

Fattori di virulenza e farmaco resistenza nei *Vibrio* spp. isolati da ecosistemi marini

A. Deriu, E. Casazza*, L.A. Sechi, S. Zanetti

Dipartimento di Scienze Biomediche-Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica,
Università degli Studi di Sassari, Sassari

*Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Sassari, Sassari

Riassunto. Sono stati esaminati 75 ceppi di vibrioni appartenenti ad otto diverse specie, allo scopo di rilevare la presenza di antibiotico resistenza, plasmidi e geni di virulenza tipici di *Vibrio cholerae*. I risultati ottenuti suggeriscono l'importanza del monitoraggio microbiologico dei vibrioni, allo scopo di valutare il rischio di infezioni connesse alla presenza di ceppi potenzialmente patogeni.

Abstract. Seventy-five *Vibrio* strains belonging to eight different species were examined for the presence of antibiotic resistance, plasmids and different virulence genes previously found in pathogenic *Vibrio cholerae* strains. Our results suggest that is important to carry out a microbiological monitoring of *Vibrio* species to evaluate the health risk associated with the occurrence of potentially pathogenic vibrios.

Introduzione

I Vibrioni sono microrganismi autoctoni dell'ambiente acquatico, ampiamente diffusi nelle acque dolci e marine, nelle acque degli estuari, nei sedimenti (4, 9, 19), sono responsabili d'infezioni di ferite, setticemie e gastroenteriti. Soprattutto quest'ultima patologia è frequente in popolazioni che, per costume popolare, sono solite consumare grandi quantità di pescato crudo (1, 4, 6, 13).

I vibrioni si trovano anche sull'epidermide e nel contenuto intestinale di molti animali marini, vertebrati e invertebrati (3, 6, 7). Per quanto riguarda la fauna ittica, poiché i vibrioni sono presenti prevalentemente nel loro intestino, se questi vengono eviscerati si elimina una grande riserva di batteri, ma aumenta la probabilità di contaminazione della carne. Inoltre questa probabilità aumenta ulteriormente se il pesce viene lavato con acqua che può essere a sua volta contaminata. Nel caso dei molluschi bivalvi il problema principale è rappresentato dalla capacità di tali organismi di concentrare i batteri attraverso la filtrazione.

Per la maggior parte dei vibrioni, fatta eccezione per i *Vibro cholerae* 01 ed 0139, i meccanismi di patogenicità sono scarsamente conosciuti. L'operone

ctxAB, che codifica per le subunità A e B della tossina colerica, risiede nel genoma del fago ctxØ, che si trova come profago nel cromosoma di ceppi patogeni di *V. cholerae* (11). È stato dimostrato (12) che il fago può infettare ceppi non tossigenici. L'attacco del fago ha inizio quando una fibra caudale entra in contatto con l'appropriato recettore, che in *V. cholerae* è il pilo TCP (che a sua volta è codificato da un fago). I geni che codificano il pilo (geni tcp) si trovano in una larga regione del DNA di *V. cholerae* denominata *Vibrio cholerae pathogenicity island* (VPI) (11, 12). Analisi molecolari hanno mostrato che ceppi non-01 di *V. cholerae* positivi alla vpi, non possiedono i geni codificanti per il pilo TCP (12). Il fago è capace di infettare altre specie di vibrio (12,14). Altri geni di virulenza toxR, toxS, toxRS, toxT, tcpA, ace, zot, e l'intera vpi oltre a quelli che codificano per la CT, sono stati rilevati in numerose specie di *Vibrio* (18, 22). Alcuni geni come ace e zot fanno parte del genoma del fago, altri come toxR, toxS, toxRS e il gene tcpA fanno parte della vpi, contenuta a sua volta nel genoma batterico (10,12).

Scopo del lavoro è stato quello di rilevare la presenza e quindi la disseminazione dei geni di virulenza in vibrioni isolati da ambiente acquatico delle coste

settecentrali sarde. Inoltre, poiché l'uso sconsiderato ed eccessivo dei farmaci si ripercuote anche sull'equilibrio degli ecosistemi acquatici, flora, fauna e di conseguenza sull'uomo, si è voluto studiare la sensibilità agli antibiotici dei vibriani ed eventuale correlazione con presenza di plasmidi.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati 75 ceppi di vibriani, isolati da acque e molluschi bivalvi eduli, appartenenti ad otto differenti specie: *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. cholerae non 01*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, e *V. fischerii*.

I microrganismi sono stati isolati da campioni di acqua e molluschi bivalvi sottoposti ad una fase di pre-arricchimento in acqua peptonata alcalina a pH 8,6 con 1% di NaCl. Successivamente è stato usato come terreno di coltura per i vibriani il TCBS agar (Thiosulfate-citrate-bile-sucrose), i campioni sono stati quindi incubati per 18-24h a 25°C. Dopo incubazione i ceppi batterici cresciuti in TCBS che davano luogo a colonie gialle o a colonie verdi sono state identificate con il sistema API20 E (BioMerieux). L'estrazione del DNA è stata eseguita mediante la tecnica di *Wilson* come riportato in precedenti lavori (18, 23).

La ricerca dei geni di virulenza è stata eseguita mediante la *polimerase chain reaction* (PCR), con i primers specifici per l'amplificazione dei geni: *ctxA*, *zot*, *tcpA*, *toxR*, *toxS*, *VP*, allo scopo di studiare la modalità di diffusione dei fattori di virulenza nell'ambiente acquatico.

Per il gene *tcpA*: 1 ciclo a 94°C per 1 minuto, 35 cicli così suddivisi: 1 ciclo a 94°C per un minuto, 1 ciclo d'annealing a 54°C per 45 secondi, 1 ciclo a 72°C per 45 secondi, estensione finale a 72°C per 5 minuti. Per i geni *VPI*, *toxS*, *toxR*: 1 ciclo a 94°C per 1 minuto, 35 cicli così suddivisi: 1 ciclo a 94°C per minuto, 1 ciclo d'annealing a 56°C per 45 secondi ed estensione a 72°C per 45 secondi, 1 ciclo finale a 72°C per 5 minuti. Per i geni *ace*, *zot*, *ctxA*: 1 ciclo a 94°C per 1 minuto, 35 cicli a 94°C per 1 minuto, 1 ciclo d'annealing a 60°C per 45 secondi, estensione a 72°C per 45 secondi, 1 ciclo d'estensione finale a 72°C per 5 minuti. L'amplificazione è stata realizzata in termocicizzatore automatico HYBAID DNA THERMAL CYCLER INSTRUMENT (modello TR3CM 220). I geni amplificati sono stati visualizzati mediante elettroforesi in gel d'agarosio all'1.8% e colorazione con bromuro d'etidio.

L'estrazione e la purificazione dei plasmidi sono state eseguite mediante l'utilizzo del *Plasmid Miniprep Kit* (Labogen s.r.l.).

Per valutare la sensibilità ai farmaci è stata utilizzata la tecnica di *Kirby Bauer* attraverso il metodo della diffusione in piastre di agar e incubazione di 24 ore a 37°C. Sono stati saggiati 14 farmaci: ampicillina, piperacillina, amoxicillina, cefotaxime, ceftazidime, amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, ofloxacina, doxiciclina, ceftriaxone, trimetoprim-sulfametossazolo, imipenem, meropenem. La presenza di beta-lattamasi è stata valutata per mezzo di una cefalosporina cromogena (Nitrocefina, Becton Dickinson).

Risultati

Dall'analisi dei campioni di acqua e molluschi raccolti lungo la costa nord-orientale e nord-occidentale della Sardegna, sono stati isolati in prevalenza *V. alginolyticus* in oltre il 65% dei campioni analizzati, seguono *V. fluvialis* nel 9% degli isolamenti, 8% di *V. cholerae non 01*, 6.7% di *V. vulnificus*, infine 1.3% rispettivamente *V. hollisae* e *V. metschnikovii*.

I risultati della ricerca dei geni di virulenza *ctxA*, *zot*, *tcpA*, *toxR*, *toxS*, e "virulence pathogenic island" *VPI* sono mostrati nella tabella I. Solo 10 ceppi (13%) hanno amplificato il gene *VPI*. Il gene *tcpA* ha dato risultati positivi in 3 ceppi (4%), due specie di *V. alginolyticus* ed un *V. cholerae non 01*. Questi ceppi erano contemporaneamente positivi anche al gene *toxS*, ed i due *V. alginolyticus* anche al gene *VPI*. I geni *zot* e *ace* hanno generato una banda di amplificazione al peso molecolare atteso solo in un ceppo (1.3%). Il gene *ctxA* non è stato amplificato da nessun ceppo. I geni maggiormente espressi sono stati il *toxS* in 49 ceppi (65.3%) e il gene *toxR* in 33 ceppi (44%).

L'87% dei vibriani ha manifestato resistenza ad uno o più farmaci saggiati, soprattutto i beta-lattamici (Tab.II). Tale resistenza si è manifestata principalmente nei confronti dell'ampicillina con una percentuale pari allo 85% (64 ceppi). Tra le diverse specie il 75% erano *V. alginolyticus*, seguiti dai *V. cholerae non 01* (8%), *V. parahaemolyticus* (6%), *V. vulnificus* (5%), *V. fluvialis* (3%), *V. hollisae* e *V. metschnikovii* (1.6%) ciascuno. Elevata anche la resistenza nei confronti della piperacillina, espressa dal 32% dei *Vibrio* (24 ceppi) rispettivamente da *V. alginolyticus* (95.8%) e *V. cholerae non 01* (4.2%). L'amoxicillina è risultata inattiva nei confronti di 11 ceppi (15%) tutti rappresentati da *V. alginolyticus*. Riguardo le cefalosporine, la resistenza nei confronti del cefotaxime è stata manifestata da 4 ceppi (5.4%), tutti rappresentati da *V. alginolyticus*, solo un ceppo (1.3%) di *V. vulnificus* è risultato resistente al ceftazidime. Riguardo i carbapenemici, il meropenem è risultato inattivo su 3 ceppi (4%) rappresentati da

Tabella I. Geni amplificati sul totale di 75 ceppi *Vibrio* spp.

Geni di virulenza	Numero ceppi positivi	Percentuale
toxS	49	65.3%
toxR	33	44%
VPI	10	13.3%
tcpA	3	4%
zot	1	1.3%
ace	1	1.3%
ctxA	0	0%

Tabella II. Percentuali di antibiotico-resistenza dei 75 ceppi di *Vibrio* spp.

Antibiotico	Percentuale
AM	85%
PIP	32%
AMC	15%
CTX	5.4%
CAZ	1.3%
CRO	0%
MEM	4%
IMP	1.3%
AN	13.5%
GM	6.7%
DO	16%
OFX	30%
CIP	2.7%
SXT	0%

LEGENDA:

β -lattamici: AM ampicillina, PIP piperacillina, AMC amoxicillina, CTX cefotaxime, CAZ ceftazidime, CRO ceftriaxone, MEM meropenem, IMP imipenem.

Aminoglicosidici. AN amikacina, GM gentamicina

Tetraciline: DO doxiciclina

Chinoloni: OFX ofloxacina, CIP ciprofloxacina

Sulfamidici/diaminopirimidine:SXT, clotrimossazolo (sulfametossazolo/trimetoprim).

V.vulnificus (33%), *V.cholerae nonO1* (33%) e *V.alginolyticus* (33%). L'imipenem, infine, è risultato inattivo solo su un ceppo (1.3%) di *V. alginolyticus*. La resistenza ai β -lattamici è dovuta alla presenza di un gruppo eterogeneo di enzimi, le beta-lattamasi, che possono essere codificati sia da geni cromosomiali sia plasmidici (8, 24). Per valutare la presenza di beta-lattamasi è stato utilizzato il test del Nitrocefim, che ha dato esito positivo per il 44.6% de ceppi.

Tra i suddetti ceppi la percentuale maggiore di positività al test è stata espressa dai *V. alginolyticus* (60%), seguono *V. parahaemolyticus* (16%) e *V. vulnificus* (8%). Il *V. fluvialis*, *V. metschnikovii* ed i *V. hollisae* hanno dato esito positivo nel 4% dei ceppi. Tra gli aminoglicosidici, 10 ceppi (13.5%) erano resistenti alla amikacina (tutti *V.alginolyticus*), 5 ceppi (6.7%) alla gentamicina (tutti *V. alginolyticus*). Interessante l'elevata percentuale di resistenza alla doxiciclina dimostrata da 12 ceppi (16%) rappresentati da *V. alginolyticus* (75%), *V. vulnificus* (16.7%) e *V. parahaemolyticus* (8.3%). La resistenza nei confronti dell'ofloxacina si è manifestata in 22 ceppi (30%), tutti appartenenti alla specie *V. alginolyticus*, mentre solo 2 ceppi (2.7%) hanno mostrato resistenza alla ciprofloxacina (anche in questo caso tutti *V. alginolyticus*).

Tra i 75 ceppi di vibrioni in studio, poco meno della metà hanno evidenziato resistenza multipla agli antibiotici saggiati. Il 41.3% dei ceppi, si sono dimostrati resistenti ad un solo antibiotico nel 94% dei casi rappresentato dall'ampicillina. Il 4% dei ceppi di *Vibrio* è risultato resistente a due antibiotici; il 16% a tre antibiotici, il 9.3% a quattro antibiotici, il 10.7% a cinque antibiotici, infine due ceppi (2.7%) hanno mostrato resistenza a sei antibiotici. La specie che ha manifestato il maggior numero di resistenze multiple è il *Vibrio alginolyticus*, frequente l'associazione di due penicilline ed una cefalosporina.

Dei 75 ceppi studiati, 38 (51%), hanno mostrato la presenza di uno o più plasmidi. Questi 38 ceppi erano rappresentati da 35 *V. alginolyticus*, 2 *V. cholerae nonO1* e 1 *V. vulnificus*. Di questi, 25 *V. alginolyticus*, 1 *V. cholerae nonO1* ed 1 *V. vulnificus* hanno evidenziato la presenza di un solo plasmide (circa 26 kb). E' stata inoltre evidenziata in 9 ceppi (8 *V. alginolyticus* e 1 *V. cholerae nonO1*) la presenza di due plasmidi. Di questi, uno avente peso molecolare di circa 26 kb e l'altro di 4 kb. Altri 2 ceppi (tutti *V.alginolyticus*), hanno mostrato la presenza di tre plasmidi; uno di circa 26 kb, uno di 18 kb ed un altro di 10 kb.

Discussione

La ricerca condotta ha riguardato lo studio di diverse specie di vibrioni isolati da matrici ambientali. I risultati ottenuti dimostrano una ampia diffusione del genere *Vibrio* in diversi ecosistemi acquatici quali acque marine costiere, lagune, estuari. Inoltre, in accordo con altri autori, la specie maggiormente diffusa è risultata essere il *Vibrio alginolyticus*.

La frequenza dei ceppi batterici ambientali resistenti agli agenti antimicrobici sono naturalmente aumen-

tati come conseguenza dell'ampia diffusione ed uso degli antibiotici. L'elevata frequenza, pari all'87%, riscontrata durante la ricerca, suggerisce una pressione selettiva esercitata da agenti antimicrobici d'uso umano e animale, eliminati in modo non appropriato nell'ambiente. I vibriani con associate resistenze multiple, sono stati infatti isolati da aree lagunari, foci e zone costiere con elevate cariche d'indicatori d'inquinamento fecale. La resistenza maggiore si è dimostrata nei confronti dell'ampicillina con 64 ceppi resistenti su 75. Non sembra esserci correlazione fra numero di plasmidi e resistenza multipla agli antibiotici, tuttavia la maggiore espressione di resistenze multiple si riscontra in ceppi di vibriani isolati da ambienti ad elevato impatto antropico, particolarmente nei mesi estivi. Significativa sembrerebbe essere la correlazione fra resistenza all'ampicillina e la presenza di un plasmide a 26 kb nel 84% dei ceppi. Il 16% erano resistenti all'ampicillina pur non avendo il plasmide a 26 kb, è tuttavia possibile che il plasmide fosse presente ma in basso numero di copie, quindi non rilevabile.

La ricerca dei geni di virulenza ha consentito di evidenziare un'ampia diffusione dei geni ricercati. Lo studio sulle specie isolate ha infatti dimostrato come i geni presenti in vibriani isolati da patologie umane, possono essere presenti anche nei vibriani ambientali. Questi ultimi possono così trasformarsi da specie opportunistiche in *Vibrio* patogeni per l'uomo. Infatti la maggior parte dei *V. cholerae* isolati da pazienti affetti da colera, presentano contemporaneamente i geni *ctxA*, *tcp* e *toxR* (5). Anche in alcuni *V. cholerae non01* e *non-0139* sono stati trovati associati gli stessi geni (12) ciò dimostra un'ampia capacità di scambi genetici per acquisizione di DNA, da parte dei *V. cholerae*. I vibriani analizzati in questo lavoro hanno evidenziato, in due ceppi di *V. alginolyticus*, la contemporanea presenza dei geni *tcpA*, *toxS* e *VPI*. L'osservazione che un ceppo di *V. alginolyticus* ha evidenziato la presenza del gene *ace*, un ceppo di *V. alginolyticus* presentava il gene *zot*, dieci ceppi di *V. alginolyticus* erano positivi per *VPI*, dimostra che alcuni geni di virulenza possono circolare tra diverse specie di *Vibrio*.

L'analisi dei geni di virulenza associata allo studio della sensibilità agli antibiotici, permette di avere un quadro completo della diffusione di ceppi particolarmente virulenti o portatori di geni codificanti per la resistenza agli antibiotici.

Il monitoraggio microbiologico dei vibriani, la conoscenza delle resistenze agli antibiotici, e la ricerca dei geni di virulenza sono determinanti per lo studio delle modalità di diffusione dei fattori di virulenza nell'ambiente acquatico. Grazie al rilevamento mediante metodi molecolari è quindi possibile monito-

rare e rilevare la diffusione di un ceppo nell'ambiente, determinando l'entità dello spostamento e di conseguenza, le condizioni ambientali che possono favorirne o contrastarne la diffusione.

Bibliografia

1. Amaro C., Biosca E.G.. *Vibrio vulnificus* Biotype2, Pathogenic for Eels, Is Also an Opportunistic Pathogen for Humans. Applied and Environmental Microbiology, 1454-1458, 1996,
2. Amaro C., Lien-I Hor, Marco-Noales E., Bosque T., Founz B. and Alcaide E.. Isolation of *V. vulnificus* Serovar E from Aquatic Habitats in Taiwan. Applied and Environmental Microbiology, 1506-1510, 1992,
3. Belebona M.C., Andrei M.J., Bordas M.A., Zorilla I., Morinigo M.A., Borrego J.J.. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for Cultured Gilt- Head Sea-Bream (*Sparus Aurata* L.) Applied and Environmental Microbiology, 4269-4275, 1998.
4. Barbieri E., Falzano L., Fiorentini C., Pianetti A., Baffone W., Fabbri A., Mattarese P., Casiere A., Katouli, Kuhn I, Mollby R.R., Bruscolini F., Donelli G.. Occurrence Diversity, and Pathogenicity of Halophilic, *Vibrio* spp. and Non-01 *Vibrio cholerae* from Estuarine Waters along the Italian Adriatic Coast. Applied and Environmental Microbiology, 2748-2753, 1999.
5. Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Bhadra R.K., Ghosh A.N., Mitra R, Shimada T., Yamasaki S., Faruque S.M., Takeda Y.T., Colwell R.R., Nair G.B.. Virulence Genes in Environmental Strain of *Vibrio cholerae* Applied and Environmental Microbiology, 4022-4028, 2000.
6. Cipriani P.. Vibriani marini e infezioni alimentari. Microbiologia medica, vol. 9 numero 3, 1994.
7. Coleman S.S., Melanson D.M., Biosca E.G., Oliver J.D.. Detection of *Vibrio vulnificus* Biotypes 1 and 2 in Eels and Oysters by PCR. Amplification. Applied Environmental Microbiology, 1378-1382, 1996.
8. Deriu A., L.A. Sechi, M.P. Falchi, S. Zanetti. Dati preliminari sulla caratterizzazione dei fattori di virulenza in *Vibrio alginolyticus*. Giornale di Bacteriologia Virologia e Immunologia, 1, 31-35, 1998.
9. Deriu A., Sechi L.A., Zanetti S. Studio microbiologico delle acque della laguna di Calich (Sardegna nord-occidentale). Igiene Moderna 117, 301-305, 2002.
10. Faruque, S.M., Albert, M.J. and Mekalanos, J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62, 1301-1314, 1998.
11. Faruque S.M., M.N.Saha, A.K. Siddique, A.R.M. Alim, M.J.Albert, K.M.N. Islam, J.J.Mekalanos. Analysis of Clinical and Environmental Strain of Nontoxigenic *Vibrio cholerae* for susceptibility to CTX₂: Molecular Basis for Origination of New Strain with Epidemic Potential. Applied and Environmental Microbiology, 5819-5825, 2000.
12. Ghosh, C., Nandy, R.K., Dasgupta, S.K., Nair, G.B., Hall, R.H. and Ghose, A.C. A search for cholera toxin

- (CT), toxin coregulated pilus (TCP), the regulatory element ToxR and other virulence factors in non-01/non-0139 *Vibrio cholerae*. Microbial Pathogenesis 22, 199-208, 1997.
13. Islam M.S., M.K. Hasan, M.A. Miah, M. Yunus, K. Zaman, M.J. Albert. Isolation of *Vibrio cholerae* 0139 Synonym Bengal from The aquatic Environmental in Bangledeh: Implications for Disases Transmission. Applied and Environmental microbiology, 1684-1686, 1994.
 14. La Placa M.. Principi di Microbiologia medica. Soc Editrice Esculapio srl Bologna, pp.843, 2001.
 15. Marco-Noales E., E.G. Biosca, C. Amaro. *Effect of Salinità and Temperature on Long-Term Survival of the Eal Pathogen Vibrio vulnificus Biotype 2 (Serovar E)*. Applied and Environmental Microbiology, 1999, p. 1117-1126.
 16. Poli G., G. Cocuzza, G. Nicoletti. Microbiologia medica. Utet. Torino, pp. 773, 1993.
 17. Reina P.J., Palazon J.H.. Otitis media due to *Vibrio alginolyticus*: the risks of the mediterranean sea. Annals of Esperimental Pediatrics 39, 361-363, 1998.
 18. Sechi L.A., I. Duprè, A. Deriu, G. Fadda, S. Zanetti. Distribution of *Vibrio cholerae* virulence genes among different *Vibrio* species isolated in Sardinia, Italy. Journal of Applied Microbiology, 88, 475-481, 2000.
 19. Shikulov V.A., Khaitovich A.B., Bogatyreva L.M.. Isolation of alophic *Vibrio* from Humanas and Environment. Zhentralback Microbiology Epidemiology ad Immunobiology,. 38-40, 1996.
 20. Tamplin M.L., Capers G.M.. Persistence of *Vibrio vulnificus* in Coast Oyers, *Crassostrea virginica*, Exposed to Seawater Disinfected with UV Light. Applied and Environmental Microbiology, 1506-1510, 1992.
 21. Vartian C.V., Septimus E.J.. Osteomyelitis caused by *Vibrio vulnificus*. The Journal of Infection Disease, 161: 363, 1990.
 22. Zanetti S., Deriu A., Volterra L., Falchi M.P., Molicotti P., Fadda G., Sechi L.A.. Virulence factors in *Vibrio alginolyticus* strains isolated from aquatic environments. Analisi di Igiene, Medicina Preventiva e di Comunità, 12, 487-491, 2000.
 23. Zanetti S., Sechi L.A., Duprè I., Sanguinetti M., Fadda G. Differentiation of *Vibrio alginolyticus* strani isolated from Sardinian waters by ribotyping and a new rapid PCR fingerprinting method. Applied and Environmental Microbiology p. 65, 1871-1875, 1999.
 24. Zanetti S., T. Spanu, A. Deriu, L. Romano, L.A. Sechi, G. Fadda. In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. Isolated from the Environmental. International of Antimicrobial Agents, 407-409, 1997.