



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale**  
**Biologia Molecolare e Applicata Curriculum Tecnologie Biologiche**

**CAMBIAMENTO CLIMATICO E DIFFUSIONE GLOBALE  
DI *VIBRIO CHOLERAE* NON O1 E NON O139:  
STUDIO DEI FATTORI DI PATOGENICITÀ**

**CLIMATE CHANGE AND GLOBAL SPREAD  
OF NON O1 AND NON O139 *VIBRIO CHOLERAE*:  
STUDY OF PATHOGENICITY FACTORS**

Tesi di Laurea Magistrale

di:

Dott.ssa Di Lillo Concettina

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa

Biavasco Francesca

Correlatori:

Dott.ssa Rocchegiani Elena

Dott.ssa Leoni Francesca

**Sessione estiva**

**Anno Accademico 2020/2021**

*A loro, il mio tutto.*

## INDICE

<b><i>1. Introduzione</i></b>	<b>1</b>
<b><i>1.1 Caratteristiche generali di V. cholerae non O1 e non O139</i></b>	
<b><i>1.2 Vibrionaceae</i></b>	<b>3</b>
<b><i>1.3 Genere Vibrio</i></b>	<b>4</b>
<b><i>1.4 Caratteristiche ecologiche di crescita del genere Vibrio</i></b>	<b>7</b>
<b><i>1.5 Classificazione di Vibrio patogeni per l'uomo</i></b>	<b>8</b>
<b><i>1.6 Vibrio cholerae</i></b>	<b>13</b>
<b><i>1.7 Classificazione dei sierogruppi</i></b>	<b>15</b>
<b><i>1.8 Genoma V. cholerae</i></b>	<b>20</b>
<b><i>1.9 Ricerca di V. cholerae da campioni clinici</i></b>	<b>21</b>
<b><i>1.10 Ricerca di V. cholerae da campioni alimentari</i></b>	<b>22</b>
<b><i>1.11 Ricerca di V. cholerae da campioni ambientali (acque superficiali)</i></b>	<b>24</b>
<b><i>1.12 Identificazione e caratterizzazione di V. cholerae</i></b>	
<b><i>1.13 Identificazione biochimica</i></b>	<b>26</b>

<b><i>1.14 Identificazione molecolare</i></b>	<b>28</b>
<b><i>1.15 Patogenesi</i></b>	<b>30</b>
<b><i>1.16 Il colera</i></b>	<b>31</b>
<b><i>1.17 Fattori di virulenza</i></b>	<b>33</b>
<b><i>1.17.1 Tossina Colerica (CT)</i></b>	<b>34</b>
<b><i>1.17.2 La tossina zonula occludens (Zot)</i></b>	<b>37</b>
<b><i>1.17.3 Enterotossina colerica accessoria (Ace)</i></b>	<b>38</b>
<b><i>1.17.4 Vibrio cholerae citolisina (VCC)</i></b>	<b>39</b>
<b><i>1.17.5 Emoagglutinina proteasi (HAP)</i></b>	<b>40</b>
<b><i>1.18 Fattori di colonizzazione</i></b>	<b>41</b>
<b><i>1.18.1 Il pilo co-regolato alla tossina (TCP)</i></b>	
<b><i>1.18.2 Emoagglutinina sensibile al mannosio (MSHA)</i></b>	<b>42</b>
<b><i>1.18.3 Sistemi di secrezione (T2SS, T3SS, T6SS)</i></b>	
<b><i>1.19 Epidemiologia</i></b>	<b>44</b>
<b><i>1.19.1 Epidemiologia in Italia</i></b>	<b>49</b>
<b><i>2. Vibrio cholerae non O1 e non O139</i></b>	<b>50</b>

<b>2.1 <i>Vibrio cholerae non O1 e non O139</i></b>	
<b>2.2 <i>Identificazione e caratterizzazione di V. cholerae non O1 e non O139</i></b>	<b>51</b>
<b>2.3 <i>Patogenesi</i></b>	<b>52</b>
<b>2.4 <i>Manifestazioni cliniche extra-intestinali</i></b>	<b>54</b>
<b>2.5 <i>Fattori di virulenza</i></b>	
<b>2.5.1 <i>Enterotossina stabile al calore (ST)</i></b>	<b>55</b>
<b>2.5.2 <i>Tossina di Cholix (Chx)</i></b>	<b>56</b>
<b>2.5.3 <i>Il sistema di secrezione di tipo III (T3SS)</i></b>	<b>59</b>
<b>2.6 <i>Epidemiologia di Vibrio cholerae non O1 e non O139</i></b>	<b>61</b>
<b>2.7 <i>Vibrio non tossigeni e cambiamento climatico</i></b>	<b>64</b>
<b>2.8 <i>Prodotti della pesca</i></b>	<b>66</b>
<b>3. <i>Scopo della ricerca</i></b>	<b>68</b>
<b>3.1 <i>Scopo della ricerca</i></b>	
<b>4. <i>Materiali e metodi</i></b>	<b>70</b>
<b>4.1 <i>Metodiche diagnostiche di ricerca</i></b>	

<i>4.2 Ceppi batterici</i>	
<i>4.3 Caratterizzazione di Vibrio cholerae, metodi microbiologici</i>	<b>71</b>
<i>4.4 Estrazione diretta tramite lisi</i>	
<i>4.5 Estrazione tramite colonnine di silice magnetiche</i>	<b>72</b>
<i>4.6 Metodi molecolari</i>	<b>74</b>
<i>4.6.1 PCR (Polymerase Chain Reaction) classica</i>	
<i>4.6.2 Identificazione Regione Spaziatrice Intergenica (ISR)</i>	<b>75</b>
<i>4.6.3 PCR per rilevamento del gene stn/sto</i>	<b>76</b>
<i>4.6.4 PCR per rilevamento del gene chxA</i>	<b>77</b>
<i>4.6.5 PCR per rilevamento dei geni vcsV2 e vcsC2</i>	<b>79</b>
<i>4.7 Elettroforesi</i>	<b>80</b>
<i>4.8 Purificazione dei campioni</i>	<b>82</b>
<i>4.9 Sequenziamento</i>	
<i>4.10 Analisi Bioinformatiche</i>	<b>85</b>
<i>4.10.1 BioEdit</i>	
<i>4.10.2 BLAST, NCBI</i>	<b>86</b>

<i>4.10.3 Clustal W</i>	<b>87</b>
<i>4.10.4 Mega X</i>	<b>88</b>
<b>5. Risultati</b>	<b>90</b>
<i>5.1 Analisi Bioinformatiche e Risultati</i>	
<i>5.2 Distribuzione dei geni associati alla virulenza</i>	<b>93</b>
<i>5.3 Analisi di sequenza per il gene stn/sto</i>	<b>97</b>
<i>5.4 Studio bioinformatico del gene stn/sto</i>	<b>99</b>
<i>5.5 Analisi di sequenza per il gene chxA</i>	<b>104</b>
<i>5.6 Studio bioinformatico del gene chxA</i>	<b>110</b>
<b>6. Conclusioni</b>	<b>125</b>
<i>6.1 Discussione e conclusioni</i>	
<b>7. Bibliografia</b>	<b>132</b>
<b>Ringraziamenti</b>	

## Capitolo primo

### INTRODUZIONE

#### *1.1 Caratteristiche generali di *V. cholerae* non O1 e non O139*

Il *Vibrio cholerae* è un batterio naturale degli ecosistemi acquatici di tutto il pianeta (Vezzulli, 2020). I sierogruppi O1 e O139 del *V. cholerae* sono causa di epidemie di colera nei paesi in via di sviluppo e circa 499.447 casi d'infezione e 2990 decessi all'anno sono riportati nel mondo dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS, 2019).

Al contrario, i sierogruppi di *V. cholerae* differenti da O1 e O139, classificati come *Vibrio cholerae* non O1/O139 (NCVs), non sono associati al colera epidemico ma possono causare altri tipi di malattie con sintomatologia che varia da una gravità lieve (ad es. gastroenterite, otite, ecc.) a pericolosa per la vita (ad es. fascite necrotizzante). Questo tipo d'infezioni, se prima trascurate, ora negli ultimi anni stanno assumendo notevole rilievo, dovute ad una stretta associazione al cambiamento climatico in rapida evoluzione.

Il *Vibrio cholerae* è un batterio Gram-negativo, mobile, con un singolo flagello polare, che predilige ambienti sub salini, salmastri ed estuari in tutto



il pianeta (Ceccarelli, 2015). Ogni anno milioni di persone si ammalano di colera soprattutto nelle aree sottosviluppate.

Sulla base delle caratteristiche dell'antigene di superficie O, nella specie *V. cholerae* sono classificati oltre 200 sierogruppi (ISS, s.d.); di questi, solo i sierogruppi O1 e O139 sono associati al colera epidemico, una malattia infettiva devastante che causa una grave diarrea acquosa nell'uomo. Gli isolati di *Vibrio cholerae* identificati come negativi per gli antigeni O1/O139 sono comunemente indicati come *V. cholerae* non O1 e non O139 (NCVs) o vibrioni non agglutinanti (Vezzulli, 2020).

I ceppi NCVs sono agenti causa d'infezioni sporadiche ma significative e rispetto ai vibrioni del colera sono un gruppo relativamente poco studiato di patogeni umani. Questo gruppo di patogeni generalmente non possiede i due principali tratti di virulenza dei sierogruppi O1 e O139, ovvero la tossina del colera (CT, codificata dal gene *ctx*) e la tossina co-regolata dal pilus (TCP, codificato dal gene *tcpA*).

I sierogruppi di *V. cholerae* differenti dall'O1 e O139 non sono causa di grandi epidemie, ma possono determinare gastroenteriti acute, sia sporadiche che collegate a piccoli focolai, infezioni dell'orecchio, infezioni cutanee, fasciti necrotizzanti (infezioni della cute e della fascia muscolare, nelle quali

la pelle mostra una rapida progressione a necrosi estesa), setticemie (Ottaviani, Leoni, & Rocchegiani, 2011). Nei casi di gastroenterite la trasmissione del patogeno avviene attraverso il consumo di frutti di mare crudi o poco cotti, mentre negli altri tipi di infezioni la trasmissione avviene tramite contatto da acque contaminate.

Comprendere l'importanza epidemiologica e clinica dei fattori associati alla patogenesi di *V. cholerae*, ci permette di evidenziare importanti osservazioni per il suo potenziale di virulenza. Questi dati sono utili per il biomonitoraggio, per migliorare lo stato e la gestione dell'ecosistema, soprattutto se la densità, la virulenza e le rispettive potenzialità sono alterate da cambiamenti ambientali e climatici nel tempo.

## ***1.2 Vibrionaceae***

La famiglia delle Vibrionaceae è caratterizzata da microrganismi appartenenti a diversi generi, fra i quali *Vibrio*, *Catenococcus*, *Listonella*, *Morinella*, *Photobacter* e *Photobacterium* (NCBI, 2021). Si tratta di microrganismi Gram-negativi, di forma bastoncellare o ricurva, asporigeni e mobili per la presenza di uno o più flagelli generalmente polari. Sono organismi chemiorganotrofi, aerobi-anaerobi facoltativi che possiedono un metabolismo

respiratorio e fermentativo, inoltre molte specie sono ossidasi positive. Le Vibrionaceae sono ampiamente distribuite nell'ambiente acquatico, acque a media e bassa salinità, nelle quali possono vivere libere o in simbiosi con la fauna presente. La famiglia delle Vibrionaceae comprende diverse specie che causano infezioni del tratto intestinale ed extra-intestinale sia nell'uomo che negli animali. Il genere tipo per la famiglia è *Vibrio* e la specie tipo è *Vibrio cholerae*, agente responsabile del colera.

### ***1.3 Genere Vibrio***

I microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* sono organismi ricurvi (tipica forma a virgola) Gram-negativi, di dimensioni comprese tra 0,5-0,8 µm di larghezza e circa 2 µm di lunghezza, sono aerobi e anaerobi facoltativi, fermentati e asporigeni, mobili per la presenza di un flagello polare. Molte specie sono ossidasi positive, fermentano il glucosio e sono alofile, poiché la loro crescita è stimolata dalla presenza di NaCl, elemento che risulta essere indispensabile per alcune specie (*Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*).

I microrganismi del genere *Vibrio* sono molto diffusi in ambiente acquatico (sia acqua dolce che acqua salmastra). Molti sono gli adattamenti che permettono a tali organismi di sopravvivere all'ambiente, sopportando anche

intensi cambiamenti di temperatura. Si possono trovare in simbiosi con pesci e crostacei (copepodi), o in associazione con l'esoscheletro di chitina degli organismi zooplanctonici (per produzione di chitinasi) (Bhowmick & Chatterjee, 2007). Possono partecipare anche alla formazione di biofilm, biopellicola o microfouling, un'aggregazione complessa di microrganismi contraddistinta dalla secrezione di una matrice adesiva e protettiva (Jiunn, 2010). Essendo microrganismi autoctoni dell'ambiente marino, sono soggetti a repentini cambiamenti dell'ambiente in cui si trovano, come cambiamenti della temperatura, nella concentrazione di nutrienti, alterazioni della salinità e del pH. I vibroni reagiscono a tali variazioni con degli adattamenti fisiologici e biochimici, tra questi lo stato di VBNC ("Viable But Non Culturable Cell"), ovvero una fase di quiescenza. Durante questo stato "d'emergenza" le cellule rimangono vitali, anche se non coltivabili, mantenendo l'integrità strutturale e una bassissima attività biosintetica (Ramamurthy & Ghosh, 2014). Tutte le altre funzioni vengono adeguate a consentire la sopravvivenza del microrganismo in condizioni ambientali avverse: diminuisce la dimensione della cellula, il suo contenuto di RNA (e a volte di DNA), il citoplasma si condensa e la parete si inspessisce aumentando i legami crociati; anche la composizione in acidi grassi della membrana citoplasmatica varia, la duplicazione è inibita ma i livelli di ATP restano alti.

I vibrioni si ritrovano anche sulla superficie e nel contenuto intestinale di molti animali marini, sia vertebrati che invertebrati (ISS I. d., 2004). Molte delle specie conosciute sono d'interesse medico-sanitario perché capaci di causare infezioni intestinali ed extra-intestinali, trasmesse per contatto diretto con l'ambiente acquatico o indirettamente per ingestione di acqua o di alimenti contaminati, per lo più prodotti della pesca.

Molti sono i fattori che concorrono ad aumentare il rischio di infezione, tra cui l'aumento dell'immigrazione da Paesi dove i patogeni *Vibrio* sono endemici, la globalizzazione dei mercati, con frequenti scambi commerciali con Paesi a rischio, i cambiamenti climatici.

Dominio	Prokaryota
Regno	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Proteobacteria Gamma
Ordine	Vibrionales
Famiglia	Vibrionaceae
Genere	<i>Vibrio</i>
Specie	<b><i>V. cholerae</i></b>

*Figura: Filogenesi del genere Vibrio (Caianiello, 2020).*

#### ***1.4 Caratteristiche ecologiche di crescita del genere Vibrio***

I principali fattori che concorrono all'insorgenza e la distribuzione di *Vibrio* in ambienti acquatici sono le variazioni di temperatura, salinità, pressione osmotica, pH, la disponibilità di nutrienti e l'associazione simbiotica con organismi marini. I vibrioni subiscono profonde e frequenti modificazioni dall'ambiente circostante ma grazie a modificazioni genotipiche e fenotipiche riescono a sopravvivere a lungo mostrando elevata adattabilità alle variazioni climatiche. In condizioni ambientali ostili i vibrioni tendono ad assumere dimensioni ridotte, entrando in una fase di quiescenza (VBNC) nella quale arrestano i loro cicli di divisione ma rimangono comunque metabolicamente attivi (Ramamurthy & Ghosh, 2014). In condizioni favorevoli possono poi ritornare allo stato vegetativo riacquistando la loro capacità di crescita (Zhao, 2017).

Il genere *Vibrio* mostra differenti sensibilità alle condizioni ambientali; la temperatura dell'acqua è considerata uno dei principali fattori ambientali che influenza la distribuzione e l'abbondanza di questi microrganismi nell'ambiente. In generale la loro densità rimane bassa a temperature inferiori ai 20°C, mentre l'isolamento è raro quando la temperatura scende al di sotto dei 10°C. I vibrioni mostrano un comportamento variabile anche rispetto alle variazioni di salinità. Il *V. cholerae*, rappresentante delle acque di estuario e

acque fluviali, tollera bene quantitativi di salinità compresi tra lo zero e il 3%, mentre gli altri vibrioni (come *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*) diffusi per lo più in ambienti costieri, crescono bene a livelli di salinità superiori al 3% (Fang, 2019). Un altro fattore che influenza la sopravvivenza di questi microrganismi è il pH. Lo sviluppo infatti viene inibito a un valore di pH<5 ma tali microrganismi riescono a tollerare bene anche valori fino a 9. Negli ultimi anni si è evidenziato come alcuni ceppi di *V. cholerae* producano biofilm, una strategia che migliora la sopravvivenza e la persistenza negli ecosistemi naturali (Ramamurthy, 2020). Anche l'associazione con lo zoo fitoplancton e alghe brune può permettere ai vibrioni una resistenza maggiore e più duratura nell'ambiente acquatico (Croci & Suffredini, 2011).

### ***1.5 Classificazione di Vibrio patogeni per l'uomo***

I *Vibrio* che maggiormente interessano la patologia umana sono rappresentati essenzialmente dalla specie *Vibrio cholerae*, agente causa del colera, malattia caratterizzata nell'uomo da una grave gastroenterite con eccessiva e massiva perdita di fluidi. Altri rappresentanti del genere che sono spesso associati a infezioni diarroiche, infezioni cutanee e alcune forme setticemiche sono *V. parahaemolyticus*, responsabile di un alto numero di tossinfezioni dovute

all'ingestione di molluschi o crostacei crudi e contaminati (Daniels, 2000-2005), *V. vulnificus* agente infettivo di ferite cutanee, di casi di setticemia in soggetti immunocompromessi e nei casi più gravi di fascite necrotizzante (Bross, 2007). In forma minore *V. alginolyticus*, che occasionalmente provoca infezioni agli occhi, all'orecchio e alle ferite (Reilly & Smith, 2011).

Acqua ed alimenti (prevalentemente crostacei e molluschi) sono generalmente implicati nella trasmissione delle infezioni per contatto diretto con l'ambiente acquatico o indirettamente attraverso il consumo di cibo e acqua contaminata (IZSVE) e del colera in particolare. Della specie *V. cholerae* sono stati individuati più di 200 sierogruppi (OMS, 2019) e prima del 1992 solo il sierogruppo O1 era stato associato ad epidemie e a casi di colera. Dal 1993 anche biotipi O139/non O1, rilevabili frequentemente nell'ambiente acquatico, sono stati segnalati come responsabili di patologie simil-coleriche, di manifestazioni cliniche riconducibili ad infezioni localizzate nei tessuti molli e nelle mucose e ad infezioni sistemiche (ISS).

Il colera classico si manifesta con sintomatologia variabile da lieve diarrea acquosa a grave diarrea ad "acqua di riso" accompagnata da segni di disidratazione fino al collasso cardio-circolatorio. In mancanza di un adeguato intervento terapeutico la mortalità può raggiungere il 50%, mentre l'impiego di una terapia reidratante la riduce al di sotto dell'1%.



I vibriani non colerici solitamente provocano infezioni più lievi, ritroviamo in questo gruppo *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. alginolyticus*. Anche questi patogeni possono però determinare gravi diarree e infezioni extra-intestinali.

Nei recenti studi i sierogruppi appartenenti a *V. cholerae* non O1 e non O139, sono stati segnalati per gastroenteriti e infezioni extra-intestinali, ma i risultati hanno indicato un rischio minimo per la salute umana poiché tali sierogruppi non avevano geni essenziali correlati alla tossina colerica (Fang, 2019). *Vibrio parahaemolyticus* provoca sintomatologia lieve, a carattere prevalentemente gastroenterico, dovuta al consumo di prodotti ittici crudi o poco cotti, di rilevante impatto sanitario in Giappone (Hara-Kudo, 2012). Tale microrganismo, alofilo obbligato, è tipico dell'ambiente marino costiero, presente sia in aree tropicali che temperate e resistente ad un ampio range di temperature. I fattori di virulenza associati a *V. parahaemolyticus* sono un'emolisina termostabile diretta (TDH), un'emolisina TDH-correlata (TRH) e una serina-proteasi (potenziale fattore di virulenza). L'azione sinergica di TDH con TRH altera il passaggio di soluti e fluidi attraverso gli spazi intracellulari e ciò provoca l'aumento della concentrazione intracellulare di  $Ca^{2+}$  che attiva canali calcio-dipendenti inducendo la secrezione di cloro e fluidi (Raghunath, 2015).

Il *V. vulnificus* è un alofilo stretto tipico dell'ambiente marino costiero (isolato più spesso nella stagione estiva), può infettare ferite e determinare gravi setticemie soprattutto se colpisce soggetti immunocompromessi (Bross, 2007). Talvolta in soggetti sani il consumo di alimenti contaminati da *V. vulnificus* determina sintomi enterici.

Diversi sono i fattori per eludere le difese dell'ospite, la virulenza è data dalla lisina-decarbossilasi che conferisce resistenza all'acidità gastrica, la produzione di siderofori (vulnibactina e sideroforo-idrossammato, piccole molecole molto affini per il ferro). Inoltre, possiede l'emolisina VvhA e la proteasi VvP che agisce come fattore tossico diretto generando lesioni cutanee, necrosi dei tessuti, reazioni emorragiche, degradazione collagene di tipo IV, aumento della permeabilità vascolare, produzione di bradichinina coinvolta nella necrosi cellulare per attivazione della procaspasi 3 ed interferenza con l'omeostasi del sangue per attivazione di protrombina e fibrinolisi. Infezione extra-intestinale si manifesta sotto forma setticemica (Bross, 2007).

*V. alginolyticus* è stato identificato per la prima volta come patogeno per l'uomo nel 1973. Occasionalmente causa infezioni agli occhi, all'orecchio e alle ferite. È una specie altamente tollerante variazioni di salinità e riesce a crescere a concentrazioni di sale del 10%. La maggior parte degli isolati

clinici proviene da ferite contaminate ed è raro che il microrganismo causi batteriemia nei soggetti immunocompromessi (Reilly, 2011).

I sierotipi di *Vibrio cholerae* non O1 e non O139 (non agglutinabili dall'antisiero O) per causare infezione necessitano di una considerevole carica batterica (Caianiello, 2020). La trasmissione è legata al consumo di acqua e prodotti ittici contaminati (crudi o poco cotti) e l'intestino è l'organo bersaglio. La sintomatologia comprende sia gastroenteriti lievi sia forme diarroiche di serietà variabile, alcune simil-coleriche, altre simili a quelle causate da *Escherichia coli* enterotossico. Nelle feci possono essere presenti muco e sangue, caratteristica che rappresenta una differenza tra i ceppi non agglutinabili e il sierogruppo di *V. cholerae* O1. Il meccanismo patogenetico di *Vibrio cholerae* non O1/O139 è ancora poco chiaro, ma sembra che, a differenza dei vibriani colerici, produca una tossina termostabile o determini un'invasione tissutale. Inoltre, non sono stati evidenziati ceppi appartenenti a tali sierogruppi associati ad epidemie (Caianiello, 2020).

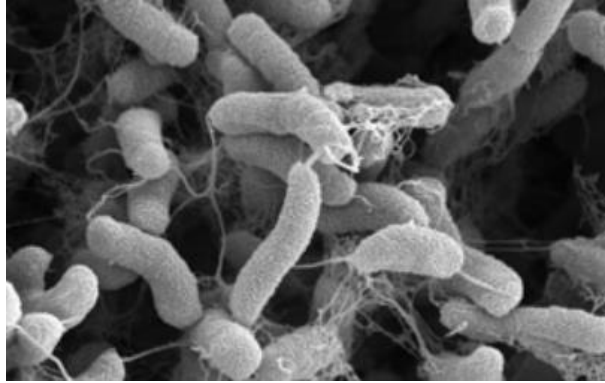
## ***1.6 Vibrio cholerae***

Un organismo simile ad un vibrione fu descritto per la prima volta come il patogeno del colera nel 1854 da Filippo Pacini anche se *Vibrio cholerae* fu isolato solo 30 anni dopo da Robert Koch nel 1884.

*Vibrio cholerae* è l'agente eziologico del colera, una malattia diarroica devastante che tuttora rappresenta un importante problema di salute pubblica in diversi paesi.

È un bacillo Gram-negativo a forma di virgola, ossidasi-positivo, asporigeno, aerobio-anaerobio facoltativo, provvisto di un singolo flagello, ad un polo della cellula, in grado di conferirgli motilità (Carraro, 2012).

Il microrganismo vive in acque marine ma può sopravvivere e moltiplicarsi in acque salmastre associate a copepodi, dove la sopravvivenza e l'abbondanza nelle comunità planctoniche dipendono dalla sua capacità di colonizzare la superficie di organismi del fitoplancton e dello zooplancton (alghe filamentose, copepodi e crostacei), questa capacità di aderire tenacemente all'esoscheletro di chitina di questi organismi marini dà vita a biofilm dovuti al gene *mshA* che codifica la subunità dei pili di tipo IV MSHA. *Vibrio cholerae* cresce bene anche a basse concentrazioni di sale.



*Figura: Vibrio cholerae al microscopio elettronico (Laboratories, 2014).*

La storia moderna del colera è caratterizzata da sette pandemie, durante le quali *Vibrio cholerae* si è diffuso in tutto il mondo. Il colera associato alla settima pandemia, quella corrente, è endemico in gran parte dell'Asia, Africa ed America Latina e nonostante il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie in alcune regioni di questi Paesi la malattia rimane una seria minaccia per la popolazione. Si è tradizionalmente ritenuto che l'ospite naturale del *Vibrio cholerae* fossero gli esseri umani, tuttavia numerosi studi ambientali hanno dimostrato che organismi di questo tipo si trovano in associazione con ambienti marini, costieri o estuari (copepodi e zooplancton possono essere serbatoi alternativi).

### ***1.7 Classificazione dei sierogruppi***

Un sierotipo è una variazione distinta all'interno di una specie di batteri o virus o tra le cellule immunitarie di individui diversi. Questi batteri, virus o cellule sono classificati insieme in base ai loro antigeni di superficie cellulare, consentendo la classificazione epidemiologica degli organismi a livello di sottospecie. Un gruppo di sierotipi con antigeni comuni è chiamato sierogruppo, dove la sierotipizzazione svolge un ruolo essenziale nel determinare specie e sottospecie. Il sierotipo è un livello di classificazione di batteri e virus equivalente di una sottospecie, si possono distinguere tra di loro microrganismi appartenenti alla medesima specie, in base a differenze tra gli antigeni di superficie, rilevabili mediante reazioni antigene-anticorpo. Al fine di una sierotipizzazione e distinzione in sierogruppi si utilizzano sieri polivalenti mentre la conferma sierologica si ha con dei sieri monovalenti.

Per *Vibrio cholerae* sono stati identificati più 200 sierogruppi sulla base dell'antigene O del lipopolisaccaride. Il lipopolisaccaride (LPS) chiamato anche endotossina, è costituito da due componenti essenziali: una lipidica (lipide A) e una polisaccaridica, unite da un ponte di acido cheto-deossioctonico (KDO).

Il lipide A è la vera e propria componente tossica dell'endotossina, si trova nella parte interna del LPS ed è costituito da acidi grassi. Il Core che è la regione centrale del lipopolisaccaride è una porzione polisaccaridica genere specifica (che rimane costante all'interno dello stesso genere). E poi abbiamo l'antigene O, regione estrema del lipopolisaccaride (Figura A), costituito da unità di ripetizione di 3-5 zuccheri. I blocchi di zuccheri che costituiscono l'antigene somatico O possono raggiungere un numero di quattro ripetizioni; questa regione ha funzioni antigeniche, ed è specie specifica.

I sierogruppi associati ad epidemie di colera sono il sierogruppo O1 e il sierogruppo O139 o Bengala, dove nel primo la composizione dell'antigene O è data da un omopolimero di 18 residui di dideossi-mannosio, mentre nel secondo la composizione dei carboidrati è più complessa. Il sierogruppo O139 è comparso nel 1992 ed è responsabile delle forme coleriche più gravi.

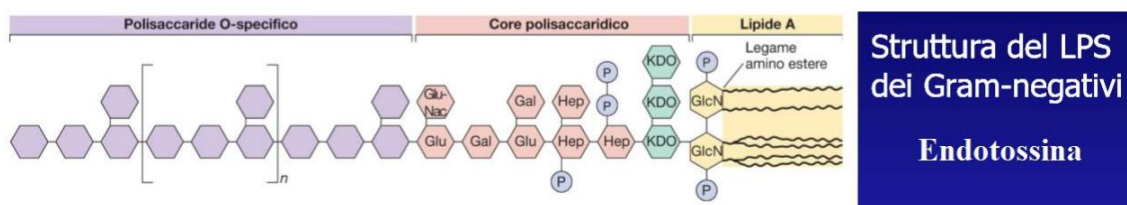


Figura A: Composizione del LPS dei batteri Gram-negativi (Doc, s.d.)

Al sierogruppo 1 di *V. cholerae* appartengono i vibrioni colerici in senso stretto detti quindi O1, ai sierogruppi dal 2 al 6 appartengono vibrioni poiché appartenenti alla specie di *V. cholerae* ma definiti vibrioni non colerici o NVCs o *Vibrio* non agglutinabili (“NAG”) in quanto non reagiscono con gli antisieri che agglutinano i vibrioni del colera propriamente detti. Analizzando più in dettaglio l’antigene O si è visto che esso è differenziabile in almeno 13 tipi differenti, indicati come A, B, C, D, E, F, G+J, H+M, I+K, L.

La contemporanea presenza di questi tipi differenti e la loro combinazione altamente variabile permette un’ulteriore differenziazione dei sei sierotipi di *Vibrio cholerae* in sottotipi sierologici.

Questa classificazione in sottotipi sierologici risulta molto importante soprattutto per il gruppo O1, ulteriormente differenziato in altri tre sottotipi: Ogawa (fattori AB), Inaba (fattori AC) Hikojima (fattori ABC) (Carraro, 2012). Il sierogruppo O1 è ulteriormente diviso in due biotipi in base a caratteristiche biofisiologiche (Figura A): sierogruppo “Classico” ed “El Tor”, quest’ultimo denominato così dal centro di quarantena El Tor nella penisola del Sinai, in cui venne isolato per la prima volta.



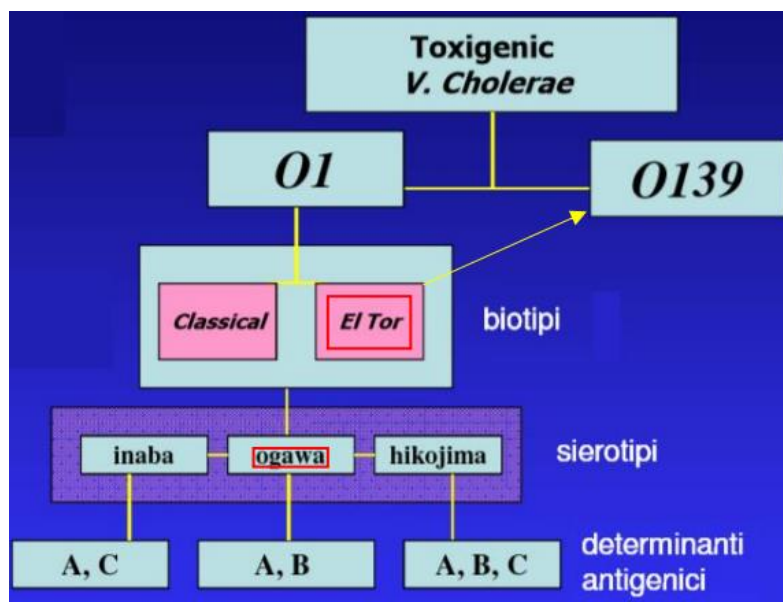


Figura A: Classificazione in sottotipi di *V. cholerae* O1 (SlidePlayer, s.d.)

La differenza fondamentale tra i due biotipi è data dal fatto che il biotipo “Classico” risulta non è emolitico per gli eritrociti di montone mentre “El Tor” risulta esserlo. Il biotipo “Classico” è ritenuto responsabile delle prime sei pandemie verificatesi tra il 1817 ed il 1923, la settima pandemia che iniziò nel 1961 fu causata dal biotipo “El Tor”; questa raggiunse sia l’Africa che l’Europa e tra il 1970 e il 2011 diversi paesi europei hanno segnalato focolai di colera da pochi a più di 2.000 casi (Oprea, 2020). I due biotipi, inoltre, presentano altre caratteristiche differenziali da un punto di vista epidemiologico. I vibriani “El Tor” sono responsabili di epidemie in cui generalmente i casi di lieve entità risultano essere più frequenti insieme alle

infezioni asintomatiche che persistono più a lungo nell'uomo definendo lo stato di portatore cronico, che invece non si verificano per il biotipo "Classico". Inoltre, i vibroni "El Tor" risultano essere più resistenti agli agenti chimici mostrando dunque maggiore capacità di sopravvivenza nell'ambiente naturale rispetto ai vibroni "Classico".

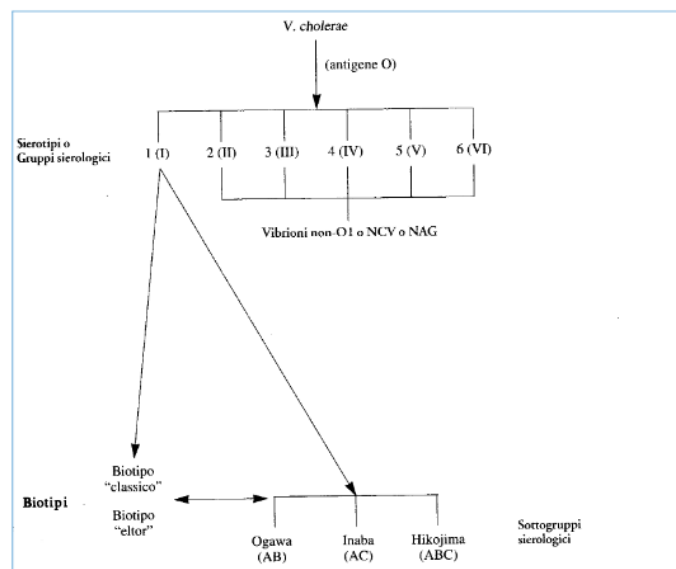


Figura: Classificazione sierogruppi di *Vibrio cholerae* (Nicoletti & Nicolosi, 1998).

I sierogruppi diversi da O1 sono collettivamente chiamati *V. cholerae* non O1, questi sono perlopiù associati a casi sporadici di gastroenteriti e lievi forme di malattie simil-colerica e fino a poco tempo fa erano ritenuti incapaci di generare colera epidemico, tuttavia recentemente alcune epidemie di colera sono state attribuite a ceppi di una specie recentemente isolata ovvero *Vibrio cholerae* O139 o *V. cholerae* Bengala che rappresenta un nuovo sierogruppo

emergente. Dalla sua comparsa in Bangladesh nel 1992 si è diffuso molto rapidamente in altre regioni tanto da portare alcuni ricercatori a suggerire la presenza di un'ottava pandemia tuttora in corso (Islam, 2013).

### ***1.8 Genoma V. cholerae***

Il genoma di *Vibrio cholerae* è composto da due cromosomi circolari *chrI* (large chromosome) e *chrII* (small chromosome). Il cromosoma I o cromosoma “dominante” contiene la maggior parte dei geni per le funzioni cellulari essenziali e per la virulenza, mentre sul cromosoma II ritroviamo geni per le normali funzioni cellulari (Figura A). L'isola di patogenicità VPI (Figura B) e il DNA del fago CTX $\phi$ , che codificano rispettivamente per i due principali fattori di virulenza ovvero il TCP (tossina co-regolata dal pilus) e la CT (tossina colerica), sono integrati nel *chrI*. La regolazione dell'espressione dei due fattori di virulenza, come anche la produzione della EPS per la vita in biofilm e la sintesi del pilo MSHA, è codificata dal *chrI*. Nel *chrII* è inserita una regione che costituisce un integrone *chrII* che codifica una proteasi *hap* e una emolisina *hlyA*.

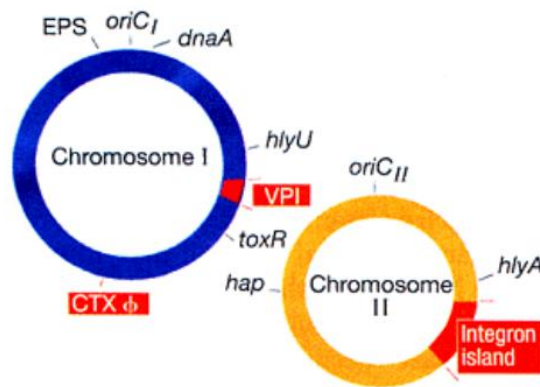


Figura A: Struttura chrI e chrII del *V. cholerae* (Waldor, 2000).

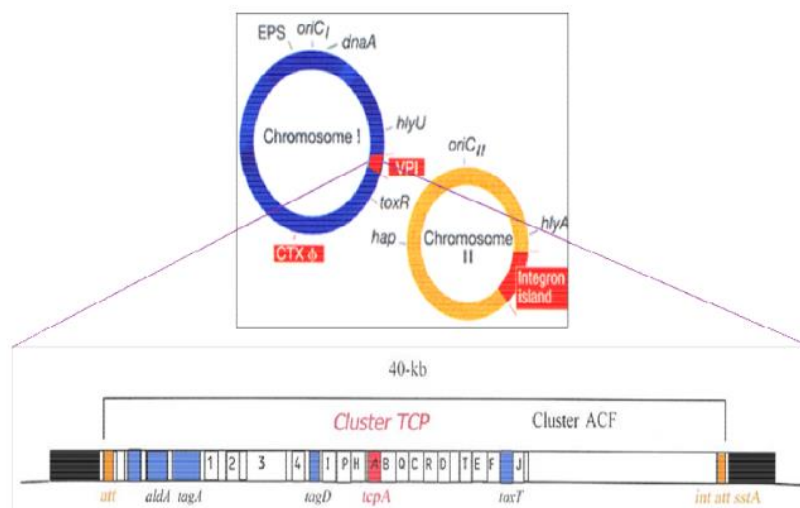


Figura B: Struttura isola di patogenicità VPI (Waldor, 2000).

### 1.9 Ricerca di *V. cholerae* da campioni clinici

Il *Vibrio cholerae* è un patogeno intestinale non invasivo, la ricerca dei vibrioni si esegue esclusivamente sul materiale fecale. Nelle zone dove il batterio è endemico, soprattutto se l'epidemia è in corso, il semplice esame

microscopico del preparato, di materiale fecale, eliminato con le scariche diarroiche è altamente indicativo ai fini diagnostici. Per poter diagnosticare con certezza bisogna ricorrere all'isolamento colturale e all'identificazione sierologica. L'isolamento mediante esame colturale può essere fatto sia direttamente dalle feci sia dal tampone rettale. Il batterio fermenta lentamente il lattosio e cresce rapidamente su vari terreni selettivi come l'agar-bile, agar-glicerina-taurocolato-tellurito e agar-tiosolfato-citrato-bile-saccarosio (TCBS). *Vibrio cholerae* cresce formando delle colonie gialle ed opache che possono essere facilmente distinte da quelle di altri microorganismi enterici (ISS).

#### ***1.10 Ricerca di *V. cholerae* da campioni alimentari***

Oltre all'acqua, considerata la principale fonte di diffusione di *V. cholerae*, anche altri alimenti (frutti di mare, carne, latte, riso, frutta, etc.) entrano in gioco nella diffusione dell'infezione tramite contaminazione dei diversi cibi, dove questa può avvenire sia all'origine, sia successivamente in filiera, durante le fasi di manipolazione e preparazione degli alimenti. Di particolare pericolosità sono gli alimenti di origine ittica.

Per l'analisi è necessario campionare una quantità sufficiente di alimento, nel caso di prodotti ittici è preferibile utilizzare i tessuti superficiali, l'intestino e le branchie; per i molluschi invece è necessario campionare l'intero animale e per i crostacei è consigliabile utilizzare la parte centrale del crostaceo, compreso l'intestino e gli organi respiratori.

Il campione una volta prelevato deve essere mantenuto a temperature di media refrigerazione (circa 7°C - 10°C) ed analizzato il prima possibile (ISS). Ciò favorisce la sopravvivenza dei vibrioni presenti e impedisce lo sviluppo incontrollato della microflora marina indigena e di eventuali altri batteri patogeni. Al campione poi viene aggiunto Acqua Peptonata Alcalina e il tutto viene omogeneizzato per almeno 1/2 minuti ad alta velocità (10.000/14.000 rpm). Una volta omogenato o triturato l'alimento nel terreno di arricchimento, bisogna mescolare accuratamente la brodocoltura. Mettere il tutto ad incubare a 2°C per 6/8 ore per la ricerca di *V. cholerae* e per 18/24 ore per la ricerca in generale di *Vibrio*. Per l'isolamento su terreno solido, si utilizzano piastre di TCBS, a cui si può affiancare un terreno non selettivo, come ad esempio un Gelatin agar (GA), poi i terreni inoculati vanno incubati a 2°C e letti dopo 18/24 ore.

### ***1.11 Ricerca di *V. cholerae* da campioni ambientali (acque superficiali)***

*Vibrio cholerae* può essere isolato dalle acque temperate, per eseguire il campionamento è essenziale che l'acqua venga raccolta con bottiglie sterili, immerse con l'apertura rivolta in direzione opposta alla corrente dell'acqua se possibile. Il campionamento va eseguito ad una profondità di 25/30 cm dalla superficie immergendo la bottiglia con l'apertura rivolta verso il basso e poi chiudendola una volta raggiunta la profondità voluta.

L'analisi va eseguita nell'ambito della stessa giornata del campionamento; se ciò non fosse possibile, i campioni prelevati dovrebbero essere conservati in condizioni di temperature comprese tra i 4°C e i 10°C. L'isolamento dei vibrioni dalle acque superficiali si effettua mediante la tecnica della filtrazione, utilizzando membrane filtranti con porosità di 0,45 µm (per esempio Millipore e Sartonus).

### ***1.12 Identificazione e caratterizzazione di *V. cholerae****

La prima identificazione della specie batterica è quella presuntiva, basata sulla morfologia delle colonie cresciute sui terreni solidi.

Su agar TCBS le colonie di *Vibrio* possono apparire più o meno grandi, sia gialle che verdi, a seconda della capacità del ceppo di utilizzare o meno il

saccarosio. In particolare, le colonie di *V. cholerae* su TCBS appaiono larghe (2-3 mm), lisce, gialle (ceppi occasionali che fermentano lentamente il saccarosio appaiono verdi) e leggermente appiattite con centro opaco e periferia traslucida (ISS). La lettura delle piastre di TCBS deve essere effettuata subito dopo averle tolte dall'incubatore, perché se lasciate a temperatura ambiente le colonie virano dal giallo al verde.

Su terreni non selettivi l'identificazione sfrutta la capacità di alcune specie di *Vibrio* di idrolizzare tale componente formando un alone intorno alla colonia. Su agar sangue le varie specie di *Vibrio* possono presentarsi come alfa, beta o non emolitiche, mentre su agar MacConkey generalmente sono lattosio-negative.



Figura A

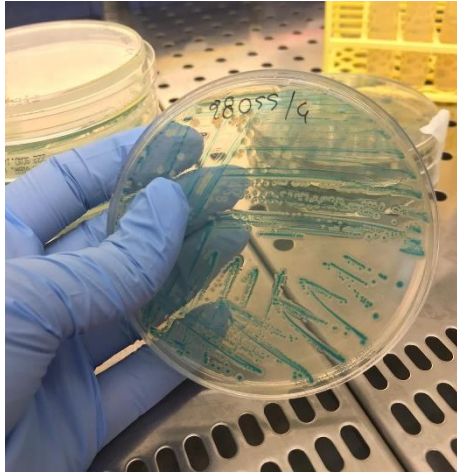


Figura B

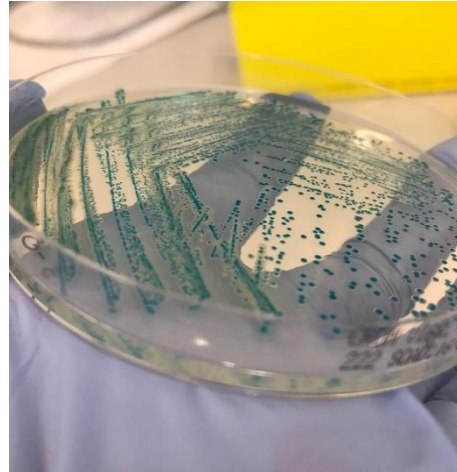


Figure A-B: Ceppi di *V.cholerae* su cromogenico per *Vibrio* (Chrom agar *Vibrio*); nel quale le colonie nella maggior parte degli isolati appaiono blu, in una minoranza di isolati le colonie appaiono bianche (IZSUM, Ancona)

### **1.13 Identificazione biochimica**

Per una completa caratterizzazione biochimica degli isolati sono necessarie decine di prove di laboratorio. I vibrioni isolati da campioni di interesse clinico e quelli patogeni veicolati da alimenti, sono divisibili in 5 gruppi sulla base di 7 test biochimici. L'incapacità di crescere in brodo nutriente senza sale (0% di NaCl) differenzia le 8 specie alofile da *Vibrio cholerae* e da *Vibrio mimicus*. *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* sono negativi (ADH-) per questa reazione ma positivi per ornitina decarbossilasi (ODC+).

Test	Gruppo I (*)		Gruppo II	Gruppo III	Gruppo IV			Gruppo V		
	V. cholerae	V. mimicus	V. metschnikovii	V. hollisae	V. damsela	V. fluvialis	V. furnissii	V. alginolyticus	V. parahae molyticus	V. vulnificus
0% NaCl	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ossidasi	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Nitrati	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Lisina	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Ornitina	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-

Figura: \*microorganismi non alofili, \*\* gli enzimi indicati sono: ADH (Arginina deidrossilasi), ODC (Ornitina decarbossilasi), LDC (Lisina decarbossilasi) (Carraro, 2012).

L'identificazione può essere eseguita utilizzando i sistemi commerciali ma i risultati non sono sempre affidabili. L'identificazione sierotipica si avvale dell'agglutinazione con antisiero antigene O specifico. L'uso di antisieri specifici è uno dei metodi più rapidi d'identificazione delle specie *Vibrio*.

Produzione di indolo	negativo
Lisina decarbossilasi	positivo
Arginina diidrolasi	negativo
Ornitina decarbossilasi	positivo
Produzione di gas da D-glucosio	negativo
Produzione di acido da D-glucosio	positivo
Produzione di acido da saccarosio	positivo
Produzione di acido da lattosio	negativo
Produzione di acido da D-galattosio	positivo
Produzione di acido da salicina	negativo

Figura: Caratterizzazione biochimica *V. cholerae* (Caianiello, 2020).

### ***1.14 Identificazione molecolare***

La spettrometria di massa di volo con desorbimento laser assistito da matrice ionizzazione o MALDI-TOF MS, viene utilizzata per analizzare la composizione proteica di una cellula batterica ed è emersa come nuova tecnologia per l'identificazione di specie. Questo strumento rapido e riproducibile ha il vantaggio di fornire risultati entro poche ore, rendendolo adatto ad analisi di routine in laboratorio. Il metodo è utilizzato per l'identificazione a livello di specie di *Vibrio*.

La PCR è generalmente considerata un buon metodo di rilevazione batterica in quanto semplice, rapida, sensibile e specifica. Il gene 16S rRNA funge generalmente da modello per la progettazione dei primer PCR identificativi specie-specifici, è stata però utilizzata con successo anche una PCR mirata al gene *dnaJ* per l'identificazione di specie *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, e *V. alginolyticus*).

Sono stati sviluppati numerosi metodi molecolari per gli isolati da campioni clinici; questi includono tecniche molecolari quali la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multilocus Sequence Typing (MLST), Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MVLA), Fluorescent

Amplified Fragment Length Polymorphism (FAFLP) e la Whole Genome Sequencing (WGS).

Tutti questi approcci consentono di sottotipizzare i ceppi non correlati, ma con diversa precisione, capacità discriminante e riproducibilità. Tuttavia, alcuni di questi metodi rimangono disponibili solo per i laboratori di riferimento e sono difficili da implementare per l'identificazione dei batteri nella routine di un laboratorio clinico.

Interessante è la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) che rileva la variazione genetica tra i ceppi utilizzando endonucleasi di restrizione per sequenze specifiche, seguita da separazione dei grandi frammenti genomici ottenuti su gel di agarosio. La PFGE è nota per essere altamente discriminante, questo metodo è stato utilizzato con successo per identificare e differenziare le specie del genere *Vibrio* con enzimi *NotI* e *SfiI*. utilizzato per eseguire la sottotipizzazione molecolare di *Vibrio cholerae* O1 e O139. (Public Health England, 2015)

Altra tecnica altamente discriminante è la Multilocus Sequence Typing (MLST) determina direttamente le variazioni di sequenza del DNA in un gruppo di geni strutturali e caratterizza i ceppi tramite i loro profili allelici unici. La MLST è stata ampiamente utilizzata come uno dei metodi principali

per analizzare le relazioni geniche nel genere *Vibrio* e la sua tipizzazione. (Public Health England, 2015)

Una tecnologia di fingerprinting solida e riproducibile che viene utilizzata per differenziare *V. cholerae* O1 dai ceppi non O1 e non O139 è la Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism, FAFLP (Public Health England, 2015). Questo è un metodo ad alta risoluzione per l'intero genoma utilizzata come strumento per l'analisi rapida ed economica della diversità genetica nell'ambito dei genomi batterici. È utile per numerose applicazioni quali l'identificazione e sottotipizzazione di microrganismi provenienti da campioni clinici, il rilievo di genotipi epidemici, lo studio di micro e macro-variazione e per popolazioni genetiche.

### ***1.15 Patogenesi***

La patogenesi del microrganismo è dettata da molteplici fattori di virulenza prodotti dai ceppi tossigeni O1 e O139. Una volta digerito il microrganismo segue il passaggio attraverso la barriera gastrica dello stomaco, arrivando a raggiungere e colonizzare la parte superiore dell'intestino tenue. L'adesione è mediata dalle fimbrie (strutture proteiche filamentose) poste ad un polo della cellula chiamate TCP o tossina co-regolata dal pilus, grazie al quale il *Vibrio*

*cholerae* vince l'azione della peristalsi intestinale e penetra attraverso lo strato mucoso che ricopre gli eritrociti per aderire ai microvilli presenti nel duodeno.

La colonizzazione è seguita dall'espressione e dall'azione della tossina colerica o CT, che viene elaborata durante la crescita esponenziale del batterio e va ad attivare l'enzima adenil-ciclasi presente nelle membrane delle cellule della mucosa intestinale e catalizzare una reazione che favorisce la trasformazione dell'ATP cellulare in AMP-ciclico (cAMP), il quale svolge un ruolo importante nella regolazione dell'equilibrio idro-salino. L'aumentata concentrazione di cAMP comporta una notevole ipersecrezione di acqua e di elettroliti che possono arrivare a superare il litro per ora.

La tossina colerica anche in associazione ad altri fattori di virulenza, influisce sul trasporto ionico attraverso le cellule epiteliali intestinali e comporta la conseguente perdita di acqua ed elettroliti portando così ad una severa diarrea caratteristica del colera.

### ***1.16 Il colera***

Il colera è una malattia a trasmissione oro-fecale che può essere contratta in seguito all'ingestione di acqua o alimenti contaminati da ceppi tossigeni di *Vibrio cholerae* O1 e O139. Gli alimenti più a rischio per la trasmissione della

malattia sono quelli crudi o poco cotti e, in particolare, i frutti di mare, a causa dell'ecologia del microrganismo dove difatti questo può vivere in ambienti naturali come fiumi salmastri o/e zone costiere, per questo il rischio di contrarre infezione dall'ingestione di molluschi è molto elevato. Anche altri alimenti possono comunque fungere da veicolo se manipolati con acqua contaminata.

Le scarse condizioni igienico-sanitarie di alcuni Paesi e la cattiva gestione degli impianti fognari e dell'acqua potabile sono le principali cause di epidemie di colera nel mondo. Senza la contaminazione di alimenti o acqua, il contagio diretto da persona a persona è molto raro in condizioni igienico-sanitarie normali (Carraro, 2012).

La carica batterica necessaria per la trasmissione dell'infezione è superiore al milione, quindi risulta molto difficile contagiare altri individui attraverso il semplice contatto. Dopo un periodo d'incubazione variabile fra le 12 e le 72 ore si sviluppano i primi sintomi clinici tipici del colera, ossia diarrea acquosa caratterizzata dall'evacuazione indolore di grandi volumi (0,5/1 litri/ora) di feci somiglianti ad "acque di riso" e caratterizzate da un forte odore di pesce; a questa tipica sintomatologia si possono aggiungere nausea, crampi addominali, vomito e febbre. La massiva perdita d'acqua provoca, in assenza di un'adeguata terapia, una severa disidratazione dell'organismo che può

portare molto rapidamente ad acidosi metabolica (perdita di bicarbonato), ipocalemia e shock ipovolemico (perdita di potassio). Da aggiungersi aritmia cardiaca e morte nei casi più gravi.

La dose infettante del vibrione è piuttosto alta  $10^8$  UFC/g, data la sensibilità del microrganismo all'acidità gastrica, anche se nei pazienti più suscettibili o affetti da problemi gastrici la dose infettante rilevata è inferiore, si parla di un  $10^3$ - $10^4$  UFC/g.

In aree dove il *Vibrio cholerae* è endemico la trasmissione per eccellenza è quella oro-fecale attraverso acqua contaminata, dovuta a gravi carenze igienico-sanitarie. I pazienti nella fase acuta della malattia riescono ad espellere fino a  $10^{13}$  cellule al giorno, dove le epidemie di colera possono rappresentare un serio problema di inquinamento ambientale e in questi casi il cibo contaminato con acqua o direttamente con le feci infette rappresenta un veicolo di trasmissione secondario.

### ***1.17 Fattori di virulenza***

Nel *Vibrio cholerae* la virulenza è un fenomeno dovuto ad un'ampia rete funzionalmente associata. Sono state identificate diversi arsenali di fattori di virulenza; l'espressione di tossine, la formazione di biofilm, la plasticità del



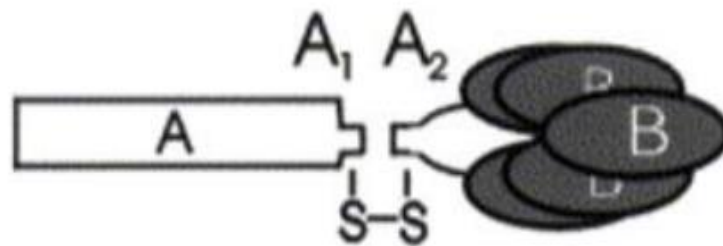
genoma, l'aderenza e le invasioni, le proteine citolitiche, i sistemi di secrezione e la capacità di rispondere a molteplici stress (Ramamurthy, 2020).

### ***1.17.1 Tossina Colerica (CT)***

La tossina colerica (CT) è il principale fattore di virulenza di *Vibrio cholerae* codificata dal fago CTX $\phi$  integrato nel genoma del vibrione. Il meccanismo d'azione di CT mira ad alterare la concentrazione intracellulare di AMP-ciclico (cAMP) portando a uno squilibrio nelle secrezioni di sali. Nello specifico si blocca l'assorbimento di sodio e si promuove la secrezione di cloruri. Questo sbilanciamento elettrolitico determina diarrea profusa grave con delle scariche intense (fino ad un litro ogni ora) caratteristica del colera e conseguente disidratazione e debolezza causata dalla fuoriuscita di potassio.

Da un punto di vista funzionale la tossina colerica è un'esotossina binomiale di tipo A-B, è una delle enterotossine batteriche più conosciute e consiste di una subunità A (dominio tossico) e da cinque subunità B (dominio di legame al recettore). Le subunità B di 11.6 kDa ciascuna, si associano a formare un anello pentamerico con un poro centrale del diametro di circa 1.5 nm. La subunità A presenta attività ADP ribosiltrasferatica, dove la subunità A matura viene tagliata proteoliticamente in due catene peptidiche A1 (21.8

kDa) responsabile dell'attività tossica e A2 (5.4 kDa) che serve da legame con la subunità B. Dopo la maturazione, le catene peptidiche A1 e A2 rimangono unite da un legame disolfuro. La struttura della tossina colerica (Figura A) rivela che le subunità A e B sono connesse attraverso l'estremità C-terminale di A2 che si inserisce nel poro centrale del pentamero B.



*Figura A: Struttura tossina colerica (Doc, s.d.).*

L'attività biologica della tossina colerica dipende dal legame delle subunità B del pentamero a specifici recettori presenti sulla superficie delle cellule eucariotiche. Tali recettori sono rappresentati da glicolipidi complessi: gangliosidi GM1. In seguito al legame della subunità B alla parete dell'intestino tenue tramite il legame al monosialoganglioside (GM1), si osserva l'internalizzazione del complesso per invaginazione della membrana e la formazione di una vescicola endocitica. All'interno dell'enterocita si ha una scissione proteolitica della CT-A nelle sue componenti A1 e A2.

La tossina attraversa le cisterne del Golgi in direzione contraria fino al reticolo endoplasmatico (RE) e nelle membrane del RE la CT viene processata e la subunità A1 attivata e traslocata nel citosol libera di interagire con i suoi target. Il target intracellulare della CT è l'adenilato ciclasi, uno dei più importanti sistemi di regolazione delle cellule eucariotiche. Questo enzima media la trasformazione dell'ATP in AMP-ciclico (cAMP), un messaggero intracellulare di fondamentale importanza per una serie di pathways cellulari. A questo punto il frammento A1 catalizza il trasferimento del gruppo ADP-ribosilico del NAD alla proteina Gs dell'adenilato ciclasi, la subunità della proteina Gs contiene un sito di legame per il GTP ed un'attività GTPasica intrinseca. Il legame del GTP porta alla dissociazione della subunità  $\alpha$  dal dimero  $\beta\gamma$  ed alla successiva attivazione dell'adenilato ciclasi da parte della subunità  $\alpha$  stessa. Questa attivazione continua fino a quando l'idrolisi del GTP a GDP non permette alla proteina G di tornare trimerica e quindi nella sua conformazione inattiva. La ADP-ribosilazione della subunità  $\alpha$  ad opera del peptide A1 inibisce l'idrolisi del GTP per cui l'adenilato ciclasi (AC) rimane costitutivamente attiva.

L'AMP-ciclico risultante attiva una proteina chinasi, cAMP-dipendente, la proteina chinasi A, che fosforila altre proteine portando ad un'alterazione del trasporto ionico. L'effetto finale della tossina colerica è quello di aumentare

in maniera anormale i livelli di cAMP provocando la perdita di fluidi con conseguente squilibrio degli elettroliti nel lume intestinale e portando la cellula ad espellere un massiccio numero di ioni con conseguente perdita massiva di acqua e caratteristica diarrea.

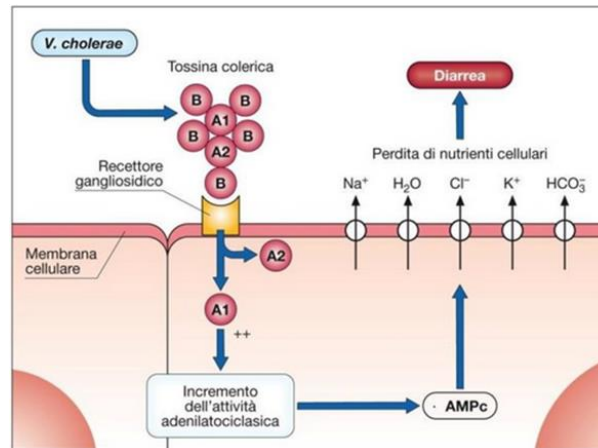


Figura: Meccanismo d'azione della tossina colerica (Clementi).

### 1.17.2 La tossina zonula occludens (Zot)

Il *Vibrio cholerae* elabora la tossina zonula occludens (Zot), una proteina che aumenta la permeabilità della mucosa dell'intestino tenue aprendo le giunzioni intercellulari strette ed è costituita da una singola catena polipeptidica di 44,8 kDa.

Il gene *zot* si trova nel genoma del fago filamentoso di *V. cholerae* CTX $\phi$ , insieme ai geni che codificano per le enterotossine CT e Ace. Il meccanismo

d'azione di Zot, recettore-mediato, tempo e dose-dipendente e completamente reversibile, induce un riarrangiamento del citoscheletro nelle cellule epiteliali intestinali permettendo l'apertura delle giunzioni strette tra le cellule (Marinero, 2003). Queste alterazioni riflettono, anche se non esclusivamente, modificazioni della permeabilità tissutale attraverso gli spazi intercellulari (pathway paracellulare), diversamente da quello che avviene in risposta alla tossina colerica (CT), in seguito alla quale si verifica un incremento della differenza di potenziale la cui variazione riflette un trasporto ionico attraverso la membrana cellulare (pathway transcellulare).

### ***1.17.3 Enterotossina colerica accessoria (Ace)***

L'enterotossina colerica accessoria (Ace) è una proteina dal peso di circa 11,3 kDa, che svolge un'azione analoga a quella della CT, infatti è capace di indurre un aumento della differenza di potenziale a livello della mucosa intestinale aumentando la secrezione di liquidi (Trucksis, 1993). La sequenza amminoacidica e la struttura proteica suggeriscono che Ace potrebbe agire polimerizzando ed inserendosi nella membrana plasmatica delle cellule eucariotiche formando un canale ionico.

#### ***1.17.4 Vibrio cholerae citolisina (VCC)***

Molti ceppi di *Vibrio cholerae* appartenenti al sierotipo O1 biotipo “El Tor” ma anche ai sierotipi non O1 e non O139, producono una esotossina emolitica chiamata El Tor emolisina o *Vibrio cholerae* citolisina (VCC).

La VCC è capace di legarsi alle membrane lipidiche e di formare dei canali (Pantano, 2006), preferenzialmente permeabili agli anioni che sono considerati responsabili di alcuni effetti citotossici della VCC come la lisi cellulare ed un'estesa vacuolizzazione. È codificata dal gene *hlyA* di *Vibrio cholerae* e avvia l'apoptosi dipendente dai mitocondri a causa della sua attività di canale anionico attraverso diverse vie di trasduzione del segnale. Questi canali anionici nella membrana apicale degli enterociti innescano un flusso transcellulare esterno di cloro, dove questo movimento ionico, associato al movimento esterno di Na<sup>+</sup> e acqua è responsabile di diarrea (Ramamurthy, 2020).

L'attività della VCC richiede la presenza del colesterolo nelle membrane dei liposomi e si ritiene che il legame specifico dell'esotossina con i componenti lipidici di membrana utilizzi distinte sequenze a loop all'interno della regione prossimale della membrana, svolgendo un ruolo chiave nel determinare l'efficacia del processo di poreforming. Il legame di membrana della VCC,

l'oligomerizzazione e l'attività di formazione di pori sono facilitati da diversi meccanismi regolatori non completamente stabiliti (Ramamurthy, 2020).

### **1.17.5 Emoagglutinina proteasi (HAP)**

L'HAP può essere un agente eziologico dell'infezione extra-intestinale mediata da *Vibrio cholerae* (Ghosh, 2016). L'emoagglutinina proteasi (HAP) viene secreta attraverso la via di secrezione di tipo II (T2SS) di *V. cholerae*, l'espressione di *hapA* è complessa e coinvolge una combinazione di diversi segnali ambientali attraverso molti regolatori globali, tra cui la proteina del recettore ciclico AMP (cAMP). L'HAP può potenzialmente contribuire all'attivazione della CT-A ed elaborare pro-*hlyA* durante l'infezione a bassa densità cellulare.

L'HAP ha più bersagli durante l'infezione per aumentarne la gravità, infatti supporta una lunga persistenza di *V. cholerae* nell'intestino tenue, media il rilascio della CT in prossimità del suo recettore e aumenta l'adesione cellule-cellula, supportando l'interazione tra cellule planctoniche e biofilm (Ramamurthy, 2020).

### ***1.18 Fattori di colonizzazione***

La colonizzazione intestinale da parte del *Vibrio cholerae* è un fenomeno multifattoriale, nel quale però alcune strutture, primo fra tutte il pilo co-regolato alla tossina, ricoprono un ruolo critico e fondamentale nel processo patogenetico.

#### ***1.18.1 Il pilo co-regolato alla tossina (TCP)***

Il *Vibrio cholerae* utilizza il pilo co-regolato alla tossina (TCP) per colonizzare l'intestino umano, causando la grave malattia diarroica del colera. I TCP sono omopolimeri lunghi, dal diametro di circa 7 nm, sono sottili e flessibili, normalmente associati a formare fasci. Il TCP agisce come recettore altamente specifico per il fago CTX $\phi$ , codificato dal gene *tcpA*, è stato chiamato TCP appunto per la sua associazione correlata all'espressione della tossina colerica (CT). La sequenza amminoacidica della subunità costituente il pilo, la TcpA, mostra un'omologia con i pili di tipo IV formati per assemblaggio di migliaia di copie di una singola subunità proteica, la pilina. I pili co-regolati con alla tossina (TCP) si auto aggregano, riunendo i batteri in micro-colonie che concentrano la tossina colerica secreta e difendono il



batterio dalle difese dell'ospite. Le interazioni tra i pili sono essenziali per la colonizzazione da *V. cholerae* nell'intestino tenue umano.

### ***1.18.2 Emoagglutinina sensibile al mannosio (MSHA)***

L'emoagglutinina sensibile al mannosio (MSHA) è un membro della famiglia dei pili di tipo IV ed è un'importante fattore di colonizzazione dell'ospite, recettore dei batteriofagi e mediatore del trasferimento del DNA nei batteri Gram-negativi. La presenza di MSHA è un altro marcatore fenotipico per i vibroni ed associato alla formazione di biofilm e alla sopravvivenza ambientale nel *V. cholerae* (Ramamurthy, 2020).

### ***1.18.3 Sistemi di secrezione (T2SS, T3SS, T6SS)***

I sistemi di secrezione vengono utilizzati per trasportare macromolecole attraverso le membrane, tre sono evidenziati in *V. cholerae*, ovvero il T2SS, il T3SS e il T6SS (Ramamurthy, 2020).

Per quanto riguarda il T2SS è noto anche come sistema di secrezione proteica extracellulare, coinvolto nel trasporto di enzimi idrolitici e può svolgere un ruolo nel miglioramento degli ambienti cellulari e nella generazione di

nutrienti per supportare la capacità batterica. Le proteine secrete dal T2SS vengono accumulate nel periplasma delle cellule batteriche. Il T2SS trasloca selettivamente le tossine e i diversi enzimi attraverso la membrana esterna. Utilizzando il T2SS, *V. cholerae* produce serina proteasi tipo tripsina (*VcsC*) calcio dipendente, e HAP dipendente dallo zinco, che è molto importante nella fase iniziale della colonizzazione intestinale.

Il T3SS è comunemente rilevato nei patogeni batterici Gram-negativi ma le modalità d'azione e le varie funzioni sono leggermente differenti. Dopo la traslocazione le proteine effettrici di T3SS possono svolgere un'ampia varietà di funzioni per promuovere la patogenesi. Ceppi di *V. cholerae* T3SS-positivi codificano tre regolatori: *VttR<sub>UN</sub>*, *VttR<sub>B</sub>*, *Tox<sub>R</sub>*. *VttR<sub>UN</sub>* e *VttR<sub>B</sub>* sono le proteine regolatrici trascrizionali transmembrana codificate all'interno dell'isola genomica del T3SS acquisita orizzontalmente, mentre *Tox<sub>R</sub>* è codificato sul cromosoma. *VttR<sub>UN</sub>* e *VttR<sub>B</sub>* sono proteine integrali di membrana, con domini di legame all'N-terminale simili per sequenza complessiva a *Tox<sub>R</sub>*.

La maggior parte dei *Vibrio cholerae* non O1/O139 utilizzano il T3SS come principale meccanismo di virulenza. Le isole di patogenicità del T3SS hanno una struttura tri-ripartita, ovvero una regione "centrale" conservata che codifica le funzioni necessarie per la colonizzazione e la malattia, mentre le regioni confinanti con le sequenze centrali codificano per lo più proteine

effettrici che svolgono una vasta gamma di attività. Tale sistema è essenziale per la virulenza in alcuni ceppi non O1/O139 e rappresenta un meccanismo diarroico distinto da quello caratteristico dell'O1 tossigeno e ceppi O139 (Ramamurthy, 2020). È stato osservato che la tossicità indotta da T3SS non predilige meccanismi apoptotici o necrotici, ma mostra lisi osmotica. Tutti e tre i regolatori di T3SS sono importanti per la morte delle cellule eucariotiche.

Il T6SS invece è un fattore indipendente dal contatto al recettore che assomiglia a una coda flagellare contrattile, ma con un orientamento opposto. Elimina i “concorrenti” nell'intestino attraverso la traslocazione di tossine proteiche, infatti *V. cholerae* può utilizzare questo sistema per danneggiare sia le cellule ospiti che altri membri del microbiota intestinale. Il macchinario del T6SS è indipendente dall'azione dell'ATP e coinvolge l'espressione di più di 10 geni ma i meccanismi o i segnali esterni che inducono l'attività di secrezione non sono completamente noti.

### ***1.19 Epidemiologia***

L'assenza o la carenza di acqua potabile e le inadeguate condizioni sanitarie di alcune aree, spesso unite a un generale stato di povertà e di degrado, sono le principali cause di diffusione del colera. Le aree tipicamente a rischio sono

le periferie urbane o i campi di rifugiati, dove la totale mancanza di infrastrutture rende completamente inadeguate le condizioni sanitarie, e dove l'assenza di sistemi fognari efficienti favorisce la contaminazione delle acque. Queste condizioni fanno dei Paesi in via di sviluppo le aree a maggior rischio di diffusione della malattia e il colera è spesso considerato tra gli indicatori di sviluppo sociale.

Le infezioni sono associate a grave diarrea e disidratazione per *Vibrio cholerae*, mentre la stragrande maggioranza delle vibriosi causa di gastroenteriti lievi sono da attribuirsi a *V. parahaemolyticus* e ai *V. cholerae* non O1/O139 (NOVC). Mentre la malattia sistemica fatale è da attribuirsi invece a *V. vulnificus*, che determina una mortalità del 50% ed è responsabile del 95% delle malattie letali associate ai frutti di mare (ISS I. d., 2004).

Il colera è stabilmente insediato nel delta del Gange nel subcontinente Indiano. Dal 1817 ad oggi si sono verificate sette pandemie, l'attuale pandemia (la settima) e la prima sono state causate da *Vibrio cholerae* "El Tor" che ha avuto origine in Indonesia e ha colpito anche l'India nel 1964; nel 1970 ha raggiunto l'Africa e l'Europa meridionale diffondendosi poi, nel 1991, fino in Sud America.



*Figura: Aree affette da epidemia di colera (WHO).*

Una maggiore ricorrenza della malattia è stata osservata nell'Europa orientale, dove è persistita fino al 2011, la pandemia si è introdotta dall'Asia meridionale, spesso circolando a livello regionale nei paesi che si affacciano sul Mar Nero e in Medio Oriente prima di raggiungere l'Africa (Oprea, 2020). Nell'Europa meridionale il colera è stato osservato principalmente nei singoli paesi durante gli anni '70 ed è stato importato dall'Africa settentrionale, nel 1994 importato in Albania e in Italia dalla regione del Mar Nero. Ciò evidenzia il decorso geografico del colera durante la settima pandemia e sottolinea il ruolo degli esseri umani nella sua diffusione globale.

Studi di sequenziamento dell'intero genoma su larga scala hanno notevolmente migliorato la comprensione della struttura (Oprea, 2020), dell'evoluzione e della diffusione della popolazione di *Vibrio cholerae*, il

batterio si è stabilito nel Golfo del Bengala da dove si è diffuso poi nel resto del mondo a lungo raggio fino in Cina, Africa e in America. L'epidemia si è diffusa anche in Europa a partire dal 1970 fino al 2011 portando alla creazione di catene di trasmissione locali.

Nel 1970 il ceppo "Ogawa" è stato il primo segnalato nei casi di colera nella regione del Mar Nero e in Medio Oriente e Africa occidentale. Questo ceppo corrisponde alla linea secondaria EUR1/AFR1 che ha continuato a circolare fino agli anni '90. Probabilmente la sua circolazione potrebbe essere dovuta a molteplici importazioni in un momento in cui il patogeno era attivo nella parte meridionale del bacino del Mediterraneo. Nell'estate del 1971 casi di colera si riscontrarono in Nord Africa per poi attraversare la Spagna e l'Italia, in quest'ultima i casi segnalati furono 278 tra l'agosto e l'ottobre dello stesso anno. Focolai esplosivi si sono verificati intorno ai principali porti della Campania, Puglia e della Sardegna (Oprea, 2020).

Alcune epidemie di colera sono state attribuite a ceppi di una specie recentemente isolata il *Vibrio cholerae* O139 (o *Vibrio cholerae* Bengala) che rappresenta un nuovo sierogruppo emergente (Islam, 2013). Dalla sua comparsa in India e in Bangladesh nel 1992, si è diffuso molto rapidamente in altre regioni tanto da indurre alcuni ricercatori a suggerire la presenza di un'ottava pandemia.

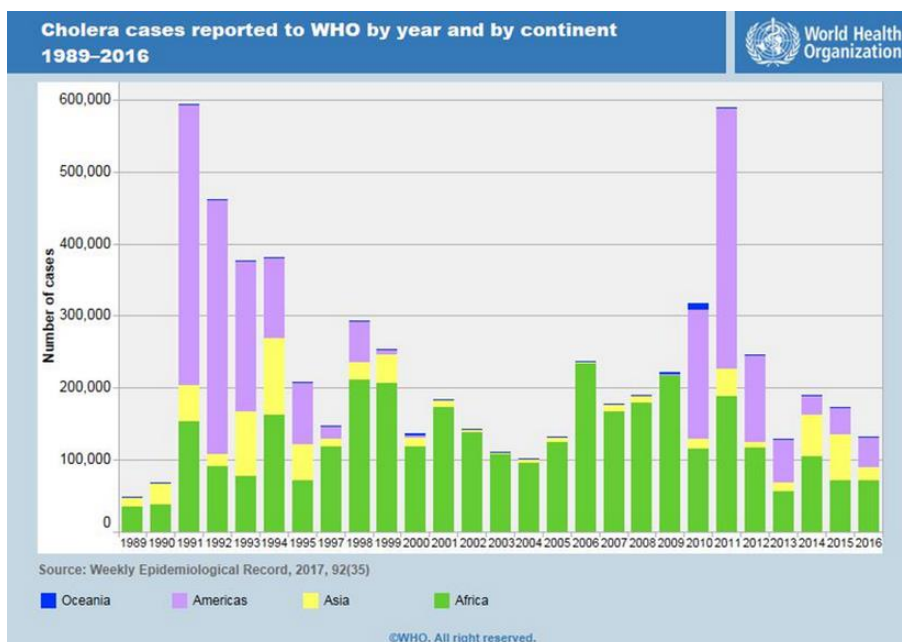


Figura: Casi di colera riscontrati tra il 1989 e il 2016 nel mondo (WHO).

Oggi la malattia è considerata endemica in molti Paesi e il microrganismo che la provoca non è ancora stato eliminato dall'ambiente (Keusch, 2002). Nei paesi sviluppati grazie al miglioramento delle condizioni igienico sanitarie i ceppi tossigeni di *Vibrio cholerae* non sono stati causa di problemi; tuttavia, a causa delle riserve ambientali del microrganismo all'interno di pesci, molluschi e plancton, c'è il potenziale rischio per i ceppi patogeni di colonizzare nuove regioni.

### ***1.19.1 Epidemiologia in Italia***

In Italia l'ultima importante epidemia di colera si ebbe in Campania e in Puglia nel 1973. Tale epidemia si sviluppò a causa del consumo di molluschi e pesce crudo. Più recentemente nel 1994 si è verificata a Bari un'epidemia di limitate proporzioni in cui sono stati segnalati meno di 10 casi e secondo gli ultimi dati forniti dal Ministero della Salute tramite la banca delle Schede di Dimissione Ospedaliera (SDO) relative all'anno 2005 a livello Nazionale si sono verificati 8 casi di infezioni da *Vibrio cholerae* di cui 2 in Sardegna. Da allora, l'unico caso descritto risale all'agosto del 2008 dove a Milano un uomo, di rientro dall'Egitto, morì di colera in ospedale. Gli accertamenti hanno mostrato che l'uomo aveva contratto la malattia all'estero e hanno escluso il rischio di epidemie per il nostro Paese.



## Capitolo secondo

### ***VIBRO CHOLERAE* NON O1 E NON O139**

#### ***2.1 Vibrio cholerae non O1 e non O139***

Gli isolati di *Vibrio cholerae* identificati come negativi per gli antigeni O1/O139 sono comunemente indicati come *Vibrio cholerae* non O1/O139 (NOVC) o vibriani non agglutinanti (NAG). I *V. cholerae* non O1 e non O139 sono generalmente presenti nell'ambiente acquatico e considerati batteri non patogeni, occasionalmente inducono gastroenterite, manifestazione clinica più comune, dove le infezioni sono simili a quelle coleriche ma perlopiù di lieve entità (Diep, 2015). Questi vibriani sono principalmente di natura non patogena, tuttavia, un numero crescente di casi sporadici e focolai di diarrea negli esseri umani è stato attribuito a questi ceppi in diverse parti del mondo. L'analisi dei cluster sia genotipici che fenotipici ha rivelato che i *Vibrio cholerae* non O1 e non O139 appartengono a un gruppo separato rispetto ai sierotipi O1 e O139, dovuto al fatto che tali test hanno valutato fattori di virulenza del colera e fattori accessori assenti nei ceppi non agglutinabili (Schirmeister, 2014).

I ceppi NOVC rispetto ai vibrioni del colera sono un gruppo relativamente poco studiato di patogeni umani e le infezioni correlate generalmente trascurate, ma negli ultimi anni focolai associati ai ceppi non tossigeni di *V. cholerae* sono in aumento e rappresentano uno degli esempi più eclatanti di malattie umane emergenti legate al cambiamento climatico (Vezzulli, 2020). Si ritiene inoltre che i ceppi NOVC, varianti di “El Tor” raggruppati insieme ai ceppi clinici inclusi il biotipo “El Tor” e il sierogruppo O139 (Siriphap, 2017), contribuiscano potenzialmente all’emergere di nuovi ceppi patogeni potenzialmente epidemici come diretta conseguenza di meccanismi di scambio o ricombinazione genetica. Inoltre, focolai di colera registrati in regioni dove la malattia non è endemica (Schirmeister, 2014) sembrano essere attribuiti a una rapida importazione di questi ceppi ambientali, *Vibrio* non tossigeni, in un contesto globale contemporaneo (Islam, 2013).

## ***2.2 Identificazione e caratterizzazione di V. cholerae non O1 e non O139***

I vibrioni non colerici o non agglutinanti (NAG) formano un gruppo eterogeneo di microrganismi indistinguibili dal punto di vista biochimico, attraverso test di routine, da ceppi di *Vibrio cholerae* O1/O139 (Ottaviani, Leoni, & Rocchegiani, 2009). Essi vengono tuttavia distinti da quest’ultimi

per due importanti caratteristiche, definiti non agglutinanti o NAG perché non presentano reazione di agglutinazione con gli antisieri specifici per *Vibrio cholerae* e sono ritenuti incapaci di dare colera epidemico. Questi microrganismi sono ampiamente diffusi nell'ambiente acquatico, ma a differenza della maggior parte dei vibrioni richiedono solo quantità trascurabili di NaCl per sopravvivere (non alofili) e per questo vengono maggiormente isolati in zone di estuario. A causa della loro sensibilità alla temperatura, sono definiti come un tangibile barometro del cambiamento climatico e gli isolamenti di questi microrganismi a latitudini più elevate e in ambienti temperati sono in aumento (Ford, 2020).

### ***2.3 Patogenesi***

La malattia associata a *Vibrio cholerae* non O1 e non O139, comprende gastroenteriti lievi e forme diarroiche di serietà variabile, alcune similcoleriche. L'infezione presenta un periodo d'incubazione inferiore alle 48 ore ed è caratterizzata principalmente dalla comparsa di diarrea che occasionalmente può provocare grave disidratazione come nel colera. Spesso si possono presentare crampi addominali, nausea, vomito e febbre e le feci possono essere anche sanguinolente e presentare muco. Questa evidenza è

importante perché rimarca una prima disuguaglianza tra i ceppi non O1/O139 ed il sierogruppo O1 (Caianiello, 2020). Anche se il meccanismo patogenetico di base non è ancora ben chiaro pare che *V. cholerae* non O1/O139 produca una tossina termostabile (Nag-ST) o determini un'invasione tissutale, a differenza dei vibrioni del colera. Inoltre, di rilevante importanza la produzione della tossina di Cholix (*chxA*) che in recenti studi ha rivelato gravi danni al fegato e morte degli epatociti in modelli animali, in modo dipendente dal tempo (Ogura, 2017). Altri geni o combinazioni di geni sono stati implicati nella patogenicità dei sierogruppi di *Vibrio cholerae* non O1/O139, il più notevole tra questi è il sistema di secrezione di tipo III (T3SS) che risulta essenziale per la virulenza e rappresenta un meccanismo diarroico distinto da quello caratteristico di *V. cholerae* O1 e O139 (Islam, 2013). Non sono stati trovati ceppi non O1/O139 associati ad epidemie. La durata della malattia varia dai 2 ai 7 giorni circa e di solito ha un esito favorevole. I sierotipi non agglutinabili dall'antisiero O necessitano di una considerevole carica batterica per causare l'infezione (Maraki, 2015). L'organo bersaglio è sempre l'intestino e la trasmissione è legata al consumo di acque e prodotti ittici contaminati crudi o poco cotti.

## ***2.4 Manifestazioni cliniche extra-intestinali***

I *Vibrio cholerae* non O1/O139 possono causare oltre a gastroenterite lieve, ampiamente documentata, anche malattie extra-intestinali invasive ed enteriti (Lee, 2007). Le batteriemie e non batteriemie da *Vibrio cholerae* non O1/O139 sono state associate all'espressione di geni di virulenza, quali *ctxA* e *tpcA*. Difatti la maggiore probabilità dei pazienti affetti da batteriemia, di sviluppare cirrosi e trombocitopenie era dovuta proprio a tali geni (Lee, 2007). I pazienti come soggetti affetti da neoplasie ematologiche, cirrosi epatica o altre condizioni immunocompromesse, risultavano vulnerabili all'invasione del flusso sanguigno da parte dei NOVC se esposti ad acqua contaminata (Maraki, 2015).

## ***2.5 Fattori di virulenza***

I *Vibrio cholerae* non O1/O139 hanno sviluppato meccanismi per adattarsi costantemente all'ambiente circostante e all'ospite che colonizzano, regolando la produzione di fattori di virulenza specializzati, dove l'espressione di quest'ultimi è controllata a livello trascrizionale e traduzionale.

### **2.5.1 Enterotossina stabile al calore (ST)**

Alcuni ceppi di *V. cholerae* elaborano l'enterotossina stabile al calore o ST che segnala le vie cicliche del guanosinemonofosfato o cGMP per attivare il regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR) che svolge la funzione di canale ionico per lo ione cloruro. La ST elevando i livelli di cGMP intracellulare induce secrezioni di anioni con conseguente diarrea. L'espressione della Nag-ST nei ceppi O1 di *V. cholerae* è rara ma segnalata soprattutto nei *V. cholerae* non O1/O139.

La tossina si lega alla guanilato ciclasi intestinale (GC-C) provocando l'attivazione del dominio catalitico intracellulare di GC-C. Ciò provoca la formazione di guanosina monofosfato ciclico (cGMP) o cAMP da guanosina trifosfato o GTP. Questa trasformazione intracellulare attiva la PKA dipendente da cAMP e quest'ultimo porta alla fosforilazione del regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR).

Il cGMP riduce  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , determina l'assorbimento di  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e inibisce la fosfodiesterasi 3 (PDE 3). Tutto ciò porta all'accumulo cellulare di cAMP e alla successiva attivazione di PKA, alla fosforilazione di PDE 3 e la diluizione di NaCl (Figura A); infine, il CFTR porta a secrezione di cloro con idrogenocarbonato ( $\text{HCO}$ ) che si traduce in diarrea (Ramamurthy, 2020).

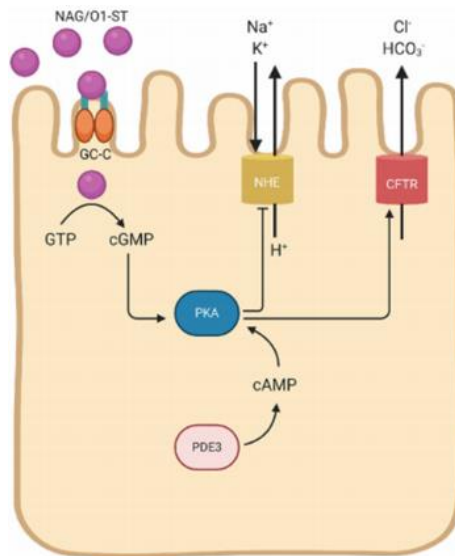


Figura A: Meccanismo d'azione enterotossina stabile al calore o ST (Ramamurthy, 2020).

### 2.5.2 Tossina di Cholix (Chx)

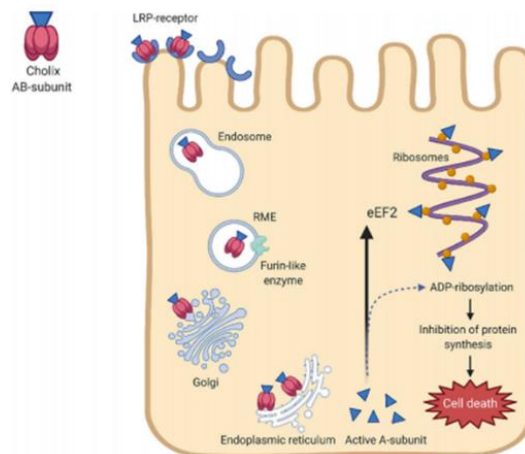
La tossina di Cholix è un membro della classe dell'ADP-ribosiltrasferasi specifiche contro il fattore di allungamento eucariotico ribosomiale-2 (*e-EF2*). La Chx è stata principalmente identificata in ambito ambientale in *V. cholerae* non O1/O139. Il recettore specifico per il binding della tossina Cholix non è noto poiché la sensibilità delle linee cellulari umane alla Chx è molto variabile. Recentemente la proteina proibitina nota anche come PHB, espressa da alcune membrane cellulari e da mitocondri, è stata identificata come proteina legante Chx (Ramamurthy, 2020).

La tossina di Cholix si lega alla proteina correlata al recettore delle lipoproteine delle cellule eucariotiche, segue poi la sua internalizzazione tramite endocitosi. Dopo aver superato il complesso di Golgi, la Chx segue un percorso retrogrado nel reticolo endoplasmatico per formare le subunità A e B. La subunità A si trasloca nel citoplasma e previene la sintesi proteica alterando attraverso la sua attività di ribosilazione ADP il residuo di diftamide del fattore di allungamento eucariotico ribosomiale-2 (Figura A). L'inibizione della sintesi proteica mediante queste alterazioni specifiche di *e-EF2* porta alla morte cellulare.

Questa tossina è cataliticamente attiva, specifica per il substrato ribosomiale *e-EF2* e tossica contro una vasta gamma di eucarioti. Recentemente si è determinata la struttura cristallina della tossina di Cholix a tutta la lunghezza e del suo dominio catalitico C-terminale, rispettivamente di 2,1 Å e 1,25 Å (Jørgensen, 2008). La struttura mostra notevoli somiglianze con la esotossina A (ExoA) di *P. aeruginosa* (identità di sequenza del 32%) che consiste in una struttura a domini tri-ripartiti, dove il dominio I e III funzionano rispettivamente nel legame al recettore, nella traslocazione nella membrana e nella catalisi enzimatica. Le nuove strutture cristalline rivelano anche una flessibilità intrinseca nella formazione di un loop (L1), prerequisito essenziale per l'attività enzimatica della tossina di Cholix (Jørgensen, 2008).



Il gene *chxA* codifica la tossina di Cholix, proteina di 666 residui (Awasthi, 2013). ChxA consiste di tre domini strutturali: un dominio di legame al recettore, un dominio di traslocazione e un dominio catalitico. Si è osservata elevata diversità genetica di Chx, infatti ritroviamo tre tossinotipi in *V. cholerae*, ovvero ChxA I, ChxA II e ChxA III. Per quanto riguarda ChxA I e II si è dimostrato che causano gravi danni a livello epatico in modelli animali (Ogura, 2017), il che suggerisce il coinvolgimento in infezioni extra-intestinali.



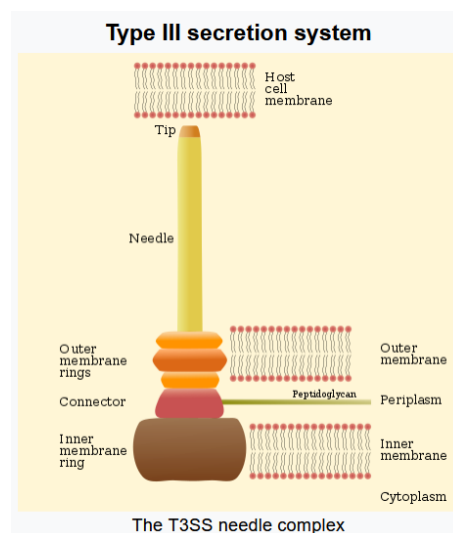
*Figura A: Meccanismo d'azione tossina di Cholix: La tossina di Cholix è un enzima batterico ADPRT, la reazione nel gruppo DT comporta una sostituzione nucleofila in cui il diftamide imidazolo in e-EF2 è il nucleofilo che sostituisce la base nicotinammide, gruppo uscente, del substrato NAD (Ramamurthy, 2020). L'effetto cellulare della modifica covalente (ribosilazione) di e-EF2 è l'inibizione della sintesi proteica che porta alla morte della cellula ospite (Jørgensen, 2008).*

### **2.5.3 Il sistema di secrezione di tipo III (T3SS)**

I ceppi non O1 e non O139 di *Vibrio cholerae* sono in grado di colonizzare l'intestino e provocare un accumulo di liquidi nonostante la mancanza di fattori di virulenza ritenuti importanti. Recentemente associati al T3SS alcuni casi di malattia diarroica causati dai NOVC (Islam, 2013). I geni *vcs* codificano le componenti strutturali del complesso di formazione dei pori associato alla membrana TTSS (*vcs*CJRTQVU) e un'ATPasi che fornisce energia per guidare la secrezione tramite l'apparato (VcsN). I TTSS sono fattori di virulenza ben noti e funzionano in diversi patogeni enterici Gram-negativi, tra cui il genere *Vibrio*. Recentemente la comprensione del ruolo di questo TTSS in *V. cholerae* è stato identificato nella patogenesi di alcuni ceppi non O1/O139 (Dziejman, 2005), e designati come importante fattore di virulenza.

I *V. cholerae* si trovano a contatto con le cellule eucariotiche non solo all'interno dell'ospite umano, ma anche in ambiente marino dove i batteri possono associarsi alla fauna marina. Considerando la prevalenza e la diversità dei ceppi non O1 e non O139 nell'ambiente, l'acquisizione di un TTSS può rappresentare una delle diverse strategie che il microrganismo impiega per competere per la sopravvivenza all'interno delle sue varie nicchie. È quindi interessante notare che tali strutture in *V. cholerae* possono

essere fondamentali per l' idoneità ambientale e per la diffusione della pandemia. Il T3SS è composto da circa 30 diverse proteine, il cluster genico di T3SS comprende geni che codificano per componenti strutturali, tra cui i geni *vcgV2* e *vcgC2*, rendendolo uno dei sistemi di secrezione più complessi. Alcune delle proteine che partecipano a T3SS condividono l' omologia della sequenza amminoacidica con le proteine flagellari. Il T3SS viene utilizzato sia per secernere proteine correlate alle infezioni sia per componenti flagellari.



*Figura A: Struttura del sistema di secrezione di tipo III (T3SS); Segno distintivo di T3SS è l'ago.*

*Le proteine batteriche che devono essere secrete passano dal citoplasma batterico attraverso l'ago direttamente nel citoplasma dell'ospite. Tre membrane separano in due il citoplasma: la doppia membrana (membrana interna ed esterna) del batterio Gram-negativo e la membrana eucariotica.*

*L'ago fornisce un passaggio regolare attraverso quelle membrane altamente selettive e quasi impermeabili (foto da Wikipedia).*

## ***2.6 Epidemiologia di Vibrio cholerae non O1 e non O139***

Le vibriosi dovute ai *Vibrio cholerae* non O1 e non O139 sono tipicamente trasmesse dal consumo di acqua potabile contaminata, da frutti di mare poco cotti, dall'esposizione delle ferite all'acqua di mare o dagli organismi marini contaminati.

Epidemie di *V. cholerae* sono generalmente limitate ai sierogruppi O1 e O139 che portano i geni per la produzione della tossina colerica, che è responsabile della maggior parte dei sintomi (ISS). Nel 2011 un piccolo focolaio di gastroenterite si è verificato ad Apalachicola, sulla costa settentrionale del Golfo della Florida e questo è il primo focolaio documentato attribuito a una tossicità dei sierogruppi non O1 e non O139 (Fang, 2019).

Questi microrganismi si trovano naturalmente negli estuari o negli ambienti fluviali costieri in tutto il mondo e tali sottogruppi emergenti di *V. cholerae* potrebbero servire come serbatoi di nuovi lignaggi con un maggiore potenziale di virulenza acquisito dal trasferimento genico orizzontale. Altri casi clinici associati a ceppi di *Vibrio cholerae* non O1/O139 isolati tra il 1983 e il 2013 sono stati riportati in Thailandia; gli isolati sono stati caratterizzati con una nuova generazione di test bioinformatici per determinarne il fenotipo e il genotipo associati alla virulenza. Nei casi

riportati i ceppi non tossigeni sono stati responsabili di diarrea sia lieve che moderata (Siriphap, 2017).

Altre evidenze a livello globale di *Vibrio* non tossigeni non O1/O139 isolati sia a livello ambientale che a livello clinico sono state evidenziate dalle acque costiere della California meridionale, in Bangladesh, in Messico (Purdy, 2010).

Ceppi di *Vibrio cholerae* non O1/O139 sono stati isolati in India, più specificatamente nel Bengala occidentale; gli isolati provenivano da pazienti ospedalizzati ed è stata evidenziata la loro capacità di causare diarrea con un meccanismo differente da quello tossico di *V. cholerae* (Dua, 2018) e perciò non più ignorati. Difatti il coinvolgimento dei ceppi non tossigeni non O1 e non O139 nell'emergenza di una nuova variante di *V. cholerae* è stato supportato da studi filogenetici che dimostrano che *V. cholerae* O139 si sia evoluto come risultato di un trasferimento genico orizzontale tra i sierogruppi O1 e non O1 (Oprea, 2020).

Diversi ceppi di *Vibrio cholerae* non O1 e non O139, con particolari fattori di virulenza, sono stati osservati in Australia e perciò considerati patogeni (Islam, 2013). Si ritiene generalmente che i focolai di colera in regioni non endemiche siano dovuti all'importazione del batterio da regioni endemiche,

dove la rapida diffusione di diversi sierogruppi a livello globale potrebbe rendere difficile l'identificazione del ceppo originale.

In Europa le infezioni da colera si riscontrano raramente e i pazienti di solito hanno una storia di viaggi da paesi in cui la malattia è endemica. I dati relativi all'Europa si riferiscono ad alcuni casi di pazienti, riscontrati dopo attività ricreative o contatto diretto nelle acque marine o lacustri in Germania e in alcuni laghi austriaci (Schirmeister, 2014). Lo studio del loro genotipo e fenotipo associati alla virulenza è stato utilizzato per valutare il potenziale di infettività in associazione a possibili cambiamenti climatici che potrebbero migliorarne la trasmissione (Schirmeister, 2014). I risultati hanno messo in evidenza la necessità di una sorveglianza continua di *V. cholerae* non O1 e non O139 nell'area del Mar Baltico, a causa dell'aumento di *Vibrio* in associazione all'aumento delle temperature delle acque superficiali (Frank, 2006). L'emergere di *V. cholerae* non O1 non O139 è coerente con il riconoscimento di nuove varianti patogene in tutto il mondo. Il riscaldamento climatico potrebbe infatti portare a un aumento di concentrazione per i patogeni di *Vibrio*, soprattutto durante i periodi caldi nei mesi estivi, una prova di tale correlazione, tra l'aumento di questi patogeni e le temperature elevate delle acque, sono state già osservate e i casi associati a *Vibrio* non tossigeni (Ford, 2020). Campioni di ostriche, sedimenti e acqua raccolti

durante un programma di sorveglianza per *Vibrio cholerae* condotto dal 2009 al 2012 nella baia di Chesapeake, nel Maryland, ha riscontrato infatti la presenza dei NOVC in molti dei campioni prelevati come una chiara dimostrazione del loro aumento (Ceccarelli, 2015).

### ***2.7 Vibrio non tossigeni e cambiamento climatico***

La sopravvivenza e la diffusione di *V. cholerae* nell'ambiente acquatico è molto dipendente dai valori di temperatura e salinità. In generale temperature superiori a 15°C e salinità comprese tra 20 e 25 g per L sono ottimali per la crescita (Carraro, 2012), sebbene il batterio possa tollerare un ampio ventaglio di condizioni ambientali. Inoltre, a differenza della maggior parte delle altre specie di *Vibrio*, *V. cholerae* è in grado di crescere in acqua dolce e potrebbe essere presente anche nei fiumi e nei laghi interni (Schirmeister, 2014). L'adattamento a condizioni di crescita non ottimali è collegato alle strategie di sopravvivenza che questi patogeni hanno evoluto, inclusa la capacità di formare biofilm (Dua, 2018) su superfici solide e l'ingresso in uno stato fisiologico VBNC (Ramamurthy, 2020).

Esiste una preoccupazione crescente riguardo al ruolo del cambiamento climatico e l'aumento delle infezioni causate dai vibrioni. Infatti, questa

stretta correlazione, tra questo gruppo di microrganismi e l'aumento delle temperature, è stata utilizzata come un barometro tangibile del cambiamento climatico in corso; dove difatti i ceppi di *Vibrio* non tossigeni crescono preferenzialmente in acqua marina calda ( $> 15^{\circ}\text{C}$ ) e a bassa salinità (25 g per L NaCl) (Baker-Austin, 2018).

Negli ultimi anni è cresciuta la comprensione riguardo al ruolo del cambiamento climatico sia a breve che a lungo termine. È probabile che questo sia il risultato di un'associazione tra l'aumento della frequenza e dell'intensità di molto eventi metereologici estremi (ondate di calore, gravi eventi di precipitazione), che possono portare ad acque più calde e meno saline, in particolare nelle acque vicino la costa. Tali eventi possono condurre a devastanti scenari per l'ecosistema marino e in questo ampio contesto in tutto il mondo sono cresciute le aree adatte alla proliferazione di *Vibrio* (Sterk, 2015).

In un recente studio sul plancton del Mar del Nord, si è dimostrata una evidente transizione durante gli ultimi trent'anni della comunità batterica dei vibrioni (Vezzulli, 2020). La transizione sembra corrispondere a una tendenza notevole del riscaldamento climatico nelle regioni ad alte altitudini ( $-0,5^{\circ}\text{C}$ ), ovvero, regioni non normalmente endemiche per questi patogeni. Il modello di diffusione verso le alte latitudini per i *Vibrio* è stato documentato in



ulteriori studi che mostrano una significativa espansione geografica di queste popolazioni, inclusi i *Vibrio* non tossigeni, identificati e rilevati quando e dove non erano mai stati segnalati con un impatto crescente sulla salute umana (Sterk, 2015). Inoltre, le alte temperature potrebbero selezionare ceppi specifici, molto più competitivi, con un potenziale di virulenza elevato e con esso un'elevata espressione dei fattori di virulenza (Oprea, 2020).

## ***2.8 Prodotti della pesca***

I *Vibrio* non tossigeni sono emersi come una seria minaccia per la salute umana in tutto il mondo, a causa della crescente rilevanza di *Vibrio cholerae* non O1 e non O139. Sono necessari strumenti diagnostici per distinguere i ceppi ambientali da quelli patogeni e infatti, si utilizzano prevalentemente geni marcatori associati alla virulenza.

La maggior parte delle infezioni da *Vibrio* sono dovute al consumo di pesce e frutti di mare, crudi, poco cotti o contaminati. I copepodi e i chironomidi sono serbatoi naturali di questa specie, infatti la capacità di degradare la chitina da parte del *Vibrio cholerae* indica una relazione commensale tra il patogeno e questi organismi (Senderovich, 2010).

Tuttavia, i modi in cui il *V. cholerae* è diffuso a livello globale sono ancora sconosciuti. C'è la possibilità che alcune specie di pesci possano essere serbatoi e vettori su piccola scala di *Vibrio cholerae*; questi poi consumati dagli uccelli acquatici, diffondono i batteri su scala globale (Senderovich, 2010). Una migliore comprensione dell'evoluzione ecologica di *V. cholerae* può aiutare a ridurre al minimo il rischio per la salute umana che questo comporta.

L'abbondanza della distribuzione delle diverse popolazioni patogene di *Vibrio* che popolano diverse regioni costiere in tutto il mondo porta a una maggiore comprensione del pericolo in atto, in modo da poter successivamente attuare un programma di gestione del rischio.

## Capitolo terzo

### 3. SCOPO DELLA RICERCA

#### *3.1 Scopo della ricerca*

I *Vibrio* non tossigeni o *Vibrio cholerae* non O1/O139 negli ultimi anni sono stati segnalati come patogeni emergenti con grave rischio per la salute umana. È stato sottolineato più volte l'ampio potenziale di infezioni che potrebbero emergere in futuro, associate all'aumento di questi patogeni in diverse aree del globo e correlate a particolari alterazioni climatiche (Sterk, 2015).

Questi batteri fanno parte della normale flora degli ecosistemi acquatici di tutto il mondo, numerosi sono i lavori che hanno evidenziato come ceppi di *V. cholerae* non O1/O139 (NCVs) o vibrioni non agglutinanti possano essere responsabili di malattie diarroiche o infezioni cutanee, senza essere capaci però di causare focolai epidemici (Diep, 2015).

Le informazioni epidemiologiche su questo gruppo di batteri sono ancora limitate, ma non mancano analisi genotipiche e fenotipiche di isolati di NCVs nelle quali vengono evidenziate differenze con i ceppi tossigeni O1 e O139 (Schirmeister, 2014).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di approfondire le conoscenze genetiche sul potenziale di virulenza di questi “nuovi” patogeni andando a ricercare nei ceppi di *Vibrio cholerae* non O1 e non O139 appartenenti alla ceppoteca dell’IZSUM ed isolati in Italia in diversi anni da matrici cliniche, ambientali o alimentari (acqua di mare, prodotti della pesca inclusi i molluschi bivalvi, feci) la presenza di potenziali fattori di virulenza di *V. cholerae* non O1/O139 quali l’enterotossina termostabile (Nag-ST, codificato dal gene *stn*), la tossina Cholix (ChxA, codificato dal gene *chxA*), il sistema di secrezione di tipo III (T3SS) e relativi fattori di virulenza accessoria.

Gli isolati risultati positivi al gene *stn/sto* e al gene *chxA* sono stati ulteriormente studiati mediante analisi di sequenziamento del DNA e confronto con sequenze registrate nei diversi database disponibili.

## Capitolo quarto

### MATERIALI E METODI

#### *4.1 Metodiche diagnostiche di ricerca*

In questo lavoro sono stati utilizzati in combinazione sia metodi microbiologici classici sia metodi molecolari che strumenti bioinformatici.

#### *4.2 Ceppi batterici*

In questo studio sono stati analizzati in totale 24 isolati di *Vibrio cholerae*, appartenenti alla ceppoteca dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" di Ancona, precedentemente identificati come *V. cholerae* mediante metodi biochimici (Ottaviani, Leoni, & Rocchegiani, 2018) e sierotipizzati presso l'IZSUM come *V. cholerae* non O1/O139. Di questi, un ceppo apparteneva alle collezioni internazionali (ATCC 4716), 17 erano stati isolati da prodotti della pesca, 2 da acqua marina, 1 da acqua dolce e 4 da campioni clinici (feci).

#### **4.3 Caratterizzazione di *Vibrio cholerae*, metodi microbiologici**

I ceppi sono stati isolati in terreno cromogenico per *Vibrio* (Chrom agar *Vibrio*) a 37°C per 24 ore ed è stata controllata la corrispondenza con la crescita di colonie dal colore verde-blu, caratteristiche della specie. In parallelo, i ceppi sono stati seminati su terreno selettivo TCBS agar (Tiosolfato-Citrato-Sali biliari-Saccarosio), che infatti favorisce la crescita di queste specie inibendo la maggior parte dei non-*Vibrio*, sfruttando la capacità dei vibrioni di tollerare un ambiente alcalino. L'identificazione di specie è stata poi effettuata mediante PCR (polymerase chain reaction), con i primers specifici per la Regione Spaziatrice Intergenica (ISR) dell'RNA ribosomiale 16S e 23S del *Vibrio cholerae* (Chun, 1999).

#### **4.4 Estrazione diretta tramite lisi**

Per l'estrazione del DNA genomico totale mediante lisi batterica, colonie caratteristiche di *V. cholerae* sono isolate in terreno Agar Nutritivo Salino all'1% di Cloruro di Sodio incubando a 37°C per 24 ore; le colonie isolate sono poi state inoculate in provette sterili da 1,5 ml contenenti 500 µL di acqua demineralizzata sterile. Le sospensioni batteriche sono state incubate per 5 minuti a 95°C nel Thermomixer (Thermomixer, Eppendorf). Dopo la

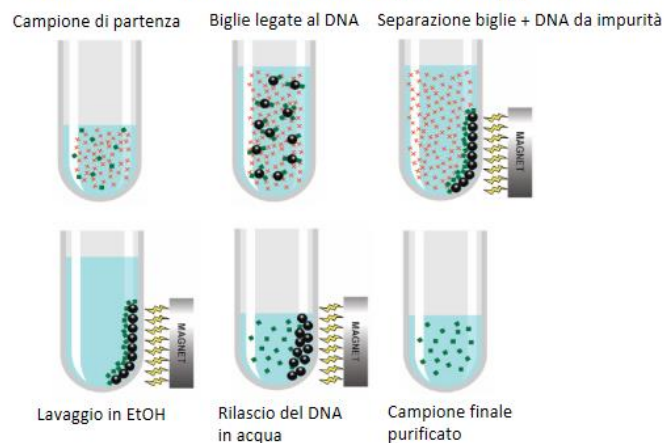
fase di lisi, le provette sono state centrifugate a 10.000 x g per 1 minuto e il surnatante è stato recuperato, eliminando il pellet. I lisati batterici sono stati conservati in congelatore a -20°C per le analisi successive. Un controllo negativo di estrazione (500 µL di acqua demineralizzata sterile) è stato estratto in parallelo con i campioni.

#### ***4.5 Estrazione tramite colonnine di silice magnetica***

L'estrazione è stata effettuata tramite l'utilizzo del Nuclises Lysis Buffer (Biomerieux) e il kit Nuclisens Magnetic Extraction Reagents (Biomerieux), secondo le specifiche del produttore. I lisati batterici ( $500 \pm 10\mu\text{l}$ ) sono stati trasferiti nel Nuclises Lysis Buffer (Biomerieux), e immediatamente agitati al vortex. Dopo aver incubato per dieci minuti a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 50 µl di Silice (Biomerieux) ai tubi contenenti i campioni. Le provette sono state mescolate con l'agitatore vortex brevemente subito dopo l'aggiunta della silice ed incubate per dieci minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono state centrifugate per 120 secondi a 1.500 x g. Il sopranatante è stato rimosso per aspirazione. I lavaggi sono stati effettuati con i tre tamponi di lavaggio del kit Magnetic Extraction Reagents (Biomerieux) e l'apparecchio NucliSens miniMAG (Biomerieux), come indicato dalla ditta

alle concentrazioni suggerite, consentendo alle particelle di silice di raccogliersi lungo le pareti della provetta, rimuovendo il soprannatante delicatamente, evitando di toccare la silice. I campioni sono stati eluiti in  $100 \pm 5 \mu\text{l}$  di Elution Buffer del Nuclisens Magnetic Extraction Reagents (Biomerieux), incubando nel Thermomixer (Eppendorf) per 5 minuti a  $60^\circ\text{C}$  a 1400 rpm. Le provette sono state poi poste nel NucliSens miniMAG (Biomerieux) con il magnete in posizione verticale e l'eluato recuperato per le successive analisi e conservato a  $-20^\circ\text{C}$ .

### Estrazione di DNA con biglie magnetiche



*Figura: Meccanismo di estrazione di DNA con biglie magnetiche (Doc, s.d.)*



## ***4.6 Metodi Molecolari***

Per tale studio sono state utilizzate tecniche di PCR classica sia per l'identificazione rapida di specie sia per la ricerca dei fattori di virulenza. La PCR offre molti vantaggi rispetto ai metodi basati sulle colture tradizionali ed altri metodi standard per il rilevamento di patogeni; tra i vantaggi ritroviamo infatti: specificità, sensibilità, rapidità, accuratezza e capacità di rilevare piccole quantità di un acido nucleico bersaglio in un campione complesso.

### ***4.6.1 PCR (Polymerase Chain Reaction) classica***

Il metodo della PCR usa una DNA polimerasi termostabile (enzima Taq polimerasi) per sintetizzare copie multiple di un DNA bersaglio. Il processo può essere diviso nei tre passaggi seguenti (che costituiscono un ciclo della reazione a catena):

1. Denaturazione del DNA (a temperature superiori a 90°C)
2. Appaiamento dei primers con il filamento complementare del DNA bersaglio,
3. Estensione ottimale del primer.

La reazione di sintesi può essere condotta ripetendo il ciclo per molte volte.



Figura: Processo di Polymerase Chain Reaction (PCR) (Doc, s.d.).

#### 4.6.2 Identificazione Regione Spaziatrice Intergenica (ISR).

La conferma di specie di *V. cholerae* è stata effettuata con primer specifici prVC-F e prVCM-R (Invitrogen, Thermofisher Scientific) diretti per la Regione Spaziatrice Intergenica dell'RNA ribosomiale 16S e 23S.

Primers	Sequenza
prVC-F	5'- TTA AGC STT TTC RCT GAG AAT G - 3'
PrVCM-R	5'- AGT CAC TTA ACC ATA CAA CCC G- 3'

La mix di reazione è stata preparata in un volume finale di 50  $\mu$ L contenente 1x Flexi buffer (Promega), 0,25 mM di ciascun dNTPs (Promega), 2,5 mM di MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1,0  $\mu$ M di ciascun primer (Invitrogen, Thermofisher Scientific), 0,025 U/ $\mu$ L di Go Taq (Promega). La reazione di amplificazione è

stata eseguita nel termociclatore Mastercycler pro (Eppendorf), con le seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti, seguita da 30 cicli di denaturazione a 94°C per 1 minuto, annealing a 50°C per 1 minuto ed estensione a 72°C per 1 minuto e 30 secondi. Ai 30 cicli di amplificazione segue un'estensione finale a 72°C per 10 minuti. Come controllo positivo di amplificazione è stato utilizzato il ceppo di riferimento NCTC 11318 *V. cholerae*. Come controllo negativo di amplificazione è stata utilizzata acqua demineralizzata sterile.

#### **4.6.3 PCR per rilevamento del gene *stn/sto***

Il NAG-ST è un peptide 17 aminoacidi, codificato dal gene *stn*. Il gene per NAG-ST è stato clonato e sequenziato (Ogawa, 1990) e ciò ha permesso la costruzione di sonde di DNA per il rilevamento di NAG-ST nei ceppi di *Vibrio cholerae* non O1 e non O139. La ricerca dell'enterotossina termostabile è stata condotta utilizzando i seguenti primers (Rivera, 2001):

Primer	Sequenza	Target
stn/sto F	5'- TCG CAT TTA GCC AAA CAG TAG AAA- 3'	stn/sto
stn/sto R	5'- GCT GGA TTG CAA CAT ATT TCG C- 3'	stn/sto

*stn/sto* amplicon: 172 bp

Concentrazione dei reagenti in un volume finale di 25 µl con 1-2 µl di DNA estratto dagli isolati di *V. cholerae*: PCR Buffer 1x (Promega), MgCl<sub>2</sub> (Promega) 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM ciascuno, primer *stn/sto* 67F e *stn/sto* 194R (Invitrogen, Thermofisher Scientific) 0,8 µM ciascuno, Taqpol (Promega) 0,05 U/µl. La reazione di amplificazione è stata eseguita nel termociclatore Mastercycler pro (Eppendorf), con le seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti, seguita da 30 cicli di denaturazione a 94°C per 2 minuti, annealing a 55°C per 1 minuto ed estensione a 72°C per 1 minuto. Ai 30 cicli segue un'estensione finale a 72°C per 10 minuti.

Come controllo positivo di amplificazione è stato utilizzato il ceppo di riferimento 35643 *Vibrio cholerae stn/sto*. Come controllo negativo di amplificazione è stata utilizzata acqua demineralizzata sterile.

#### ***4.6.4 PCR per rilevamento del gene chxA (Cholix Toxin Gene)***

La tossina di Cholix (Chx) è un'esotossina scoperta di recente in *Vibrio cholerae*, che è stata caratterizzata come un terzo membro delle tossine ADP-ribosiltrasferasi specifiche del fattore di allungamento eucariotico 2. Per

rilevare la presenza del gene negli isolati analizzati sono stati utilizzati primers specifici per tale gene (Purdy, 2010).

Primers	Sequenza	Target
ChxA F	5'- TGG TGA AGA TTC TCC TGC AA - 3'	<i>chxA</i> gene
ChxA R	5'- R CTT GGA GAA ATG GAT GCG CTG -3'	<i>chxA</i> gene

*ChxA* amplicon : 439 bp

Concentrazione dei reagenti in un volume finale di 25 µl con 1-2 µl di DNA estratto dagli isolati di *V. cholerae*: PCR Buffer 1x (Promega), MgCl<sub>2</sub> (Promega) 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM ciascuno, primer *ChxA* F e *ChxA* R (Invitrogen, Thermofisher Scientific) 0,4 µM ciascuno, Taqpol (Promega) 0,026 U/µl.

La reazione di amplificazione è stata eseguita nel termociclatore Mastercycler pro (Eppendorf), con le seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti, seguita da 30 cicli di denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 55°C per 30 secondi ed estensione a 72°C per 1 minuto. Ai 30 cicli di amplificazione segue un'un'estensione finale a 72°C per 3 minuti.

Come controllo positivo di amplificazione è stato utilizzato il ceppo di riferimento TO7 *V. cholerae*. Come controllo negativo di amplificazione è stata utilizzata acqua demineralizzata sterile.

#### 4.6.5 PCR per rilevamento dei geni *vcsV2* e *vcsC2*

Il cluster genico T3SS comprende geni che codificano per componenti strutturali, tra cui i geni *vcsV2* e *vcsC2*. La presenza di tali geni nei ceppi di *Vibrio* in esame è stata ricercata PCR con primer specifici (Chatterjee, 2009).

Primer	Sequenza
vcs V2 F	5'- TTT GGC TCA CTT GAT GGG -3'
vcs V2 R	5'- GCC ACA TCA TTG CTT GCT - 3'

*vcs V2* amplicon : 742 bp

Primer	Sequenza
vcs C2 F	5'- CGT TAC CGA TGC TAT GGG T - 3'
vcs C2 R	5'- AGA AGT CGG TTG TTT CGG TAA -3'

*vcs C2* amplicon : 535 bp

Concentrazione dei reagenti in un volume finale di 25 µl con 1-2 µl di DNA estratto di isolati di *V. cholerae*: PCR Buffer 1x (Promega), MgCl<sub>2</sub> (Promega)

2,0 mM, dNTPs 0,2 mM ciascuno, primer *vcsV2F* e *vcsV2R* (Invitrogen, Thermofisher Scientific) o primer *vcsC2F* e *vcsC2R* (Invitrogen, Thermofisher Scientific) 0,2  $\mu$ M ciascuno, Taqpol (Promega) 0,06 U/ $\mu$ l. La reazione di amplificazione è stata eseguita nel termociclatore Mastercycler pro (Eppendorf), con le seguenti condizioni per i geni *vcsV2* e *vcsC2*: denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti, seguita da 30 cicli di denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 55°C per 30 secondi (per il gene *vcsV2*) o 60°C (per il gene *vcsC2*) ed estensione a 72°C per 1 minuto. Ai 30 cicli di estensione segue un'estensione finale a 72°C per 3 minuti. Come controllo positivo d'amplificazione è stato utilizzato il ceppo di riferimento 11611-1 *V. cholerae*. Come controllo negativo d'amplificazione è stata utilizzata acqua demineralizzata sterile.

#### **4.7 Elettroforesi**

L'elettroforesi è una tecnica analitica e separativa basata sul movimento di particelle elettricamente cariche (ioni, molecole) immerse in un fluido per effetto di un campo elettrico applicato, mediante una coppia di elettrodi al fluido stesso. Gli elettrodi, con riferimento ad una cella elettrolitica, sono detti catodo, quello che assume carica negativa e anodo, quello che assume carica

positiva. Per cui le particelle si muovono verso l'elettrodo avente carica opposta rispetto alla carica della particella. Tale procedura, per tale studio è stata utile, per confermare la presenza dei geni di virulenza citati (*stn/sto*, *chxA*, *vcsV2* e *vcsC2*). L'elettroforesi è stata effettuata in un gel di agarosio al 2.0% in tampone TAE 1X, con l'aggiunta di 5 µl del colorante intercalante il DNA Midori Green. La separazione elettroforetica è stata effettuata con 5µl del marcatore di peso molecolare DNA marker (Opti DNA) e 20µl dei prodotti di PCR. L'analisi si è svolta a 100V per 50-60 min. La lettura è stata effettuata mediante lettore UV per gel elettroforesi, tramite controllo del marcatore di peso molecolare e dei controlli positivi di riferimento.

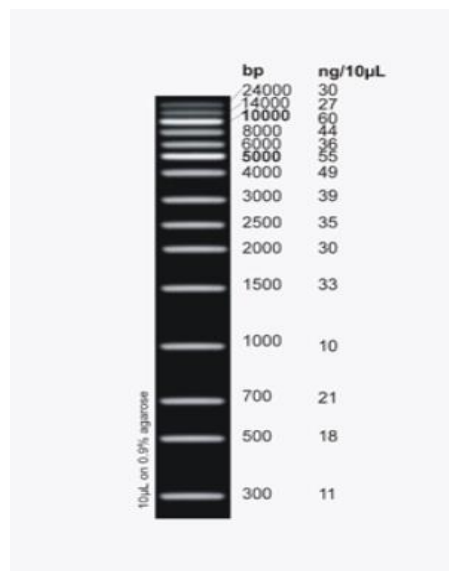


Figura: Bande elettroforetiche di riferimento  
(SlidePlayer, s.d.)



#### ***4.8 Purificazione dei campioni***

Per la purificazione dei prodotti di PCR è stato utilizzato il kit: High Pure PCR (Roche Diagnostics). L'obiettivo della purificazione è quello di eliminare gli oligonucleotidi primer utilizzati per la reazione a catena della polimerasi o PCR, i dNTP e l'enzima rimasti in soluzione al termine della reazione di amplificazione.

#### ***4.9 Sequenziamento***

Questa procedura si applica ai prodotti di PCR, che abbiamo rivelato tramite elettroforesi in gel di agarosio. È impiegata come conferma diagnostica o di caratterizzazione molecolare, si basa sul metodo di sequenziamento del DNA secondo Sanger con rilevazione mediante fluorescenza ed elettroforesi capillare. Alla purificazione preliminare del campione di DNA, di cui si vuole ottenere la sequenza, segue la reazione di sequenza tramite “cycle sequencing”, un metodo automatizzato che combina la reazione di PCR con il metodo di sequenziamento di Sanger. Questa, permette di determinare la sequenza di un DNA utilizzando un unico primer in presenza di ddNTPs che bloccano la polimerizzazione a livello di basi specifiche. Nella miscela di reazione si inseriscono il DNA da sequenziare (corrispondente ad un preciso

frammento del genoma), un singolo primer, una DNA polimerasi termostabile, dNTPs e ddNTPs. Ad ogni ddNTP è legato un determinato fluoroforo, il quale è specifico per la base a cui è stato legato. Ogni fluoroforo emette una radiazione fluorescente ad una lunghezza d'onda caratteristica e facilmente rilevabile. I ddNTPs marcati vengono utilizzati nella reazione per generare una miscela di frammenti di diverse dimensioni con la stessa estremità 5' e con un ddNTP marcato all'estremità 3'. L'utilizzo di una polimerasi termostabile permette di ripetere la reazione più volte riscaldando la miscela di reazione per denaturare il DNA e successivamente raffreddarla, per permettere l'appaiamento del primer e la sintesi di nuove molecole. In questo modo la reazione può essere automatizzata in un thermal cycler. I prodotti di reazione vengono poi separati tramite elettroforesi in gel di poliacrilamide su un sequenziatore automatico, cioè un sistema ad elettroforesi capillare dotato di un rilevatore ad induzione di fluorescenza al laser. L'analisi in elettroforesi capillare è stata eseguita presso la sede dell'Istituto Zooprofilattico sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" (IZSUM) di Perugia. Le fluorescenze emesse vengono canalizzate e separate da uno spettrografo in funzione della lunghezza d'onda ed il segnale viene acquisito da un rilevatore con dispositivo a carica accoppiata (CCD camera: charge-couple device); in tal modo possono essere determinate

simultaneamente in un unico campione tutte le diverse emissioni di fluorescenza. Il segnale di intensità luminosa viene raccolto da un software di acquisizione dei dati che li immagazzina come segnali elettrici per essere poi elaborati generando un elettroferogramma. Per la reazione di sequenza vengono usati quattro fluorofori, la cui fluorescenza viene rilevata man mano che i frammenti si spostano lungo il capillare elettroforetico irradiato dal raggio laser, in modo da riuscire a rilevare la sequenza di nostro interesse.

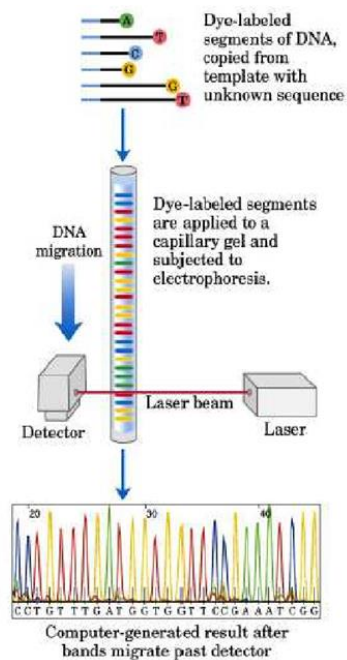


Figura : Meccanismo del sequenziamento (Doc, s.d.).

## ***4.10 Analisi Bioinformatiche***

### ***4.10.1 BioEdit***

Per questo studio si sono utilizzati diversi programmi per analisi bioinformatiche associati al confronto di sequenze rilevate tramite precedente sequenziamento, al fine di rilevarne la presenza in diversi database disponibili nel web. Tra i programmi utilizzati ritroviamo BioEdit. BioEdit è uno dei programmi più comuni utilizzati negli studi di biologia molecolare, è stato sviluppato come editor di allineamento di sequenze biologiche. Il programma contiene notevoli funzionalità, al fine dello studio si è adoperato per la costruzione manuale di sequenze consenso, costruite mediante l'utilizzo delle sequenze dei primers specifici scelti per la PCR. È diventato negli ultimi anni uno dei programmi ampiamente utilizzati, grazie agli efficienti moduli aggiornati e alla sua rapida capacità di produrre risultati. BioEdit è stato utilizzato per costruire le sequenze consenso relative ai ceppi positivi per geni di virulenza *stn/sto* e *chxA*, per confrontare quest'ultime poi nel database National Center for Biotechnology Information (NCBI) con sequenze già presenti nel database.

#### **4.10.2 BLAST, NCBI**

Il National Center for Biotechnology Information (NCBI), ha la sua sede a Bethesda (Maryland), ed è stato fondato nel 1988. Questo centro deve la sua importanza anche al fatto che ospita e gestisce varie banche dati di genomica (GenBank), proteine e altre informazioni relative alle biotecnologie, nonché sviluppa strumenti e software per analizzare i dati del genoma. Tra questi, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, ovvero strumento di ricerca di allineamento locale) è un algoritmo usato per comparare le informazioni contenute nelle strutture biologiche primarie, come ad esempio sequenze proteiche o sequenze nucleotidiche delle molecole di DNA. BLAST ci permette di confrontare una sequenza di interesse con un database di sequenze già conosciute e d'identificare tra queste ultime quelle che presentano delle somiglianze con la sequenza di interesse (*query*); una volta trovati i due geni "affini" si può indagare sperimentalmente la funzione e confrontarli.

Al fine di questa ricerca è stato utilizzato BLASTn (nucleotide BLAST) per riscontrare e confrontare le nostre *query* con le sequenze presenti nel database. Le sequenze sono state inserite in formato Fasta e come parametri di ricerca abbiamo utilizzato lo standard database: Nucleotide collection (nr/nt), organismo selezionato come confronto *V. cholerae* e come Program selection è stato utilizzato il somewhat similar sequences (BLASTn). Le sequenze

presentati somiglianza con le nostre sequenze consenso sono state poi scaricate da GenBank e utilizzate per ulteriori studi di confronto.

#### ***4.10.3 ClustalW***

Il software ClustalW allinea le sequenze in esame, utilizzando un'euristica che costruisce progressivamente un allineamento di sequenze multiple da una serie di allineamenti a coppie. Questo metodo funziona analizzando le sequenze nel loro insieme, quindi utilizzando il metodo UPGMA / Neighbor-join per generare una matrice di distanza. Un albero guida viene quindi calcolato dai punteggi delle sequenze nella matrice, quindi utilizzato successivamente per costruire l'allineamento di sequenze multiple allineando progressivamente le sequenze in ordine di somiglianza. Il programma è stato utilizzato in questo studio per valutare gli allineamenti tra sequenze analizzate tramite le somiglianze e le divergenze. Come parametro di ricerca è stato utilizzato il Pairwise Alignment: fast/approximate. Lo scoring method utilizzato è stato Percent, Gap open penalty: 15 e come Gap extension penalty: 6,66. Whight matrix relativo a sequenza di DNA utilizzato è stato IUB.

#### ***4.10.4 Mega X***

Il software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega) implementa molti metodi e strumenti analitici per la filogenomica. Mega X è stato inoltre aggiornato per utilizzare più core di elaborazione per molte analisi evolutive molecolari. Negli ultimi anni, il sequenziamento del genoma è diventato un mezzo efficiente e potente per indagare su un'ampia gamma di sistemi biologici, dagli studi su larga scala della diversità biologica al monitoraggio dell'evoluzione e dell'origine dei microbi patogeni. I numerosi passaggi necessari per raccogliere risultati interpretabili e utilizzabili dai dati di sequenza grezza richiedono invariabilmente un'analisi comparativa delle sequenze molecolari per scoprire differenze genomiche funzionali e adattive. Il software Mega fornisce questi strumenti per condurre tali analisi, include un ampio repertorio di programmi per l'assemblaggio di allineamenti di sequenze, risolvere alberi evolutivi, stimare distanze e diversità genetiche, inferire sequenze ancestrali, calcolare tempi di calcolo e testare la selezione (Kumar, 2016). In tale studio tale programma è stato utilizzato come software comparativo per sequenze rilevate tramite precedenti analisi in NCBI, in modo da delineare un profilo dei vari ceppi ricercati e della loro appartenenza a diversi o stessi gruppi filogenetici, mediante la costruzione di alberi filogenetici. Gli alberi filogenetici sono stati costruiti con il metodo di

Neighbor-Joining, utilizzando i Bootstrap e come modello Maximum composite Likelihood. Per i gap tra i parametri si è selezionato Pairwise deletion.



## Capitolo quinto

### RISULTATI

#### *5.1 Analisi Bioinformatiche e Risultati*

In totale 24 ceppi di *Vibrio cholerae*, appartenenti alla ceppoteca dell'Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" di Ancona, gli isolati sono stati come *V. cholerae* non O1/O139 (Ottaviani, Leoni, & Rocchegiani, 2018), sono stati analizzati per verificare la presenza dei maggiori geni associati alla patogenicità per i vibrioni non tossigeni, tra cui i geni per *stn/sto*, *chxA*, *vscV2* e *vscC2*.

Gli isolati sono stati confermati come appartenenti alla specie *V. cholerae* tramite analisi di PCR (polymerase chain reaction) per la Regione Spaziatrice Intergenica ISR dell'rRNA 16S-23S. I campioni analizzati provenivano da prodotti ittici, da acque contaminate e da campioni fecali (Tabella 1).

Tabella 1: Ceppi utilizzati in questo studio con relativa matrice e anno di isolamento.

<b>NUMERO IDENTIFICATIVO DELL'ISOLATO BATTERICO</b>	<b>MATRICE D'ISOLAMENTO</b>	<b>ANNO DI ISOLAMENTO</b>
VC NCTC 4716	Non disponibile	Non disponibile
46175	Vongole	2019
28055/4	Vongole	2020
44313	Vongole veraci	2019
41765	Pesce	2019
42614	Gasteropode	2019
54763	Prodotti della pesca	2019
114 (35643)	Gamberetti	2005
115 (810-6)	Acqua marina	2011
116(810-116)	Acqua marina	2011
38631	Molluschi di acqua dolce	2008
5033/3	Molluschi bivalvi	2012
30116	Vongole	2009
11611/1	Mitili	2012
30115	Mitili	2009
38098	Feci	2012
2570/2.3	Molluschi Bivalvi	2014
10689/1	Molluschi Bivalvi	2009
37253	Feci	2007
52717	Pesce	2009
29510-1	Mitili	2009
41918	Feci	2007
31548	Feci	2012
2570/2.2	Molluschi bivalvi	2014

Tutti i ceppi hanno confermato l'appartenenza alla specie di *V. cholerae*, amplificando il prodotto di PCR di 281-320 bp alla PCR per la sequenza ISR 16S-23S rRNA (Fig. A/B/C).

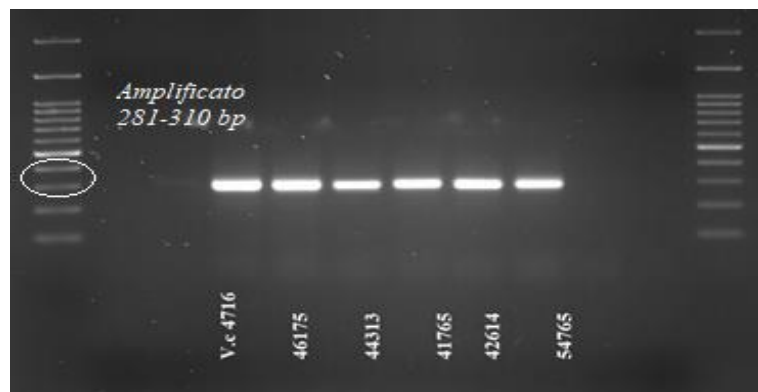


Figura A: Gel di agarosio al 2% dei prodotti di PCR della sequenza ISR 16S- 23S rRNA di isolati di *V. cholerae* nonO1 nonO139, amplificato atteso per ISR 16S- 23S rRNA: 281-320 bp.

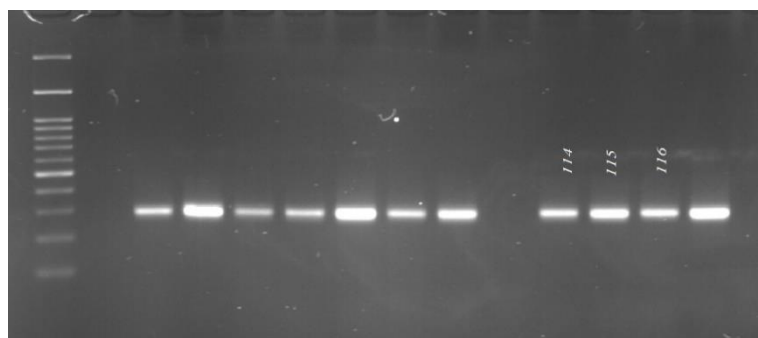


Figura B: Gel di agarosio al 2% dei prodotti di PCR della sequenza ISR 16S- 23S rRNA di isolati di *V. cholerae* nonO1 nonO139: Ceppi in esame, 114 (35643), 115 (810-6), 116 (810-116).

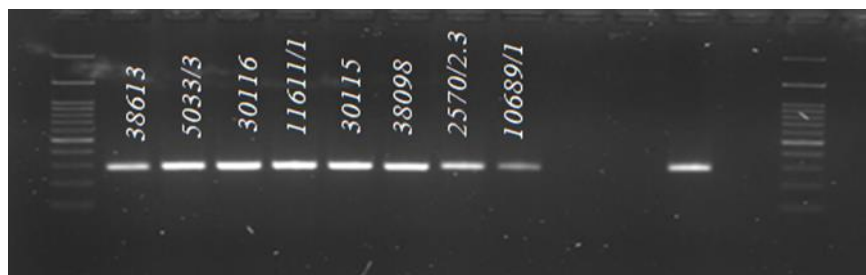


Figura C: Gel di agarosio al 2% dei prodotti di PCR della sequenza ISR 16S- 23S rRNA di isolati di *V. cholerae* nonO1 nonO139. Ceppi di *V.cholerae* 38613, 5033/3, 30116, 11611/1, 30115, 38098, 2570 2.3, 106689/1.

## 5.2 Distribuzione dei geni associati alla virulenza

I ceppi di *V.cholerae* presi in esame sono stati sottoposti ad analisi di PCR classica per riscontrare la presenza di geni associati alla virulenza per i *Vibrio cholerae* non O1/O139, tra cui l'enterotossina stabile al calore codificata dal gene *stn/sto*, la tossina di Cholix codificata dal gene *chxA* e il sistema di secrezione di tipo III (T3SS) rilevato tramite i geni *ves V2/C2*. Dei 24 ceppi analizzati 4 hanno amplificato il frammento di PCR del gene *stn/sto*, 10 risultavano positivi alla PCR per la tossina di Cholix (*chxA*) e 9 alle PCR per il sistema secretorio T3SS (geni *ves V2/C2*). Un solo ceppo (114 (35643)) presentava simultanea presenza per il gene *stn/sto* e il gene *chxA* (Figura A/B/C/D ).

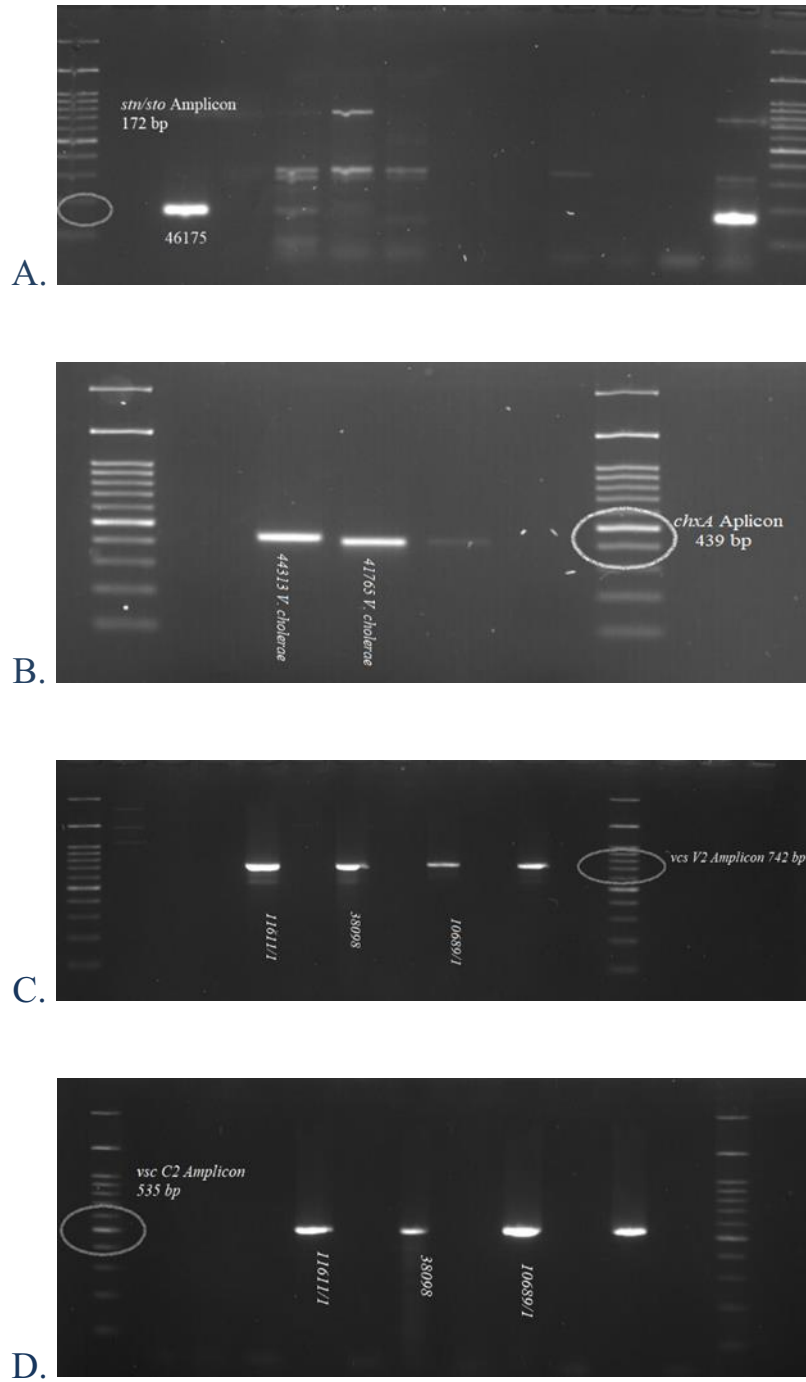


Figura A/ B/ C/ D: Profilo elettroforetico su gel d'agarosio al 2% per alcuni ceppi positivi ai geni per *stn/sto*, *chxA*, *vcsV2* e *vscC2*.

I ceppi di *V. cholerae* identificati come 46175, 114(35643), 115(810-6) e 116(810-116) sono risultati positivi alla presenza del gene per la virulenza all'enterotossina stabile al calore (gene *stn/sto*). I ceppi di *Vibrio cholerae* 114(35643), 41918, 44313, 41765, 38631, 5033/3 e 30116 hanno evidenziato la presenza per la tossina di Cholix (gene *chxA*). I ceppi positivi al sistema di secrezione di tipo III (T3SS), geni *vcs V2/vcsC2*, sono rispettivamente il: Vc 4716, 46175, 4716, 28055/4, 41765, 54763, 11611/1, 38098, 10689/1, 29510-1 (Tabella 1).

Analizzando i ceppi in questo studio è stato evidenziato che i campioni ambientali positivi per i geni *stn/sto*, *chxA*, *vcs V2/C2* erano rispettivamente 4 (21%), 9 (47%), 6 (32%) su 19, mentre nei ceppi provenienti da campioni fecali la presenza dei geni *vcs V2* e *vcs C2* è stata riscontrata su 2 campioni su 4 (50%) e la presenza del gene per la ChxA in un solo campione su 4 (25%; Tabella 2). Il ceppo proveniente dalla ceppoteca NCTC era positivo ai geni *vcs V2/C2*.

Tabella 1: Distribuzione dei geni associati alla virulenza per i ceppi di *V. cholerae* appartenenti a questo studio (IZSUM, Ancona).

ISOLATO BATTERICO	FONTE D'ISOLAMENTO	GENE <i>stn/sto</i>	GENE <i>chxA</i>	GENI <i>vcs V2/C2</i>
Vc NCTC 4716	Non disponibile	negativo	negativo	positivo/positivo
46175	Vongole	positivo	positivo	positivo/negativo
28055/4	Vongole	negativo	negativo	positivo/positivo
44313	Vongole veraci	negativo	positivo	negativo/negativo
41765	Pesce	negativo	positivo	positivo/positivo
42614	Gasteropode	negativo	negativo	negativo/negativo
54763	Prodotti della pesca	negativo	negativo	positivo/positivo
114 (35643)	Gamberetti	positivo	positivo	negativo/negativo
115 (810-6)	Acqua marina	positivo	negativo	negativo/negativo
116(810-116)	Acqua marina	positivo	negativo	negativo/negativo
38631	Molluschi d' acqua dolce	negativo	positivo	negativo/negativo
5033/3	Molluschi bivalvi	negativo	positivo	negativo/negativo
30116	Vongole	negativo	positivo	negativo/negativo
11611/1	Mitili	negativo	negativo	positivo/positivo
30115	Mitili	negativo	positivo	negativo/negativo
38098	Feci	negativo	negativo	positivo/positivo
2570/2.3	Molluschi bivalvi	negativo	positivo	negativo/negativo
10689/1	Molluschi bivalvi	negativo	negativo	positivo/positivo
37253	Feci	negativo	negativo	negativo/negativo
52717	Pesce Mitili	negativo	negativo	negativo/negativo
29510-1	Feci	negativo	negativo	positivo/positivo
41918	Feci	negativo	positivo	negativo/negativo
31548	Molluschi	negativo	negativo	positivo/positivo
2570/2.2	bivalvi	negativo	negativo	negativo/negativo
Tot. Ceppi 24		Positività 4/24	Positività 10/24	Positività 9/24

Tabella 2. Tabella riassuntiva di positività ai geni *stn/sto*, *chxA*, *vcsV2/C2* per diverse fonti d'isolamento.

Fonti d'isolamento	<i>stn/sto</i>	<i>chxA</i>	<i>vcsV2/C2</i>
Prodotti della pesca e molluschi d'acqua dolce	2/17	9/17	7/17
Acqua di mare	2/2	0/2	0/2
Feci	0/4	1/4	2/4
<b>Totale</b>	<b>4/24 (17%)</b>	<b>10/24 (42%)</b>	<b>9/24 (38%)</b>

### 5.3 Analisi di sequenza per il gene *stn/sto*

Sono state valutate su database pubblici e internazionali (NCBI) le sequenze consenso per il gene *stn/sto*, costruite sulle sequenze dei ceppi di *V. cholerae* non O1 e non O139 in analisi che hanno presentato positività per la tossina termostabile al calore (NAG-ST).

I ceppi di *V. cholerae* non O1/O139 di origine ambientale 114 (35643), 115 (810-6), 116(810-16) e 46175, risultati positivi alla presenza per il gene *stn/sto* sono stati analizzati mediante sequenziamento del DNA del frammento di PCR del gene *stn/sto* in entrambe le direzioni, con i primer *stn/sto* 67F e *stn/sto* 194R (Tabella 3).

La costruzione della sequenza consenso è possibile grazie all'utilizzo del primer forward *stn/sto* 67F e del primer reverse *stn/sto* 194R (Rivera, 2001),



i quali ci permettono di creare la parte iniziale (data dal reverse invertito e complementato) e finale (data dal forward) della nostra *query*, mentre la parte centrale è data dal loro allineamento. Prima della costruzione è stato valutato il cromatogramma delle sequenze ottenute con entrambi i primers, per eliminare eventuali parti non idonee ai fini della costruzione della sequenza consenso.

Tabella 3

<b>stn/ sto 67 F</b>	5'- TCG CAT TTA GCC AAA CAG TAG AAA - 3'
<b>stn/ sto 194 R</b>	5'- GCT GGA TTG CAA CAT ATT TCG C - 3'

Le sequenze di consenso ottenute per i vari isolati sono state prima confrontate tra loro e poi inserite su BLASTn (NCBI) per confrontarle con le sequenze registrate presenti nel database, per verificarne l'identità, similitudini e differenze. Le sequenze di consenso erano rispettivamente:

> Sequenza di consenso dell'isolato di *V. cholerae* 114 (35643) per il gene *stn/sto*

ACAATACAAAACAGTGCAGCAACCACAACAAATTGAAAGCAAG  
 GTAAATATTAAAAAACTAAGTGAAAATGAAGAATGCCCATTTATA  
 AAACAAGTCGATGAAAATGGAAATCTCATTGACTGCT

> Sequenza di consenso dell'isolato di *V. cholerae* 115 (810-6) per il gene *stn/sto*

ACAATACAAAACAGTGCAGCAACCACAACAAATTGAAAGCAAG  
GTAAATATTAAAAAACTAAGTGAAAATGAAGAATGCCCATTTATA  
AAACAAGTCGATGAAAATGGAAATCTCATTGACTGCT

> Sequenza di consenso dell'isolato di *V. cholerae* 116 (810-16) per il gene *stn/sto*

ACAATACAAAACAGTGCAGCAACCACAACAAATTGAAAGCAAG  
GTAAATATTAAAAAACTAAGTGAAAATGAAGAATGCCCATTTATA  
AAACAAGTCGATGAAAATGGAAATCTCATTGACTGCT

> Sequenza di consenso dell'isolato di *V. cholerae* 46175 per il gene *stn/sto*

ACGATACAAAACAGTGCAGCAACCACAACAAATTGAAAGCAAG  
GTAAATATTAAAAAACTAAGTGAAAATGAAGAATGCCCATTTATA  
AAACAAGTCGATGAAAATGGAAATCTCATTGACTGCT

#### ***5.4 Studio bioinformatico del gene stn/sto***

Abbiamo confrontato le sequenze di consenso ricavate su BioEdit per omologia/divergenza di sequenza. Si è notato che le *query* risultanti non

presentano differenze né in termini di sequenza nucleotidica né in termini di sequenza amminoacidica.

Le sequenze sono state inserite sul programma bioinformatico BLASTn per confrontare le *query* con eventuali corrispondenze su Standard database per *Vibrio cholerae*.

Le corrispondenze risultanti sono state scaricate in formato FASTA e valutato il multiallineamento risultante (Figura A).

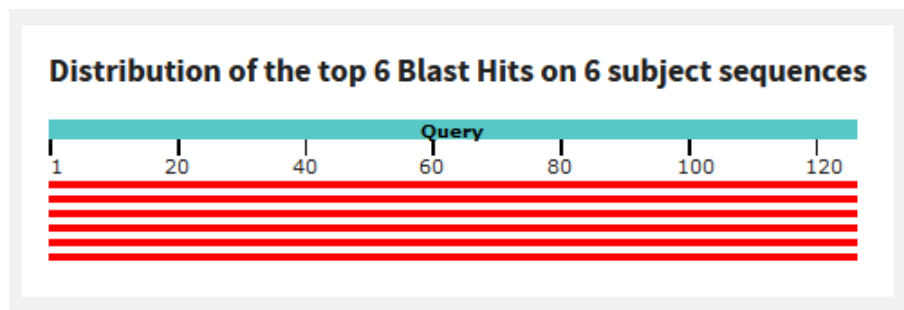


Figura A: Grafico dell'allineamento su BLASTn dove i punteggi e le coperture sono massimi (NCBI).

Una volta scaricato in formato FASTA le sequenze risultanti sul data base sono state confrontate e allineate con le *query* dello studio.

Le sequenze consenso per il gene *stn/sto* degli isolati di *V. cholerae* sono state confrontate fra loro per omologia/divergenza di sequenza (Figura B-C).

Gli isolati 35643, 810-6, 810-16 non presentavano differenze né in termini di sequenza nucleotidica (126 bp) né in termini di sequenza amminoacidica (41 aa) nel frammento del gene *stn/sto* analizzato.

L'isolato 46175 aveva una base nucleotidica differente nelle 126 bp analizzate, che determinava un cambiamento aminoacido nella sequenza della proteina, rispetto agli altri ceppi analizzati.

Dall'analisi in BLAST è risultato che le sequenze del gene *stn/sto* degli isolati 35643, 810-6, 810-16 avevano un'identità di sequenza del 100% (126/126 bp) alle sequenze per il gene *stn/sto* dei ceppi di *V. cholerae* GenBank accession number CP05380 e X74108, del 99% (125/126 bp) per la sequenza del ceppo M85198 e del 98% (124/126 bp) per le sequenze M97591, GU598214 e L03220. L'isolato di *V. cholerae* 46175 aveva un'identità di sequenza del 100% (126/126 bp) con il gene *stn/sto* del ceppo di *V. cholerae* GenBank accession number GU598214.

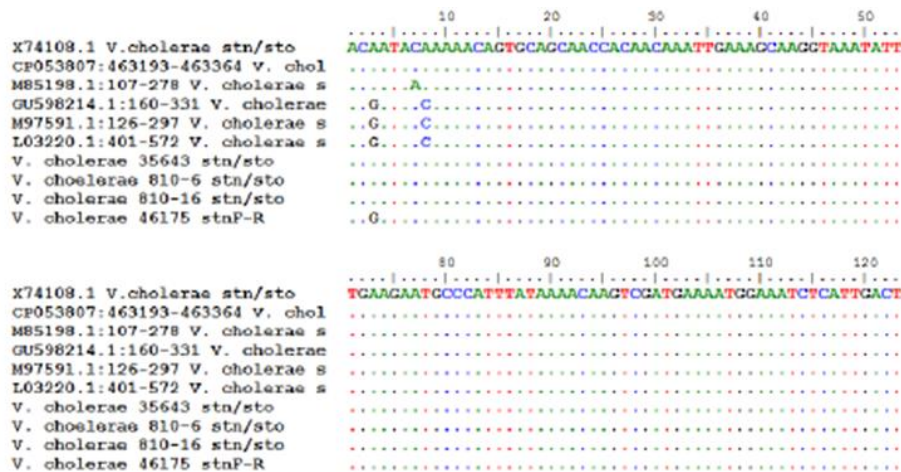


Figura B: Allineamento su BioEdit; confronto tra sequenze consenso ricavate appartenenti ai ceppi in analisi e subject riscontrate su BLASTn.

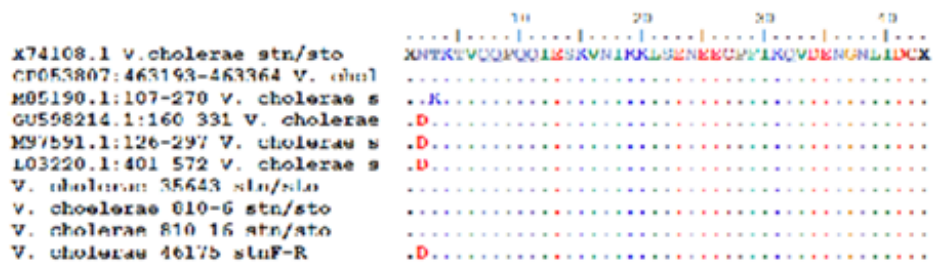


Figura C: Confronto tra le sequenze consenso costruite per il gene stn/sto e le sequenze risultanti su BLASTn in termini di sequenza amminoacidica.

Le sequenze amminoacidiche costruite per il gene *stn/sto* relativo all'enterotossina stabile al calore NAG-ST sono state valutate anche su UniProt, una Banca dati secondaria, che ha il compito di raccogliere tutte le informazioni presenti a riguardo delle proteine contenute su il Protein Data

Bank (PDB), un archivio per dati di struttura tridimensionale di proteine e acidi nucleici.

Il gene si trova sul cromosoma II e il prodotto è lungo 78 amminoacidi, il peso della molecola è di 8.814 Da. I primi 18 amminoacidi all'estremità ammino-terminale sono idrofobici suggerendo che questa regione del polipeptide agisca come sequenza segnale per la tossina. Gli ultimi 17 amminoacidi all'estremità carbossi-terminale sono identici a quelli della tossina NAG-ST prodotta da *Vibrio cholerae* non O1/O139 un'omologia del 46/50% (GenBank).

### **Vibrio cholerae NAG-ST (stn) gene, complete cds**

GenBank: M85198.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

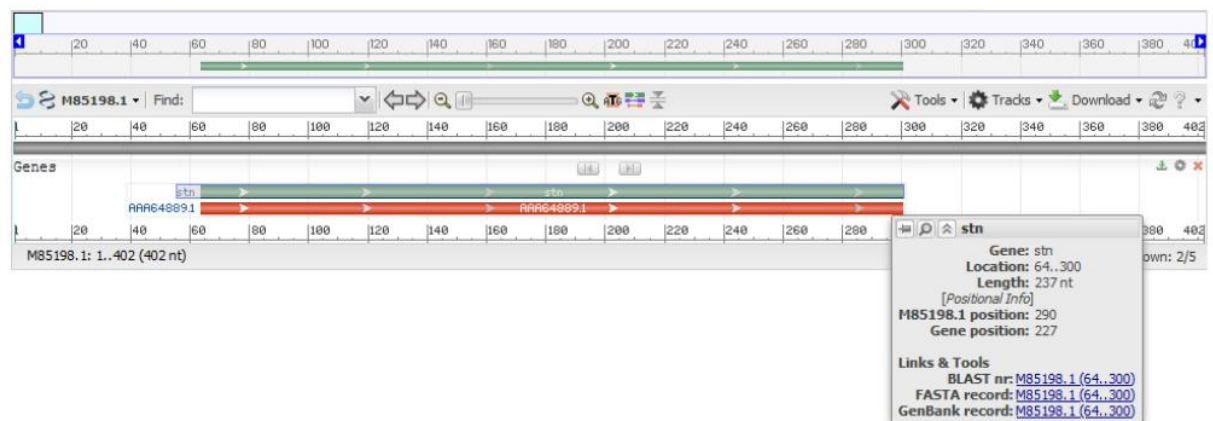


Figura: *Vibrio cholerae* NAG-ST gene (GenBank).

### ***5.5 Analisi di sequenza per il gene chxA***

Sono state valutate e confrontate le sequenze di consenso relative al gene *chxA*, gene responsabile della virulenza della tossina Cholix di *V. cholerae*, costruite per i ceppi ambientali 30115, 30116 , 114 (35643), 2570 2.3, 5033, 38631, 41765 e il ceppo 44313; che avevano presentato positività alla PCR. Le sequenze sono state studiate su BioEdit e MEGA X, al fine di identificare le omologie con i risultati disponibili nei database pubblici utilizzando BLAST (NCBI).

Le sequenze di consenso costruite grazie all'utilizzo dei primers *forward* e *reverse* per il gene *chxA* ( **ChxA F:** TGG TGA AGA TTC TCC TGC AA, **ChxA R:** CTT GGA GAA ATG GAT GCG CTG) (Purdy, 2010), sono state rispettivamente:

>Consenso 30115 chxA

```
GCATTAAAATTTCCGTTGATGAACTCGATCAGCAAAGAAACATCA
TCGAGGTGCCTAAACTATATAGTATAGATCTCGATAACCAAACGTT
AGAGCAGTGGAAAACCCAAGGTAATGTTTCTTTTTTCGGTAACGCG
ACCTGAACAAAGTATTGCCATTTCTTGGCCAAGCGTGAGTTACAAA
GCGGCGCATAAAAACGGTTCGCGTCATAAGCGTTGGGCAAATTGG
TTTACGACATCACCAAAGTGACTTTATGTTTCTATGAAGATCCTG
```

CTCAGTGTACTTATGGTGACGATTGGCATGGTGGAGCCTATAAAAC  
TGTTGCAGGAACTCCGAAGGCGATTACGGTTAAGCAAGGGATAGA  
ACAAAAAACCGTTGAA

>Consenso 30116 chxA

GCATTAAAATTTCCGTTGATGAGCTCGATCAGCAAAGAAATATCAT  
CGAGGTGCCTAAACTATATAGTATTGATCTCGATAACCAAACGTTA  
GAACAGTGGGAAAATCAAGGTAATGTCTCTTTTGCGGTAACGCGA  
CCAGAACAAAGTATTGCCATTTCTTGGCCAAGTGTCAGTTACAAAG  
CGGCGCATAAAAATGGTTCGCGTCATAAGCGTTGGGCAAACCTGGC  
TCACGACATTACCAAAGTGGTTTTATGTTTCTATGAAGATCCTGA  
GCTTTGTACTTATGGTGACGATTGGCATGGTGGAGCCTATAAAACT  
GTTGCAGGAACTCCGAAGGCGATTACGGTTAAGCAAGGGATAGAA  
CAAAAAAACCGTTGAA

>Consenso 114 (35643) chxA

GCATTAAAATTTCCGTTGATGAACTCGATCAGCAAAGAAATATCAT  
CGAGGTGCCTAAACTATATAGTATTGATCTCGATAACCAAACGTTA  
GAGCAGTGGAAAACCCAAGGTAATGTTTCTTTTTCGGTAACGCGA  
CCTGAACATAATATTGCTATTTCTTGGCCAAGCGTGAGTTACAAAG  
CAGCGCAGAAAGAGGGTTCACGCCATAAGCGTTGGGCTCATTGGC



ATACAGGATTAGCACTATGTTGGCTTGTGCCAATGGATGCTATTTA  
TAACTATATCACCCAGCAAAATTGTACTTTAGGGGATAAATTGGTTT  
GGTGGATCTTATGAGACTGTTGCAGGAACTCCGAAGGTGATTACG  
GTTAAGCAAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAG

>Consenso 2570 2.3 chxA

TGGTGAAGATTCTCCTGCAAGCATTAAAATTTCCGTTGATGAACTC  
GATCAGCAAAGAAATATCATCGAGGTGCCTAAACTATATAGTATA  
GATCTCGATAACCAAACGTTAGAGCAGTGGAAAACCCAAGGTAAT  
GTTTCTTTTTTCGGTAACGCGACCTGAACATAATATTGCTATTTCTTG  
GCCAAGCGTGAGTTACAAAGCAGCGCAGAAAGAGGGTTCACGCCA  
TAAGCGTTGGGCTCATTGGCATAACAGGATTAGCACTATGTTGGCTT  
GTGCCAATTGATGCTATTTATAACTATATCACCCAGCAAAATTGTA  
CTTTAGGGGATAAATTGGTTTGGTGGATCTTATGAGACTGTTGCAGG  
AACGCC

>Consenso 44313 chxA

GCATTAAAATTTCCGTTGATGAGCTCGATCAGCAAAGAAATATCAT  
CGAGGTGCCTAAACTATATAGTATTGATCTCGATAACCAAACGTTA  
GAACAGTGGGAAAATCAAGGTAATGTCTCTTTTTCGGTAACGCGA  
CCAGAACAAAGTATTGCCATTTCTTGGCCAAGTGTCAGTTACAAAG

CGGCGCATAAAAATGGTTCGCGTCATAAGCGTTGGGCTCATTGGC  
ATACAGGATTAGCACTATGTTGGCTTGTGCCAATTGATGCTATTTA  
TAACTATATCACCCAGCAAAAATTGTACTTTAGGGGATAAATTGGTTT  
GGTGGATCTTATGAGACTGTTGCAGGAACTCCGAAGGCGATTACG  
GTTAAGCAAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAG

>Consenso 41765 chxA

GCATTAAAATTTCCGTTGATGAACTCGATCAGCAAAGAAATATCAT  
CGAGGTGCCTAAACTATATAGTATAGATCTCGATAACCAAACGTT  
AGAGCAGTGGAAAACCCAAGGTAATGTTTCTTTTTTCGGTAACGCG  
ACCTGAACATAATATTGCTATTTCTTGGCCAAGCGTGAGTTACAAA  
GCAGCGCAGAAAGAGGGTTCACGCCATAAGCGTTGGGCTCATTGG  
CATACAGGATTAGCACTATGTTGGCTTGTGCCAATTGATGCTATTT  
ATAACTATATCACCCAGCAAAAATTGTACTTTAGGGGATAAATTGGTT  
TGGTGGATCTTATGAGACTGTTGCAGGAAACGCCGAAGGCGATTAC  
GGTTAAGCAAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAG

>Consenso 5033-3 chxA

GCATTAAAATTTCCGTTGATGAACTCGATCAGCAAAGAAATATCAT  
CGAGGTGCCTAAACTATATAGTATAGATCTCGATAACCAAACGTT  
AGAGCAGTGGAAAACCCAAGGTAATGTTTCTTTTTTCGGTAACGCG

ACCTGAACATAATATTGCTATTTCTTGGCCAAGCGTGAGTTACAAA  
ACAGCGCAGAAAGAGGGTTCACGCCATAAGCGTTGGGCTCATTGG  
CATACAGGATTAGCACTATGTTGGCTTGTGCCAATTGATGCTATTT  
ATAACTATATCACCCAGCAAAATTGTACTTTAGGGGATAATTGGTT  
TGGTGGATCTTATGAGACTGTTGCAGGAACGCCGAAGGCGATTAC  
GGTTAAGCAAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAG

>Consenso 38631 chxA

GCATTAATAATTTCCGTTGATGAGATCGATCAGCAAAGAAATATCA  
TCGAGGTGCCTAAACTATATAGTATTGATCTCGATAACCAAACGTT  
AGAACAGTGGGAAAATCAAGGTAATGTCTCTTTTGCGGTAACGCG  
ACCTGAACAAAGTATTGCCATTTCTTGGCCAAGCGTGAGTTACAAA  
GCGGCGCATAAAAACGGTTCGCGTCATAAGCGTTGGGCAAATTGG  
TTTACGACATCACCAAAGTGACTTTATGTTTCTATGAAGATCCTG  
CTCAGTGTACTTATGGTGACGATTGGCATGGTGGAGCCTATAAAAC  
TGTTGCAGGAACTCCGAAGGCGATTACGGTTAAGCAAGGGATAGA  
ACAAAAAACCGTTGAA

È stata visualizzata su UniProt la struttura e la sequenza amminoacidica della ChxA rilevando regioni altamente conservate e domini variabili associati a

cambiamenti in aminoacidi e dimostrando l'ampia variabilità presente nella tossina di Cholix (Figura A-B).

### Sequence<sup>i</sup>

Sequence status<sup>i</sup>: Complete.

Sequence processing<sup>i</sup>: The displayed sequence is further processed into a mature form.

Q5EK40-1 [UniParc] [FASTA](#) [Add to basket](#)

« Hide

```
      10      20      30      40      50
MYLTFYLEKV MKRMLLIAGA TVISSMAHPT FAVEDELNIF DECRSPCSLT
      60      70      80      90     100
FEPGKFIQSK LSIPSDVVLD EGVLYYSMTI NDEQNDIKDE DRGESIITIG
     110     120     130     140     150
EFATVRAIRH YVNQDAPFGV IHLDTTENG TKIYSYNRKE GEFAINWLVP
     160     170     180     190     200
IGEDSFASIK ISVDELDQQR NIIEVFKLYS IDLDNQTLEQ WKTQGNVSFS
     210     220     230     240     250
VTRPEHNIAI SWPSVSYRAA QKEGSRHRKW AHWHTGLALC WLVPMDAIYN
     260     270     280     290     300
YITQQNCILG DNWFGGSYET VAGTPKVITV KQGIEQKPV E QRIHFSKGN
     310     320     330     340     350
MSALAAHRVC GVPLETIARS RKPRDLTDDL SCAYQAQNI V SLFVATRILF
     360     370     380     390     400
SHLDSVFTLN LDEQEPEVAE RLSDLRRINE NNPGMVTQVL TVARQIYNDY
     410     420     430     440     450
VTHHPGLTPE QTSAGAQAAD ILSLFCPDAD KSCVASMNDQ ANINIESRSG
     460     470     480     490     500
RSLPENRAV ITPQGVINWT YQELEATHQA LTREGYVFGV YHGTNHVAAQ
     510     520     530     540     550
TIVNRIAPVP RGNNTENEK WGGLYVATHA EVAHGVARIK EGTGEVGLPT
     560     570     580     590     600
RAERDARGVM LRVYIPRASL ERFYRINTPL ENAEEHITQV IGHSPLRNE
     610     620     630     640     650
AFTGPESAGG EDETIVIGWDM AIHAVAIPST IPGNAYEELA IDEEAVAKEQ
     660
SISTKFFYKE RKDELK
```

Figura A: Sequenza amminoacidica completa per la ChxA (UniProt).

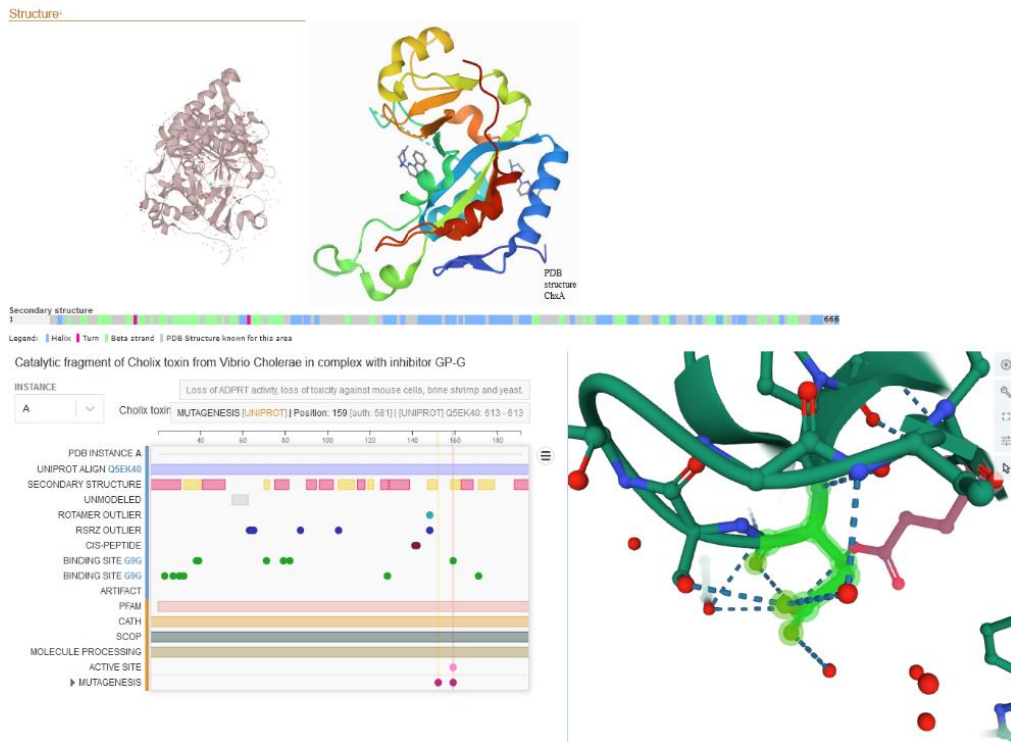


Figura B: Rappresentazione grafica di ChxA da UniProt e PDB. La struttura rivela una porzione amminoacidica altamente conservata e domini altamente variabili riconducibili alla funzione catalitica della tossina.

## 5.6 Studio bioinformatico del gene *chxA*

Le sequenze sono state inserite nel programma bioinformatico BLASTn per confrontare le *query* con eventuali corrispondenze per *Vibrio cholerae* presenti su NCBI. Si è valutata una ricerca fatta sia su Standard Database sia su RefSeq Genome Database per vedere se le sequenze consenso costruite per il gene *chxA* si allineassero eventualmente con sequenze sequenziate con il

metodo del NGS sequencing e disponibili pubblicamente. Le corrispondenze risultanti da BLAST sono state scaricate (formato FASTA) e si è poi valutato il multiallineamento risultante (Figura A) sui diversi programmi bioinformatici. Poi i risultati sono stati valutati su MEGA X tramite un'analisi filogenetica.



*Figura A: Grafico dell'allineamento su BLASTn dove i punteggi e le coperture per le sequenze risultanti sono massimi (NCBI).*

Le sequenze risultanti sul database sono state scaricate in formato FASTA e sono state confrontate e allineate con le *query* dello studio.

Dall'analisi in BioEdit è risultato che le sequenze del gene *chxA* prese in analisi presentavano maggiori differenze fra le 230 bp e le 340 bp su un totale di 390 bp. Le sequenze degli isolati di *Vibrio cholerae* 38631 e 30115 condividono un'omologia di sequenza rispettivamente del 99% (397 bp /398 bp) e del 90% (386 bp/ 398 bp) con la sequenza per il gene *chxA* del ceppo *V.cholerae* GenBank accession number KR337502. L'isolato di *V. cholerae* 44313 aveva un'identità di sequenza di 85% (385 bp/398 bp) con il gene *chxA* del ceppo di *V. cholerae* GenBank accession number KY595959. Le sequenze degli isolati 35643, 38248, 2570 2.3 e 5033-3 avevano un'identità del 100% (398 bp/398 bp) con la sequenza di *Vibrio cholerae* non O1/O139 GenBank accession number KU215668.

Dall'analisi della sequenza amminoacidica per il gene *chxA* degli isolati 30115, 30116, 39137 e 38631 è risultato che gli isolati condividono il 100% d'identità evidenziando gli stessi cambiamenti nella porzione amminoacidica compresa tra i 75 aa e 111 aa.



Figura B: Confronto tra le sequenze consenso costruite per il gene *chxA* e le sequenze risultanti su BLASTn in termini di sequenza amminoacidica. BioEdit inserisce una X dove il sequenziamento nella codifica della tripletta è incompleto.



Le *query* costruite sono state valutate su Clustal W per identificare regioni di omologia, dato che tale programma allinea prima tutte le sequenze a coppie tra di loro; ciò molto utile perché ci indica velocemente la similarità delle sequenze a coppie.

I risultati riscontrati mettono in evidenza un'alta percentuale di omologia dove lo *score* (punteggio) corrispettivo tra le sequenze è alto (75-95%). Ciò indicherebbe un'alta somiglianza tra le sequenze di consenso ricavate in questo studio (Figura A).

```

CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments

Sequence type explicitly set to DNA
Sequence format is Pearson
Sequence 1: 30113      380 bp
Sequence 2: 30116      380 bp
Sequence 3: 114_35643_ 398 bp
Sequence 4: 2570      372 bp
Sequence 5: 44313      398 bp
Sequence 6: 41765      398 bp
Sequence 7: 5033-3     388 bp
Sequence 8: 38631      380 bp
Start of Pairwise alignments
Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 93.4211
Sequences (1:3) Aligned. Score: 80
Sequences (1:4) Aligned. Score: 71.2366
Sequences (1:5) Aligned. Score: 80.2632
Sequences (1:6) Aligned. Score: 80.2632
Sequences (1:7) Aligned. Score: 79.7368
Sequences (1:8) Aligned. Score: 97.3684
Sequences (2:3) Aligned. Score: 77.6316
Sequences (2:4) Aligned. Score: 68.2796
Sequences (2:5) Aligned. Score: 83.4211
Sequences (2:6) Aligned. Score: 77.3684
Sequences (2:7) Aligned. Score: 76.8421
Sequences (2:8) Aligned. Score: 95.5263
Sequences (3:4) Aligned. Score: 93.8172
Sequences (3:5) Aligned. Score: 94.2211
Sequences (3:6) Aligned. Score: 98.995
Sequences (3:7) Aligned. Score: 98.7437
Sequences (3:8) Aligned. Score: 78.4211
Sequences (4:5) Aligned. Score: 88.4403
Sequences (4:6) Aligned. Score: 94.6237
Sequences (4:7) Aligned. Score: 94.3549
Sequences (4:8) Aligned. Score: 69.0386
Sequences (5:6) Aligned. Score: 94.2211
Sequences (5:7) Aligned. Score: 93.7186
Sequences (5:8) Aligned. Score: 82.3684
Sequences (6:7) Aligned. Score: 99.7487
Sequences (6:8) Aligned. Score: 78.1579
Sequences (7:8) Aligned. Score: 77.6316
Guide tree file created: [clustalw.dnd]

There are 7 groups
Start of Multiple Alignment
Aligning...
Group 1: Sequences: 2      Score:6678
Group 2: Sequences: 3      Score:6859
Group 3: Sequences: 4      Score:6916
Group 4: Sequences: 5      Score:6775
Group 5: Sequences: 2      Score:7087
Group 6: Sequences: 3      Score:6968
Group 7: Sequences: 5      Score:5706
Alignment Score 62037

CLUSTAL-Alignment file created [clustalw.aln]

clustalw.aln

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

2570      TGGTGAAGATTCCTCCGCAAGCATAAAAATTCCTGATGAACTGGATCAGCAAGAAA
5033-3     -----GCATTAATAATTCCTGATGAACTGGATCAGCAAGAAA
41765     -----GCATTAATAATTCCTGATGAACTGGATCAGCAAGAAA
114_35643_ GCATTAATAATTCCTGATGAACTGGATCAGCAAGAAA
44313     -----GCATTAATAATTCCTGATGAACTGGATCAGCAAGAAA
30115     -----GCATTAATAATTCCTGATGAACTGGATCAGCAAGAAA
38631     -----GCATTAATAATTCCTGATGAACTGGATCAGCAAGAAA
30116     -----GCATTAATAATTCCTGATGAACTGGATCAGCAAGAAA
*****

2570      TATCATCGAGTGCCTAAACTATATAGTATAGATCTCGATAACCAACGTTAGAGCAGTG
5033-3     TATCATCGAGTGCCTAAACTATATAGTATAGATCTCGATAACCAACGTTAGAGCAGTG
41765     TATCATCGAGTGCCTAAACTATATAGTATAGATCTCGATAACCAACGTTAGAGCAGTG
114_35643_ TATCATCGAGTGCCTAAACTATATAGTATAGATCTCGATAACCAACGTTAGAGCAGTG
44313     TATCATCGAGTGCCTAAACTATATAGTATAGATCTCGATAACCAACGTTAGAGCAGTG
30115     CATCATCGAGTGCCTAAACTATATAGTATAGATCTCGATAACCAACGTTAGAGCAGTG
38631     TATCATCGAGTGCCTAAACTATATAGTATAGATCTCGATAACCAACGTTAGAGCAGTG
30116     TATCATCGAGTGCCTAAACTATATAGTATAGATCTCGATAACCAACGTTAGAGCAGTG
*****

2570      GAAACCCAAAGTAAATGTTCTTTTTCGGTAAACGCGACCTGAACATAATGCTATTTC
5033-3     GAAACCCAAAGTAAATGTTCTTTTTCGGTAAACGCGACCTGAACATAATGCTATTTC
41765     GAAACCCAAAGTAAATGTTCTTTTTCGGTAAACGCGACCTGAACATAATGCTATTTC
114_35643_ GAAACCCAAAGTAAATGTTCTTTTTCGGTAAACGCGACCTGAACATAATGCTATTTC
44313     GAAACCCAAAGTAAATGTTCTTTTTCGGTAAACGCGACCTGAACATAATGCTATTTC
30115     GAAACCCAAAGTAAATGTTCTTTTTCGGTAAACGCGACCTGAACATAATGCTATTTC
38631     GAAACCCAAAGTAAATGTTCTTTTTCGGTAAACGCGACCTGAACATAATGCTATTTC
30116     GAAACCCAAAGTAAATGTTCTTTTTCGGTAAACGCGACCTGAACATAATGCTATTTC
*****

2570      TTGCCAAGCGTGGATTACAAGCAGCGCAGAAAGAGGGTTACGCCATAAGCGTTGGGC
5033-3     TTGCCAAGCGTGGATTACAAGCAGCGCAGAAAGAGGGTTACGCCATAAGCGTTGGGC
41765     TTGCCAAGCGTGGATTACAAGCAGCGCAGAAAGAGGGTTACGCCATAAGCGTTGGGC
114_35643_ TTGCCAAGCGTGGATTACAAGCAGCGCAGAAAGAGGGTTACGCCATAAGCGTTGGGC
44313     TTGCCAAGCGTGGATTACAAGCAGCGCAGAAAGAGGGTTACGCCATAAGCGTTGGGC
30115     TTGCCAAGCGTGGATTACAAGCAGCGCAGAAAGAGGGTTACGCCATAAGCGTTGGGC
38631     TTGCCAAGCGTGGATTACAAGCAGCGCAGAAAGAGGGTTACGCCATAAGCGTTGGGC
30116     TTGCCAAGCGTGGATTACAAGCAGCGCAGAAAGAGGGTTACGCCATAAGCGTTGGGC
*****

2570      ICATTGGCATAAGGATAGACACTATGTTGGCTTGTGCCAATGATGCATTAATACTA
5033-3     ICATTGGCATAAGGATAGACACTATGTTGGCTTGTGCCAATGATGCATTAATACTA
41765     ICATTGGCATAAGGATAGACACTATGTTGGCTTGTGCCAATGATGCATTAATACTA
114_35643_ ICATTGGCATAAGGATAGACACTATGTTGGCTTGTGCCAATGATGCATTAATACTA
44313     ICATTGGCATAAGGATAGACACTATGTTGGCTTGTGCCAATGATGCATTAATACTA
30115     AAATTGGTTACGACATCACC--AAAGTACTTT-----ATGTT-TCTATGAAGA
38631     AAATTGGTTACGACATCACC--AAAGTACTTT-----ATGTT-TCTATGAAGA
30116     AAATTGGTTACGACATCACC--AAAGTACTTT-----ATGTT-TCTATGAAGA
*****

2570      TATCACCAGCAAAATGTACTTTAGGGGATAATGGTTTGGTGGATCTTATGAGACTGT
5033-3     TATCACCAGCAAAATGTACTTTAGGGGATAATGGTTTGGTGGATCTTATGAGACTGT
41765     TATCACCAGCAAAATGTACTTTAGGGGATAATGGTTTGGTGGATCTTATGAGACTGT
114_35643_ TATCACCAGCAAAATGTACTTTAGGGGATAATGGTTTGGTGGATCTTATGAGACTGT
44313     TATCACCAGCAAAATGTACTTTAGGGGATAATGGTTTGGTGGATCTTATGAGACTGT
30115     TCTCTCAG-----TGTACTTATGTTGACGATTGGCATGGTGGACCTATAAACTGT
38631     TCTCTCAG-----TGTACTTATGTTGACGATTGGCATGGTGGACCTATAAACTGT
30116     TCTCTCAG-----TGTACTTATGTTGACGATTGGCATGGTGGACCTATAAACTGT
*****

2570      TGCAGGAACGCC-----
5033-3     TGCAGGAACGCCGGAAGCGATTACGGTTAAGCAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAG
41765     TGCAGGAACGCCGGAAGCGATTACGGTTAAGCAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAG
114_35643_ TGCAGGAACGCCGGAAGCGATTACGGTTAAGCAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAG
44313     TGCAGGAACGCCGGAAGCGATTACGGTTAAGCAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAG
30115     TGCAGGAACGCCGGAAGCGATTACGGTTAAGCAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAG
38631     TGCAGGAACGCCGGAAGCGATTACGGTTAAGCAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAG
30116     TGCAGGAACGCCGGAAGCGATTACGGTTAAGCAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAG
*****

```

Figura A: Rappresentazione dell'allineamento fatto su Clustal W delle sequenze ricavate per il gene *chxA* in questo studio. Le regioni che presentano \* rappresentano regioni molto conservate.

Le sequenze di consenso appartenenti a questo studio insieme alle sequenze risultanti in BLAST su Ref seq Genome database e Standard database sono state inserite su BioEdit e MEGA X e confrontate mediante allineamento con gruppi di sequenze costruite per il gene *chxA* per isolati batterici di *V. cholerae* non *O1/O139* sequenziati già in precedenza (Tabella 1), per i quali è stata inviata la sequenza per analisi comparative (Ottaviani, 2018). I ceppi provenivano per la maggior parte da matrici ambientali, uno soltanto da un caso clinico di fascite necrotizzante.

Tabella 1: Isolati batterici precedentemente analizzati da IZSUM e utilizzati per analisi comparative in questo studio.

Isolato batterico	Matrice d'isolamento	Anno d'isolamento
41	Fascite necrotizzante	2009
677-13	Vongole	2011
934-3	Acqua di mare	2011
38248	Mitili	2012
39137	Molluschi di acqua dolce	2008
44909-2	Acqua di abbeverata	2007

Incluse in queste analisi comparative anche altri gruppi di sequenze per il gene *chxA* divise a gruppi ed allineate a sequenze presenti in NCBI GenBank (IZSUM, Ancona).

Si è confrontato tramite multi-allineamento in BioEdit le *query* in esame con il ceppo clinico 41 associato a fascite necrotizzante. Il risultato ha presentato un'alta omologia di sequenza con gli isolati di *Vibrio cholerae* 35643(114), 38248, 2570 2.3, 41765, 5033-3 e 44313.

Si è evidenziato nel dettaglio omologie e divergenze per le sequenze amminoacidiche risultanti dopo multi-allineamento in BioEdit. Dall'analisi è risultato che le sequenze del gene *chxA* degli isolati presentati in questo studio condividono con il ceppo 41 associato a fascite necrotizzante la maggior parte delle regioni altamente conservate, con un'identità di sequenza complessiva di 95% (120 aa-125 aa/133 aa). L'isolato 35643(114) presenta un'identità di sequenza con il ceppo clinico del 99% con una sostituzione amminoacidica sul 100 aa (Figura A).



*Figura A: Divergenze di sequenza nucleotidica e sequenza amminoacidica a seguito del multi-allineamento tra le sequenze di consenso appartenenti a questo studio e la sequenza costruita per il ceppo clinico 41, la X iniziale non rappresenta un amminoacido in quanto la tripletta nucleotidica non è completa.*



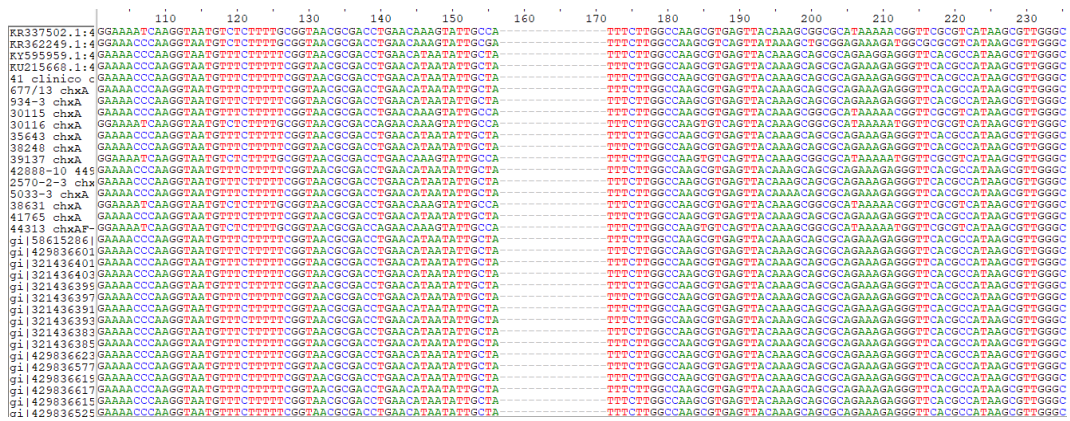


Figura B: Multiallineamento eseguito con BioEdit, in evidenza il gap risultante (tra le 155 bp e 172 bp) dal multiallineamento delle sequenze prese in esame.

Il risultato del multiallineamento eseguito su MEGA X è stato utilizzato per costruire un albero filogenetico che determina relazioni evolutive tra le sequenze in esame (Figura A).

Un albero filogenetico è un grafico costituito da nodi, rami e foglie. Le foglie (nodi esterni) sono etichettate con le specie o le sequenze note che si vogliono confrontare; i nodi interni rappresentano ipotetici predecessori incogniti degli oggetti iniziali. I rami definiscono le relazioni in termini di discendenza evolutiva.

Per la realizzazione della relazione filogenetica delle sequenze costruite per la *chxA* si è utilizzato il metodo del Neighbor-Joining. I clusters costruiti dal Neighbor-Joining sono formati dai cosiddetti vicini (*neighbors*) che sono definiti come due foglie che sono in relazione tra loro più che con tutte le altre

e che per questo sono connesse attraverso un solo nodo all'albero. Lo scopo è quello di minimizzare la lunghezza di ogni ramo, basato sul minimum evolution criterion, cioè il metodo vuole che siano più vicine evolutivamente specie/sequenze che differiscono meno.

L'outgroup (fuori gruppo) utilizzato è dato dallo stesso programma MEGA X, perché quest'ultimo sceglie come fuori gruppo il cosiddetto "meet point groups", cioè prende le due sequenze con la maggiore distanza e inserisce la radice tra di loro.

L'attendibilità di un'analisi filogenetica può essere valutata dalla significatività statistica dei vari nodi che compongono l'albero in questione. La tecnica più utilizzata è il cosiddetto bootstrap. Il valore di bootstrap del nodo considerato corrisponde alla significatività statistica del nodo (alto valore di bootstrap corrisponde ad un'alta significatività). Il bootstrap ci dà inoltre una stima della topologia dell'albero, ovvero ci mostra le diverse parti di una sequenza che convergono verso una stessa topologia filogenetica. Se il processo evolutivo si è manifestato in modo uniforme su tutta l'estensione della sequenza in esame allora i valori di bootstrap tenderanno ad essere più alti; al contrario se le sequenze hanno subito diversi processi evolutivi i valori di bootstrap saranno più bassi.

L'albero di massima verosimiglianza delinea due gruppi separati per le sequenze di *chxA*, infatti il primo gruppo contiene le sequenze per i ceppi 5033-3, 41765, 2570 2.3, mentre nel secondo gruppo ritroviamo le sequenze costruite per i ceppi ambientali: 35643(114), 44313, 30115, 30116, 38631.

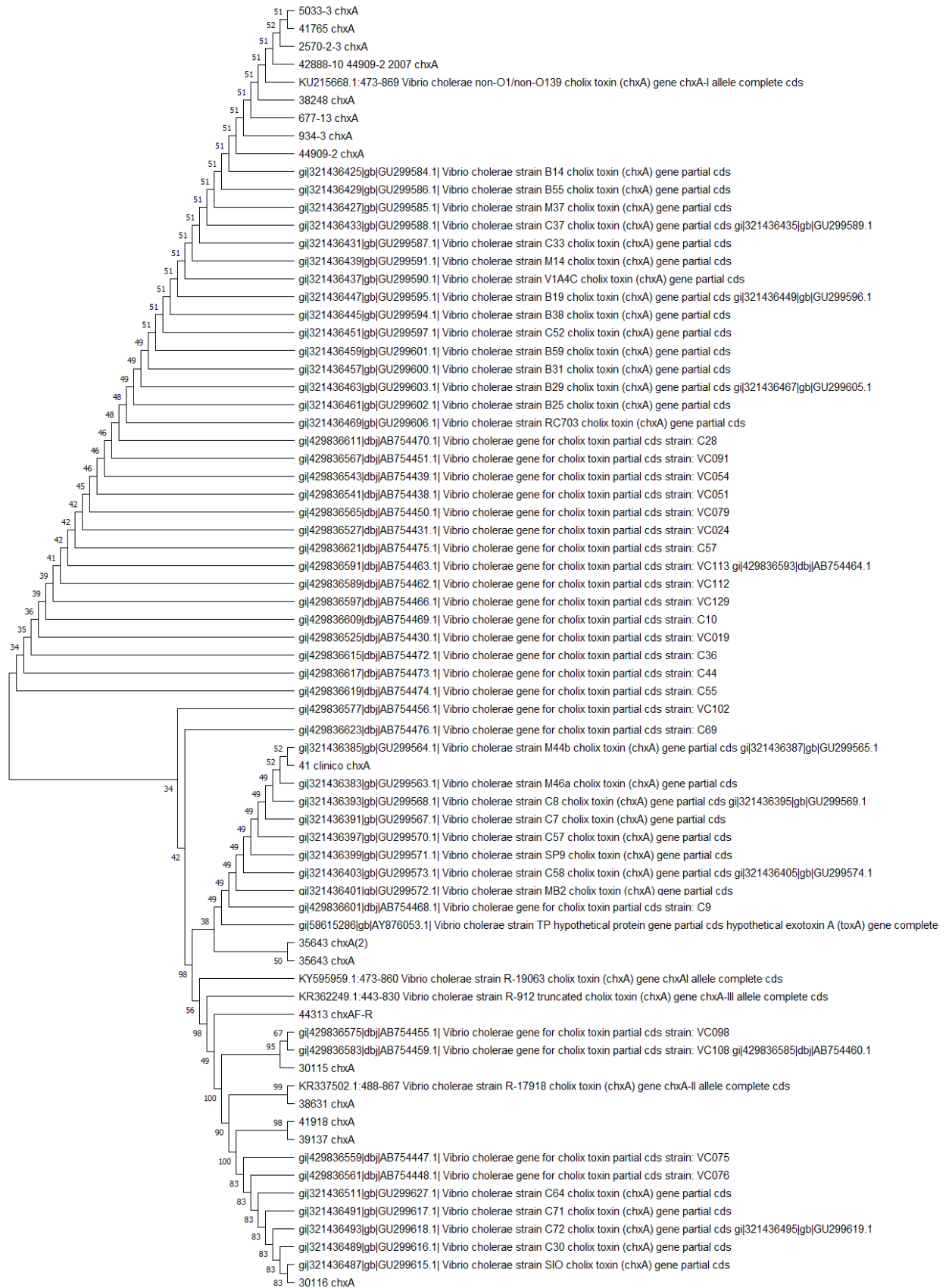
Nel primo gruppo ritroviamo il ceppo di *V. cholerae* non O1/O139 GenBank accession number KU215668, scaricato in formato FASTA da BLASTn (NCBI) e diversi ceppi provenienti da precedenti analisi (IZSUM, Ancona). Nel secondo gruppo troviamo il ceppo clinico 41 associato a fascite necrotizzante (Ottaviani, Leoni, & Rocchegiani, 2018) e la maggior parte delle sequenze ricavate per questo studio.

Dall'analisi filogenetica è risultato che la sequenza di consenso costruita per il gene *chxA* dell'isolato 35643(114) si presenta nel sottogruppo di sequenze *chxA* con il ceppo clinico 41, questo condivide un valore di bootstrap del 52% con la sequenza del gene *chxA* del ceppo di *V. cholerae* GenBank accession number GU299564. Le sequenze del gene *chxA* degli isolati 5033-3, 41765 e 2570 2.3 presentano una relazione con un valore di bootstrap rispettivamente del 51% e 52%. La sequenza del gene *chxA* per l'isolato 38631 presenta un valore di bootstrap del 99% con l'isolato di *V. cholerae* GenBank accession number KR337502 scaricato da BLAST. L'isolati 41918 e 39137 appartenenti a questo lavoro condividono tra loro un valore di bootstrap del 98%. L'isolato



di *V. cholerae* GenBank accession number GU299615 scaricato da BLAST presenta un valore di bootstrap dell'83% con la sequenza *chxA* del ceppo di *V. cholerae* 30116, le sequenze per il gene *chxA* degl'isolati di *Vibrio cholerae* GenBank accession number AB754455 e AB754459 presentano un valore di bootstrap del 95% con la sequenza di consenso costruita per il ceppo 38631 presentato in questo lavoro.

I valori di bootstrap evidenziati nel primo gruppo sono più bassi rispetto al secondo, vuol dire che il nodo non è “solido” e questo potrebbe indicare che il processo evolutivo nel primo gruppo ha subito diversi cambiamenti.



*Figura A: Bootstrap tree derivato dal programma MEGA X. Gli isolati relativi a questo studio sono denominati come segue: 5033-3 chxA, 41765 chxA, 35643 chxA, 44313 chxA AF-R, 30115 chxA, 30116 chxA, 2570 2-3 chxA, 38361 chxA.*

## Capitolo sesto

### 6. CONCLUSIONI

#### 6.1 *Discussione e conclusioni*

I ceppi di *Vibrio cholerae* non O1 e non O139 sono autoctoni degli ambienti marini, di estuario e delle acque interne e la loro presenza potrebbe aumentare in futuro a causa del riscaldamento globale. Con il processo di riscaldamento globale, numerose aree costiere del mondo si sono rivelate idonee alla proliferazione dei *Vibrio* (Vezzulli, 2020). Temperature delle acque  $>15^{\circ}\text{C}$  e salinità minori di 25 g/L di NaCl favoriscono infatti la moltiplicazione di questi microrganismi nell'acqua di mare (Baker-Austin, 2018). Diversi studi hanno riportato che questi microrganismi dipendano da fluttuazioni della salinità delle acque e delle temperature, presentandosi in aree non normalmente colonizzate quando le condizioni ambientali diventano favorevoli (Fang, 2019) (Ford, 2020).

A causa della crescente rilevanza per la salute umana, strumenti diagnostici rapidi sono necessari al fine di distinguere i ceppi ambientali da quelli potenzialmente patogeni. I *V. cholerae* non O1 e non O139 contengono determinanti di patogenicità che differiscono da quelli ritenuti essenziali per mediare la malattia colerica propria dei *V. cholerae* tossigeni (Fang, 2019).

In questo studio è stato indagato il profilo di virulenza di 24 ceppi appartenenti alla ceppoteca dell'Istituto Zooprofilattico "Togo Rosati" dell'Umbria e delle Marche di Ancona dove i campioni sierotipizzati come *Vibrio cholerae* non O1 e non O139 sono stati raccolti negli ultimi anni (2005-2019). I campioni provenivano da diverse matrici d'isolamento, tra cui prodotti ittici, acque contaminate e in minor parte da matrici fecali.

Alcuni fattori chiave nel processo patogenetico dei NCVs come il gene *stn/sto* associato alla produzione dell'esotossina stabile al calore (NAG-ST), del gene *chxA* associato alla produzione della tossina di Cholix e la presenza del sistema di secrezione di tipo III (T3SS) codificato dai geni *vcsV2* e *vcsC2*; sono stati ricercati mediante PCR. Un 17% dei ceppi ha presentato il gene per *stn/sto*, un 42% ha presentato il gene *chxA* e un 38% ha riportato la presenza dei geni *vcs V2* e *vcsC2*.

Il profilo di virulenza dei geni *vcsV2* e *vcsC2* ha rivelato la presenza di questi geni in un 38% dei campioni esaminati in questo lavoro. È dimostrato che la presenza del sistema di secrezione di tipo III, T3SS, possa essere mediatore di malattie diarroiche nell'uomo per i ceppi di *Vibrio cholerae* non tossigeni. Sono diverse le componenti dell'apparato strutturale del T3SS (*vcsCJRTQVU*) che combinate ad altri fattori possono contribuire al processo patogenetico per questo sierogruppo di *Vibrio cholerae* (Chaand, 2015).

È stato osservato che nei ceppi di *V. cholerae* dove era presente un T3SS parziale questo spesso conferiva maggiore virulenza, rispetto a un T3SS completo (Islam, 2013). Nel presente lavoro 1% (1/24 campioni) degli isolati risultava positivo alla presenza di uno dei due geni indagati per il T3SS (positivo al *vcsV2*).

L'analisi comparative di microarray genomico riportate da Dziejman et al. (Dziejman, 2005) indicano che i vari ceppi di *Vibrio cholerae* non O1/O139 sono piuttosto divergenti dai comuni ceppi pandemici O1 e O139. L'analisi della sequenza genomica suggerisce che il T3SS sia correlato al cluster di geni TTSS2, dove i geni per questo sistema di secrezione sembrano essere presenti in molti *Vibrio cholerae* non O1 ipotizzando il loro coinvolgimento nei meccanismi di virulenza. Chatterjee et al. (Chatterjee, 2009) hanno riportato una prevalenza complessiva dei geni per il sistema di secrezione di tipo III (T3SS) del 31,5% nei ceppi di *V. cholerae* non O1/O139 isolati da pazienti ospedalizzati in India, dove l'analisi parziale della sequenza nucleotidica dei ceppi contenenti TTSS ha rivelato mutazioni nucleotidiche silenti all'interno dell'apparato funzionale del TTSS, presentando larga variabilità genica. La distribuzione era ampiamente diversificata, a supporto dell'ipotesi di altri studi secondo cui questi geni di virulenza nei sierogruppi

di *Vibrio cholerae* non O1 e non O139 conferiscano una maggiore idoneità ambientale e predominanza ecologica (Zeb, 2019) (Dziejman, 2005).

L'espressione genica negli operoni T3SS è molto complessa e attualmente si sta ancora studiando l'organizzazione trascrizionale per comprenderne meglio l'impatto d'espressione per i geni presenti nella regione regolatoria per TTSS.

L'analisi di sequenza, tramite la costruzione di sequenze di consenso per i ceppi risultati positivi ai gene *stn/sto* e *chxA*, ha permesso di confrontare i ceppi in esame con i dati presenti in database pubblici e internazionali (NCBI) per quanto riguarda l'omologia di sequenza, contribuendo, con altri studi già effettuati, all'ampliamento della conoscenza sulla distribuzione di potenziali fattori di virulenza in ceppi di *V. cholerae* non O1 non O139 di diversa origine e alla loro variabilità genetica.

Lo studio della sequenza costruita per il gene *stn/sto* ha rivelato un stretta omologia con i dati presenti in BLAST (NCBI), dove gli ultimi 17 amminoacidi all'estremità carbossi-terminale sono identici (omologia del 50%) a quelli presentati dalla tossina NAG-ST prodotta da *V. cholerae* non O1/O139, confermando la sierotipizzazione dei ceppi in analisi e la struttura della tossina per i profili altamente conservati, permettendoci di evidenziare la regione del polipeptide responsabile del segnale per la tossina.

La ricerca mediante PCR del gene *chxA*, responsabile per la virulenza della tossina di Cholix, ha rivelato la presenza del gene nel 42% di ceppi appartenenti a questo lavoro. Altri studi hanno riportato una prevalenza del gene *chxA* complessivamente del 27% (Awasthi, 2013) in ceppi di *Vibrio cholerae* non O1 e non O139 clinici e ambientali isolati in India, del 33% nei ceppi di *V. cholerae* non O1/O139 clinici e ambientali isolati in diverse aree del mondo (Purdy, 2010), del 17% in isolati clinici da gastroenteriti o infezioni locali in pazienti austriaci o tedeschi (Schirmeister, 2014). Lo studio della sequenza di consenso costruita per il gene *chxA* ha rivelato la presenza di due cladi del gene *chxA*, riscontrati per diversi profili di divergenza in alcune regioni della sequenza nucleotidica ed evidenziati tramite analisi filogenetica.

L'identificazione di differenti tossinotipi, almeno due, *chxA I* e *chxA II*, è stata rilevata per un'ampia diversità del gene *chxA*, pur mantenendo numerose regioni di sequenza altamente conservate. La presenza di differenti cladi del gene *chxA* negli isolati di *V. cholerae* non O1 non O139 è in accordo con quanto riportato precedentemente da Purdy et al. 2010 (Purdy, 2010), confermando un'ampia diversità genetica per il gene responsabile della tossina ChxA. Il lavoro di Awashi e colleghi ha dimostrato la presenza di tre varianti del gene *chxA* (*chxA I*, *chxA II* e *chxA III*) e che le divergenze nella *chxA*



Il erano presenti, in particolare, nella regione del dominio di legame al recettore (Awasthi, 2013).

Queste differenze sono associate a cambiamenti amminoacidici utili ai fini della capacità di legame o dell'attività catalitica e dell'espressione della tossina, che sicuramente offrono nuove intuizioni su meccanismi di patogenicità per la tossina di Cholix. I risultati ottenuti tramite studi bioinformatici nel complesso hanno evidenziato una concordanza simile tra i dati già presenti in letteratura per questi vibrioni, sommandosi ed ampliando le conoscenze a riguardo.

I ceppi ambientali presentati in questo lavoro condividono una significativa omologia di sequenza nel gene *chxA*, evidenziata tramite multi-allineamento e comparazione filogenetica, con il ceppo clinico 41 associato a fascite necrotizzante, precedentemente analizzato (Ottaviani, Leoni, & Rocchegiani, 2009), la cui sequenza del gene *chxA* era disponibile presso l'IZSUM (dati non pubblicati).

Questo lavoro ha contribuito a comprendere l'epidemiologia dei *Vibrio cholerae* non O1/O139 o NCVs, ha offerto osservazioni su elementi ritenuti chiave per la virulenza e ha dimostrato la loro presenza sempre più rilevante in un gran numero di isolati.

Sono ancora molte le domande relative a questi fattori, alle loro attività biologiche, alle loro modalità d'espressione, alle differenze alleliche riscontrate e sono ancora limitate e difficilmente disponibili le conoscenze per questo sottogruppo di *Vibrio cholerae*.

Lo studio effettuato ha contribuito all'ampliamento della conoscenza sulla distribuzione di potenziali fattori di virulenza in ceppi di *V. cholerae* non O1 non O139 isolati in Italia da diverse fonti e sulla loro variabilità genetica.

In conclusione, questo studio offre una significativa riflessione sulla presenza nell'ambiente dei *V. cholerae* non O1 e non O139, dei fattori di virulenza ad essi associati e della loro possibile diversità genetica, offrendo una maggiore comprensione e sensibilizzazione sull'emergenza di questi nuovi sierogruppi conosciuti come non O1 e non O139 e del loro potenziale di patogenicità.

## Capitolo settimo

### BIBLIOGRAFIA

- Awasthi. (2013). Novel Cholix Toxin Variants, ADP-Ribosylating Toxins in *Vibrio cholerae* Non-O1/Non-O139 Strains, and Their Pathogenicity. *Infection and Immunity*, 531-541. doi:10.1128/IAI.00982-12
- Baker-Austin. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 1-19. doi:10.1038/s41572-018-0005-8
- Bhowmick, & Chatterjee. (2007). Effect of environmental factors on expression and activity of chitinase genes of vibrios with special reference to *Vibrio cholerae*. *Journal of Applied Microbiology*, 97–108. doi:DOI:10.1111/j.1365-2672.2006.03253.x
- Bross. (2007). *Vibrio vulnificus* Infection: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*, 539-544. Tratto da <https://www.aafp.org/afp/2007/0815/p539.html>
- Caianiello. (2020). *Vibrio cholerae*. Tratto da Microbiologia Italia: <https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/vibrio-cholerae/>
- Carraro. (2012). Rischio igienico sanitario associato al consumo dei molluschi eduli lamellibranchi (M.E.L).
- Ceccarelli. (2015). Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* Carrying Multiple Virulence Factors and *V. cholerae* O1 in the Chesapeake Bay, Maryland. *Applied and Environmental Microbiology*, 1909–1918. doi:10.1128/aem.03540-14
- Chaand. (2015). Type Three Secretion System Island-Encoded Proteins Required for Colonization by Non-O1/Non-O139 Serogroup *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, 2862–2869. doi:DOI:10.1128/iai.03020-14
- Chatterjee. (2009). Incidence, Virulence Factors, and Clonality among Clinical Strains of Non-O1, Non-O139 *Vibrio cholerae* Isolates from Hospitalized Diarrheal Patients in Kolkata, India. *Journal of Clinical Microbiology*, 1087–1095. doi:DOI:10.1128/jcm.02026-08
- Chun, J. (1999). Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.65.5.2202-2208.1999>
- Clementi. (s.d.). *Principi di Microbiologia Medica*.
- Croci, & Suffredini. (2011). Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici. In *Istituto Superiore di Sanità* (p. 35-45).

- Daniels. (2000-2005). *Vibrio parahaemolyticus* Infections in the United States, 1973–1998. *The Journal of Infectious Diseases*, 1661–1666. doi:DOI:10.1086/315459
- Diep. (2015). Isolation of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1-producing *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain carrying *ctxA*, *st* and *hly* genes in southern Vietnam: NDM-1-producing NAG *Vibrio*. *Microbiology and Immunology*, 262-267. doi:10.1111/1348-0421.12248
- Doc, S. T. (s.d.). *Slide To Doc*. Tratto da Slide To Doc: <https://slidetodoc.com/batteri-cocchi-spirochete-bastoncelli-vibrioni-spirilli-1-forme/>
- Dua. (2018). Virulence gene profiles, biofilm formation, and antimicrobial resistance of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 bacteria isolated from West Bengal. *Heliyon*. doi:10.1016/j.heliyon.2018.e01040
- Dziejman. (2005). Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 3465-3470. doi:10.1073/pnas.0409918102
- Fang. (2019). Survey and genetic characterization of *Vibrio cholerae* in Apalachicola Bay, Florida (2012–2014). *Journal of Applied Microbiology*, 1265-1277. doi:10.1111/jam.14199
- Ford. (2020). Isolation and characterization of potentially pathogenic *Vibrio* species in a temperate, higher latitude hotspot. *Environmental Microbiology Reports*, 424-434. doi:10.1111/1758-2229.12858
- Frank. (2006). *Vibrio vulnificus* wound infections after contact with the Baltic Sea, Germany. *Weekly releases*. doi:DOI:10.2807/esw.11.33.03024-en
- Ghosh. (2016). The Role of *Vibrio cholerae* Haemagglutinin Protease (HAP) in Extra-Intestinal Infection. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. doi: 10.7860/JCDR/2016/16510.8461
- Hara-Kudo, Y. (2012). Characteristics of a sharp decrease in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 95–101. doi:DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.019
- Islam. (2013). Indigenous *Vibrio cholerae* strains from a non-endemic region are pathogenic. *Open Biology*. doi:10.1098/rsob.120181
- ISS. (s.d.). *Colera*. Tratto da Istituto Superiore di Sanità: <https://www.epicentro.iss.it/colera/>
- ISS, I. d. (2004, Maggio). *RISCHI IGIENICO-SANITARI CONNESSI AL CONSUMO DEI PRODOTTI DELLA PESCA*. (L. Toti, A cura di) Tratto da Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma: <https://www.iss.it/documents/20126/955767/05-24.1129716985.pdf/5d1c4fef-401c-6c39-a56a-b80913ed39c2?t=1575578982833#page=7>
- IZSVE. (s.d.). *Vibriosi*. Tratto da Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie: <https://www.izsvenezie.it/temi/malattie-patogeni/vibriosi/>

- Jiunn. (2010). Role of *Vibrio* polysaccharide (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology*, 2757–2769. doi:DOI:10.1099/mic.0.040196-0
- Jørgensen. (2008). Cholix Toxin, a Novel ADP-ribosylating Factor from *Vibrio cholerae*. *Journal of Biological Chemistry*, 10671-10678. doi:10.1074/jbc.M710008200
- Keusch. (2002). Toxin-associated Gastro-intestinal Disease: A clinical Overview. In *Molecular Medical Microbiology* (p. 1083-1088). Elsevier. doi:10.1016/b978-012677530-3/50271-3
- Kumar. (2016, Marzo 22). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 1870–1874. doi:DOI:10.1093/molbev/msw054
- Laboratories, N. R. (2014). *National Reference Centres and Consultant Laboratories*. Tratto da Robert Koch Institut:  
[https://www.rki.de/EN/Content/infections/Diagnostics/NatRefCentresConsultantLab/CONSULAB/EM-images/EM\\_Tab\\_Vibrio\\_cholerae\\_en.html](https://www.rki.de/EN/Content/infections/Diagnostics/NatRefCentresConsultantLab/CONSULAB/EM-images/EM_Tab_Vibrio_cholerae_en.html)
- Lee. (2007). Clinical characteristics of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolates and polymerase chain reaction analysis of their virulence factors. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 474-480.
- Maraki. (2015). Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteremic skin and soft tissue infections. *Infectious Diseases*, 171-176. doi:10.3109/23744235.2015.1104720
- Marinaro, M. (2003). Zonula Occludens Toxin Acts as an Adjuvant through Different Mucosal Routes and Induces Protective Immune Responses.
- NCBI. (2021). *Taxonomy*. Tratto da NCBI:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=641&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>
- Nicoletti, & Nicolosi. (1998). *Dizionario di batteriologia umana normale e patologica*. Momento Medico.
- Ogawa. (1990). Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable enterotoxin gene from *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from a patient with traveler's diarrhea. *Infection and Immunity*, 3325–3329. doi:DOI:10.1128/iai.58.10.3325-3329.1990
- Ogura. (2017). *Vibrio cholerae* Cholix toxin-induced HepG2 cell death is enhanced by tumor necrosis factor- $\alpha$  through ROS and intracellular signal-regulated kinases. *Toxicological Sciences*. doi:10.1093/toxsci/kfx009
- OMS, O. M. (2019, Dicembre 20). *Bioetica News Torino*. Tratto da Bioetica News Torino:  
<https://www.bioeticanews.it/monitoraggio-del-colera-nei-paesi-endemici-rapporto-oms/>
- Oprea. (2020). The seventh pandemic of cholera in Europe revisited by microbial genomics. *Nature Communications*. doi:10.1038/s41467-020-19185-y

- Ottaviani. (2018). Molecular characterization and drug susceptibility of non-O1/O139 V. cholerae strains of seafood, environmental and clinical origin, Italy. *Food Microbiology*, 82–88. doi:DOI:10.1016/j.fm.2017.11.011
- Ottaviani, D., Leoni, F., & Rocchegiani, E. (2011). Unusual Case of Necrotizing Fasciitis Caused by *Vibrio cholerae* O137. *Journal of Clinical Microbiology*, 757–759. doi:DOI:10.1128/jcm.02257-10
- Ottaviani, D., Leoni, F., & Rocchegiani, E. (2018). *Vibrio parahaemolyticus*-specific Halobacteriovorax From Seawater of a Mussel Harvesting Area in the Adriatic Sea: Abundance, Diversity, Efficiency and Relationship With the Prey Natural Leve. *Frontiers in Microbiology*. doi:DOI:10.3389/fmicb.2020.01575
- Ottaviani, Leoni, & Rocchegiani. (2009). Unusual Case of Necrotizing Fasciitis Caused by *Vibrio cholerae* O137. *Journal of Clinical Microbiology*, 757-759. doi:10.1128/JCM.02257-10
- Pantano. (2006). A molecular model of the *Vibrio cholerae* cytolysin transmembrane pore. *Toxicon*, 35-40. doi:10.1016/j.toxicon.2005.09.007
- Public Health England. (2015). *SMI ID 19: identification of Vibrio and Aeromonas species*. Tratto da UK government: <https://www.gov.uk/government/publications/smi-id-19-identification-of-vibrio-species>
- Purdy. (2010, Febbraio 8). Diversity and distribution of cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*. *Environmental Microbiology Reports*, 198–207. doi:DOI:10.1111/j.1758-2229.2010.00139
- Purdy. (2010). Diversity and distribution of cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*: *Vibrio cholerae* cholix toxin distribution. *Environmental Microbiology Reports*, 198-207. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00139.x
- Raghunath. (2015, Gennaio 22). Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*. doi:DOI:10.3389/fmicb.2014.00805
- Ramamurthy. (2020). Virulence Regulation and Innate Host Response in the Pathogenicity of *Vibrio cholerae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. doi:10.3389/fcimb.2020.572096
- Ramamurthy, & Ghosh. (2014, Luglio 31). Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Frontiers in Public Health*. doi:DOI:10.3389/fpubh.2014.00103
- Reilly. (2011). *Vibrio alginolyticus*-associated wound infection acquired in British waters, Guernsey, July 2011. *Eurosurveillance*. doi:10.2807/ese.16.42.19994-en
- Reilly, & Smith. (2011, Ottobre). *Vibrio alginolyticus*-associated wound infection acquired in British waters, Guernsey, July 2011. *Eurosurveillance*. doi:DOI:10.2807/ese.16.42.19994-en

- Rivera. (2001). Genotypes Associated with Virulence in Environmental Isolates of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2421–2429. doi:DOI:10.1128/aem.67.6.2421-2429.2001
- Schirmeister. (2014). Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 767-778. doi:10.1007/s10096-013-2011-9
- Senderovich. (2010, Gennaio 6). Fish as Reservoirs and Vectors of *Vibrio cholerae*. *PLoS ONE*. doi:DOI:10.1371/journal.pone.0008607
- Siriphap. (2017). Characterization and Genetic Variation of *Vibrio cholerae* Isolated from Clinical and Environmental Sources in Thailand. *PLOS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0169324
- SlidePlayer. (s.d.). *SlidePlayer*. Tratto da SlidePlayer: <https://slideplayer.it/slide/12997739/>
- Sterk. (2015, Marzo 24). Effect of Climate Change on the Concentration and Associated Risks of *Vibrio* spp. in Dutch Recreational Waters. *Risk Analysis*, 1717–1729. doi:DOI:10.1111/risa.12365
- Trucksis. (1993). Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 5267-5271. doi:10.1073/pnas.90.11.5267
- Vezzulli. (2020). Global emergence of environmental non O1/non O139 *Vibrio cholerae* infection linked with climate change: a neglected research field? *Environmental Microbiology*, 4342-4355. doi:10.1111/1462-2920.15040
- Waldor. (2000). Treasure trove for cholera research. *Nature*, 470.
- Zeb. (2019). Type III secretion system confers enhanced virulence in clinical non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. *Microbial Pathogenesis*, 103645. doi:DOI:10.1016/j.micpath.2019.103645
- Zhao. (2017, Aprile 4). Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. *Frontiers in Microbiology*. doi:DOI:10.3389/fmicb.2017.00580

## RINGRAZIAMENTI

Il ringraziamento più sentito va alla mia famiglia, grazie a mamma e papà per avermi sempre sostenuto e per essermi stati sempre accanto. Sono sempre stati il “vento che ha sorretto le mie ali”, coloro che hanno sempre creduto in me e nelle mie scelte. Spero siano fieri di me.

Grazie a mia sorella Nicole, la mia certezza, la mia complice di vita. Grazie alla sua comprensione, ai suoi incoraggiamenti e al suo esserci sempre.

Grazie a nonna Anna, ai suoi baci, ai suoi sorrisi e al suo bene immenso.

Un ringraziamento colmo d'affetto a Nicola, colui che è testimone di questo percorso fin dall'inizio. Fedele confidente, compagno e spalla sempre pronta all'ascolto. Grazie al suo appoggio, ai suoi consigli e grazie a tutti i nostri momenti.

Ringrazio la Chiar.ma Professoressa Biavasco per la professionalità e disponibilità dimostratami.

Grazie infinite alla Professoressa Rocchegiani Elena per avermi saputo ispirare sulle potenzialità di questo cammino, grazie a tutti i suoi insegnamenti e suggerimenti. Le sono riconoscente.



Ringrazio di vero cuore la Dottoressa Leoni Francesca dell'Istituto Zooprofilattico "Togo Rosati" dell'Umbria e delle Marche di Ancona per essere stata in questo iter una guida attenta e preziosa.

Grazie a tutti i professionisti, biologi e tecnici dell'Istituto Zooprofilattico "Togo Rosati" dell'Umbria e delle Marche di Ancona per la loro gentilezza e la loro collaborazione.

Grazie alla mia tenacia, alla mia forza nello stringere i denti e al saper tenere duro, perché ogni ostacolo che supererò sarà come un "colpo d'ali" e là io volerò.