

SUMMARY

The presence of vibrios, particularly *Vibrio parahaemolyticus*, in seafood and mussels were studied in order to determine seafood safety for consumption. Samples of 100 seafood of different origin were collected and analyzed by culture, using selective media including TCBS (Thiosulphate-Citrate-Bile salts-Sucrose). Presumptive *Vibrio* colonies were isolated and identified using selected biochemical tests and biomolecular analyses. Total DNA from isolated blue-green colonies, with phenotypic and biochemical characteristics typical of *V. parahaemolyticus*, was extracted and PCR protocols for the specific detection of the *V. parahaemolyticus* *tox-R* gene and *tl* gene were performed; moreover, in *tox-R* positive isolates thermostable direct haemolysin gene (*tdb*) and thermostable direct haemolysin-related gene (*trb*) were detected through PCR. The isolates identified as *Vibrio* by traditional methods (N=58) were identified through sequencing of a fragment of *rpoA* gene.

Out of 28 suspected *V. parahaemolyticus*, the identification was confirmed by sequencing and by PCR amplification of the *tox-R* and *tl* fragments in 6 isolates (21,4%). However these did not generate the amplicons of *tdb* and *trb*, suggesting these as non virulent strains. The remaining isolates were identified through sequencing as vibrios: *V. alginolyticus* (39,3%) and *V. diabolus* (17,8%). The application of both biochemical and biomolecular identification systems contextually may provide a more accurate identification of *Vibrio* spp., including *V. parahaemolyticus*, particularly if environmental bacteria are present in the tested sample.

SOMMARIO

La ricerca ha avuto lo scopo di valutare la presenza di vibrii, con particolare riferimento a *Vibrio parahaemolyticus*, in prodotti della pesca presenti sul circuito commerciale, al fine di valutare la presenza di rischi sanitari legati a questi microrganismi per il consumatore. Il campione era costituito da 100 prodotti della pesca e dell'acquacoltura di differente origine e la ricerca di vibrii riconducibili a *V. parahaemolyticus* è stata effettuata impiegando terreni culturali selettivi quali il TCBS (Tiosolfato Citrato Bile Saccarosio) e metodi biomolecolari. Le colonie sospette per caratteristiche morfologiche e biochimiche, sono state sottoposte ad estrazione del DNA per bollitura e successiva PCR per confermare la specie mediante amplificazione di frammenti specifici dei geni *tox-R* e *tl*. Campioni positivi a *tox-R* sono stati successivamente sottoposti a PCR per identificare i fattori di virulenza (*tdb* e *trb*). Tutti i ceppi identificati come *Vibrio* con metodi tradizionali (N=58) sono stati altresì identificati mediante sequenziamento di un frammento del gene *rpoA*. Su 28 ceppi sospetti *V. parahaemolyticus*, 6 (21,4%) sono stati confermati sia dal sequenziamento che dalle PCR, che però non hanno mai messo in evidenza i fattori di virulenza *trb* e *tdb*. I restanti ceppi sono per lo più vibrii ambientali, e in particolare modo *V. alginolyticus* (39,3%) e *V. diabolus* (17,8%). La ricerca ha evidenziato la scarsa accuratezza dei test biochimici e la necessità di confermare l'identificazione con tecniche biomolecolari.

IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA E GENOTIPICA DI VIBRII IN PRODOTTI DELLA PESCA

Biochemical and molecular identification of vibrios in seafood

Parole chiave: *Vibrio*, prodotti della pesca, identificazione biochimica e biomolecolare, sicurezza degli alimenti

Key words: *Vibrio*, seafood, biochemical and molecular identification, food safety

INTRODUZIONE

Al genere *Vibrio* appartengono bastoncini Gram negativi, solitamente mobili, mesofili con un metabolismo fermentativo facoltativo, di frequente riscontro nell'habitat acquatico e in associazione con organismi eucarioti. Tale associazione può essere di tipo mutualistico, come nel caso di *V. fischeri*, *V. leiognathi*, *V. logei* con molluschi cefalopodi, ma alcune specie possono anche determinare malattie, come nel caso di *V. cholerae* nell'uomo (Thompson *et al.*, 2004, 2005). La loro concentrazione nelle acque è modulata dalla temperatura e dalla salinità: le maggiori cariche si riscontrano in acque con temperature comprese fra 17° e 35°C e con salinità compresa fra 5 e 25‰. Tuttavia alcune specie necessitano di particolari condizioni per la crescita: *V. cholerae* per esempio non richiede

de aggiunta di sale nei terreni di coltura (Janda *et al.*, 1988).

Le specie comunemente riconosciute patogene per l'uomo sono tre: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, responsabili di infezioni per contaminazione di acque e alimenti. Altri vibrii quali *Grimontia hollisae*, *Photobacterium damsela*, *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii* e *V. mimicus* sono stati sporadicamente isolati in infezioni umane e per questo considerati potenzialmente patogeni (Thompson *et al.*, 2004).

Il sistema di sorveglianza del Center for Disease Control and Prevention (USA), che raccoglie le notifiche legate ai tre principali *Vibrio* patogeni per l'uomo, nel 2002 su 452 isolamenti di *Vibrio* da pazienti ha riconosciuto responsabile per il 35% dei casi *V. parahaemolyticus*, per il 20% *V. vulnificus* e per il 17% *V. cholerae*

(non tossigeno); nel restante 28% invece sono stati identificati *V. alginolyticus* (12%), *V. fluvialis* (8%), *V. hollisae* (2%), *V. mimicus* (1,5%), *P. damsela* (0,7%), *V. furnissii* e *V. metschnikovii* (0,5%); infine nel 3% dei campioni non è stato possibile identificare la specie (www.cdc.gov). In Europa non esiste una rete di rilevamento delle infezioni da *Vibrio*, anche se alcuni dati è possibile ricavarli dalle singole organizzazioni: per esempio in Francia il centro di referenza nazionale presso l'Istituto Pasteur tra il 2003 e il 2006 ha registrato 38 casi sporadici di malattia non legata a *V. cholerae* O1/O139, di cui 9 legati a *V. parahaemolyticus* (<http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadre/cnr/Web-vibrio2006.pdf>). Anche dai dati raccolti da fonti diverse in Spagna è possibile desumere che le infezioni da *V. parahaemolyticus* siano abbastanza frequenti: nella sola Galizia, dove si producono la maggior parte dei bivalvi spagnoli, si sono registrati 84 casi di infezione tra il 1997 e il 2000, e nel 2004 è stato registrato un focolaio che ha coinvolto 80 individui a La Coruña legato a un clone epidemico di *V. parahaemolyticus* O3:K6 (Martinez-Urtaza *et al.*, 2004, 2005).

V. parahaemolyticus è responsabile di una gastroenterite acuta, generalmente acquosa, a volte sanguinolenta, con vomito e crampi addominali, accompagnati in circa la metà dei casi da febbre moderata e cefalea, raramente setticemia, per lo più associata al consumo di molluschi o crostacei crudi (Okuda *et al.*, 1997; Ward e Bej, 2006).

Si è osservato che la capacità di determinare malattia da parte di un ceppo di *V. parahaemolyticus* è associata alla facoltà di produrre

beta-emolisi su agar sangue (fenomeno di Kanagawa), capacità conferita dal gene *tdh* che codifica per un'emolisina diretta termostabile; tuttavia ulteriori studi hanno dimostrato che alcuni ceppi patogeni producono una diversa emolisina, codificata dal gene *trh* (Okuda *et al.*, 1997; Kaufman *et al.*, 2002; Ward e Bej, 2006). L'isolamento ed identificazione di *V. parahaemolyticus* da prodotti della pesca non può essere indicativo, in se e per sé, di un alimento pericoloso in quanto è necessario dimostrare la presenza dei fattori di virulenza: una ricerca condotta da Hervio-Heath *et al.* (2002) su campioni di acqua e molluschi prelevati dalle coste francesi, evidenziò che solo il 4,8% dei ceppi di *V. parahaemolyticus* era positivo per il gene *trh*; uno studio di Ottaviani *et al.* (2005) effettuato su *Mytilus galloprovincialis* raccolti in mar Adriatico, rilevò positività per *tdh* pari al 2,8% e per *trh* dell'8,5%. Anche ricerche condotte su prodotti ittici tropicali hanno evidenziato il fattore *trh* nel 5,5% degli isolati e *tdh* nel 2% (Dileep *et al.*, 2003).

L'accresciuta incidenza a livello mondiale di *V. parahaemolyticus* come agente di malattia alimentare, ha indotto i ricercatori a sviluppare metodi sensibili, specifici e rapidi in grado di evidenziare la sua presenza negli alimenti ittici.

Proprio a fronte di questi rilievi, l'Istituto Superiore di Sanità ha emesso un parere che richiede ai laboratori preposti ai controlli ufficiali, di confermare l'identificazione di *V. parahaemolyticus* e di ricercare i geni legati alla virulenza mediante PCR. Detto parere è stato recepito a livello del Ministero della Salute (Prot.

Comunicazione del 15/09/2005) e consente di esprimere una valutazione univoca, basata sulla potenziale pericolosità del microrganismo.

La presente ricerca si propone pertanto di valutare la presenza di *V. parahaemolyticus* in prodotti della pesca e dell'acquacoltura presenti sul circuito commerciale, affiancando i tradizionali test di identificazione biochimica a metodi biomolecolari, atti a confermare la specie e identificare eventuali geni correlati alla virulenza.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati analizzati 100 campioni di prodotti della pesca, rappresentati da molluschi bivalvi, crostacei e teleostei marini prelevati presso punti vendita al dettaglio, depositi frigoriferi e mercati ittici, nonché prodotti in importazione presso il Posto di Ispezione Frontaliera di La Spezia. I molluschi bivalvi erano provenienti per la quasi totalità da allevamenti nazionali; mentre per le altre categorie si trattava maggiormente di pescato nel mar Mediterraneo.

Isolamento di *Vibrio* spp. e *V. parahaemolyticus*

L'isolamento di *Vibrio* spp. è stato condotto secondo il metodo FDA Bacteriological Analytical Manual (1995), mentre la ricerca di *V. parahaemolyticus* è stata effettuata secondo il metodo ISO 8914.1990.

Da 50 g di campione omogenato,

si sono prelevati 25 g addizionandoli a 225 mL di APWS (Alcaline Peptone Water Saline, Oxoid, Garbagnate Milanese, Italy) con NaCl al 2%. Per i Molluschi Eduli Lamellibranchi (M.E.L.) la procedura prevede l'apertura di almeno 10 individui. I campioni sono stati incubati a $36^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ per 7-8 ore, ad eccezione dei campioni congelati per i quali il tempo di incubazione è stato prolungato a 16-18 ore.

Successivamente si è proceduto all'isolamento su TCBS (Tiosolfato Citrato Bile Saccarosio, Oxoid) incubato a $36^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore. Le colonie sospette *V. parahaemolyticus*, di colore verde, superficie liscia, dimensione 2-3 mm, sono state poste in coltura a 37°C per 18-24 h in terreno nutritivo Trypton Soy Agar (TSA, Oxoid) addizionato di NaCl 2% per la successiva identificazione biochimica e biomolecolare.

Prove biochimiche

Per l'identificazione *V. parahaemolyticus* si sono effettuate le prove biochimiche previste dal Rapporto ISTISAN 97/31 (Ripabelli *et al.*, 1997) e dal FDA-BAM 2004: in particolare i ceppi sono stati sottoposti alla determinazione dell'attività ossidasica (Oxidase discs, HIMedia Laboratories, Mumbai, India), alla semina su Triple Sugar Iron Saline (TSIS, Oxoid), alla prova di sviluppo su Brodo Triptone (BT, Oxoid) a differenti concentrazioni saline e alla determinazione della sensibilità al fattore vibriostatico O129 (Abtek Biologicals Ltd, Liverpool, UK). I ceppi sono stati inoltre testati in micrometodo utilizzando le gallerie API 20E e 20NE (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Estrazione del DNA

Dalle colonie identificate come *Vibrio* spp. dai metodi tradizionali è stato estratto il DNA mediante bollitura. Successivamente il DNA è stato quantificato mediante lettura spettrofotometrica e portato ad una concentrazione finale di 50 ng/ μL .

PCR

Per confermare l'appartenenza delle colonie alla specie *V. parahaemolyticus* sono stati utilizzati due protocolli di PCR specie specifici, amplificanti frammenti dei geni *tox-R* (Kim *et al.*, 1999) e *tl* (Bej *et al.*, 1999).

Successivamente, sui ceppi identificati come *V. parahaemolyticus*, si è proceduto alla verifica della potenziale patogenicità mediante amplificazione dei geni *tdh* e *trh* (Bej *et al.*, 1999).

Ogni reazione è stata allestita utilizzando una concentrazione finale di primers di 600 nM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in un volume finale di reazione di 30 μL per *tl*, *tdh* e *trh* ed una concentrazione finale di primers di 400 nM (Applied Biosystems) in un volume finale di 50 μL per il gene *tox-R* (Ottaviani *et al.*, 2005). Le reazioni di amplificazione sono avvenute mediante utilizzo di Taqman Universal PCR Master Mix (Roche, Milano, Italy).

Gli amplimeri sono stati risolti su gel d'agarosio al 3%, colorati con bromuro d'etidio (0,4 ng/mL) per 20 min e visualizzati al transilluminatore.

Sequenziamento

Tutti i ceppi identificati come *Vibrio* spp. dai metodi tradizionali

sono stati sottoposti a sequenziamento per identificare o confermare la specie. A tal fine è stata eseguita una preliminare PCR utilizzando una coppia di primers specifica per il genere *Vibrio* in grado di amplificare un frammento del gene *rpoA* (5'-CGMGTDGCM-GAAGGCAAA-3' e 5'-GGCA-ATTTTRTCDACYGGG-3') (La Neve *et al.*, 2006). Successivamente è stata eseguita una purificazione del prodotto di amplificazione mediante MinElute PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany), 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' con Hi-Di Formammide (Applied Biosystem) e sottoposto ad 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.

RISULTATI

Colonie riconducibili a *Vibrio* spp. sono state isolate nel 58% dei campioni esaminati, rappresentati soprattutto da molluschi bivalvi (92%); le ulteriori prove biochimiche condotte su questi ceppi hanno permesso di identificare 28 ceppi come possibili *V. parahaemolyticus*. La percentuale di identificazione con sistemi miniaturizzati API 20NE era superiore al 95% in 8 ceppi, 15 ceppi avevano un'identificazione pari a

83,8%, per 5 ceppi era inferiore al 30%. Oltre a *V. parahaemolyticus* i sistemi miniaturizzati hanno identificato 13 ceppi come *V. alginolyticus*, 7 *V. vulnificus*, 6 *V. metschnikovii*, 2 *V. cholerae*, 1 *V. fluvialis*, 1 *P. damsela* (tab. 1).

L'amplificazione dei geni *tox-R* e *tl* ha dato origine ad ampliconi di lunghezza pari a 368 bp (fig. 1) e 450 bp in 6 campioni, corrispondenti al 21,4% dei ceppi identificati fenotipicamente come *V. parahaemolyticus*. Questi ceppi sono risultati negativi quando testati con le PCR per i geni *trh* e *tdh*.

Nessun ceppo identificato mediante prove biochimiche come appartenente ad altre specie del genere *Vibrio* ha mostrato amplificazione dei geni *tox-R* e *tl*.

L'amplificazione del gene *rpoA* ha dato origine ad un amplicone di 284 bp in 52 su 58 isolati esaminati, sui quali è stato effettuato il successivo sequenziamento.

Dei 28 ceppi sospetti *V. parahaemolyticus*, solo 6, già risultati positivi in PCR per *tox-R* e *tl*, sono stati confermati appartenenti a questa specie, con omologia pari al 100% rispetto alle sequenze depositate in GenBank; i restanti

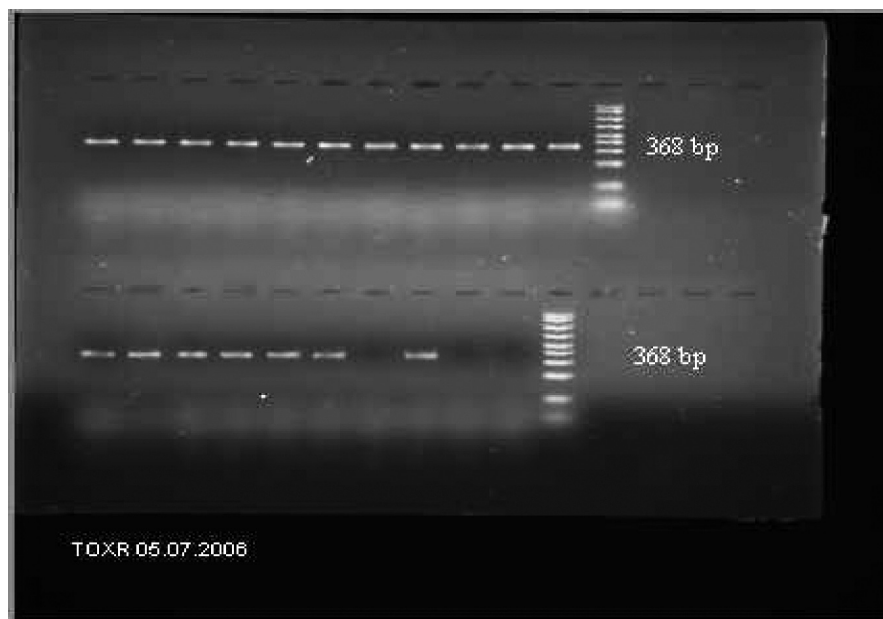


Fig. 1 - Amplificazione del gene *tox-R* di 6 ceppi di *V. parahaemolyticus* isolati nel corso della presente indagine; nella foto sono presenti anche controlli positivi di ceppi certificati.

22 campioni sono stati identificati come *V. diabollicus* (21/22) e *V. alginolyticus* (1/22).

I risultati del sequenziamento dei restanti ceppi sono riportati in tab. 1: solo il 33% dei campioni sequenziati ha confermato l'identificazione biochimica.

Infine per 5 ceppi, identificati fenotipicamente come *V. metschnikovii*, non è stato possibile otte-

nere l'identificazione molecolare in quanto la coppia di primer impiegata per il sequenziamento non è in grado di amplificare questa specie. Analogo risultato è stato ottenuto nel caso del ceppo riconducibile a *P. damsela*.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Benché i test biochimici abbiano identificato 23 ceppi come possibili *V. parahaemolyticus* con percentuale di identificazione superiore all'83,8%, solo 6 sono stati confermati dalla PCR e dal sequenziamento, evidenziando una specificità dei test biochimici inferiore al 26%. La bassa accuratezza dei sistemi commerciali di identificazione per la famiglia vibriaceae, era già stata discussa da O'Hara *et al.* (2003) che, confrontando sei kit commerciali, riscontrarono che i sistemi identificavano correttamente non più dell'80,9% dei *Vi-*

Tabella 1

Riepilogo dei risultati derivanti dall'identificazione biochimica e biomolecolare di *Vibrio*. Il simbolo // indica che non è stata effettuata la ricerca.

Identificazione fenotipica	Sequenziamento	PCR <i>tox-R</i> , <i>tl</i>	PCR <i>tdh</i> , <i>trh</i>
28 <i>V. parahaemolyticus</i>	6 <i>V. parahaemolyticus</i>	+	-
	21 <i>V. diabollicus</i>	-	//
	1 <i>V. alginolyticus</i>	-	//
13 <i>V. alginolyticus</i>	9 <i>V. alginolyticus</i>	-	//
	4 <i>V. diabollicus</i>	-	//
7 <i>V. vulnificus</i>	6 <i>V. harveyi</i>	-	//
	1 <i>V. diabollicus</i>	-	//
6 <i>V. metschnikovii</i>	5 non amplificato	//	//
	1 <i>V. alginolyticus</i>	-	//
2 <i>V. cholerae</i>	1 <i>V. alginolyticus</i>	-	//
	1 <i>V. cholerae</i>	-	//
1 <i>V. fluvialis</i>	<i>V. aestuarianus</i>	-	//
1 <i>P. damsela</i>	1 non amplificato	//	//

brio. In particolare il sistema API 20E identificava correttamente il 63,9% degli isolati a livello di specie, riducendosi molto nel caso di *V. cholerae* (50,0%).

L'elevata specificità del test basato sull'amplificazione del gene *tox-R* nell'identificazione di *V. parahaemolyticus*, è stata ben dimostrata da un lavoro di Croci *et al.* (2007). Gli stessi autori hanno invece messo in evidenza falsi positivi (18%) in presenza di specie diverse per il gene *tl*.

Nel presente lavoro, i 6 ceppi identificati come *V. parahaemolyticus* dalle PCR e dal sequenziamento sono risultati negativi per la ricerca dei geni codificanti le due tossine coinvolte in affezioni umane (*trh* e *tdh*), pertanto non rappresentano un pericolo per il consumatore. La presenza di *V. parahaemolyticus* appare quindi inferiore rispetto a quanto riscontrato da Ottaviani *et al.* (2005), che isolarono questo microrganismo nel 24,3% dei molluschi dell'Adriatico, di questi il 2,8% era positivo per *tdh* e l'8,6% per *trh*, e da Hervio-Health *et al.* (2002), che identificarono il 21,7% dei vibrioni appartenenti a questa specie, di cui il 5% *trh* positivo.

Dal sequenziamento è emerso che *V. diabolicus* risulta la specie più spesso falsamente identificata come *V. parahaemolyticus*.

V. diabolicus è un microrganismo identificato recentemente e isolato da anellidi, non pigmentante e non luminescente, associato ad acque profonde (Raguénès *et al.*, 1997). I lavori di filogenesi di Thompson *et al.* (2004, 2005), basati sull'analisi delle sequenze di più geni (16S *rRNA*, *rpoA*, *pyrH*, *recA*), collocano *V. diabolicus* in un cluster unico con *V. parahaemolyticus*, *V. mytili*, *V. natriegens*, evidenziando di fatto

l'elevata omologia a livello genico di questi microrganismi.

In questo lavoro, l'identificazione dei ceppi di *V. diabolicus* deriva dal sequenziamento di un frammento di 284 bp che risulta troppo corto per soddisfare i criteri individuati per i marker filogenetici da Zeigler (2003). Tuttavia tale risultato è da considerarsi attendibile in quanto le sequenze ottenute presentano un'omologia del 100% con le sequenze di *V. diabolicus* depositate in GenBank, mentre differiscono rispetto alle sequenze di *V. parahaemolyticus* di 3 basi, di 5 basi rispetto a *V. mytili*, di 7 rispetto a *V. alginolyticus* e di 8 rispetto a *V. natriegens*.

Inoltre l'assenza di amplificazione dei frammenti legati ai geni *tox-R* e *tl*, permette di escludere ulteriormente *V. parahaemolyticus*, mentre l'uso di chiavi dicotomiche basate su test fenotipici consente di escludere *V. mityli* e *V. alginolyticus*.

Sulla base delle chiavi dicotomiche primarie per l'identificazione di tutte le specie di *Vibrio* (Noguerola e Blanch, 2008), che si basano sui test arginino deidrolasi (A), lisina decarbossilasi (L) e ornitina decarbossilasi (O), i campioni identificati dal sequenziamento come *V. diabolicus* sono caratterizzati da un profilo A -, facilmente distinguibili da *V. mityli*, che ha un profilo A +. Invece *V. diabolicus* e *V. alginolyticus*, presentanti entrambi profili A -, L +, O +, possono essere differenziati tra di loro per la resistenza al fattore vibriostatico O129. Infatti *V. diabolicus* è sensibile ad una concentrazione pari a 10 µg, mentre i ceppi di *V. alginolyticus* mostrano un comportamento variabile a basse concentrazioni (Ripabelli *et al.*, 2003) e sensibilità a concentrazioni di 150 µg. In questo

lavoro i ceppi identificati come *V. diabolicus* sono risultati sensibili al fattore vibriostatico a basse concentrazioni, confermando quindi l'identificazione biomolecolare.

Infine, oltre ai ceppi di *V. parahaemolyticus* e *V. diabolicus*, il sequenziamento ha permesso di identificare 1 ceppo di *V. aestuarianus* e 6 di *V. harveyi*, specie riconducibili alla microflora autoctona non potenzialmente pericolose per la salute umana, e 12 ceppi di *V. alginolyticus* ed 1 di *V. cholerae*, potenzialmente patogeni per i quali tuttavia non sono state condotte ulteriori analisi sierologiche o di valutazione delle proprietà tossinogene.

In conclusione, tra i vibrioni isolati, prevalgono quelli legati all'ambiente, mentre i ceppi di *V. parahaemolyticus*, isolati nel 6% dei campioni, non possedendo fattori di virulenza, non costituiscono un rischio per la salute pubblica.

I dati della presente ricerca confermano la difficoltà a giungere ad una corretta identificazione dei vibrioni isolati dall'ambiente acquatico mediante metodiche di isolamento tradizionali e test biochimici. Le prime risultano infatti caratterizzate da una scarsa specificità, mentre le chiavi dicotomiche proposte da Noguerola e Blanch (2008) basate sull'uso combinato di almeno 14 test biochimici, risultano di difficile applicazione e presentano un potere discriminatorio pari al 90% nella maggior parte dei casi. Risulta pertanto indispensabile affiancare le metodiche tradizionali con le metodiche biomolecolari al fine di confermare l'identificazione.

Il lavoro è stato realizzato con il finanziamento per la ricerca corrente del Ministero della Salute.

BIBLIOGRAFIA

- Bej A.K., Patterson D.P., Brasher C.W., Vickery M.C.L., Jones D.D., Kaysner C.A. "Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*". *Journal of Microbiological Methods*, 36, 215-225, 1999.
- Croci L., Suffredini E., Cozzi L., Toti L., Ottaviani D., Pruzzo C., Serratore P., Fischetti R., Goffredo E., Loffredo G., Mioni R., *V. parahaemolyticus* Working Group. "Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *V. parahaemolyticus*". *Journal of Applied Microbiology*, 102, 229-237, 2007.
- Dileep V., Kumar H.S., Kumar Y., Nishibuchi M., Karunasagar I., Karunasagar I. "Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment". *Letters in Applied Microbiology*, 36, 423-427, 2003.
- Food and Drug Administration, U.S. Centre of Food Safety and Applied Nutrition, Bacteriological Analytic Manual *online*, Chapter 9, "*Vibrio*", Maggio 2004. In: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html> accesso 24/4/2008.
- ISO 8914:1990 – Microbiology – General guidance for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*.
- Janda J.M., Powers C., Bryant R.G., Abbott S.I. "Current perspective on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp". *Clinical Microbiology Reviews*, 1, 245-267, 1988.
- Hervio-Heath D., Colwell R.R., Derrien A., Robert-Pillot A., Fournier J.M., Pommeuy M. "Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of Francia". *Journal of Applied Microbiology*, 92, 1123-1135, 2002.
- Kaufman G.E., Myers M.L., Pass C.L., Bej A.K., Kaysner C.A. "Molecular analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from human patients and shellfish during US Pacific north-west outbreaks". *Letters in Applied Microbiology*, 34, 155-161, 2002.
- Kim Y.B., Okuda J., Matsumoto C., Takahashi N., Hashimoto S., Nishibuchi M. "Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *tox-R* gene". *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1173-1177, 1999.
- La Neve F., Pedonese F., Nuvolosi R., D'Ascenzi C., Dalmasso A., Civera T. "Identificazione di vibroni di interesse sanitario in orate di allevamento mediante metodiche biomolecolari". *Atti del Congresso S.I.S.Vet.*, LX, 431-432, Terrasini (Pa), 2006.
- Martinez-Urtaza J., Lozano-Leon A., DePaola A., Ishibashi M., Shimada K., Nishibuchi M., Liebana E. "Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American Pandemic isolates". *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4672-4678, 2004.
- Martinez-Urtaza J., Simental L., Velasco D., DePaola A., Ishibashi M., Nakaguchi Y., Nishibuchi M., Carrera-Flores D., Rey-Alvarez C., Pousa A. "Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe". *Emerging Infectious Diseases*, 11, 1319-1320, 2005.
- Ministero della Salute – comunicazione Prot. DGVA III del 15/9/2005 relativo al parere dell'Istituto Superiore di Sanità a seguito della conclusione del gruppo di lavoro su *V. parahaemolyticus* nei prodotti della pesca.
- Noguerola I., Blanch A.R. "Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys". *Journal of Applied Microbiology*, 41, 5654-5659, 2008.
- O'Hara C.M., Sowers E.G., Bopp C.A., Duda S.B., Strockbine N.A. "Accuracy of six commercially available systems for identification of members of the family *Vibrionaceae*". *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5654-5659, 2003.
- Okuda J., Ishibashi M., Abbott S.L., Janda J.M., Nishibuchi M. "Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the west coast of the United States". *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 1965-1971, 1997.
- Ottaviani D., Santarelli S., Bacchiocchi S., Masini L., Ghittino C., Bacchiocchi I. "Presence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in mussel from the Adriatic sea, Italy". *Food Microbiology*, 22, 585-590, 2005.
- Raguénès G., Christen R., Guezennec J., Pignet P., Barbier G. "*Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 989-995, 1997.
- Ripabelli G., Grasso G.M., Sammarco M.L., Luzzi I. "Procedure di isolamento e caratterizzazione di *Vibrio* spp. di importanza clinica". *Rapporti ISTISAN* 97/31.
- Ripabelli G., Sammarco M., Mclauchlin J., Fanelli I. "Molecular characterisation and antimicrobial resistance of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio alginolyticus* isolated from mussels (*Mytilus galloprovincialis*)". *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 119-126, 2003.
- Thompson F.L., Iida T., Swings J. "Biodiversity of *Vibrios*". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 403-431, 2004.
- Thompson F.L., Gevers D., Thompson C.C., Dawyndt P., Naser S., Hoste B., Munn C.B., Swings J. "Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis". *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5107-5115, 2005.
- Ward L.N., Bej A.K. "Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by the use of multiplexed Real-Time PCR with TaqMan fluorescent probes". *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2031-2042, 2006.
- Zeigler D.R. "Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 53, 1893-1900, 2003.

