



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

Meccanismi di antibiotico-resistenza e patogenicità di *Salmonella enterica* Serovar *Typhi*

**Understanding the Mechanism of Antimicrobial Resistance and Pathogenesis of
Salmonella enterica Serovar *Typhi***

Tesi di laurea di:

Tarducci Andrea

Sessione straordinaria febbraio 2023

Anno accademico 2021/2022

Docente referente:

Prof.ssa

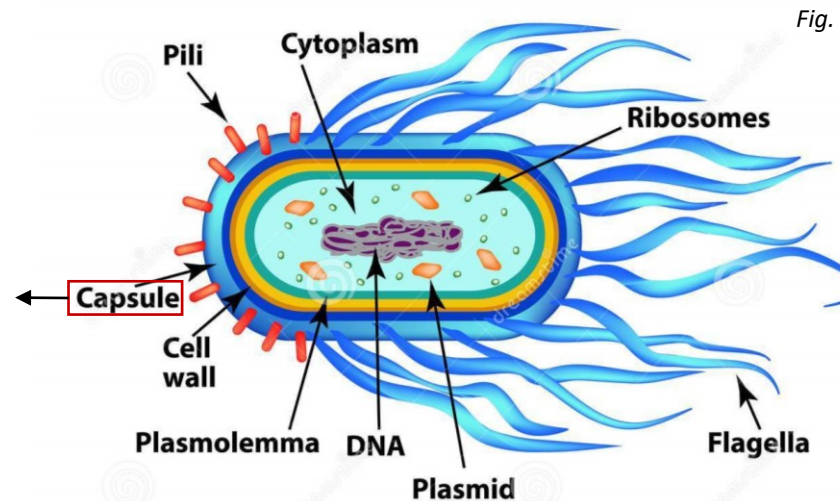
Vignaroli Carla

SALMONELLA ENTERICA SEROVAR TYPHI

CARATTERISTICHE

- Famiglia delle *Enterobacteriaceae*
- Specie «*Salmonella enterica*»
- Sottospecie «*enterica*»
- **Gram –**
- A forma di **bastoncello**
- Flagelli lungo tutta la cellula (**batterio peritrico**)

Antigene Vi =
Capsula
polisaccaridica che
contribuisce alla
virulenza



MODALITÀ DI TRASMISSIONE

Il batterio viene trasmesso per via *oro-fecale*, cioè tramite il passaggio da residui di feci umane all'apparato digerente di un individuo sano

In particolare sono cibo ed acqua ad essere contaminati, specialmente in quei Paesi dove le condizioni igienico-sanitarie sono precarie

→ L'infezione sopraggiunge in seguito all'ingestione delle suddette sostanze

ORGANISMI OSPITI

Antigene Vi = codificato dal locus B del batterio, presente nella SPI-7 maschera l'antigene O rendendo il patogeno più virulento

Antigene O = parte polisaccaridica con proprietà antigeniche presente nello strato più esterno della parete dei Gram -

Antigene H = antigene flagellare regione altamente immunogenica

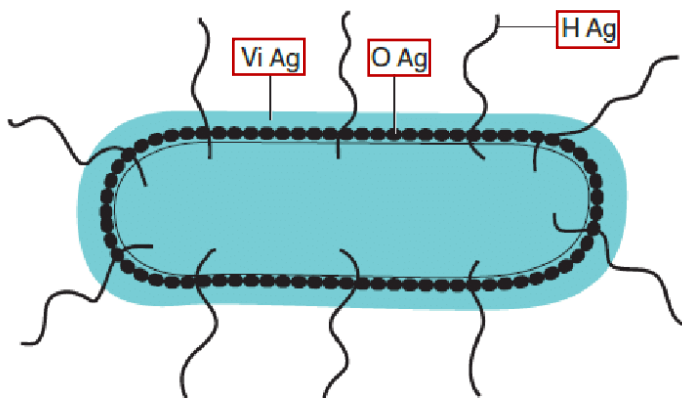
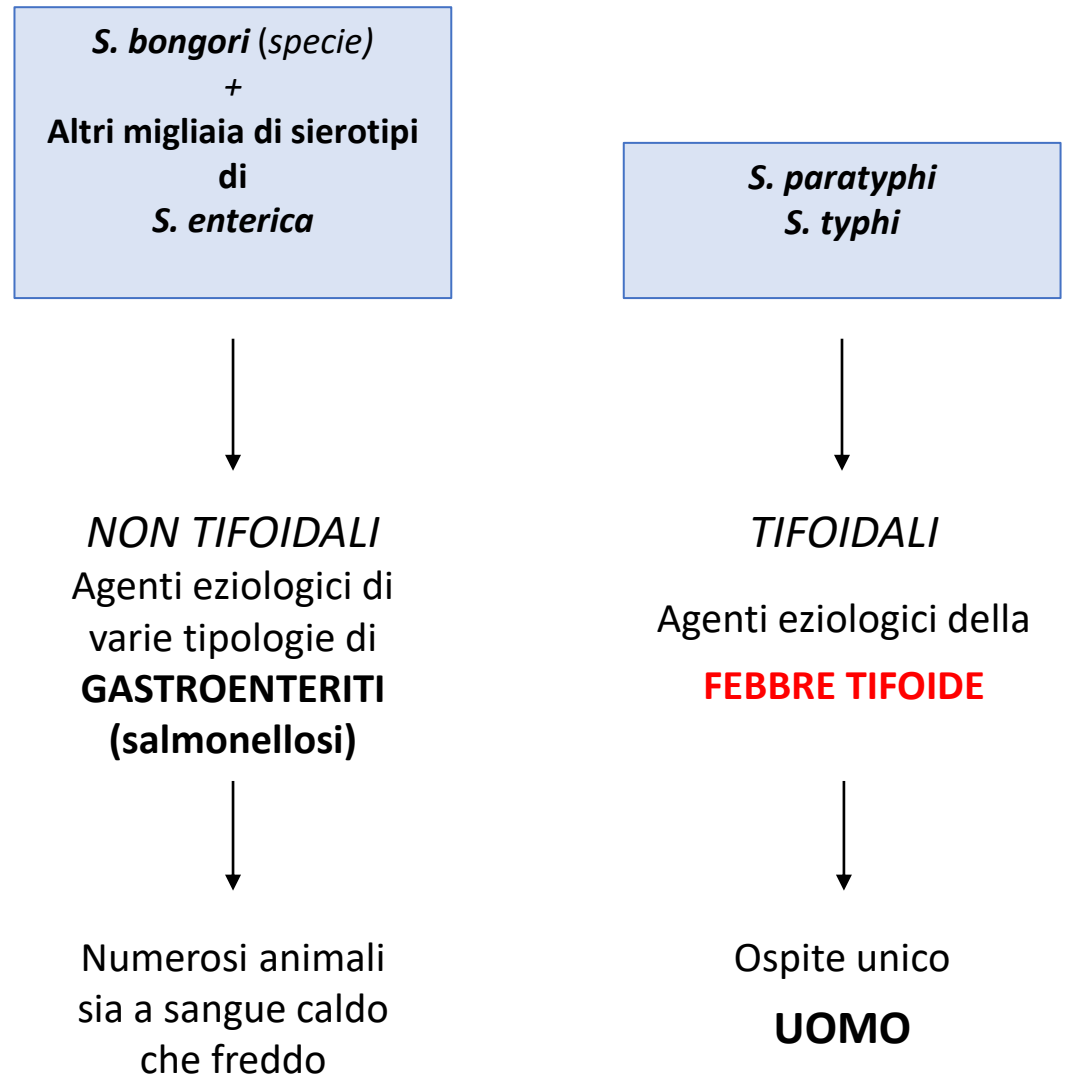


Fig. 2

Struttura antigenica di *S. typhi*



FEBBRE TIFOIDE

La **febbre tifoide** è una malattia sistemica provocata dal batterio *S. typhi*

Si registrano circa 10-20 milioni di casi ogni anno e approssimativamente 200.000 morti ^{[1][2]}

Il rischio di infezioni fatali si è ridotto dal **10-30%** a meno dell'**1%** a partire dall'utilizzo degli antimicrobici ^[1]

I pazienti più colpiti sono bambini, anziani e adulti immunocompromessi

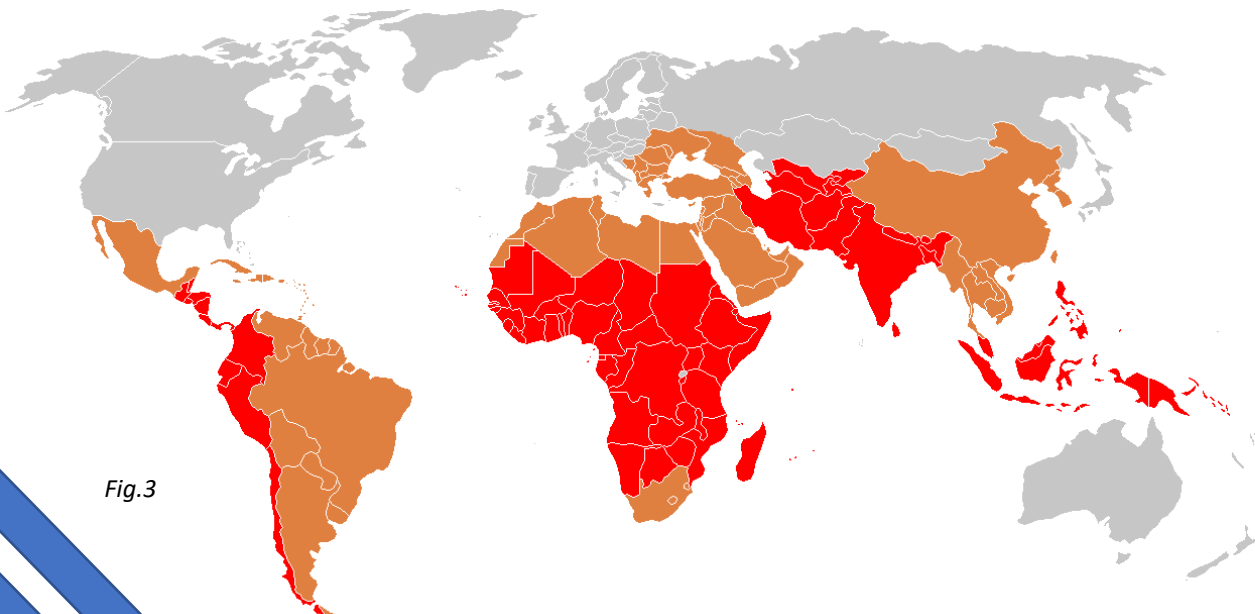


Fig.3

| | Cases | Deaths | YLLs | YLDs | DALYs |
|--|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Paratyphoid fever only | | | | | |
| 1990 | 5508 (4233-7086) | 28.5 (12.7-56.7) | 2071 (913-4172) | 15.0 (9.4-22.6) | 2086 (923-4199) |
| 1995 | 5139 (3963-6543) | 27.3 (12.4-53.8) | 1977 (888-3912) | 14.0 (8.8-21.0) | 1991 (897-3931) |
| 2000 | 4698 (3640-5953) | 25.2 (11.5-49.9) | 1817 (835-3600) | 12.9 (8.1-19.5) | 1830 (845-3619) |
| 2005 | 4232 (3311-5327) | 23.0 (10.5-45.3) | 1649 (756-3259) | 11.6 (7.3-17.3) | 1661 (762-3274) |
| 2010 | 3794 (2992-4739) | 20.9 (9.5-40.6) | 1477 (670-2862) | 10.4 (6.7-15.5) | 1487 (679-2881) |
| 2017 | 3397 (2666-4184) | 19.1 (8.7-37.3) | 1354 (622-2620) | 9.4 (5.9-13.9) | 1364 (631-2641) |
| Typhoid fever only | | | | | |
| 1990 | 20366 (17117-23882) | 202.0 (112.5-327.1) | 14954 (8330-24474) | 192.7 (128.8-277.2) | 15147 (8493-24777) |
| 1995 | 18424 (15562-21584) | 185.4 (104.2-302.6) | 13693 (7658-22281) | 174.9 (117.9-254.6) | 13868 (7801-22501) |
| 2000 | 16797 (14229-19550) | 171.6 (96.6-278.9) | 12598 (7138-20572) | 160.0 (108.1-227.6) | 12758 (7280-20723) |
| 2005 | 15415 (13131-17894) | 160.2 (89.8-262.9) | 11712 (6582-19081) | 147.3 (97.6-213.2) | 11860 (6694-19317) |
| 2010 | 13769 (11739-15938) | 145.4 (80.9-236.0) | 10556 (5902-17048) | 132.2 (88.3-188.4) | 10688 (6028-17188) |
| 2017 | 10924 (9343-12597) | 116.8 (65.4-187.7) | 8332 (4632-13419) | 105.5 (70.3-151.0) | 8437 (4731-13577) |
| Typhoid and paratyphoid fevers combined | | | | | |
| 1990 | 25875 (22073-29915) | 230.5 (131.2-372.6) | 17026 (9768-27546) | 207.7 (140.0-299.2) | 17233 (9931-27789) |
| 1995 | 23563 (20198-27338) | 212.7 (120.8-341.5) | 15671 (8845-25182) | 189.0 (127.6-273.5) | 15860 (9016-25474) |
| 2000 | 21495 (18521-24788) | 196.8 (113.0-315.9) | 14415 (8329-23159) | 172.8 (117.1-245.0) | 14588 (8422-23327) |
| 2005 | 19648 (16992-22576) | 183.2 (104.6-293.4) | 13362 (7649-21673) | 158.9 (106.0-229.1) | 13521 (7780-21847) |
| 2010 | 17564 (15295-20086) | 166.3 (95.2-264.5) | 12033 (6907-19424) | 142.7 (95.4-202.7) | 12175 (7033-19654) |
| 2017 | 14321 (12540-16337) | 135.9 (76.9-218.9) | 9686 (5485-15746) | 114.9 (77.7-164.2) | 9801 (5569-15880) |

95% uncertainty intervals are included in parentheses. YLL=years of life lost. YLD=years lived with disability. DALY=disability-adjusted life-years.

Table 1: Global numbers of cases, deaths, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years (in thousands) by year for typhoid and paratyphoid fevers

Fig.4

- Diffusione della febbre tifoide nel mondo
- In **rosso** compaiono quei paesi in cui la malattia è endemica ad alti livelli (>100 casi ogni 100.000 abitanti ogni anno)
- In **marrone** i paesi dove la malattia è endemica a livelli più bassi (<100 casi ogni 100.000 abitanti ogni anno)

CICLO VITALE DI S. TYPHI E MALATTIA

TRASMISSIONE

- Oro-fecale
- Tramite ingestione di cibo o acqua contaminati
- Alcuni insetti possono essere vettori passivi (caso raro)



PENETRAZIONE

- Avviene in corrispondenza dell'intestino tenue
- Cellule maggiormente coinvolte sono quelle *epiteliali*, *cellule M* e *cellule dendritiche*
- In questa fase spesso non si attivano efficienti risposte immunitarie

Aspetto essenziale per la sopravvivenza di *S. typhi* nell'ospite

SINTOMI

Lievi:

- *Febbre alta (fino a 40°C) specialmente i primi giorni*
- *Fatica*
- *Perdita d'appetito*
- *Mal di testa*
- *Mialgia*
- *Nausea*
- *Diarrea*

Gravi:

- *Emorragie interne*
- *Perforazioni intestinali*
- *Complicazioni neurologiche*

DIFFUSIONE

- Via d'uscita del batterio sono le feci e più raramente le urine
- Non è chiaro come *S. typhi* raggiunga le feci, ma alcuni studi indicano che ciò avvenga durante le fasi acute della malattia



INCUBAZIONE

- La durata media è di 2 settimane
- Fattore fondamentale è la carica batterica presente
- È accompagnata da un breve periodo di **batteriemia**

PATOGENICITÀ DI *S. TYPHI*

- Infezione attiva solo se dose infettiva ≥ 10000 cellule
- Sfruttamento giunzioni occludenti aumenta capacità di penetrazione del batterio
- Prime cellule attaccate sono le **Cellule M** (cellule specializzate della mucosa intestinale che internalizzano sostanze estranee per poi rilasciarle ai macrofagi sottostanti)
- La penetrazione può anche avvenire attraverso le cellule epiteliali intestinali, dove però è fondamentale l'intervento del **T3SS-1** (Type III Secretion System 1)

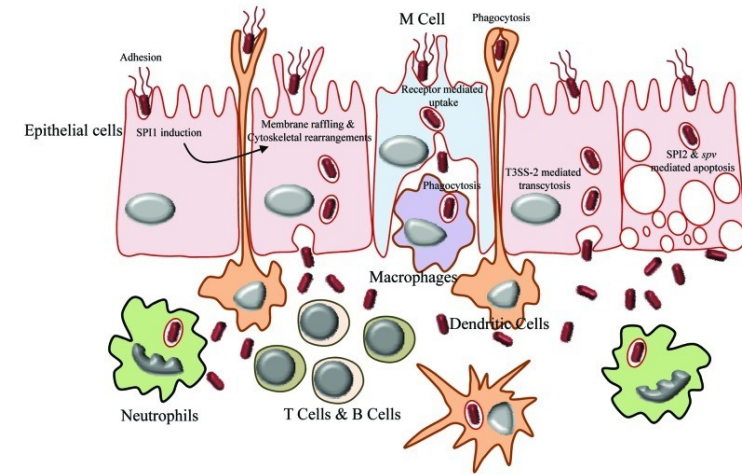
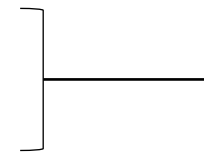


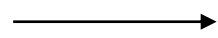
Fig.6



Determina il rilascio di numerose proteine effettrici che promuovono il riarrangiamento dei costituenti della membrana cellulare e permettono l'entrata del batterio



Sintesi di proteine effettrici e dei costituenti del T3SS-1 mediata dall'attivazione della **SPI-1** per quanto riguarda i meccanismi di invasione



Stimoli attivazione:

- Diminuzione livelli O_2
- Elevata osmolarità
- pH neutro
- Alti livelli di Fe

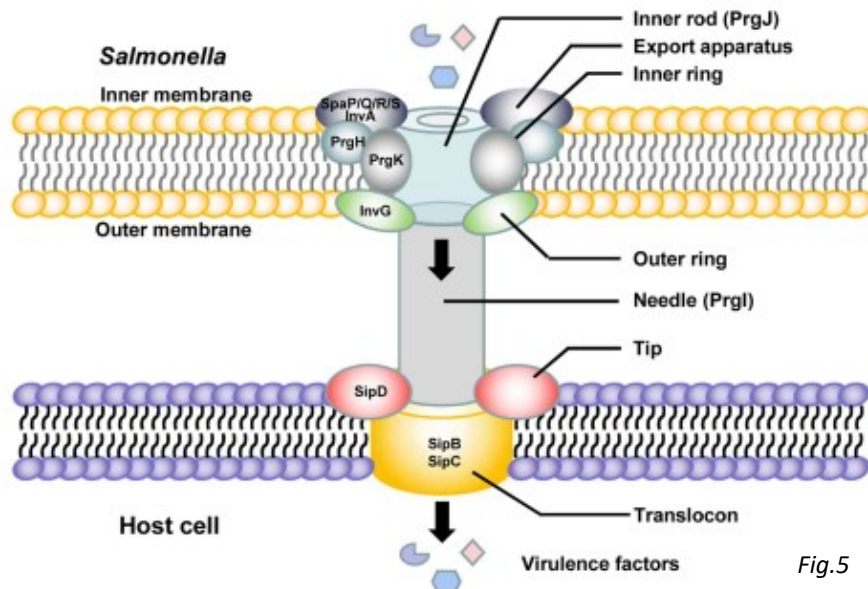


Fig.5

SALMONELLA PATHOGENICITY ISLANDS (SPIs)

Le **SPIs** sono regioni di DNA cromosomico tipiche dei patogeni del genere *Salmonella*

Sono costituite da numerosi **geni di virulenza** implicati in una moltitudine di funzioni:

- Adesione cellulare
- Penetrazione nelle cellule
- Evasione dalle risposte immunitarie
- Sopravvivenza e moltiplicazione all'interno dell'ospite

SPI1 e **SPI2** sono le più importanti e quelle maggiormente coinvolte nei meccanismi di infezione e patogenicità del batterio

SPI1 = Proteine **SipA**, **SipB** e **SipC** mediano l'invasione dei tessuti dell'ospite.
Sono componenti del T3SS-1

SPI2 = Codifica per un altro T3SS all'interno del **SCV** (Salmonella Containing Vacuole) in grado di rilasciare numerosi effettori di virulenza

SPI3 = Contribuisce alla resistenza del batterio specialmente al di fuori dell'ospite

Sono acquisite dai patogeni attraverso meccanismi di trasferimento genico orizzontale

Particolarmente importante perché contiene i geni per la produzione delle **componenti dell'antigene**

Vi

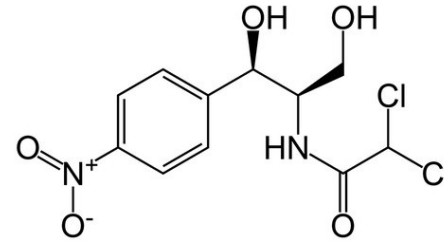
Non sono mai state trovate in ***S. typhi***

| SPIs | Protein | Function |
|--------|---------------------------|--|
| SPI-1 | SipA SipC | Promote membrane ruffling and <i>Salmonella</i> invasion by directly interacting with actin cytoskeleton |
| | SopE SopE ₂ | Promote membrane ruffling and <i>Salmonella</i> invasion by directly interacting with actin cytoskeleton by inducing membrane ruffling after injection into epithelial cells |
| | SipB | Nucleates actin and translocates other effector proteins |
| | IaeP | Involved in post-translational modification of T3SS |
| | SopA SopC | Recruit immune cells and secrete fluid in intestinal lumen |
| | AvrA | Inhibits cellular apoptosis Inhibits macrophage degradation |
| | SicA SicP | Serve as a chaperone |
| SPI-2 | SsaB | Disrupts Golgi apparatus |
| | SpiC | Disrupts vesicular transport |
| | SsaE SscA | Serve as a chaperone |
| | SsPH2 SseJ | Rearrange cytoskeletal system |
| | SrFT | Cellular apoptosis |
| SPI-3 | PipB SopD ₂ | Target pathogen-induced filaments |
| | MgtC MgtB | Ensure adaptation in nutrition-scarce environment |
| | MisL MarT | Ensures attachment to epithelial cells Activates MIS L protein |
| SPI-4 | SicE | Ensures attachment to epithelial cells |
| SPI-5 | SsrAB | Serves key role in developing infection |
| SPI-6 | Invasion proteins | Ensure invasion of pathogen into host cells |
| SPI-7 | | Produces Vi antigen |
| SPI-8 | | Contributes to putative virulence |
| SPI-9 | T1SS and RTX | Contribute to toxin production and invasion of pathogen into host cells |
| SPI-10 | | Production of sef fimbriae |
| SPI-11 | | Function not clear |
| SPI-12 | | Function not clear |
| SPI-13 | | Function not clear |
| SPI-14 | | Function not clear |
| SPI-15 | | Serves a vague role to effector proteins attached to T3SS |
| SPI-16 | | Encodes genes for tRNA arg and lipopolysaccharides |
| SPI-17 | | Encodes genes for tRNA arg and lipopolysaccharides |

RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI DI *S. TYPHI*

1947 ⇒ **Cloramfenicolo** diviene il principale antimicrobico per il trattamento della febbre tifoide

- Antibiotico ad ampio spettro utilizzato per combattere numerose infezioni batteriche
- Inibitore sintesi proteica



Cloramfenicolo

Ceppi resistenti furono rilevati già negli anni '50

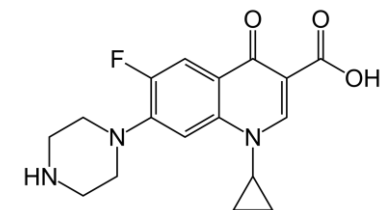


Gran parte delle infezioni ad oggi è ad opera di **ceppi resistenti al cloramfenicolo** [1]

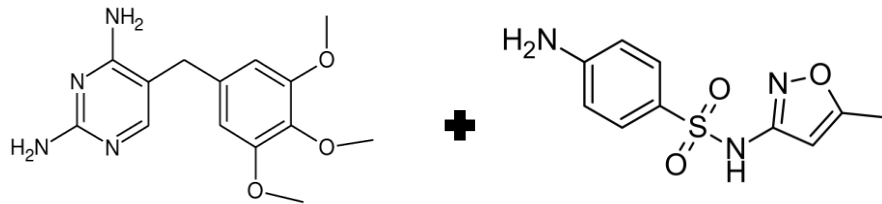


Tutto ciò porta all'utilizzo di terapie basate su nuovi antibiotici

Fluoroquinoloni

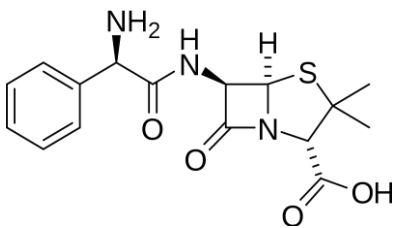


Ciprofloxacina



Trimetoprim

Sulfametoxazolo



Ampicillina

Utilizzati abbondantemente fino agli anni '80 assieme al cloramfenicolo per contrastare la patologia

quindi

Comparsa di **MDR**
(Multi Drug-Resistant)

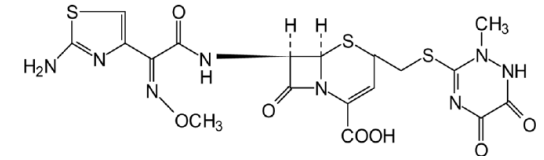
Ceppi batterici in possesso di geni di resistenza per i suddetti antibiotici di prima linea

Nel corso degli anni, soprattutto nelle regioni asiatiche, iniziano ad essere individuate infezioni da parte di **ceppi resistenti ai fluorochinoloni**

XDR (Extensively Drug-Resistant)

Ceppi batterici in possesso di geni di resistenza anche per antibiotici di ultima generazione
es. cefalosporine

Nuove terapie basate sull'utilizzo di **Cefalosporine**



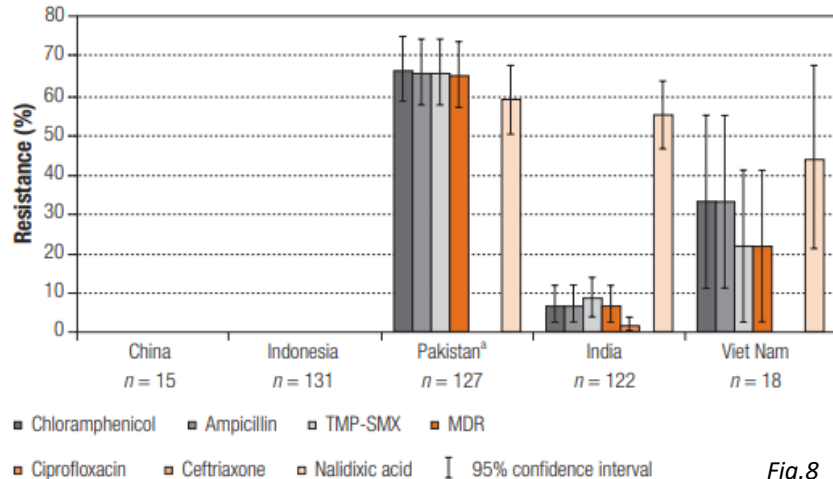
Ceftriaxone

- Comparsa di casi sporadici di ceppi resistenti a partire dal 2016 [1]
- Diversi casi riportati anche in Paesi sviluppati (Canada, USA, Australia...)*

Particolarmente allarmante la comparsa in Asia e Africa dell'**aplotipo H58 (4.3.1)** di *S. Typhi*

Correlato a presenza di ceppi MDR resistenti anche a **fluorochinoloni**

Fig. 3. Antimicrobial agent resistance pattern of *S. enterica* serotype Typhi isolates by study site



*Comune denominatore resta però il luogo di infezione corrispondente quasi sempre al **Pakistan**

*Patologia legata ai viaggi in Paesi a medio e basso reddito

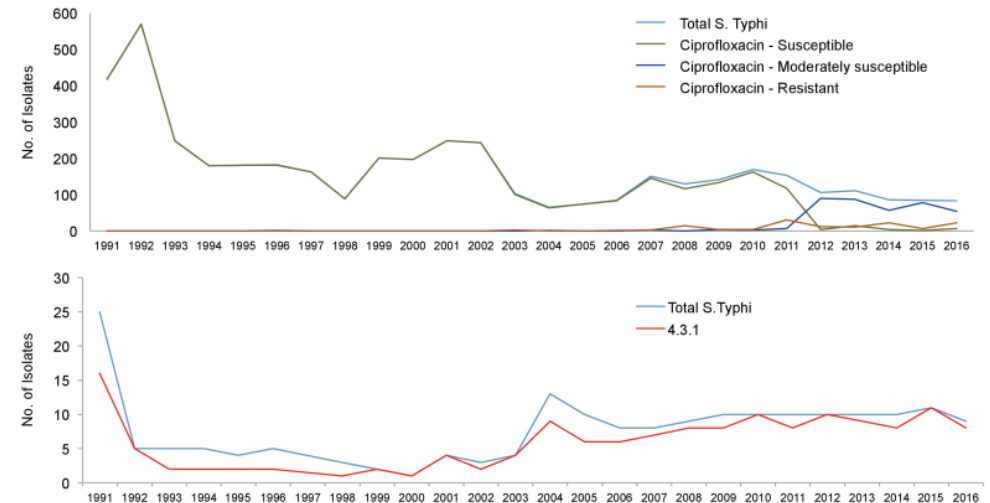


Fig.9

Fig.8

MECCANISMI DI RESISTENZA ANTIMICROBICA DI S. TYPHI

Fig.10

Può essere mediata da:

➤ **DNA plasmidico**

➤ **DNA cromosomico**

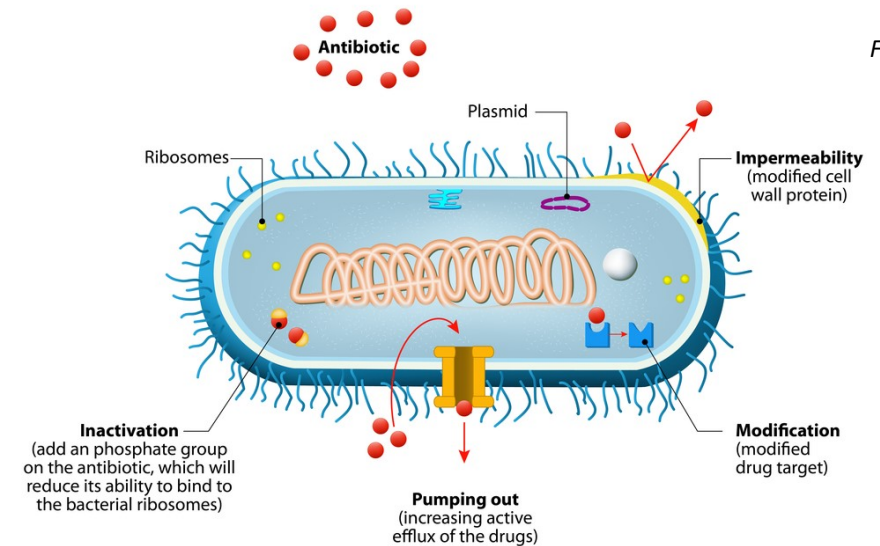


Fondamentale la presenza in S. Typhi di plasmidi del gruppo di incompatibilità **IncHI**

3 sottogruppi: *IncHI1*, *IncHI2*, *IncHI3*

IncHI1 legato ad aptotipo H58 e ad epidemie di MDR e XDR sviluppatasi negli anni [1]

Altri plasmidi coinvolti sono **R27**, **pHCM1**, e **pAKU1**



Resistenza a β -lattamici

- È il tipo di resistenza più diffusa
- Tramite produzione di β -lattamasi che degradano l'anello comune a questi farmaci (es. **TEM**, **SHV**)

Resistenza a chinoloni

- Geni **qnrA**, **qnrB**, **qnrC** e **qnrS**
- Formazione di pentapeptidi che proteggono la DNA girasi e altri enzimi dall'azione dell'antibiotico

Resistenza a tetracicline

- Geni **tetA**, **tetB** e **tetC**
- Codificano per la produzione di pompe di efflusso per il trasporto del principio attivo verso l'esterno

Resistenza a cloramfenicolo

- Geni **cat1** e **cat2**
- Inattivazione enzimatica ad opera di un acetiltransferasi

RIASSUNTO

Salmonella enterica sottospecie enterica serovar typhi è un batterio patogeno Gram-negativo ed agente eziologico della *febbre tifoide*.

Rappresenta ad oggi uno dei più importanti e diffusi microorganismi virulenti a trasmissione oro-fecale, in particolare nei Paesi a medio-basso reddito delle regioni occidentali dell'America Latina, dell'Africa, dell'Asia Meridionale e del Sud-Est Asiatico. Il decorso della malattia è più o meno grave in relazione alla tempestività con cui si interviene e alla terapia utilizzata, ma ad oggi, la mortalità è globalmente ridotta (<1% dei casi dove è più diffusa). Diversi studi confermano l'importanza fondamentale delle **SPI** (Salmonella Pathogenicity Islands) nei meccanismi di infezione, sopravvivenza e replicazione del batterio all'interno dell'ospite, che può essere solamente l'uomo. Le prime terapie antimicrobiche prevedevano l'utilizzo di *cloramfenicolo*, *ampicillina* e *trimetoprim+sulfametoxazolo* ma la comparsa di ceppi multi-resistenti (**MDR**) ha portato all'utilizzo di *fluorochinoloni* e, solo negli ultimi anni, di *cefalosporine*. Tuttavia, è stata sporadicamente riscontrata anche la presenza di ceppi resistenti a questi ultimi antibiotici (**XDR**), cosa che potrebbe rappresentare una futura problematica in Paesi dove la malattia è endemica (es. Pakistan).

Sono stati sviluppati anche dei vaccini.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

Articoli visualizzati =

1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36296282/> = Understanding the Mechanism of Antimicrobial Resistance and Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serovar Typhi
2. <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S1473-3099%2818%2930685-6> = The global burden of typhoid and paratyphoid fevers: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017

Fonti immagini =

1. <https://www.dreamstime.com/structure-bacteria-salmonella-infographics-vector-illustration-isolated-background-structure-bacteria-image111182379>
2. https://www.researchgate.net/figure/S-typhi-bacterial-antigen-The-three-components-of-the-antigen-mentioned-above-in-the_fig4_344663644
3. https://en.wikipedia.org/wiki/Typhoid_fever#/media/File:Fievre_typhoide.png
4. <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S1473-3099%2818%2930685-6>
5. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-the-SPI-1-related-T3SS-needle-apparatus-in-contact-with-a-host_fig1_334806718
6. https://www.researchgate.net/figure/Figure2-Breaching-of-gut-epithelia-by-Salmonella-The-mode-of-entry-of-Salmonella-in-gut_fig1_227856739
7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9606911/pdf/microorganisms-10-02006.pdf> = Tabella SPIs
8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2647431/pdf/06-039818.pdf>
9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7643746/pdf/ciz1112.pdf>
10. <https://www.shutterstock.com/it/image-illustration/antimicrobial-resistance-antibiotic-main-mechanisms-by-388323214>
11. Immagini sulla struttura degli antibiotici tratte da Wikipedia e ResearchGate