

ISOLAMENTO E GENOTIPIZZAZIONE DI *AEROMONAS* SPP. IN ALIMENTI DI PRONTO CONSUMO. RISULTATI PRELIMINARI

ISOLATION AND GENOTYPING OF AEROMONAS SPP. IN READY-TO-EAT FOODS. PRELIMINARY RESULTS

Montemurro F., Martino M. E., De Pasquale F., Balzan S., Cardazzo B., Novelli E., Fasolato L.
Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria. Università degli Studi di Padova

SUMMARY

The taxonomy of the genus *Aeromonas* is constantly changing and it is important that strains are identified and carefully differentiated. The aim of this preliminary investigation was to assess the presence of *Aeromonas* spp. in RTE foods from supermarkets and sushi Take Away and stored at refrigeration temperature. Particular attention was given to the choice of culture media in order to assess their ability to differentiate *Aeromonas* spp. and to perform subsequent phylogenetic analysis and the characterization of the species isolated.

KEYWORDS

Aeromonas spp., ready-to-eat, phylogenetical analysis

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni si è osservata la presenza, negli alimenti, di agenti patogeni finora non considerati pericolosi per l'uomo, definiti "patogeni emergenti"; tra questi, alcune specie, come le *Aeromonadaceae*, hanno acquistato un importante significato sanitario. Le specie appartenenti al genere *Aeromonas* sono spesso associate unicamente ad ambienti acquatici, molti dati suggeriscono che la maggior parte degli isolati da casi umani derivano dall'ingestione di acqua contaminata; tuttavia, un'altra via frequente di infezione è rappresentata dagli alimenti (vegetali o di origine animale) esposti alle contaminazioni attraverso processi di irrigazione o altre operazioni "farm-to-table" (1; 2). L'aumentata richiesta, da parte dei consumatori, di alimenti "freschi" sottoposti a blandi trattamenti termici, di prodotti pronti a cuocere (Ready-To-Cook foods, RTC) o pronti al consumo (Ready-To-Eat, RTE), ha in gran parte contribuito all'incremento delle MTA (Malattie a Trasmissione Alimentare). A questo scenario si devono aggiungere altri fattori, quali l'aumento della popolazione maggiormente suscettibile alle

MTA, indicata con l'acronimo YOPI (Young Old Pregnant Immunocompromised) e lo sviluppo di ceppi di *Aeromonas* spp. resistenti agli antibiotici e alla clorazione dell'acqua (3). Le specie maggiormente coinvolte in episodi di MTA sono: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas veronii* biovar *sobria* (4). Questi batteri, causa di gastroenteriti e sintomatologia non enterica sia in adulti che in bambini, sono stati isolati da acqua dolce, acqua salata, da differenti alimenti e da pazienti con diarrea. La capacità di crescere e produrre tossine a temperatura di refrigerazione aumentano il rischio di malattia alimentare legata alla presenza di *Aeromonas* (5; 6; 7). La tassonomia del genere *Aeromonas* è in continua evoluzione ed è importante che i ceppi siano identificati accuratamente, considerando che potrebbero differenziarsi per la sensibilità nei confronti degli antibiotici, per i meccanismi patogenetici (4) e che spesso si compiono errori di identificazione confondendo *Aeromonas* spp. con *Escherichia coli* e *Vibrio* spp. (3). Questa indagine preliminare ha voluto stimare la presenza di *Aeromonas* spp. in alimenti RTE conservati a temperatura di refrigerazione, provenienti dalla GDO. Particolare attenzione è stata rivolta alla scelta dei terreni di

coltura per valutare la loro capacità differenziale nei confronti di *Aeromonas* spp. e alla successiva conferma molecolare delle specie isolate.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 15 campioni di prodotti RTE a fronte di un numero più cospicuo di campioni calcolato in base alle prevalenze di *Aeromonas* spp. riportate in letteratura, utilizzando il software WinEpiscope 2.0 (8) (Tabella 1). Il campionamento è stato effettuato tra maggio e giugno 2010 presso ipermercati e sushi Take Away di Padova. I campioni, appena prelevati, sono stati trasportati in laboratorio in contenitore refrigerato e analizzati entro 2 ore dal prelievo. In condizioni di sterilità, 25 g di alimento sono stati addizionati a 225 ml di acqua peptonata tamponata (BPW, Biokar diagnostics) e omogeneizzati mediante stomacher (PBI International, Milan, Italy). Si è proceduto alla conta della carica microbica totale (CMT), dei coliformi a 30°C e alla determinazione qualitativa e quantitativa di *Aeromonas*. Le diluizioni decimali sono state seminate in Plate Count Agar (PCA, Oxoid), Violet Red Bile Agar (VRB, Oxoid) e su *Aeromonas* Starch DNA Agar Base (Biolife) (9), CIN Agar Base (Biolife) (2) e GSP Agar (*Pseudomonas* *Aeromonas* Selective Agar Base, Merck). Per la valutazione qualitativa di *Aeromonas*, l'omogenato è stato incubato a 28 °C e seminato dopo 24 h. Le piastre sono state incubate alla stessa temperatura per 24 h. Da ciascun terreno selettivo sono state selezionate 5 colonie con morfologia tipica e 5 atipiche per un preliminare screening biochimico mediante colorazione di Gram, test dell'ossidasi e O/F (Hugh Leifson Base, Biolife). Gli isolati che si presentavano Gram negativi con metabolismo ossidativo/fermentativo e ossidasi positivi nonché gli isolati atipici, sono stati sottoposti ad analisi molecolare mediante sequenziamento del gene ribosomale 16S. Per la caratterizzazione degli isolati considerati sono stati scelti due geni housekeeping (*gyrB*, *groL*).

Tutte le sequenze parziali e complete disponibili dei due geni sono state scaricate dal database on-line Genbank e quindi allineate mediante il software ClustalW Multiple Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). I primer sono stati disegnati nelle regioni maggiormente conservate mediante il software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in un volume finale di 20 µl utilizzando un termociclatore Euroclone One Advanced (Celbio, Milan, Italy). Il sequenziamento bidirezionale dei due geni target è stato effettuato utilizzando gli stessi primer impiegati nelle reazioni di amplificazione

e le sequenze sono state ottenute utilizzando un sequenziatore ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied BioSystem Foster City, CA). Tutte le sequenze sono state verificate mediante BLAST. L'analisi filogenetica delle sequenze concatenate è stata effettuata tramite il software MEGA v4.1 e l'albero filogenetico è stato costruito mediante il metodo di neighbor-joining. Al fine di una completa comparazione, analisi e caratterizzazione filogenetica sono state aggiunte anche le sequenze di altri 22 ceppi di riferimento e type-strain delle principali specie di *Aeromonas* e 16 ceppi di riferimento provenienti da casi di tossinfezioni umane.

Tabella 1. Descrizione del campionamento.

RTE	N. campioni previsti	N. campioni analizzati
Vegetali (IV Gamma)	10	4 (Insalata mista)
Prodotti lattiero-caseari	52	10 (Mozzarella di bufala)
Sushi, sashimi	24	1 (Salmone)

RISULTATI

In tabella 2 sono riportati i risultati riguardanti le analisi microbiologiche quali-quantitative. Lo screening biochimico ha permesso di selezionare 110 isolati, di cui 35 sono stati confermati come appartenenti al genere *Aeromonas* mediante sequenziamento del gene 16S. L'analisi biomolecolare ha evidenziato una sovrastima delle colonie dalla morfologia tipica in tutti i terreni testati sia nella valutazione quantitativa che qualitativa. Inoltre l'analisi delle colonie atipiche ha evidenziato la presenza di falsi negativi (f) che dovrebbe essere considerata nella valutazione della prevalenza di *Aeromonas* spp. L'analisi biomolecolare ha evidenziato l'assenza di *Aeromonas* in campioni di mozzarella di bufala campana DOP, come riportato in precedenza in Italia nei prodotti lattiero caseari (10), confermando invece la presenza di *Aeromonas* in 4 campioni di insalata ed in uno di salmone crudo in linea con quanto riportato da altri autori (11, 12). Le relazioni filogenetiche dei ceppi isolati sono state analizzate mediante la costruzione di un albero neighbor-joining ottenuto dalle sequenze concatenate dei due geni housekeeping (fig.1). Allo scopo, sono stati selezionati 20 dei 35 ceppi confermati con l'analisi molecolare. L'impiego dei ceppi type-strain, rappresentativi delle specie più diffuse, ha permesso di assegnare i taxa ai ceppi di campo genotipizzati. Gli isolati appartengono alle seguenti specie: *A. hydrophila*, *A. media-caviae*, *A. veronii*, *A. allosaccharophila* e *A. salmonicida*. I ceppi prove-

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Il conteggio dei coliformi evidenzia, in alcuni casi, una sovrapposizione delle UFC con quelle rilevate nei conteggi di *Aeromonas*, suggerendo quindi possibili problemi di sovrastima dei coliformi stessi, specie in quei campioni che presentano basse cariche microbiche (13). Dal confronto tra i tre terreni di coltura, utilizzati per l'isolamento di *Aeromonas*, si evince una diversa capacità selettiva. Nel caso del CIN la presenza di colonie con morfologia atipica e la difficile valutazione di quelle che presentano morfologia tipica, descritta come "bull's eye-like", simile ad altre specie batteriche (2), possono influire sul conteggio finale. A differenza del CIN, l'AE e il GSP hanno evidenziato una maggiore selettività, infatti, la conta in piastra è stata confermata con l'analisi biomolecolare in tutti i casi eccetto che in uno per il GSP, evidenziando una sovrastima delle UFC. Lo studio filogenetico evidenzia la presenza di diverse specie di *Aeromonas* in una stessa matrice alimentare, ma per avere un quadro più chiaro e completo sarà opportuno approfondire gli studi avvalendosi di altri geni housekeeping ed indagando la presenza di eventuali fattori di virulenza correlati ai genotipi studiati. Il successivo confronto tra i ceppi isolati da casi umani e gli isolati dagli alimenti permetterà di studiare nel dettaglio l'epidemiologia molecolare del genere *Aeromonas*. I risultati di questa indagine preliminare mostrano come sia necessario l'utilizzo di almeno due terreni di coltura per isolare differenti ceppi di *Aeromonas* e che l'analisi biomolecolare può essere un valido mezzo di conferma e di identificazione delle varie specie residenti.

BIBLIOGRAFIA

1. McMahon M.A.S, Wilson I.G. (2001). The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *Int J of Food Microbiol.* 70:155-162.
2. Janda J.M. and Abbott S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews.* 23:35-73.
3. Galindo C.L., Sha J., Fadl A. A., Pillai L. L. and Chopra A. K. (2006). Host Immune Responses to *Aeromonas* Virulence Factors. *Current Immunology Rev.* 2:13-26.
4. Doyle M.P. and Beuchat L. R.. (2007). *Food Microbiology. Fundamentals and frontiers.* Third Edition. 382.
5. Kirov S.M., Ardestani EK, Hayward LJ (1993). The growth and expression of virulence factors at refrigeration temperature by *Aeromonas* strains isolated from foods. *Int J of Food Microbiol.* 20: 159-68.
6. Majeed K.N., Egan AF, Mac Rae IC. (1990). Production of exotoxin by *Aeromonas* spp. at 5 degrees C. *J Appl Bacteriol;* 69: 332-7.
7. Uyttendale M., Neyts K., Vanderswalmen H., Notebaert E., Debevere J. (2004). Control of *Aeromonas* on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chlorinated water, or thyme essential oil solution. *Int J of Food Microbiol.;* 90: 263-371.
8. Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, Noordhuizen, J.P., Frankena, K. (2001). WIN: EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec;* 148(18) 567-72.
9. Palumbo S., Abeyta C., Stelma G., Wesley W. I., Wei C., Koberger A. J., Franklin K. S., Schroeder-Tucker L. and Murano E. A. (2001). *Microbiological Examination of Foods.* Chapter 30, 283-290.
10. Villari P., Crispino M., Montuori P., Stazione S. (2000). Prevalence and molecular characterization of *Aeromonas* spp. In ready-to-eat foods in Italy. *J Food Prot.* 63 (12):1754-7.
11. Kingombe C. I.B., Huys G., Howald D., Luthi E., Swings J., Jemmi T. (2004). The usefulness of molecular techniques to assess the presence of *Aeromonas* spp. harboring virulence markers in foods. *Int J of Food Microbiol.* 94:113-121
12. Xanthopoulos V., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E. (2010). Occurrence and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in minimally processed fresh vegetable salads. *Food Control.;* 21: 393-398.
13. Firstenberg-Eden R., Foti D., McDougal S., Beck S. (2004). Performance comparison of the BioSys optical assay and the violet red bile agar method for detecting coliforms in food products. *J. Food Prot.* 67(12):2760-6