rpoA* ha permesso di identificare diverse specie appartenenti al genere *Vibrio*: 89 ceppi di *V. harveyi*, 6 *V. diabolicus*, 2 *V. parahaemolyticus* e 1 *V. mediterranei* (per due ceppi non si è potuto procedere al sequenziamento).

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Data la natura ubiquitaria di *Vibrio* spp negli ambienti marini, i prodotti ittici risultano frequentemente contaminati da questi microrganismi (11). Studi condotti sul livello di contaminazione da *Vibrio* spp dell'acqua e del sedimento, attestano in campioni prelevati nel Mediterraneo una prevalenza compresa tra il 25% e il 74% (13). Le differenze gestionali e ambientali dei due allevamenti coinvolti nella ricerca, giustificano la diversa prevalenza osservata. L'allevamento A, rispetto all'allevamento B, è situato in prossimità della costa, con conseguente ridotta profondità dei fondali. In questo allevamento la somministrazione *ad libitum* dell'alimento determina aumento dei nutrienti e accumulo del sedimento sul fondale. Queste condizioni possono giustificare la maggior prevalenza del microrganismo nel primo allevamento rispetto al secondo (16;17). La prevalenza ed i livelli di contaminazione più elevati registrati nel secondo campionamento sono invece riconducibili alla stagionalità. La temperatura dell'acqua infatti era di circa 14°C in occasione del primo campionamento e di circa 23°C nel secondo. Diversi studi infatti indicano che la prevalenza di *Vibrio* spp è correlata alla temperatura dell'acqua (18;19). L'87,4% dei ceppi identificati appartiene alla specie *Vibrio harveyi*. Questo microrganismo è da sempre associato a patologie dei pesci e di alcuni squali (*Carcharhinus plumbeus*), da cui è inizialmente derivato il nome della specie (*Vibrio carchariae*), successivamente modificato appunto in *V. harveyi* in relazione al sequenziamento del gene 16S rDNA (20). Viene considerato inoltre come potenziale patogeno dell'uomo perchè in grado di infettare ferite esposte all'acqua contaminata (10;21). *V. harveyi* è ritenuto da diversi autori, responsabile di infezione generalizzata in allevamenti di *Spaurus aurata*. Viene isolato da organi interni e ulcere cutanee, sia in soggetti adulti che in forme giovanili, nei quali determina una sintomatologia che comprende erosione della coda, infezione dell'occhio, della cute e frequente mortalità in 3-4 giorni (22;23). La restante parte dei ceppi identificati è rappresentato da *V. diabolicus* (5,8%) e da due specie meno rappresentate, *V. parahaemolyticus* (1,9%) e *V. mediterranei* (1%), che insieme a *V. harveyi* sono comprese nel medesimo *core group* (8). Il sequenziamento del 16S rDNA ha infatti evidenziato la stretta relazione filogenetica tra queste specie. I

risultati ottenuti nel presente lavoro evidenziano l'elevata frequenza di *Vibrio* spp nei prodotti dell'itticoltura e la presenza, tra i microrganismi isolati, di specie potenzialmente patogene per l'uomo. I prodotti dell'itticoltura attualmente sono utilizzati in seguito a cottura, cui consegue l'inattivazione di *Vibrio* spp, ma è sempre più frequente il consumo di preparazioni crude, con un incremento del rischio per il consumatore. Al fine di ridurre il livello di contaminazione dei prodotti dell'itticoltura i risultati evidenziano l'importanza di appropriate condizioni e tecniche di allevamento e alimentazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Jaksic, S., Uhtil, S., Petrak, T., Bzauli, D., Karolyi, L.G. (2002). Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. *Food Control*, 13, (8), 491-493
2. ICMSF, 1996. Micro-organisms in foods, Blackie Academic & Professional, London, 414-435
3. Feldhusen, F. (2000) The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*, 2, 13, 1651
4. Gram, L., Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 3, 262-266
5. Chattopadhyay, P. (2000). Fish Catching and Handling. *Encyclopedia of Food Microbiology*, London, Academic Press, 806-813
6. Bourgeois, C.M., Mescle, J.F., Zucca, J. (1996). *Microbiologie Alimentaire* (1), 348-359
7. Vandenberghe, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera G., Bolland A., Balladares M.; Gomez-Gil B., Calderon J., Sorgeloos P., Swings J. (1999) Vibrios Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae. Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, (6) 2592-2597
8. Macián, M.C., Garay, E., Grimont, P.A.D., Pujalte M.J. (2004). *Vibrio ponticus* sp. nov., a neighbour of *V. fluvialis*-*V. furnissii* Clade. Isolated from Gilthead Sea Bream, Mussels and Seawater. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, (5), 535-540
9. Strom, M.S., Paranjpye, R.N. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection*, 2, (2), 177-188
10. Austin, B., (2010). Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 140,

- (3-4), 310-317
11. Su, Y.C., Liu, C., (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiology*, 24, (6), 549-558
 12. Cañigral, I., Moreno, Y., Alonso, J.L., González, A., Ferrús, M. A. (2010). Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. *Microbiological Research*, In Press, doi :10.1016/j.micres.2009.11.012
 13. Dumontet, S., Krovacek, K., Svenson, S.B., Pasquale, V., Baloda, S.B., Figliuolo, G. (2000). Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. in coastal waters of Southern Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 23, (1), 53-72
 14. La Neve, F., Pedonese, F., Nuvoloni, R., D'Ascenzi, C., Dalmaso, A., Civera, T. (2006). Identificazione di Vibrioni di interesse sanitario in orate di allevamento mediante metodiche biomolecolari. *LX Convegno Nazionale della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, 432
 15. Dalmaso, A., La Neve, F., Suffredini, E., Croci, L., Serracca, L., Bottero, M.T., Civera, T. (2009). Development of a PCR Assay Targeting the rpoA Gene for the Screening of *Vibrio* Genus. *Food Analytical Methods*, 2:317-324
 16. Fries, J.S., Characklis, G.W., Noble, R.T. (2008). Sediment-water exchange of *Vibrio* spp. and fecal indicator bacteria: Implications for persistence and transport in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Water Research*, 42, (4), 941-950
 17. Hsieh, J.L., Fries, J.S., Noble, R.T. (2007). *Vibrio* and phytoplankton dynamics during the summer of 2004 in a eutrophying estuary. *Ecological Applications, Supplement: Eutrophication*, S102-S109. doi:10.1890/05-1274.1
 18. Barbieri, E., Falzano, L., Fiorentini, C., Pianitti, A., Baffone, W., Fabbri, A., Matarrese, P., Caisere, A., Katouli, M., Kühn, I., Mölby, F., Bruscolini, F., Donelli G. (1999). Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic Coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, (52), 2748-2753
 19. Castañeda Chávez, M.R., Pardo Seda, V., Orrantia Borunda, E., Lango Reynoso, F. (2005). Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, México. *Marine Pollution Bulletin*, 50, (12), 1641-1648
 20. Gauger, E.J., Gomez-Chiarri, M. (2002). 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. *Diseases of Aquatic Organism*, 52, 39-46
 21. Austin, B., Zhang, X.H. (2006). Under the microscope. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 119-124
 22. Pujalte, M.J., Sitjà-Bobadilla, A., Macián, M.C., Belloch, C., Álvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., Uruburu, F., Garay, E. (2003). Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured Dentex, Gilthead Sea Bream and European Sea Bass. *Systematic and Applied Microbiology*, 26 (2), 284-292
 23. Halder, S., Maharajan, A., Chatterjee, S., Hunter, S.A., Chowdhury, N., Hinenoya, A., Asakura, M., Yamasaki, S. (2010). Identification of *Vibrio harveyi* as a causative bacterium for a tail rot disease of sea bream *Sparus aurata* from research hatchery in Malta. *Microbiological Research*, In Press. doi:10.1016/j.micres.2009.12.001

Ricerca eseguita con finanziamento MIUR Programmi di Ricerca Scientifica di Rilevante Interesse Nazionale 2007