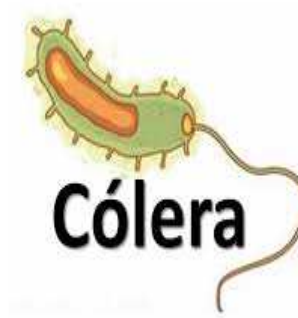


Malattie alimentari da batteri del gen. **Vibrio** parte Seconda: *Colera*

Docente: Elena Rocchegiani
e.rocchegiani@izsum.it

Di cosa parleremo

- Il **Colera** Introduzione ed etimologia
- Patogenesi
 - *Trasmissione*
 - *Fattori di viruenza*
 - *Dose infettante*
 - *Meccanismo d'azione della CTX*
- Clinica
- Un po' di Storia
- Epidemiologia
- Vibrioni e biofilm
- Diagnosi
- Terapia
- Profilassi



Dove siamo arrivati....

Batteri patogeni

- ★ *Salmonella* spp.
- ★ *Clostridium botulinum*
- ★ *Staphylococcus aureus*
- ★ *Campylobacter jejuni* e *coli*
- ★ *Yersinia enterocolitica*
- Yersinia pseudotuberculosis*
- Listeria monocytogenes*
- Vibrio cholerae* O1**
- Vibrio cholerae* non-O1**
- Vibrio parahaemolyticus*
- ★ Altri vibrioni alofili correlati
- ★ *Vibrio vulnificus*
- ★ *Clostridium perfringens*
- Bacillus cereus*
- ★ *Aeromonas hydrophila* e altre spp.
- Plesiomonas shigelloides*
- ★ *Shigella* spp.
- Streptococcus*
- Vari germi enterici patogeni occasionali

★ *Gruppo degli Escherichia Coli* *Enterovirulenti (EEC)*

- Escherichia coli* - enterotossigeni (ETEC)
- Escherichia coli* - enteropatogeni (EPEC)
- Escherichia coli* O157:H7 enteroemorragici (EHEC)
- Escherichia coli* - enteroinvasivi (EIEC)

Protozoi e altri parassiti

- Cyclospora cayentanensis*
- Anisakis* sp. e vermi correlati

- Diphyllobothrium* spp.
- Nanophyetus* spp.
- Eustrongylides* sp.
- Acanthamoeba* e altre amebe
- Ascaris lumbricoides*
- Trichuris trichiura*
- Giardia lamblia*
- Entamoeba histolytica*
- Cryptosporidium parvum*

Virus

- Epatite A virus*
- Epatite E virus*
- Rotavirus*
- Norwalk virus* (gruppo)
- Altri agenti virali (*Polio-*, *Echo-*, *Coxsackie-*, *Corona-*, *Astro-* e *Parvovirus*)

Tossine naturali

- Ciguatera
- Tossine dei molluschi (PSP, DSP, NSP, ASP)
- Veleni da sgombridi
- Tetrodotossine (Pesce palla)
- Tossine fungine
- Aflatossine
- Alcaloidi pirrolizidine
- Fitoemoagglutinine (*Red kidney bean poisoning*)
- Tossine del miele

Altri agenti patogeni

- Prioni (BSE)

Colèra

[dal lat. cholĕra, gr. χολέρα, femm.],

colèra dal gr. CHOLÈRA da CHÒLIX
CHOLÀS intestino oppure da CHOLÈ bile (cagione del profluvio di bile o di materie simili per la bocca o per la via inferiore (v. Colon), cui taluno aggiunge RÈÔ scorrendo non reputando RA semplice e muta desinenza (cfr. *Collera*). — Morbo epidemico venuto dall'Asia, che cagiona improvvisamente vomiti e copiose deiezioni alvine ed è spesso seguito da morte.
Deriv. *Colèrica: Coleréno: Colerósa.*

COLLERA: Secondo la medicina ippocratica, l'abbondanza di bile gialla - uno dei quattro fluidi fondamentali del corpo umano - caratterizzava la persona di temperamento collerico, che naturalmente tenderebbe a non riflettere, reagendo in maniera impetuosa anche agli stimoli più delicati. Una reazione, quindi, non di testa né di cuore, ma di pancia. Il colera temine già usato da Ippocrate, in quanto grave infezione intestinale, etimologicamente nasce dalla medesima radice: gli squilibri addominali si credevano effetto di squilibri biliari.

Introduzione

- 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 **molluschi bivalvi**.
- Anche altri alimenti possono comunque fungere da veicolo.
- Il microrganismo può vivere anche in ambienti naturali, come i **fiumi salmastri** e le zone costiere: per questo il rischio di contrarre l'infezione per l'ingestione di molluschi è elevato.
- 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.



Associazione tra alcune sindromi cliniche e *Vibrio*

Specie <i>Vibrio</i>	Sito di infezione						
	Tratto gastro-intestinale	Ferita	Orecchio	Setticemia primaria	Batteriemia	Polmone	Meningi
<i>V. cholerae</i> O1/O139	++	(+)	?	?	?	?	?
<i>V. cholerae</i> non-O1 / non-O139	++	+	+	(+)	(+)	?	(+)
<i>V. parahaemolyticus</i>	++	+	(+)	?	(+)	(+)	(+)
<i>V. vulnificus</i>	+	++	?	++	+	(+)	(+)
<i>V. fluvialis</i>	++	?	?	?	?	?	?
<i>V. alginolyticus</i>	?	++	+	?	(+)	?	?
<i>V. damsela</i>	?	++	?	?	?	?	?
<i>V. furnissii</i>	(+)	?	?	?	?	?	?
<i>V. hollisae</i>	++	?	?	(+)	?	?	?
<i>V. mimicus</i>	++	+	+	?	?	?	?
<i>V. metschnikovii</i>	(+)	?	?	(+)	?	?	?
<i>V. cincinnatiensis</i>	?	?	?	?	(+)	?	(+)
<i>V. carchariae</i>	?	++	?	?	?	?	?

++ più comune sito di infezione; + altri siti di infezione; (+) raro sito di infezione; ? da stabilire. Modificata da [11, 12].

Vibrio spp. (Family Vibrionaceae)

Associated with Human Disease

Species	Source of Infection	Clinical Disease
<i>V. cholerae</i>	Water, food	Gastroenteritis
<i>V. parahaemolyticus</i>	Shellfish, seawater	Gastroenteritis, wound infection, bacteremia
<i>V. vulnificus</i>	Shellfish, seawater	Bacteremia, wound infection, cellulitis
<i>V. alginolyticus</i>	Seawater	Wound infection, external otitis
<i>V. holisae</i>	Shellfish	Gastroenteritis, wound infection, bacteremia
<i>V. fluvialis</i>	Seafood	Gastroenteritis, wound infection, bacteremia
<i>V. damsela</i>	Seawater	Wound infection
<i>V. metschnikovii</i>	Unknown	Bacteremia
<i>V. mimicus</i>	Fresh water	Gastroenteritis, wound infection, bacteremia
<i>V. furnissii</i> *	Seawater	Gastroenteritis
<i>V. cincinnatiensis</i> *	Unknown	Bacteremia, meningitis
<i>V. carchariae</i> *	Seawater	Wound (shark bite)

Caratteristiche del gen. *Vibrio*

- Il genere *Vibrio* comprende microrganismi **Gram-negativi**, di forma leggermente ricurva e **mobili** per la presenza di **un flagello polare** che risulta avvolto da un involucro esterno continuo con la membrana esterna della parete cellulare.
- Aerobi –anaerobi facoltativi
- Non sporigeni
- **ossidasi positivi** (tranne il *Vibrio metschnikovii*)
- fermentano il glucosio
- **organismi alofili** poiché la loro crescita viene stimolata dalla presenza di NaCl (indispensabile per *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*).
- Possono infatti essere classificati come alofili o non alofili, in base alla richiesta di NaCl per la crescita .



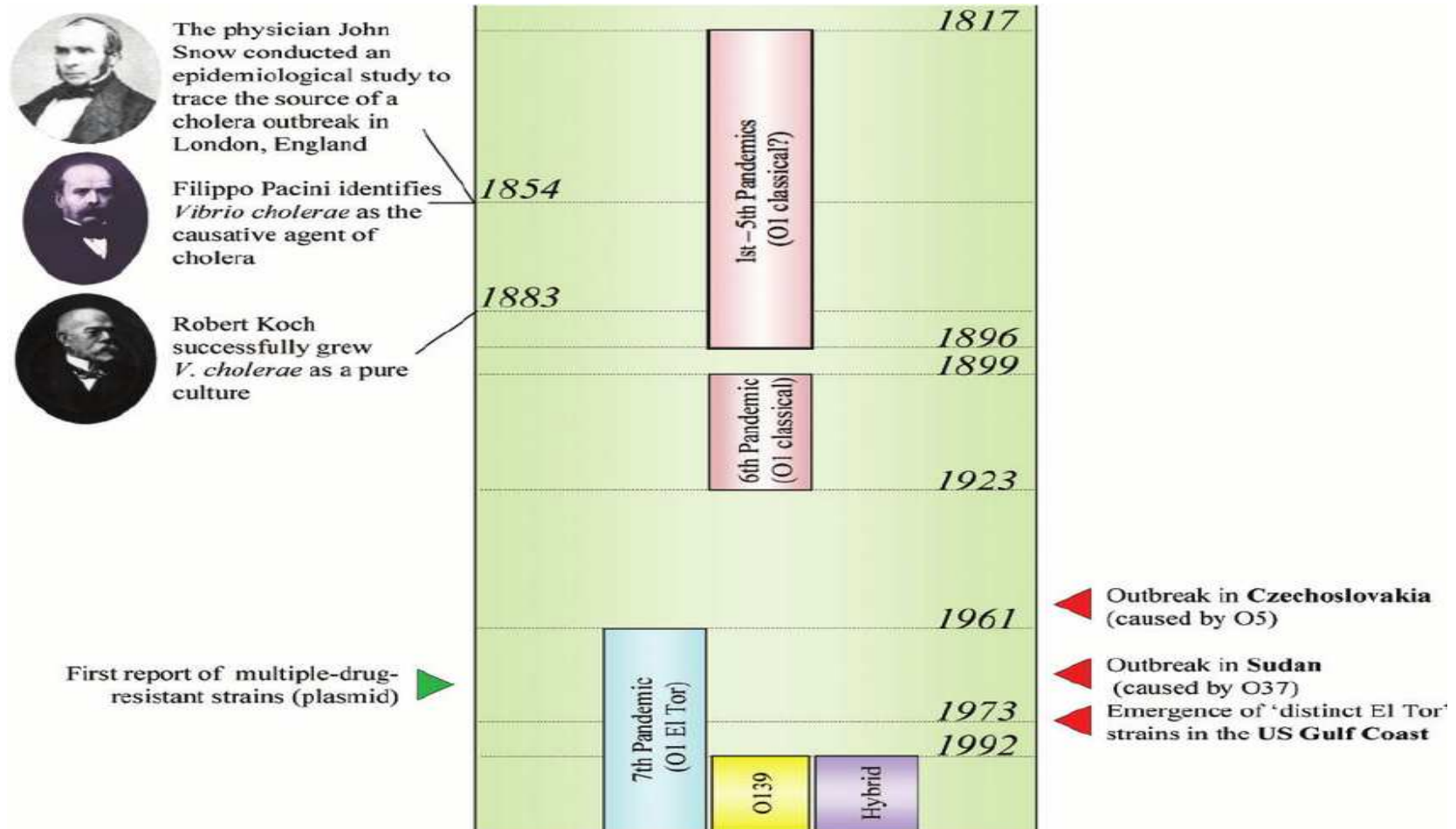
Classificazione dei vibroni in base alla richiesta di NaCl

Salinità	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
0%	+	+	-	-	-
3%	+	+	+	+	+
6%	-	-	+	+	+
8%	-	-	-	+	+
10%	-	-	-	-	+

Test biochimici caratteristici delle specie patogene

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

Discovery



Discovery

- **Filippo Pacini** (1812-1883)
 - 1854: Cholera reaches Florence, Italy. Pacini discovers causative agent
 - Publishes “Microscopical Observations and Pathological Deductions on Cholera”
 - 1965: Bacterium named *Vibrio cholerae* Pacini 1854
- **Robert Koch** (1843-1910)
- 1884: Rediscovered *Vibrio cholerae*

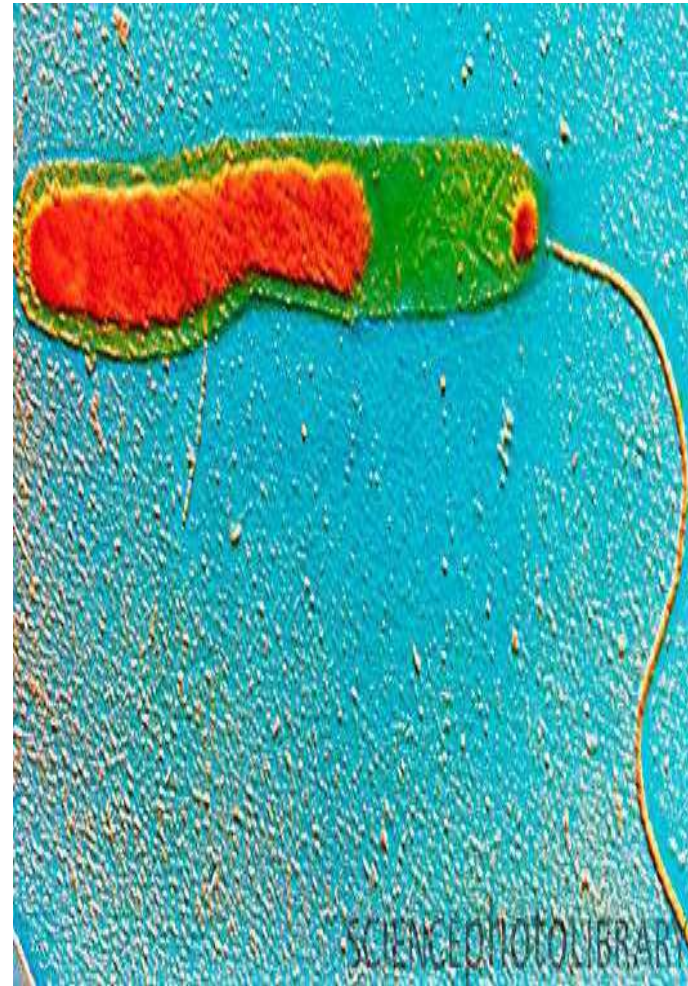


Un organismo simile ad un vibrione fu **descritto** per la prima volta come il patogeno del colera già dal 1854 da Filippo Pacini anche se *Vibrio cholerae* fu **isolato** 30 anni dopo da Robert Koch nel 1884



Vibrio cholerae

- *Vibrio cholerae* è un microrganismo Gram-negativo, **ossidasi-positivo, asporigeno**, aerobio- anaerobio facoltativo, forma bastoncellare ricurva, provvisto di un singolo flagello, ad un polo della cellula, in grado di conferirgli **motilità**
- E' in grado di fermentare alcuni zuccheri, come maltosio, saccarosio, destrosio e mannitolo, producendo acidi;
- **debolmente alofilo** e, a livello ambientale, ha una variabile capacità di resistenza a seconda della temperatura, umidità e presenza di sostanze organiche



Vibrio cholerae condizioni di crescita

Sopravvive:

- 7 a 13 giorni nell'acqua potabile
- 28 giorni negli alimenti in funzione del pH e dell' a_w
- 14 giorni nei molluschi bivalvi a temperatura di refrigerazione.

Parametri	Optimum	Intervallo
Temperatura (C°)	37	10-43
pH	7,6	5,0-9,6
a_w	0,984	0,97-0,998
NaCl%	0,5	0,1-4

Vive nelle acque marine in vicinanza delle coste nei mesi estivi e solo raramente in quelli invernali durante i quali sembra si localizzi nei sedimenti per risalire nelle acque superficiali quando la temperatura dell'acqua è favorevole (sopra i 14°C circa). Qui *Vibrio cholerae* si insedia nello zooplancton e nei materiali ricchi di chitina dove si moltiplica: questa colonizzazione si verifica con maggiore efficacia nelle condizioni di salinità tipiche degli **estuari**.

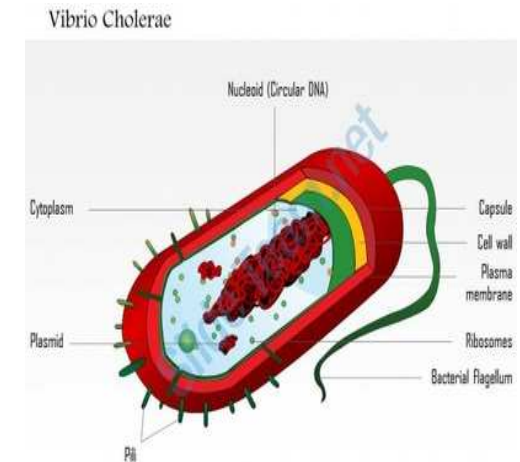
Condizioni di salinità tipiche degli estuari



“Stato dormiente” in simbiosi con zooplancton
(piccoli crostacei) non coltivabile ma dimostrabile con IFA

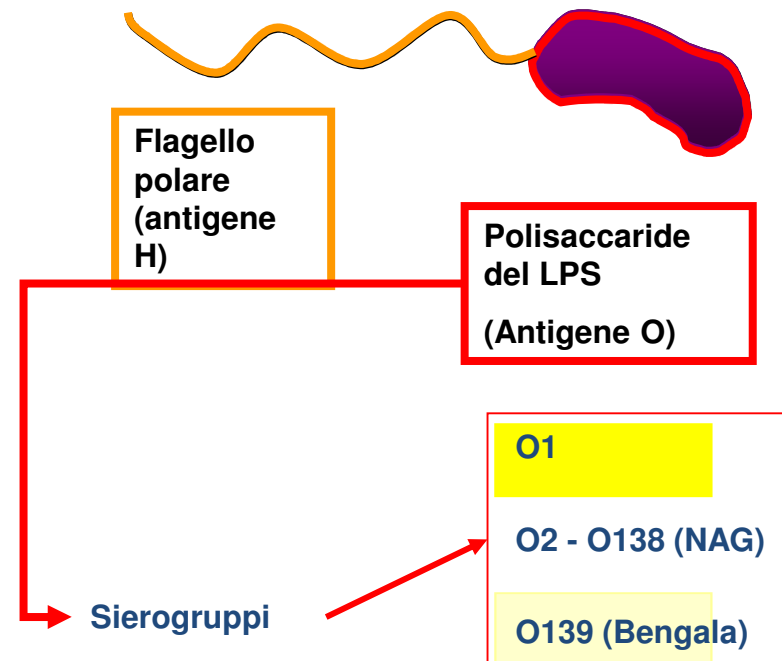
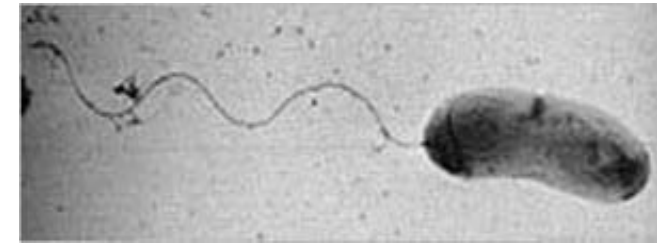
General Characteristics of Vibrio

- Similarities to Enterobacteriaceae
 - Gram-negative
 - Facultative anaerobes
 - Fermentative bacilli
- Differences from Enterobacteriaceae
 - **Polar flagella**
 - **Oxidase positive**



Caratteri antigeni del *V. cholerae*

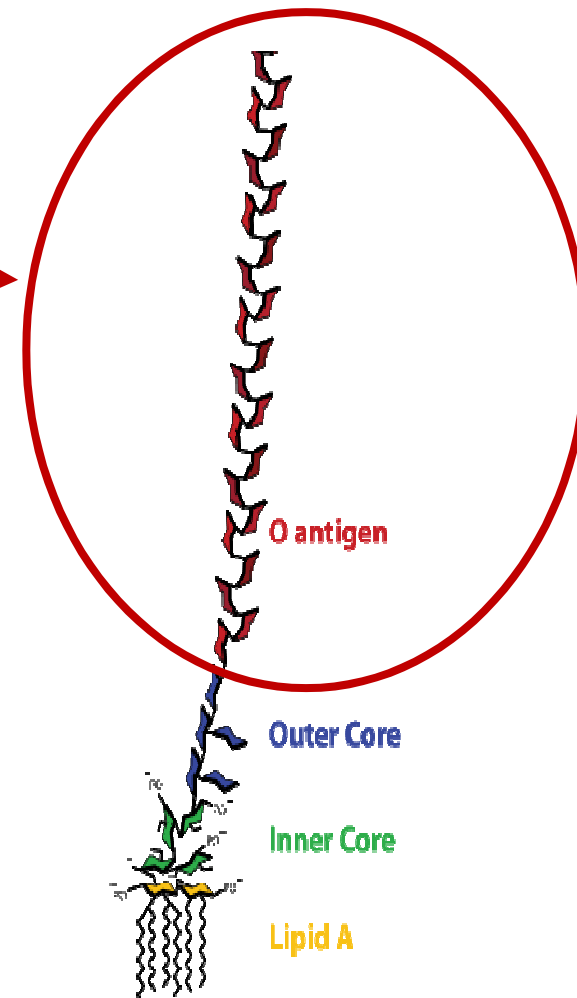
- Ag Ciliare H → termolabile, non specifico
- Ag Somatico O → termostabile **specifico**
 - in base all'antigene "O" è classificato in 139 gruppi sierologici (sierogruppi)
 - da *V. cholerae* O1 a *V. cholerae* O139
 - **O1 e O139: possono produrre tossina colerica e causare pandemie ed epidemie di colera.**



Durante episodi epidemici sono stati isolati solo ceppi TOSSIGENICI che appartengono ai sierogruppi O1 e O139 (colerigeni)

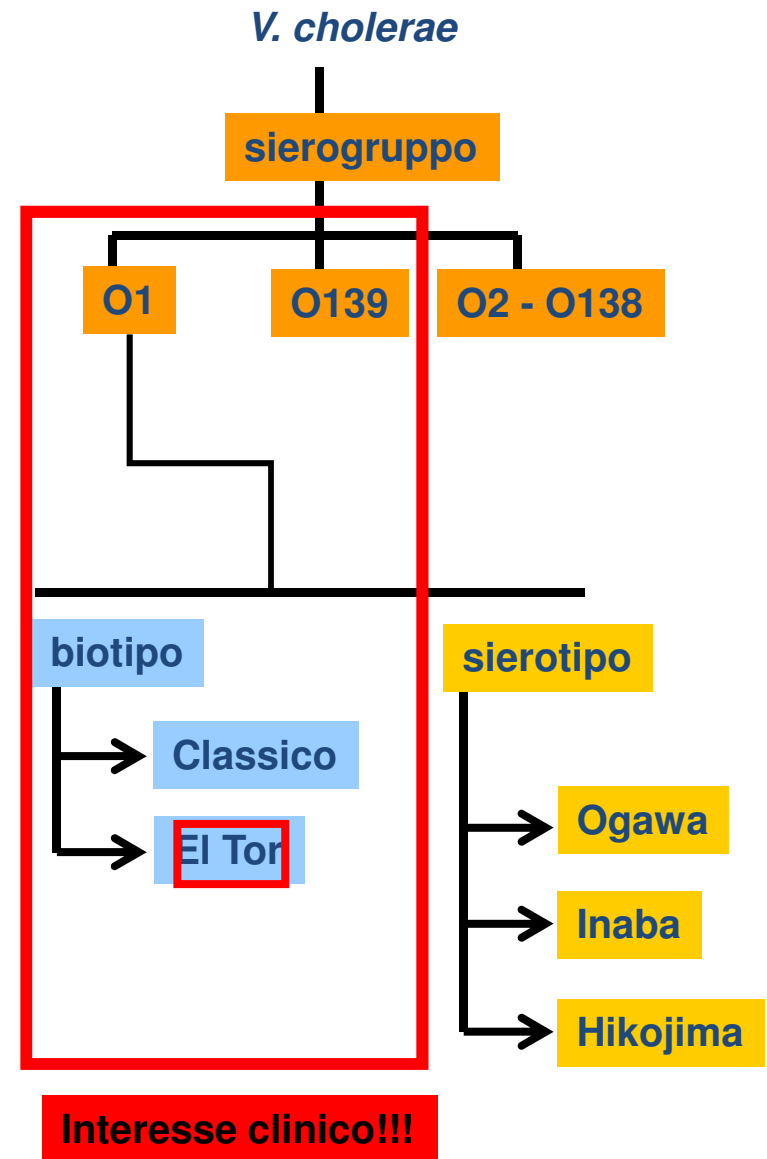
Ricordiamo?

- Il **lipopolisaccaride (LPS)** è uno dei componenti della membrana cellulare esterna dei batteri Gram-negativi
- L'**antigene O** (*O-Specific Chain*), detto anche catena laterale, è costituito da una ripetizione di 20-50 unità che compongono 4-8 zuccheri comuni (glucosio, galattosio, mannosio) o specifici della specie. Rappresenta la porzione più esterna, e quindi quella esposta al sistema immunitario. Oltre ad essere diverso nelle diverse specie può anche essere diverso all'interno della specie, caratterizzando quindi i diversi ceppi.



Classificazione del *Vibrio cholerae*

- All'interno del gruppo sierologico O1 vengono distinti **2 biotipi** (caratteristiche fenotipiche) e **3 sierotipi** (caratteri antigenici)
- *Vibrio cholerae* Nuovo Sierogruppo **O-139 Bengal** (probabilmente derivato da El tor)
- O2 -O138 Non-cholera vibrio (NCV) or non-agglutinating vibrios (NAG) or non-O1 vibrio cholerae)



I due biotipi di *V.cholerae*

- 1) *V. cholerae* O1 **biotipo classico** (colera asiatico, è il più diffuso) ritenuto responsabile delle prime sei pandemie verificatesi tra il 1817 ed il 1923.
- 2) *V. cholerae* O1 **biotipo El Tor** (isolato in un campo di quarantena “El Tor” nella penisola del Sinai in Arabia) ritenuto responsabile della settima pandemia che iniziò nel 1961

Caratteri biochimici *V.cholerae*

- Ossidasi +
- Catalasi +
- Fermentano il glucosio
- Producono indolo

TEST	CLASSICAL CHOLERA	EL TOR CHOLERA
HAEMOLYSIS	NEGATIVE	POSITIVE
VOGES-PROSKAUER	NEGATIVE	POSITIVE
CHICK ERYTHROCYTE AGGLUTINATION	NEGATIVE	POSITIVE
POLYMYXIN B SENSITIVITY	POSITIVE	NEGATIVE
GROUP IV PHAGE SUSCEPTIBILITY	POSITIVE	NEGATIVE
EL TOR PHAGE 5 SUSCEPTIBILITY	NEGATIVE	POSITIVE

Difference between El Tor & classical *Vibrio cholerae*

La patologia umana da vibrioni

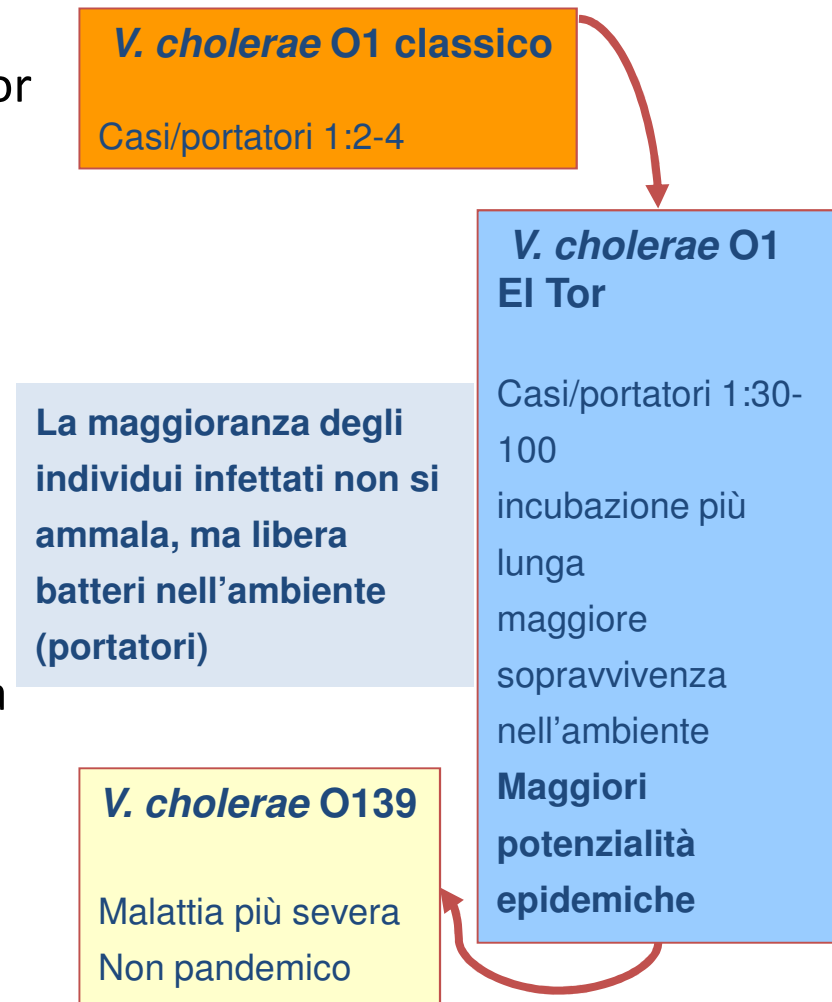
	sierogruppo	biotipo	sierotipo	patologia
<i>Vibrio cholerae</i>	O1 (epidemie)	Classico El Tor	Ogawa Inaba Hikojma	colera
	O139 (Bengala) epidemie			
	O2-0138 Casi sporadici			

PRINCIPALI ALTRI VIBRIONI DI INTERESSE MEDICO

Specie	Patologie sostenute
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gastroenteriti per ingestione cibi contaminati
<i>Vibrio vulnificus</i>	Infezione da ferite, setticemie

V.cholerae O1 classico vs *V. cholerae* O1 El Tor

- I vibroni biotipo “El Tor” sono responsabili di epidemie in cui generalmente i casi gravi sono in minor numero mentre sono più frequenti le **infezioni asintomatiche e lievi**; persistono più a lungo nell’uomo per cui esistono casi di **portatori cronici** che non si verificano per il biotipo “classico”;
- *V.cholera* O1 “El Tor” risulta essere più resistente agli agenti chimici mostrando dunque maggiore capacità di **sopravvivenza** nell’ambiente naturale rispetto ai Vibroni “Classici”.



Vibrio cholerae **non-O1**

- Tutti i ceppi appartenenti a sierogruppi diversi da O1 sono associati con casi sporadici di gastroenteriti e lievi forme di malattie simili al colera
- **Nota bene:** alcune epidemie di colera tipico sono state attribuite a ceppi di una specie non O1: il ***Vibrio cholerae* O139** (o *Vibrio cholerae* Bengala) che rappresenta un nuovo sierogruppo emergente.
- Dalla sua comparsa in India e Bangladesh nel 1992, infatti O139 si è diffuso molto rapidamente in altre regioni tanto da indurre alcuni ricercatori a suggerire la presenza di **un'ottava pandemia in corso**.

Trasmissione

- Senza la contaminazione di alimenti o acqua, il contagio diretto da persona a persona è molto raro in condizioni igienico-sanitarie normali.
- La **carica batterica necessaria per la trasmissione dell'infezione è, infatti, superiore al milione**: pertanto risulta molto difficile contagiare altri individui attraverso il semplice contatto.

► Trasmissione indiretta: acqua, alimenti, indumenti, insetti
► “5 F” → Fingers, Foods, Faeces, Flies, Fomites



Infectious dose: $10^6 - 10^8$

Varies with vehicle of transmission

Gastric acidity

Incubation period

–1-3 days ($\frac{1}{2}$ -5 days)

Patogenesi

- *Vibrio colerae* O-1 e O-139 causano malattia attraverso **l'azione della esotossina colerica** (CTX) → prodotta in fase replicativa
- *V. cholerae* **non invade l'intestino**, ma si attacca all'epitelio intestinale tramite i pili e l'azione della tossina rende le cellule altamente permeabili ai liquidi (si può perdere 1 litro d'acqua in 1 ora, fino a 20 litri in 1 giorno).

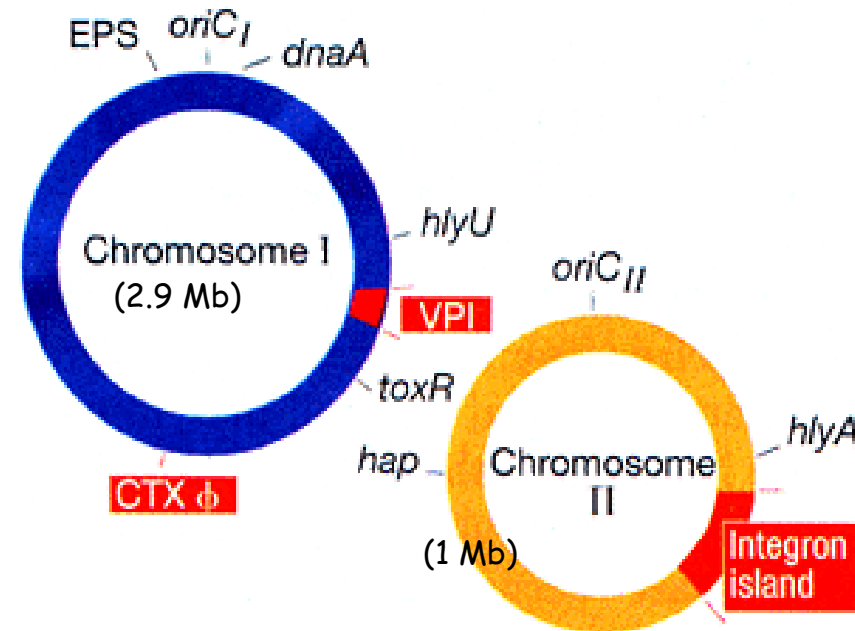
**n.b.: Il microrganismo è poco invasivo.
La patogenicità è legata alla tossina.**

Vibrio cholerae: il genoma

Il genoma di *Vibrio cholerae* è composto da **due cromosomi**.

Il cromosoma più grande (cromosoma 1) contiene la maggior parte dei geni per le funzioni cellulari essenziali e per la virulenza.

La maggior parte dei geni sul cromosoma 2 sono a funzione sconosciuta

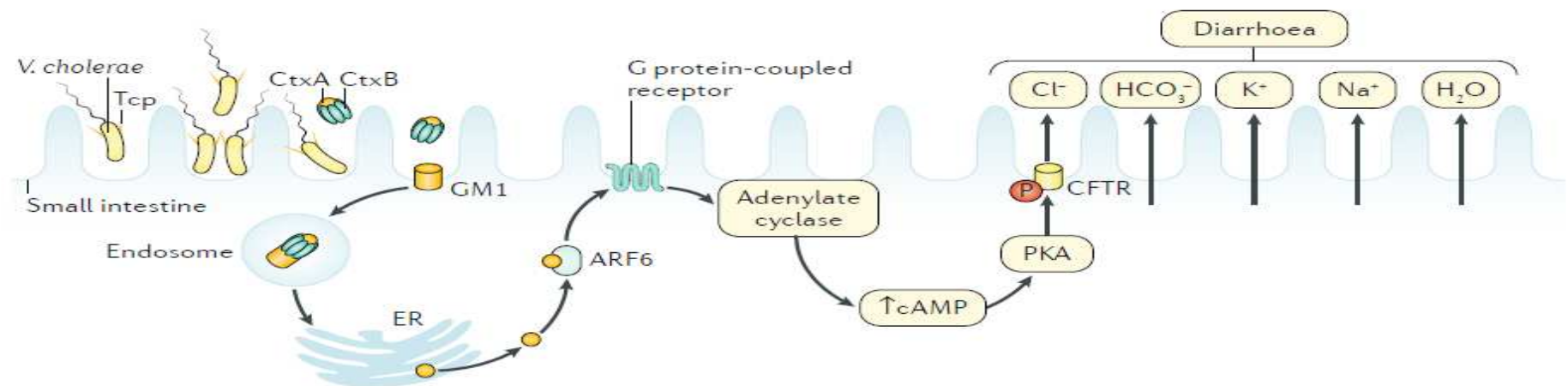


Isole di patogenicità, fagi ed
integroni contribuiscono alla
virulenza

1Mb =
1.000000 bp

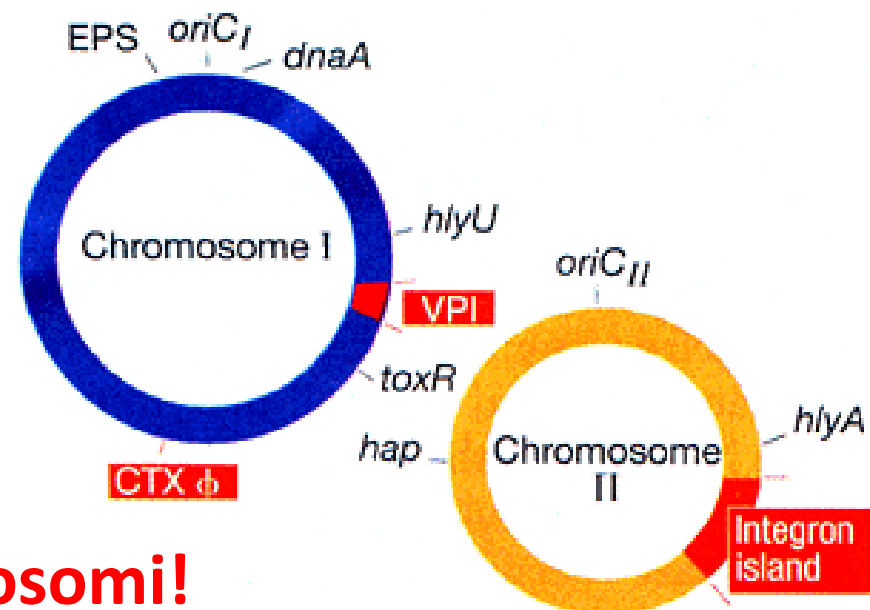
Enterotossina colerica CTX

- Da un punto di vista funzionale è un'**esotossina** binomiale di tipo A-B cioè una Proteina termolabile, pm 84-85.000 D, composta da due frazioni proteiche:
 - Una **subunità A** (*active*) che svolge l'attività, suddivisa in A1 e A2 (tenute insieme da un ponte disolfuro) → centrale, pm 27.000D
 - Cinque **subunità B** (*binding*) periferiche, pm 11.500 D (5) carrier e legame con il recettore specifico di membrana dell'enterocita del tenue (GM₁-Ganglioside)



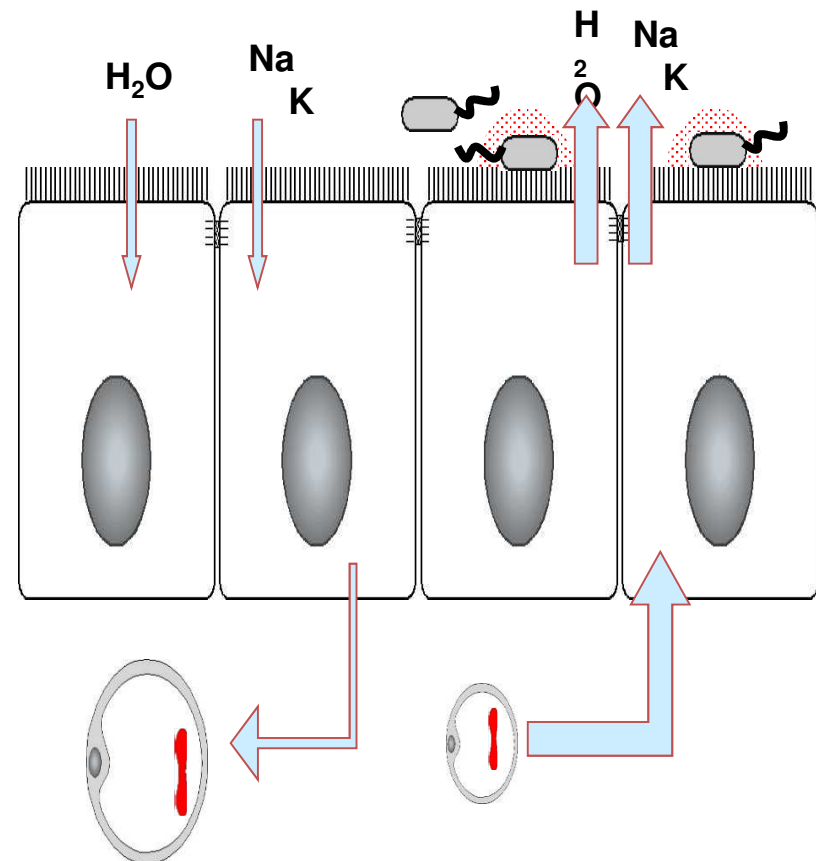
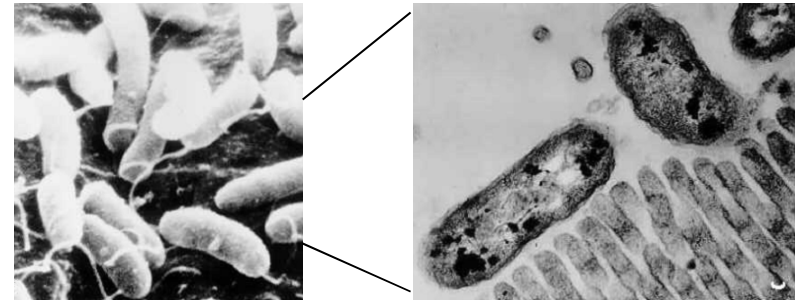
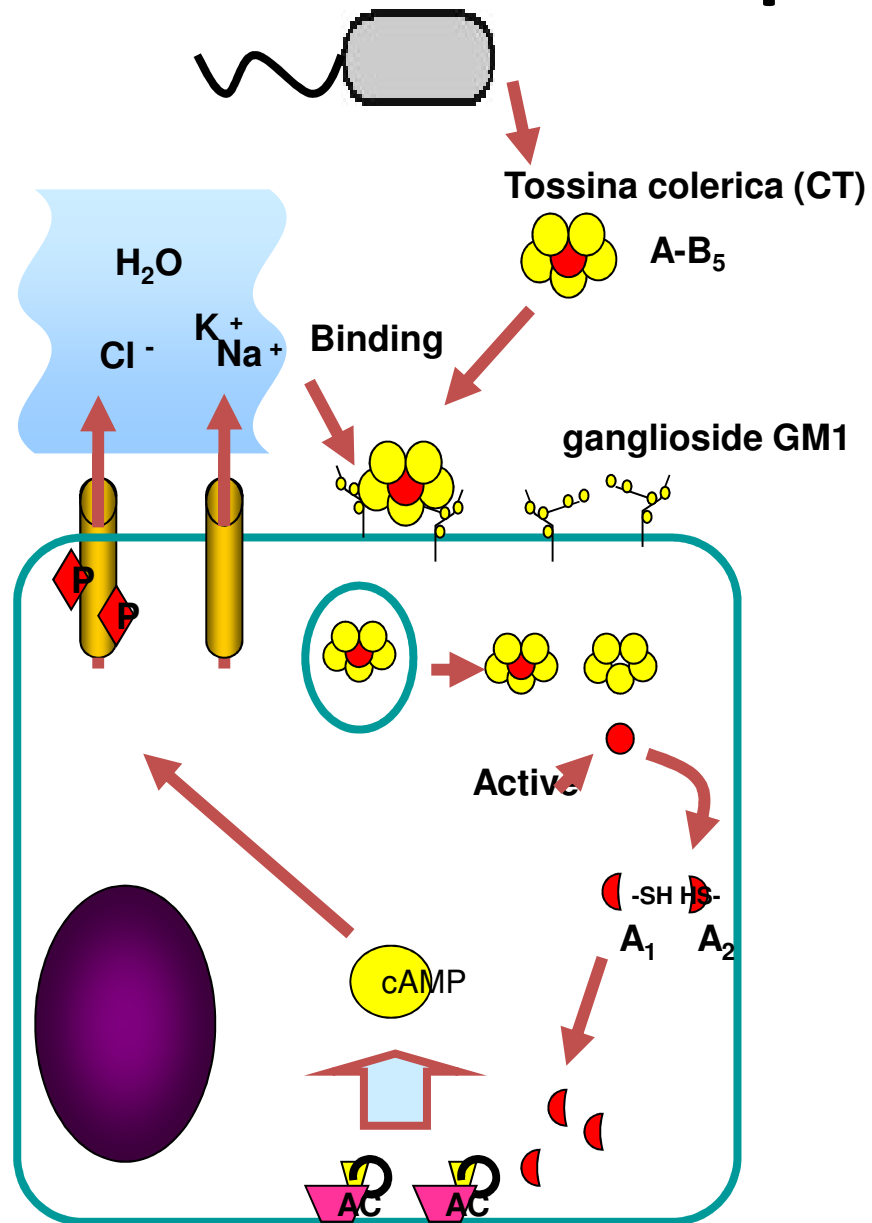
Patogenesi ed Immunità

- Il fago si lega al tcp (toxin co-regulated pilus) e si integra nel genoma batterico.
- Il fago codifica anche per:
 - **ace** (tossina accesoria)
 - **zot** (tossina *zonula occludens*)
 - **cep** (chemotaxis protein)



n.b.: *Vibrio* ha 2 cromosomi!

Azione patogena del *V. cholerae*

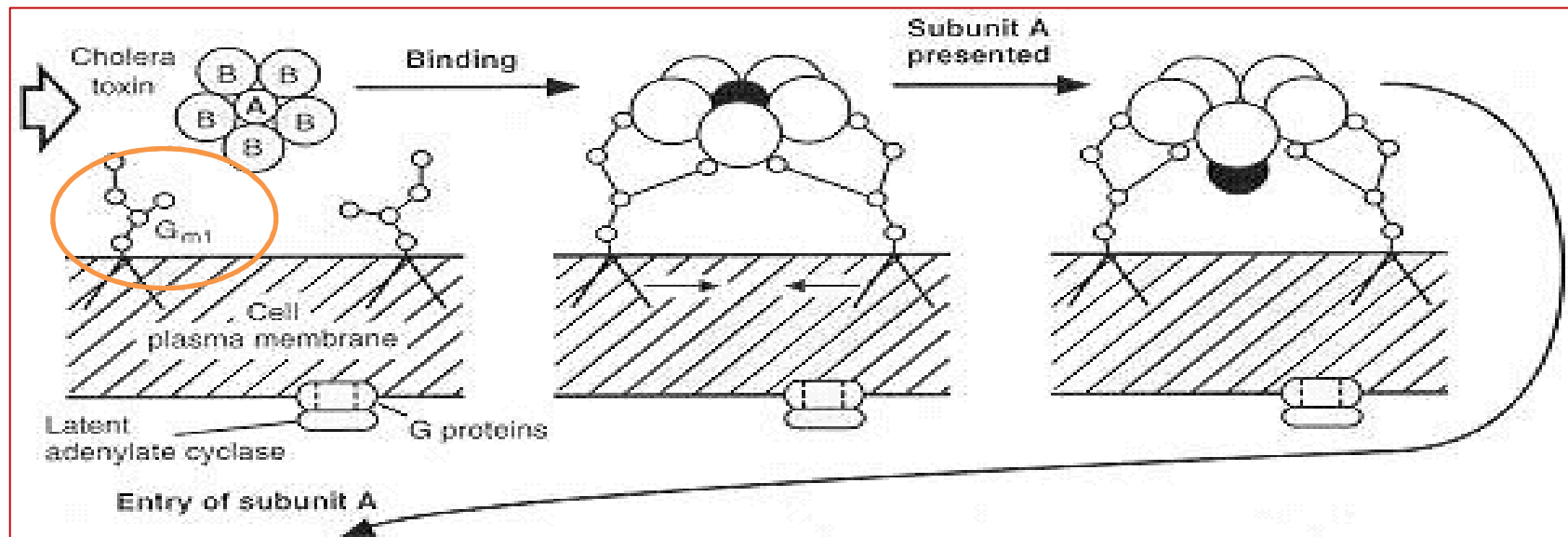


Patogenesi ed Immunità

Meccanismo d'azione della tossina colerica.

- La subunità B si lega al ganglioside GM1 delle cellule epiteliali permettendo la successiva internalizzazione nell'enterocita delle subunità A tramite un canale idrofobico.

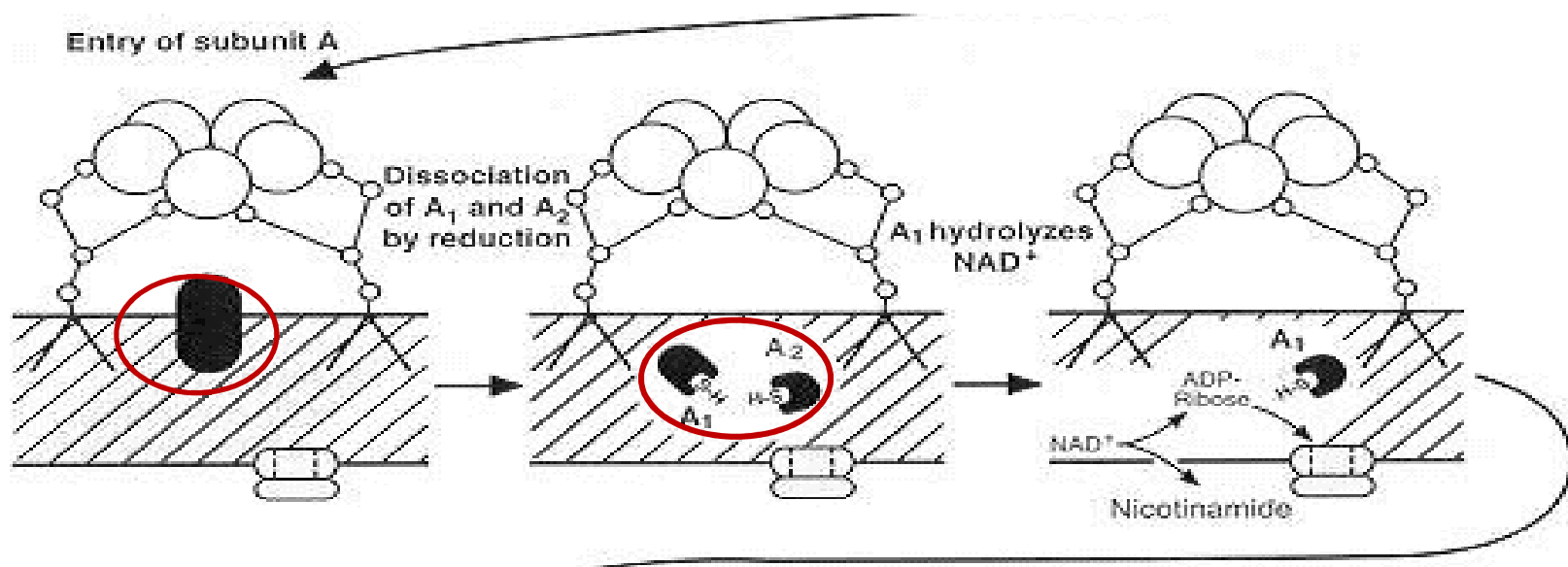
1



Patogenesi ed immunità

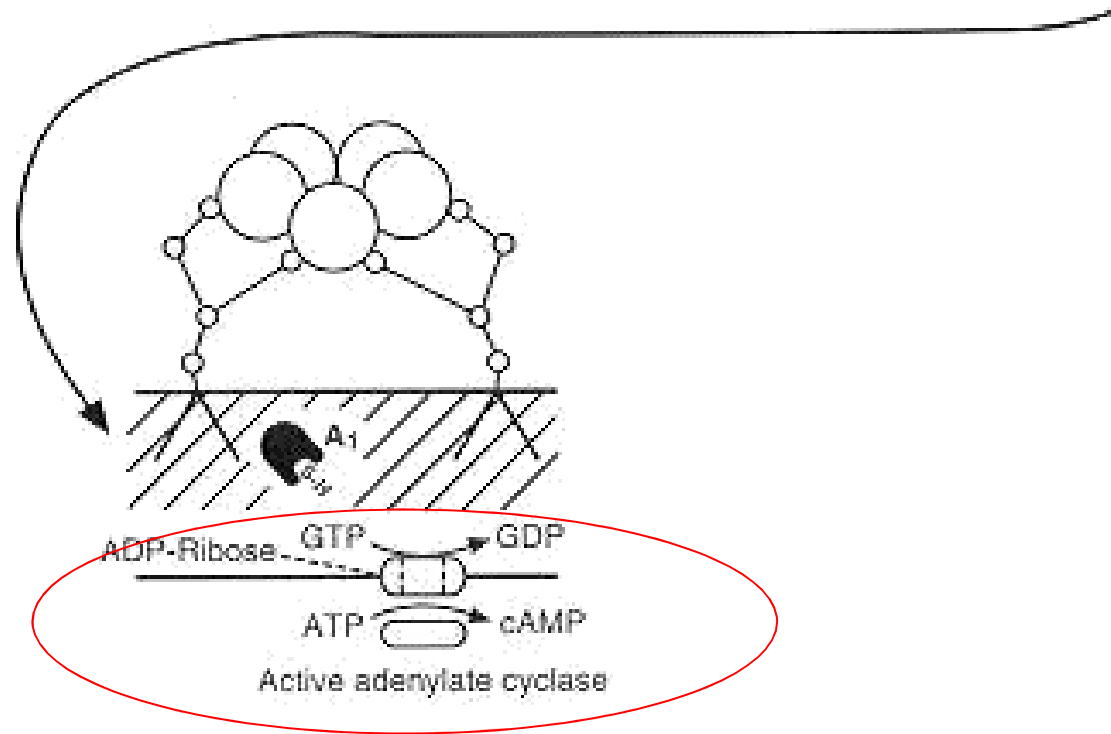
- All'interno della cellula, la subunità si dissocia in A1 e A2.
- A1 catalizza la ADP-ribosilazione sull'arginina di un complesso regolatorio (proteina G) che a sua volta attiva l'adenilato ciclasi presente sulle membrane cellulari a livello dell'epitelio intestinale.

2



3

ADP-ribosylation of G protein α inactivates GTPase, thus activating adenylate cyclase

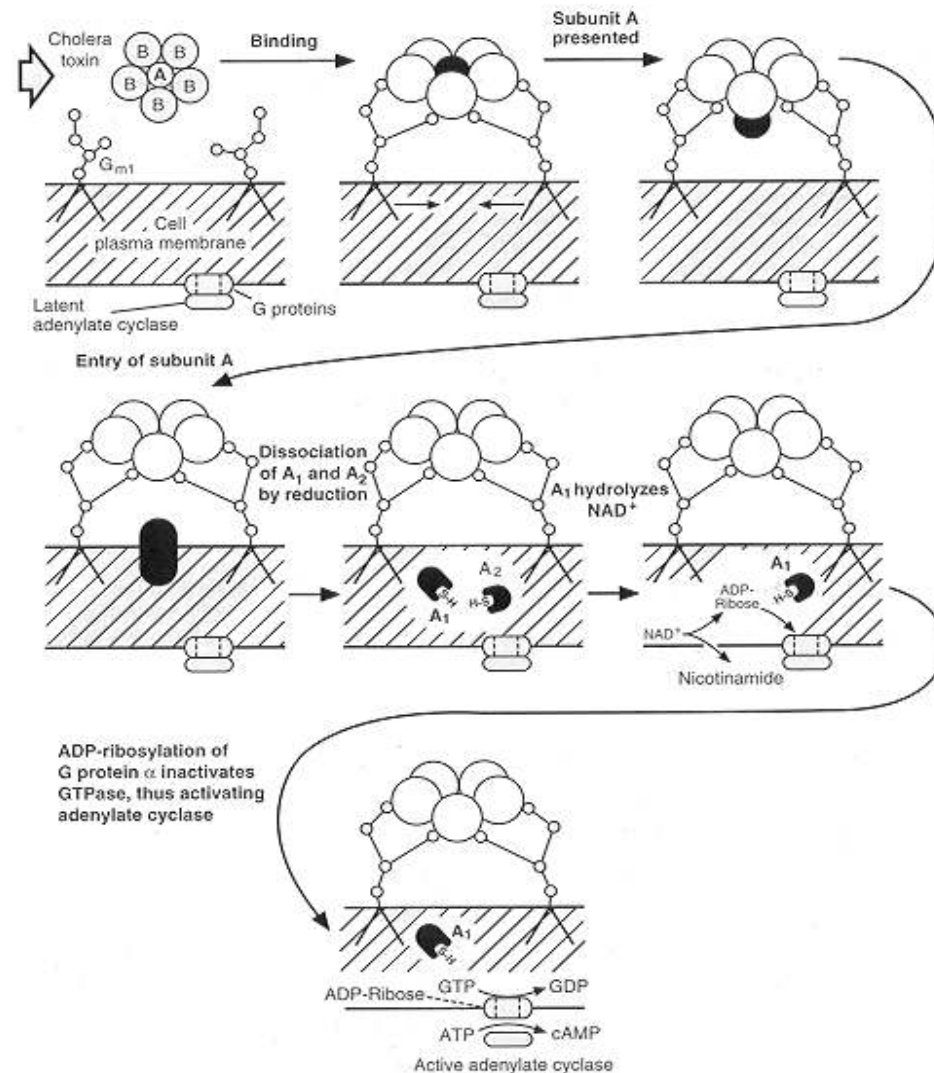


L'attività GTPasica della proteina G è bloccata.

Ne consegue iperproduzione di cAMP che stimola massiva secrezione di ioni sodio, potassio, bicarbonato con rilascio di acqua nel lumen, disidratazione e morte (in assenza trattamento).

Il *Vibrio cholerae*, a differenza degli enterobatteri e dei dissenterici (*Salmonelle* e *Shigelle*), **non attraversa l'epitelio intestinale**, la malattia sia causata dall'attività tossica posseduta dal germe.

La malattia insorge violentemente dopo 2-3 giorni di incubazione. I vibroni colerici, una volta ingeriti, giungono nell'intestino tenue dove si moltiplicano e producono una tossina che, alterando la funzione delle cellule della parete intestinale, provoca un abnorme afflusso di liquidi e di sostanze in essi disciolte nel canale digerente: ciò spiega la diarrea profusa con cui si manifesta la malattia e la grave perdita di liquidi e di sali responsabile degli altri sintomi.



► A → attivazione Adenilato-ciclasti cellulare = ↑ cAMP = secrezione attiva di H_2O ed elettroliti verso il lume intestinale (Fuga Intestinale)

***Altri* Fattori di virulenza**

a) Altre esotossine

- ACE: enterotossina accessoria del colera, aumenta la secrezione di liquidi
- ZOT: tossina della *zonula occludens*, aumenta la permeabilità intestinale

b) Adesine: pilo co-regolato con la tossina (gene tcp):

- media l'adesione sulla mucosa intestinale del pilo recettore per il fago CTXf (sito di legame del batteriofago che viene internalizzato e integrato nel cromosoma)

c) produzione di enzimi: proteasi (mucinas agiscono sulle IgAs e sul muco)

d) proteina chemotattica (gene cep): fattore di adesione

e) flagelli: movimento

f) siderofori: sequestro del ferro

g) neuraminidasi: modifica la superficie cellulare aumentando il sito di legame GM1 per la tossina colerica.

h) Altri fattori

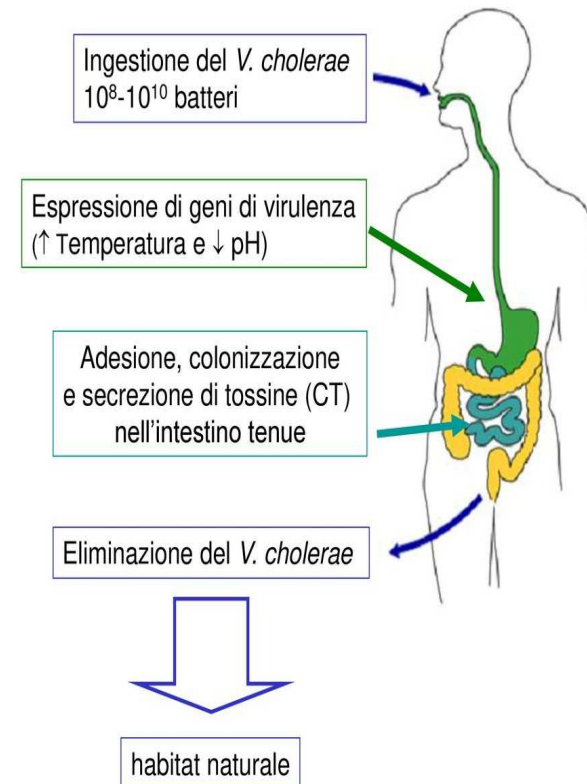
- acf: fattori di colonizzazione accessori
- hap: gene per l'emoagglutinazione/proteasi

Riassumendo l'azione patogena del *V. cholerae*

- *V. cholerae* **non invade l'intestino**, ma si attacca all'epitelio intestinale tramite i pili e l'azione della tossina rende le cellule altamente permeabili ai liquidi (si può perdere 1 litro d'acqua in 1 ora, fino a 20 litri in 1 giorno).
- L'epitelio intestinale è danneggiato ed i sintomi sono: dolore addominale, diarrea aquosa e vomito. Per la presenza di muco, le feci diarroiche vengono definite "ad acqua di riso".

Obiettivo:

replicare e persistere nell'habitat naturale (marino) dei batteri



Il colera: dose infettante

- Data la **sensibilità del vibrione all'acidità gastrica** la dose infettante è piuttosto alta (**10^8 ufc/g/ml**)
- Dosi infettanti inferiori (10^3 - 10^5 ufc/g) in pazienti affetti da ipocloridria
- La **simultanea ingestione di cibo** fornisce una barriera protettiva contro l'acidità gastrica, permettendo alle cellule sopravvissute di colonizzare le pareti dell'intestino tenue.
- via primaria di trasmissione è quella oro-fecale attraverso acqua contaminata.
- I pazienti nella fase acuta della malattia riescono ad espellere fino a **10^{13} cellule al giorno**
- le epidemie possono generare un **inquinamento ambientale**
- in tali casi, il cibo contaminato con l'acqua o direttamente con le feci può rappresentare un veicolo di trasmissione secondario.

Portatori sani



- Esistono **portatori sani**
- l'infezione è conseguente a:
 - consumo di crostacei, molluschi bivalvi crudi o poco cotti
 - Acqua contaminata
 - alimenti contaminati in genere
- In soggetti con acloridria o ipocloridria la carica infettante si riduce notevolmente da 10^{10} a 10^3 - 10^5
- Massima incidenza nei mesi caldi e in condizioni di scarsa igiene



Tossina colerica

Ingerito, *Vibrio cholerae* aderisce alla parete intestinale tramite il flagello polare per poi rilasciare la **tossina colerica (CTX)**, a sua volta codificata dal fago **CTX ϕ** , integrato nel genoma del vibrione.

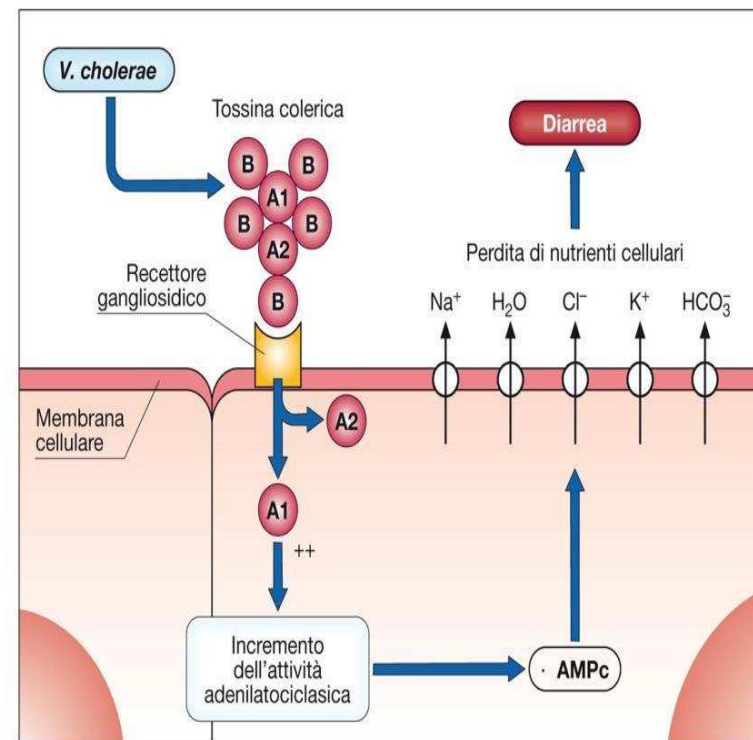
Il meccanismo d'azione di CTX mira ad alterare la concentrazione intracellulare di c-AMP portando ad uno squilibrio nelle secrezioni di sali.

Precisamente si blocca l'assorbimento di sodio e si promuove la secrezione di cloruri.

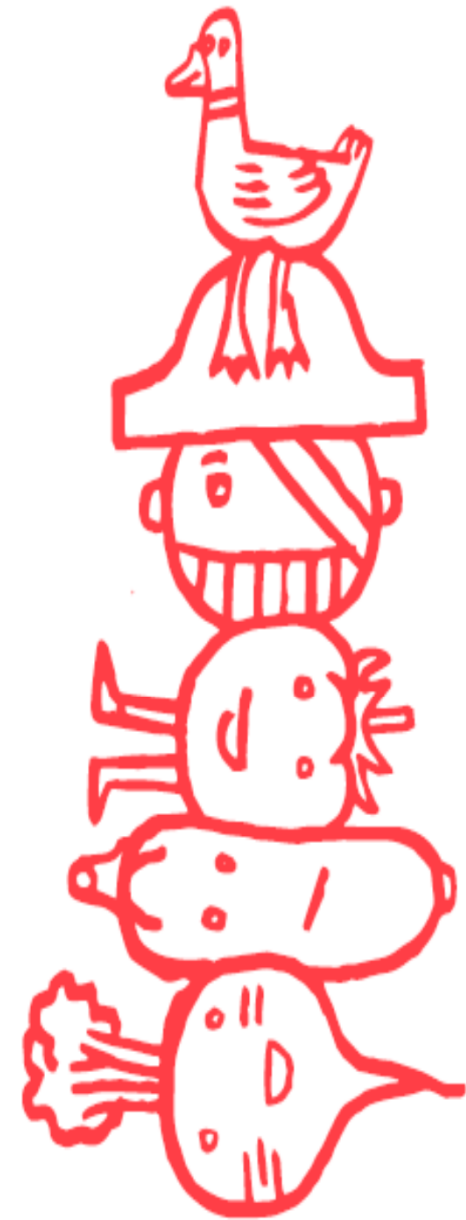
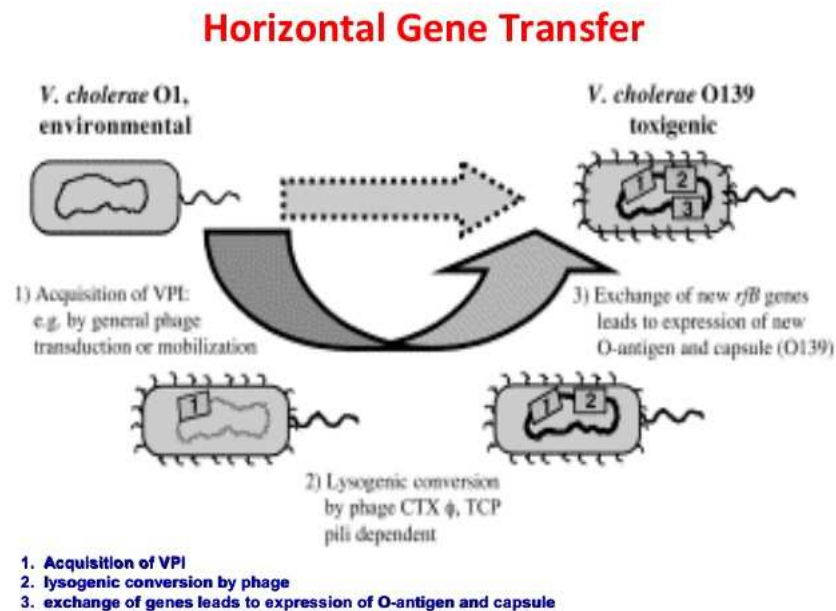
Lo sbilanciamento elettrolitico causa diarrea profusa grave con scariche intense (fino a perdere 1 litro di liquidi all'ora) e disidratazione, da cui debolezza e dolori muscolari per fuoriuscita di potassio.

Da un punto di vista funzionale CTX è un'**esotossina** binomiale di tipo A-B, si compone ovvero di due frazioni proteiche:

- La **subunità A (active)** che svolge l'attività, suddivisa in A1 e A2, tenute insieme da un ponte disolfuro;
- La **subunità B (binding)**.



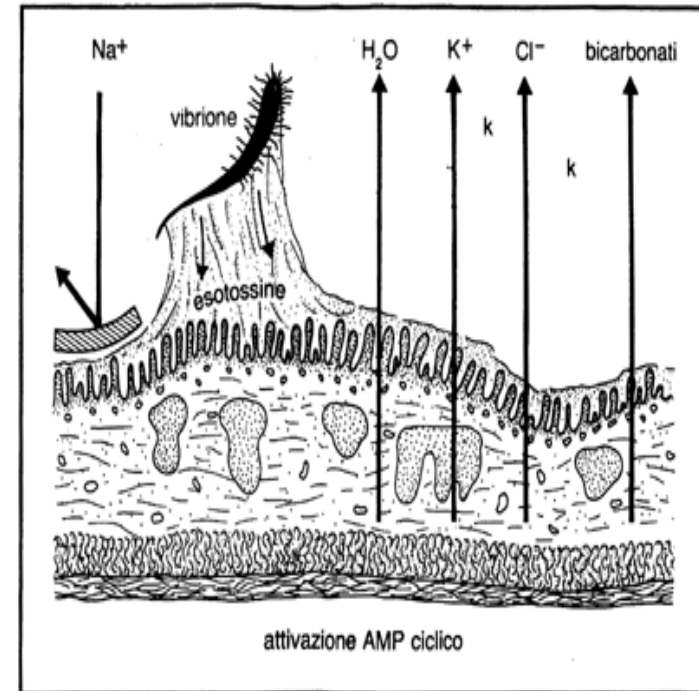
I batteri del genere *Vibrio* presentano una elevata capacità di trasferimento genico orizzontale (HHGT), che può comportare una transizione dai ceppi ambientali non patogeni a quelli patogeni.



nota bene

Patogenesi

- Penetrazione per OS → superamento barriera gastrica (cibo, acqua a digiuno) → duodeno, tenue → colonizzazione ed adesione mucosa → produzione esotossina → abnorme passaggio di acqua ed elettroliti nel lume intestinale senza modificazione del potere di assorbimento (Fuga Intestinale)
- “Feci” del coleroso → basse proteine (0.1 g%), soluzione quasi isotonica con plasma:



Perdita di H₂O ed elettroliti → Disidratazione = ↓ massa sanguigna circolante, ↑ viscosità (Hct → 70%, protidemia → 14 g%) = shock, ipokaliemia e acidosi metabolica; insufficienza renale

➤ An. Patologica: Ø danno anatomico intestinale !

Clinica

- Incubazione: 1 – 5 gg (media 3 gg)
- Inizio brusco; non febbre
- Diarrea improvvisa, senza dolori addominali, senza tenesmo, subito numerose scariche → 50 – 100 / die
- “Feci” : piccole quantità, 50 – 100 ml → liquame incolore, con fiocchetti biancastri (vibrioni conglutinati), odore indifferente, pH alcalino, assenza di GB e GR, ± muco, ad “*acqua di riso*”, → 7 – 15 litri/die → in 4-5 gg > peso corporeo!
- Vomito : prima alimentare, poi come “feci”



Clinica

- Segni di disidratazione acuta e alterazioni elettrolitiche ($\downarrow K^+$, $\downarrow Ca^{++}$, $\downarrow HCO_3^-$): sete, crampi muscolari, ipotermia cutanea, tachicardia, ipotensione, oligo-anuria, ...
- Aspetto Algido in 24h: cute fredda, sudore vischioso, "*facies tipica*" $\Rightarrow$ occhio infossato, palpebre semichiusse, naso affilato, labbra secche, cianotiche, attaccate ai denti (*faccia da mummia*); lingua secca, fuliginosa; voce roca; addome a barca
- P.A. $\downarrow \rightarrow$ shock; polso piccolo, filiforme, tachicardico
- Sensorio integro fino al decesso.



- La perdita di potassio può causare complicazioni cardiache e collasso cardiocircolatorio;
- Mortalità del 50-60% se non trattato;

Clinica

nel 60% dei casi in ~3gg → Exitus (shock irreversibile, acidosi metabolica, uremia da necrosi tubulare acuta secondaria alla prolungata ipotensione).

Casi favorevoli: dopo ~ 3gg fase di reazione con ↓ diarrea, ↓ vomito, ↑ diuresi, ↑ P.A. e t° corporea

Nelle varie epidemie presenti anche numerosi casi di forme attenuate



Un po' di storia

Il colera compare in Europa quando la peste scompare



Dal 1817 si sono verificate **7 pandemie**. Le prime sei determinate da *Vibrio cholerae* O1 sono durate ognuna da 5 a 25 anni.
nel 1961 la VII pandemia è causata da una variante di *V. cholerae* O1 detta El Tor.
L' Epidemia attuale causata da un sierotipo non O1 ma **O139**

La comparsa di un nuovo sierotipo evidenzia in modo chiaro la rapida evoluzione di *Vibrio cholerae* che grazie a questo nuovo sierotipo riesce ad evadere l'immunità presente nella popolazione.

Le pandemie di colera

- **Sierogrupo O1**: colera epidemico (6 pandemie biotipo Classico - 1817/1923 e Settima Pandemia ElTor – 1961-1997)
 - **La Settima Pandemia** Inizia nel 1961 in Indonesia. Raggiunge l'Africa dell'est nel 1970 ed il Sud America nel 1991 dove durerà fino al 1996
 - Coinvolge 21 paesi
 - Un totale di 1.000.000 di casi
 - Causa 12.000 morti (12%)
- **Sierogrupo O139** (1992)

Aspetti epidemiologici del *V. cholerae*

Per secoli endemico nel sub-continente Indiano

A partire dal 1817 il Colera si è diffuso in altri continenti (pandemie) → **biotipo Classico**

L'ultima pandemia (VII), attualmente in corso, ha avuto inizio negli anni '60 → **biotipo El Tor**



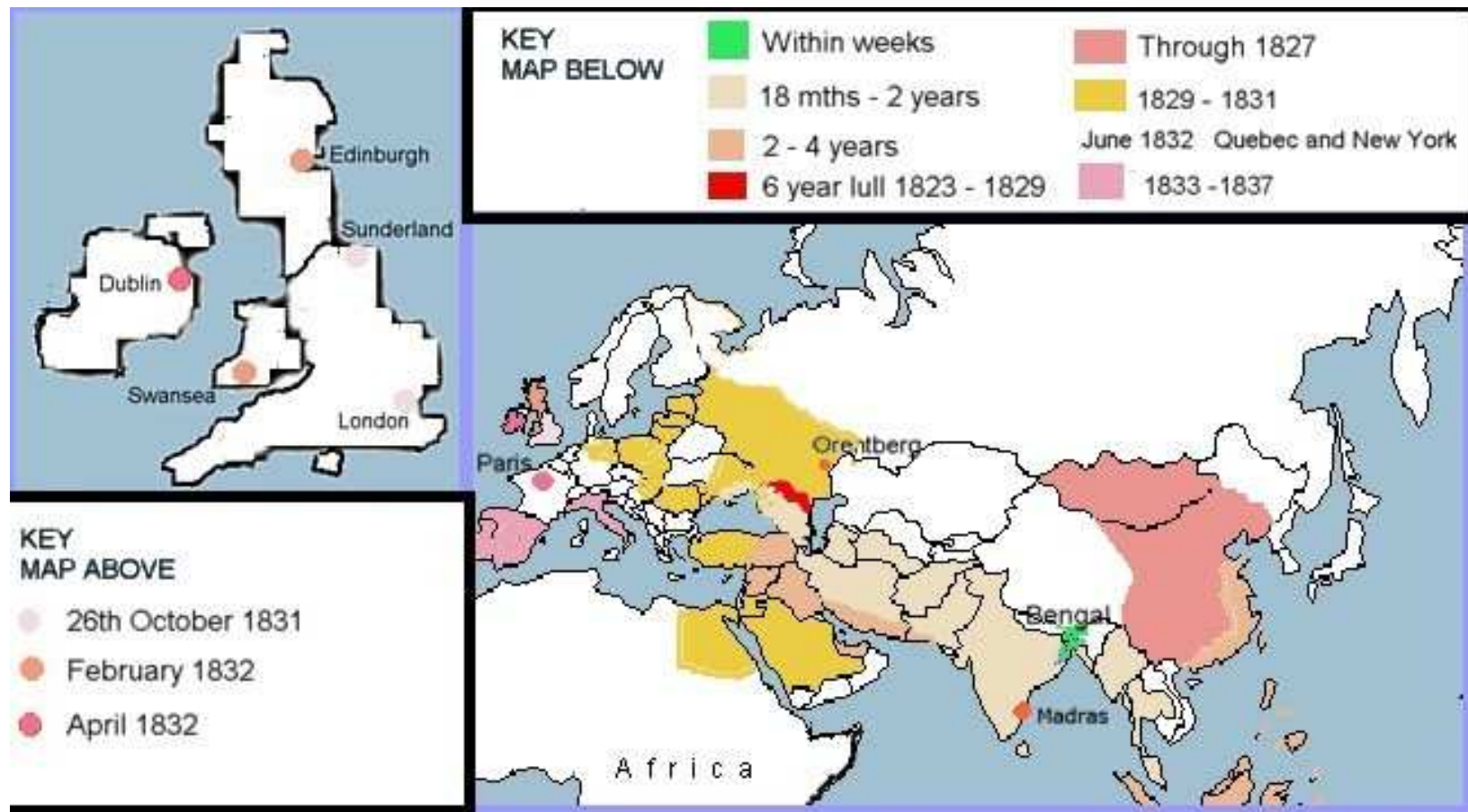
Anni 1991 - 1994
Perù e Sud-America

1992: *V. cholerae*
O 139
Golfo del Bengala

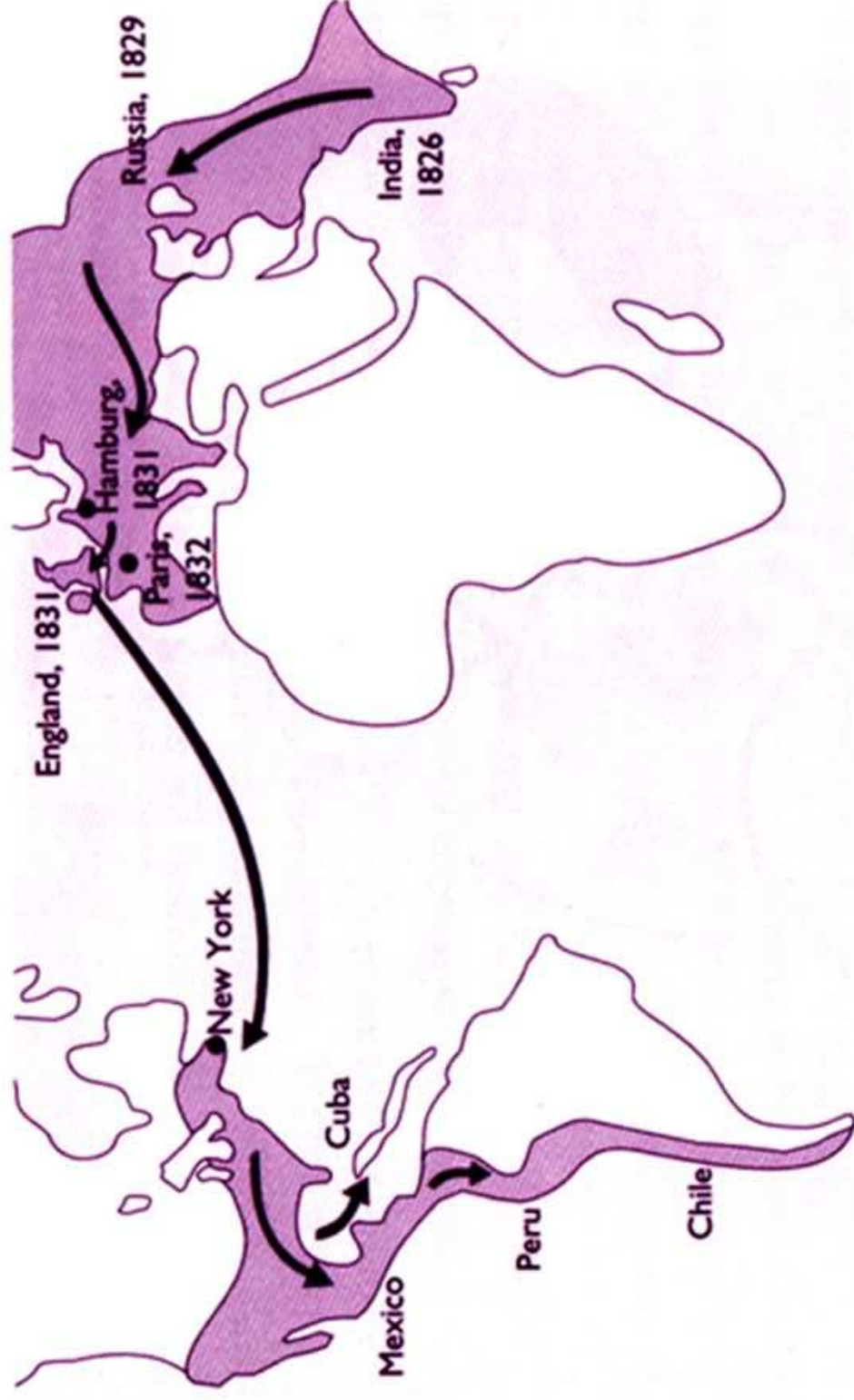
Prima Pandemia 1817 - 1823



Seconda pandemia 1829-1851

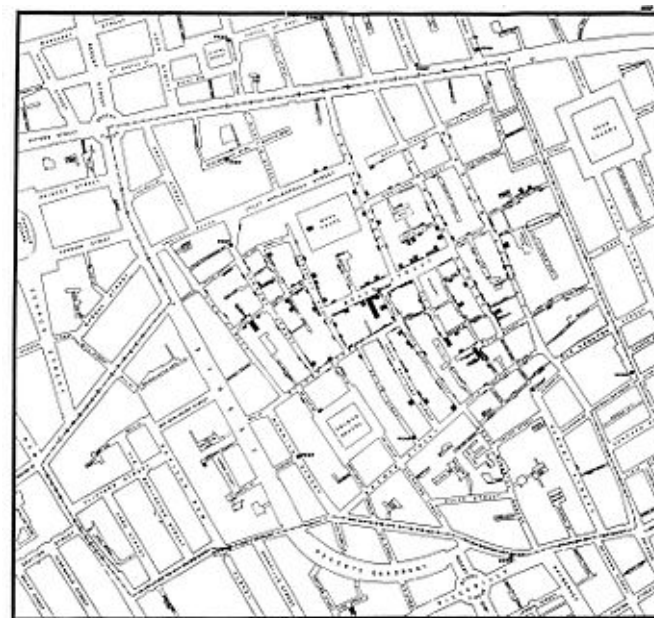


Second Cholera Pandemic



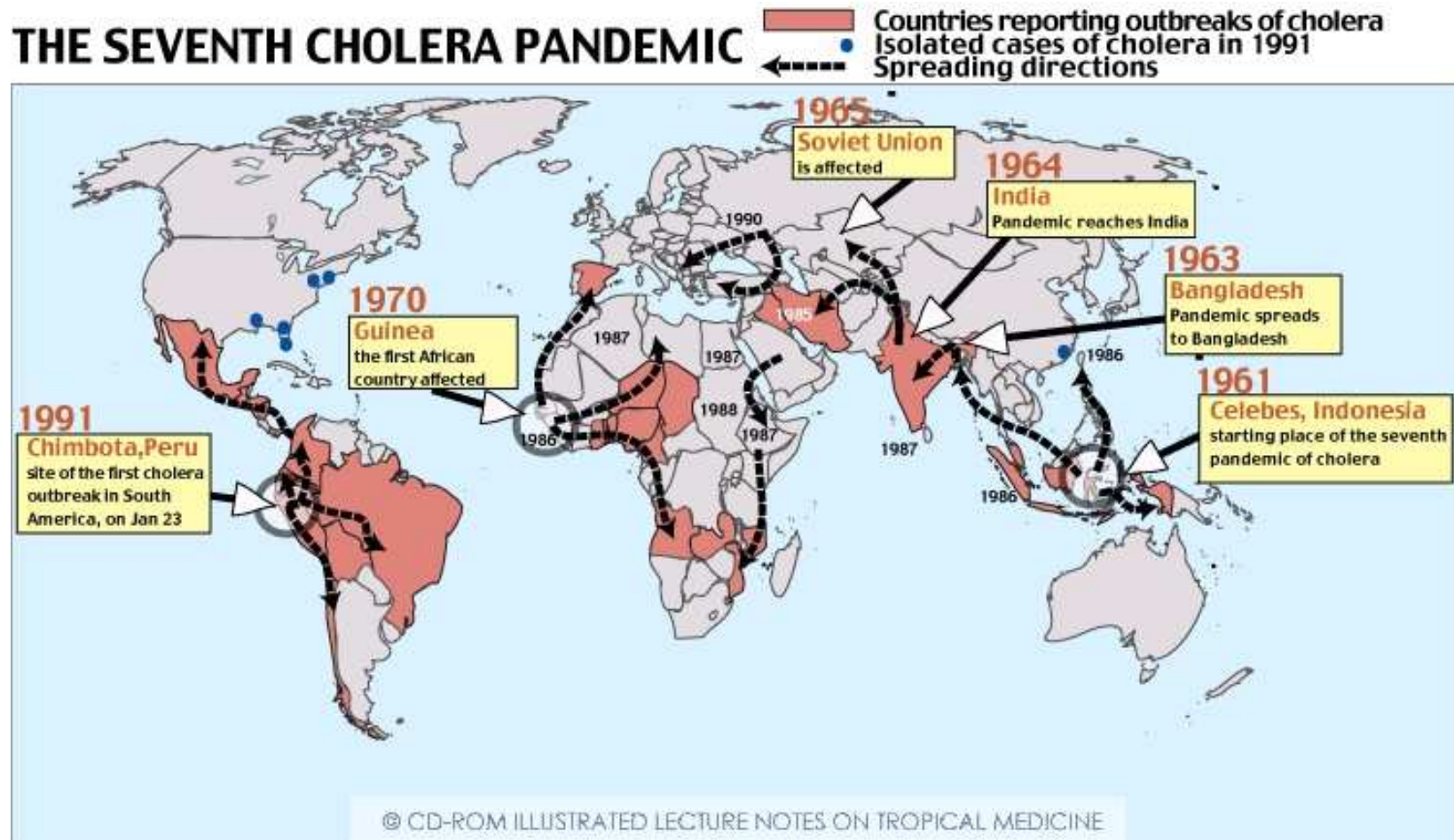
Epidemia di colera a Broad Street del 1854

- John Snow deve la sua attuale notorietà per aver studiato la diffusione dell'epidemia di colera del 1854 a Soho ipotizzando la sua diffusione a causa di una pompa di distribuzione dell'acqua.
- Durante la sua ricerca delle cause dell'epidemia, utilizzò una piantina di Londra con la diffusione dei casi nei diversi periodi. Questo metodo gli permise di notare che i casi si concentravano attorno ad una pompa dell'acqua nel distretto di Soho. Bloccando il funzionamento della pompa riuscì a fermare il diffondersi della malattia.
- Snow pubblicò i risultati delle sue ricerche in un'opera (*On the Mode of Communication of Cholera*) che venne fortemente criticata, in particolar modo da *The Lancet*, una rivista medica molto autorevole.
- La pompa venne successivamente rimessa in funzione, non considerando le tesi di Snow valide.
- Snow morì improvvisamente a 45 anni, noto a quel tempo molto più per i suoi lavori concernenti l'anestesia che non per quelli epidemiologici.
- Le ricerche successive dimostrarono che le sue ipotesi sulla trasmissione del colera erano corrette: nel 1883 Robert Koch dimostrò l'ipotesi batteriologica



La mappa originale di John Snow che mostra i gruppi dei casi di colera nell'epidemia di Londra del 1854. La pompa è ubicata all'incrocio tra Broad Street e Little Windmill Street, oggi Lexington St

Settima Pandemia 1961-present



V. cholerae O139: 8^a pandemia?

A partire dal **1992** emerge un nuovo sierogruppo *V. cholerae* O139 Bengala che causa un'ampia epidemia in Bangladesh e in India, si diffonde in tutto il Sud Est asiatico
È il primo ceppo non-O1 capace di causare epidemie di colera
Potrebbe essere l'inizio della 8^o pandemia?



Epidemiologia

Il colera nel mondo

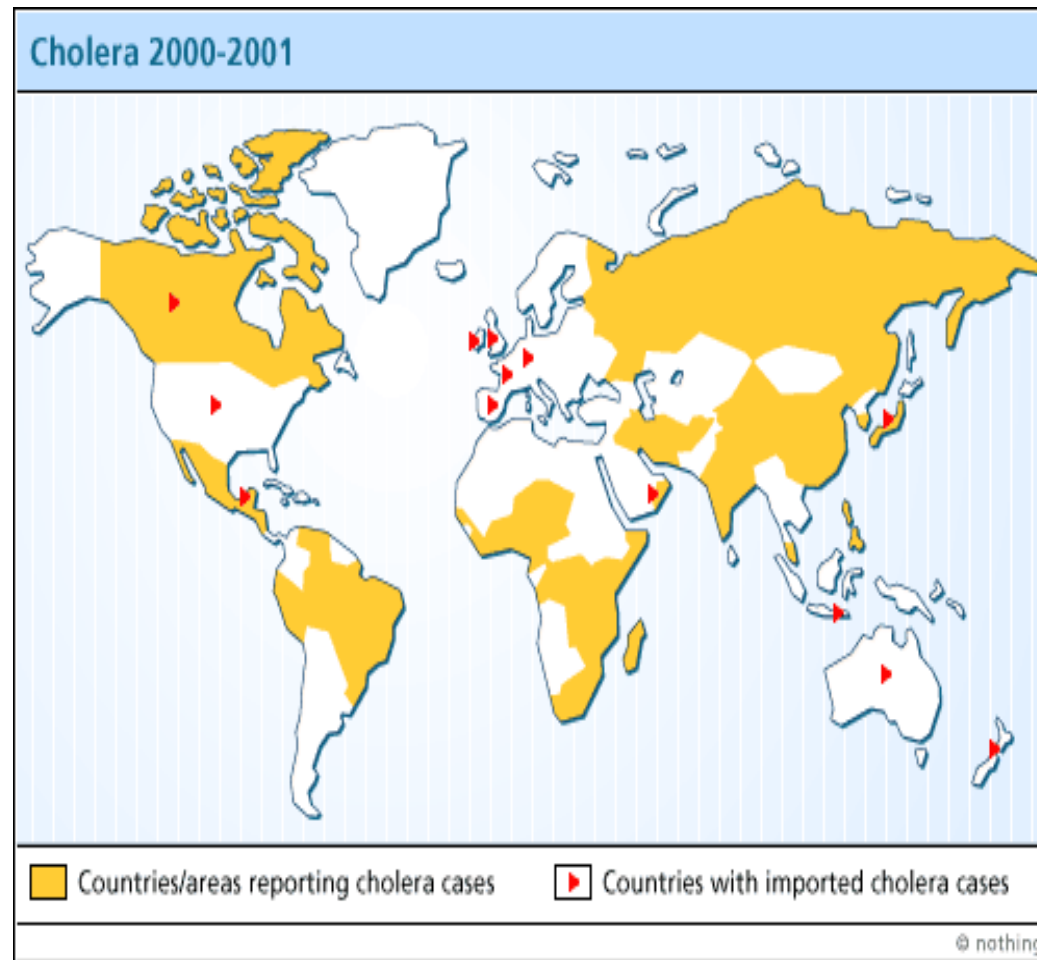
- Secondo gli ultimi dati OMS, attualmente il colera non solo non arretra, ma è ancora **diffuso in 47 nazioni** tra le più povere del pianeta.
- la malattia tende a riaffacciarsi anche in zone nelle quali si considerava debellata a seguito di carestie, guerre o fenomeni naturali come terremoti o uragani che possono costringere le popolazioni a servirsi di acqua non trattata.
- Dal 2017 si è registrato un importante focolaio in **Yemen con 600 mila casi sospetti** e oltre **2.000 morti**.
- Nei primi nove mesi del 2018, la malattia ha ucciso 800 persone in Somalia e resta una delle principali cause di morte **a Haiti** dove, in meno di 7 anni, ha contagiato **1 milione di persone e causato 100 mila vittime**.



In Europa 0,01 casi ogni 100 mila abitanti

- Secondo l'Eurostat, in Europa i casi di colera sono diminuiti dopo un picco massimo di 40 contagi avvenuto nel 1998.
- Dal 1995 al 2004 gli episodi riportati sono stati 237, per un'incidenza di 0,01 casi ogni 100 mila abitanti.
- Nel 2005 le infezioni sono state 34 in 20 diversi Paesi.
- Gli ultimi episodi noti risalirebbero al 2011, localizzati in **Ucraina**, come riporta il bollettino epidemiologico Ecdc.
- Per la precisione, tra il 31 maggio e il 9 giugno 2011, ci furono 14 contagi nella città balneare di Mariupol, nel Donetsk e uno nella vicina Volnovakha. Senza decessi.

Attualmente endemico: nel sub-continente
Indiano in molti Paesi dell'Africa sub-sahariana
e in America Latina



Cholera outbreak in Haiti 2010- 2011

- una grave epidemia di colera ha colpito Haiti nell'ottobre 2010, sono stati registrati più di 500.000 casi in tutto il paese.



Colera in Zimbabwe



2009 :
Quasi 100.000 casi
conclamati
4200 decessi



2020 Colera in Yemen

- Da quando la guerra è cominciata, nel marzo del 2015, le condizioni di vita della popolazione sono precipitate drammaticamente: **18 milioni di persone sono esposte a rischio di contagio del colera per mancanza di acqua pulita e servizi igienico-sanitari.**
- Dopo 5 anni di guerra civile non è rimasto nulla: **le città sono distrutte, la popolazione decimata, le fonti d'acqua potabile non esistono più. Solo metà delle strutture sanitarie sono funzionanti.**



- oltre 2 milioni di casi sospetti di colera
- e più di 3.700 decessi associati nel paese da ottobre 2016.

Diffusione del colera durante le «emergenze » e i disastri naturali

2010-2011 colera ad Haiti dopo il
terremoto (170.000 persone colpite,
quasi 4.000 morti)

2016 colera dopo l'uragano Matthew
(Haiti, Caraibi, Florida)





Agosto 1973: a Napoli scoppia il colera

**Ottobre 1973: l'Organizzazione Mondiale della Sanità
dichiara terminata, a tre mesi dallo scoppio,
l'emergenza colera a Napoli.**

Mario Soscia, direttore del "Cotugno": "La folla dei parenti premeva contro i cancelli per avere notizie dei propri cari in isolamento. Usavamo un megafono per fornire notizie".

file per la vaccinazione di massa



Ottobre 2018 dopo 40 anni

Il ritorno del colera mamma e figlio ricoverati a Napoli

► Erano rientrati dal Bangladesh nel Casertano
I medici del Cotugno: non c'è rischio epidemia

Ettore Mautone

Torna il colera in Italia: mamma e figlio di 2 anni, appena rientrati dal Bangladesh dove hanno contratto la malattia. I due, che risiedono nel Casertano, sono ricoverati nell'ospedale Cotugno di Napoli. I medici: nessun rischio contagio. *In Cronaca con Rosselli*

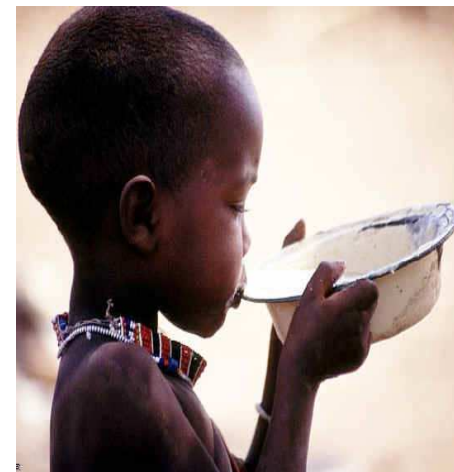
Acqua contaminata per 2 miliardi di persone

- Il report dell'Oms sottolinea più volte come il colera sia spia della forte **diseguaglianza** tra ricchi e poverissimi.
- Al mondo, oltre 844 milioni di persone non hanno accesso a un acquedotto, 2 miliardi bevono in pozzi e rigagnoli fognari contaminati da batteri fecali, molto spesso perché le bidonville in cui abitano sorgono proprio nei dintorni degli scoli delle acque reflue delle vicine città.
- Infine quasi 3 miliardi di persone non hanno accesso a strutture sanitarie di base, che potrebbero prontamente e facilmente curare i sintomi diarroici caratteristici della malattia.

Colera 2020

- 94% dei casi totali riscontrati nel Continente Africano. WHO stima che i casi notificati rappresentino in realtà il 5-10% dei casi presenti
- Il colera è strettamente associato a povertà, abitazioni affollate e stato socio-economico basso!
- Il rischio di colera in Italia è generalmente molto basso, fatta eccezione per crostacei o molluschi importati illegalmente e per i viaggiatori in aree dove si è verificata un'epidemia.
- Il rischio di contrarre la malattia per il viaggiatore internazionale è di 0.2 casi/100.000

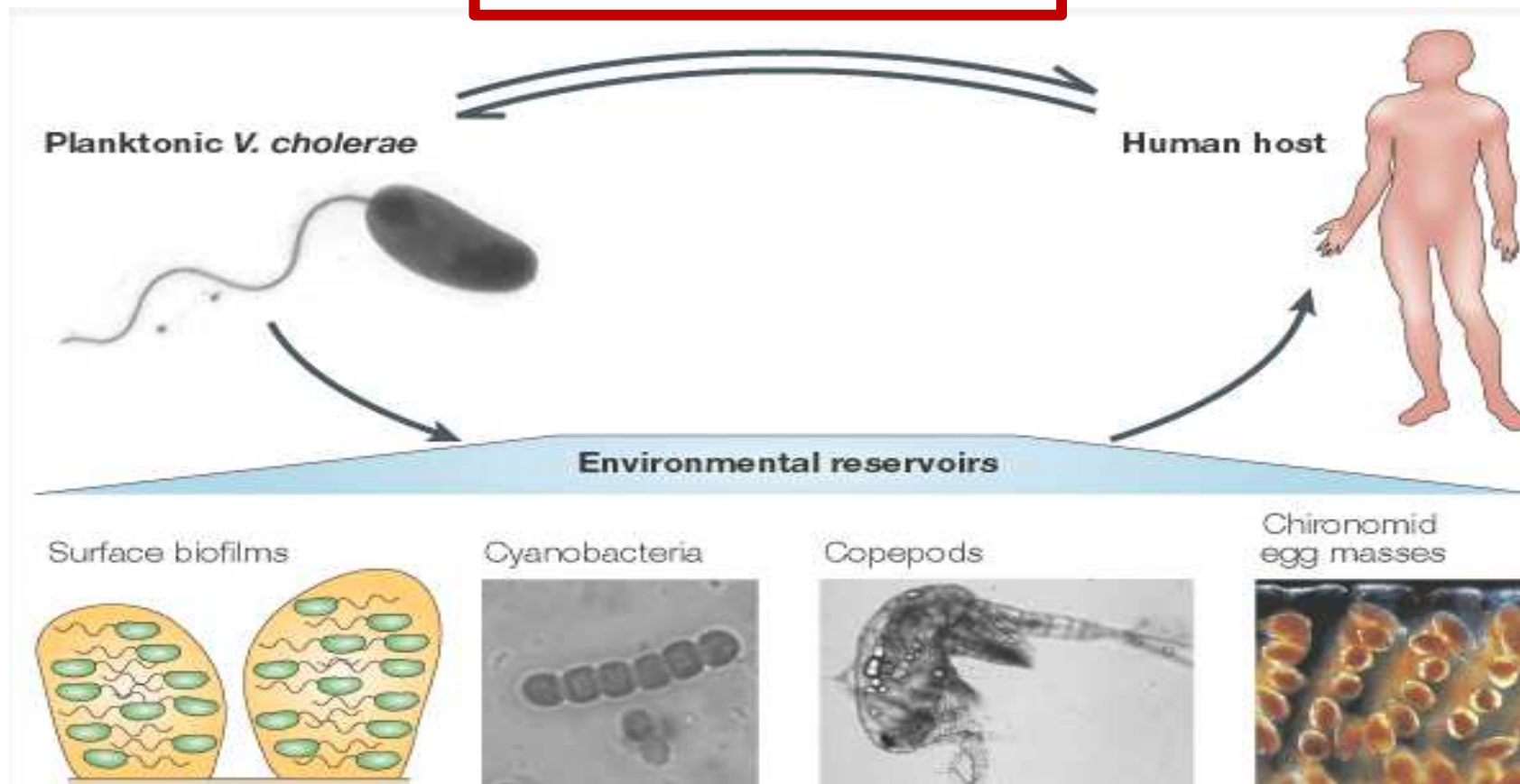
	casi	morti	%
Africa	179.323	5074	2,83
Nord-America	7	0	
Asia	10.778	69	0,64
Europa	22	0	
Oceania	0		
Total	190.130	5143	2,71



Vibrioni e biofilm

L'evoluzione di *Vibrio cholerae*: dall'ambiente all'uomo

Dove vive il vibrione?



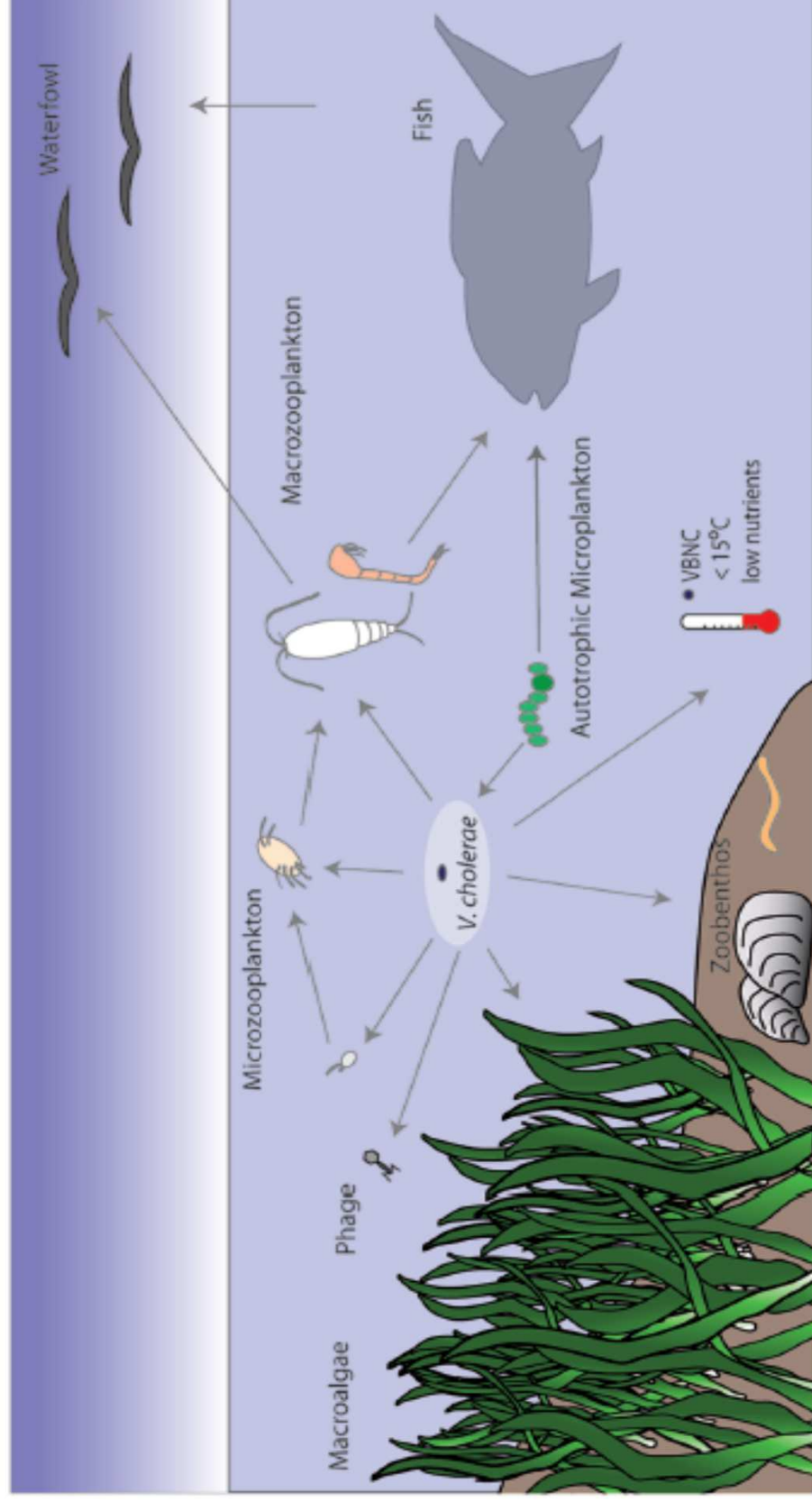
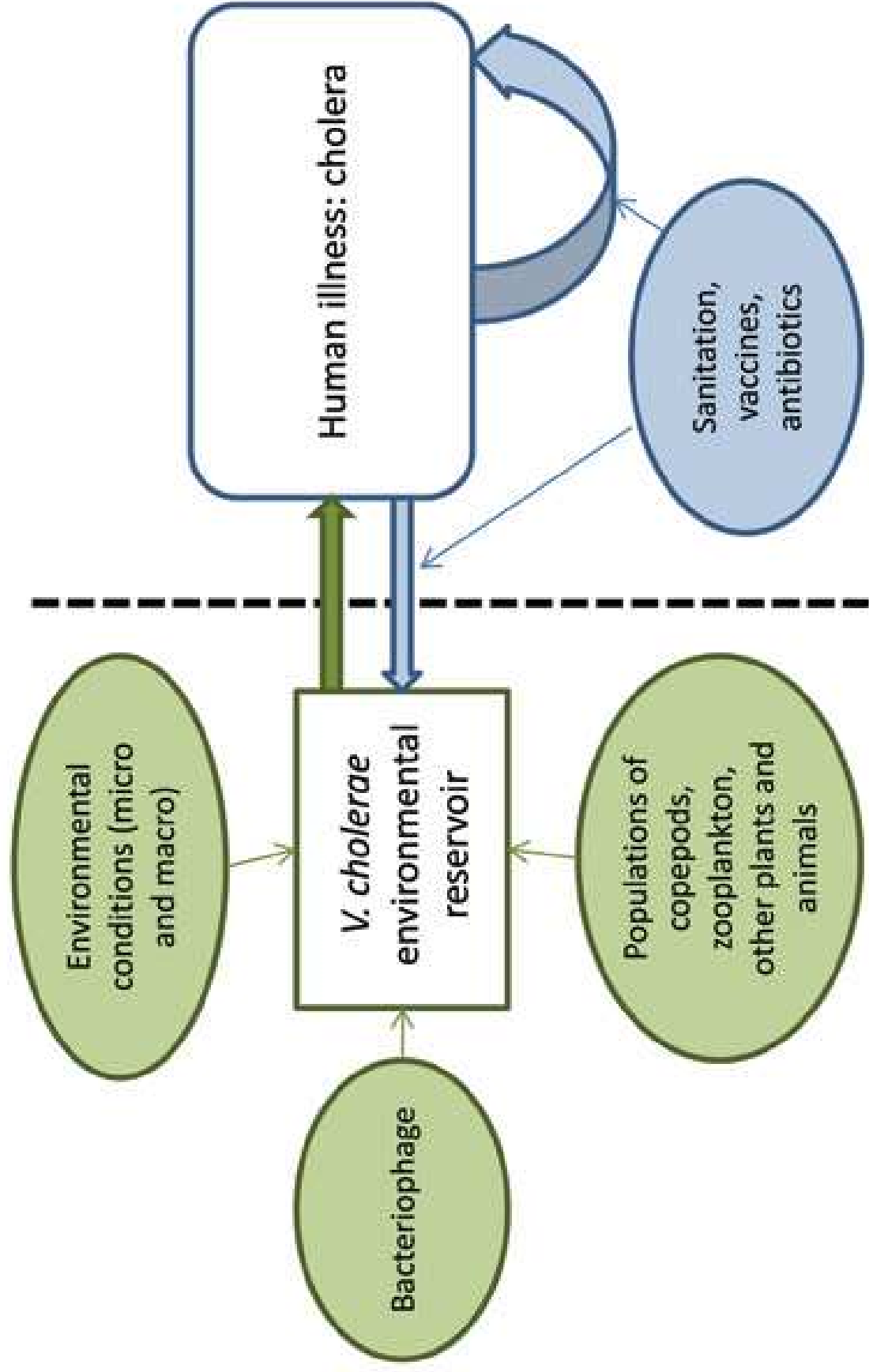


FIGURE 3 | *Vibrio cholerae* interactions with other organisms and the environment. *V. cholerae* is part of the bacterioplankton in aquatic environments. It is under predation pressure by protozoa and bacteriophage and is thus incorporated into the microbial loop. Low temperature and nutrient conditions can trigger the VBNC state, from which it resuscitates under more favorable conditions. *V. cholerae* can

also attach to autotrophic organisms such as phytoplankton or macroalgae, which can provide a carbon source. Attachment to chitinous zooplankton and gelatinous egg masses (e.g., chironomids) provide nutrients and also facilitate HGT. Fish and birds feed on plankton or mussels that might harbor *V. cholerae* and can potentially spread the bacterium across long distances.



«Cholera Paradigm»

- Il colera rappresenta un esempio di come la salute umana sia *minacciata* dai cambiamenti climatici
- Le epidemie stagionali in Bangladesh si diffondono periodicamente con El Niño
- Il vibrione vive attaccato a piccoli crostacei (**biofilm su zooplancton**), dove può sopravvivere a lungo, fino a 14 giorni.
- La popolazione dei piccoli crostacei dipende dall'abbondanza del phytoplankton
- Il fitoplancton tende ad aumentare (bloom) quando la temperatura dell'oceano è calda
- Al bloom di fitoplancton segue il bloom di zooplancton e associato l'aumento di *Vibrio cholerae*



Sari cloth can filter cholera from water, research shows

- A simple method of using readily available sari cloth to filter pond and river water successfully reduced the incidence of cholera by nearly half in a study conducted in Bangladesh.
 - In many rural areas of Bangladesh, women use surface water for their household since it may be safer than well water, which can contain arsenic.
 - The research team took its cue from a local practice to rid drinking water of insects and leaves by pouring it through sari cloth.
 - Lab tests showed that a filter made of four layers of worn cotton material held back more than 99 percent of all cholera bacteria - using more layers or newer cloth slowed water collection too much.
- 
- The image shows a woman in a vibrant, patterned sari standing in a body of water, likely a pond or river. She is bent over, pouring water from a small container through a piece of sari cloth into a larger metal pot. This illustrates the simple filtration method described in the text.
- The filter is unique and useful," said Dr. Rita University of Maryland colleague. "It doesn't require any money or sophisticated training and the women bringing water to the house enthusiastically used the filtration, once the benefit was explained to them."

Research shows that Sari cloth can filter cholera from water

- To test the filter's effectiveness, studied about 45,000 residents, all in households with children under age five, who are typically more vulnerable to cholera.
- E' stato mostrato alle donne come usare il sari per filtrare l'acqua che avrebbero usato per lavarsi i denti, per cucinare e per lavare gli utensili da cucina
- They followed up by visiting the village every two weeks to encourage compliance.
- An additional group of villages served as controls, adopting no interventions.
- In the households that were filtering water, **cholera incidence was about half the level of the control participants** and infections arising were milder, the scientists reported in Proceedings of the National Academy of Sciences.
- The study also showed the practice **benefited neighbors** who did not filter their water, by reducing the overall incidence of cholera in the community.
- In a follow-up study **five years later**, researchers discovered about one-third of participants continued to filter water as trained.
- It suggested repeated training and messages on TV and the radio could improve usage.



Colwell RR et al. *Reduction of cholera in Bangladeshi villages by simple filtration. Proceedings of the National Academy of Sciences*, February 2003

La storia di come un sari può ridurre il colera

Rita Colwell, ha ottenuto una riduzione del 50 per cento dei casi di colera in Bangladesh insegnando a filtrare l'acqua da bere attraverso un pezzo di vecchia stoffa di cotone ripiegato quattro volte può dimezzare i casi di colera.



I ricercatori hanno insegnato agli abitanti del villaggio come ripiegare la stoffa, immergerla nell'acqua e lasciarla poi asciugare completamente al sole dopo l'utilizzo.



A simple method of filtering water through sari cloth can reduce cholera incidence by nearly half.

- Un semplice filtro non potrebbe rimuovere dei bacilli di pochi micron, se questi non avessero l'attitudine di aderire a **minuscoli crostacei, i copepod**, che vengono trattenuti anche da un filtro improvvisato come nel caso della stoffa.
- Inoltre, le probabilità di contrarre la malattia dipendono fortemente dal numero di batteri ingeriti, il che aumenta l'efficacia di questa grossolana prevenzione.
- Il metodo più sicuro per purificare l'acqua resta ancora la bollitura, ma in Bangladesh la legna è un bene prezioso.
- Dopo alcuni esperimenti, i ricercatori si sono resi conto che i tessuti più vecchi funzionano meglio di quelli nuovi.



Simple Sari Cloth Filtration of Water Is Sustainable and Continues To Protect Villagers from Cholera in Matlab, Bangladesh

Anwar Huq,^a Mohammed Yunus,^b Syed Salahuddin Sohel,^b Abbas Bhuiya,^b Michael Emch,^c Stephen P. Luby,^b Estelle Russek-Cohen,^{d*} G. Balakrish Nair,^{b*} R. Bradley Sack,^e and Rita R. Colwell^{a,e,f}

Maryland Pathogen Research Institute, University of Maryland, College Park, Maryland, USA^a; International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh, Dhaka, Bangladesh^b; Department of Geography, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA^c; Department of Animal and Avian Sciences, University of Maryland, College Park, Maryland, USA^d; Johns Hopkins School of Public Health, Baltimore, Maryland, USA^e; and Center for Bioinformatics and Computational Biology, University of Maryland, College Park, Maryland, USA^f

* Present address: Estelle Russek-Cohen, Diagnostics Branch, Division of Biostatistics, Office of Surveillance and Biometrics, U.S. Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, USA; G. Balakrish Nair, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, P-33, Clt Scheme XM, Bellaghata, Kolkata, India.

ABSTRACT A simple method for filtering water to reduce the incidence of cholera was tested in a field trial in Matlab, Bangladesh, and proved effective. A follow-up study was conducted 5 years later to determine whether the filtration method continued to be employed by villagers and its impact on the incidence of cholera. A total of 7,233 village women collecting water daily for their households in Bangladesh were selected from the same study population of the original field trial for interviewing. Analysis of the data showed that 31% of the women used a filter of which 60% used sari filters for household water. Results showed that sari filtration not only was accepted and sustained by the villagers and benefited them, including their neighbors not filtering water, in reducing the incidence of cholera, the latter being an unexpected benefit.

IMPORTANCE A simple method for filtering pond and river water to reduce the incidence of cholera, field tested in Matlab, Bangladesh, proved effective in reducing the incidence of cholera by 48%. A follow-up study conducted 5 years later showed that 31% of the village women continued to filter water for their households, with both an expected and an unexpected benefit that filtration had both a direct and indirect effect in reducing cholera (chi-square statistic of 1,591.94; $P = <0.0001$). Results of the study showed that the practice of filtration not only was accepted and sustained by the villagers but also benefited those who filtered their water as well as neighbors not filtering water for household use in reducing the incidence of cholera.

mBio 2010, volume 1 issue 1 e00034-10

Vibrioni e biofilm

- *V. cholerae* forma **biofilm** durante tutte le fasi del suo ciclo di vitale in mare e nell'intestino.
- Ceppi di *V. cholerae* tossigeni e non tossigeni vivono in mare per tutto l'arco dell'anno, sia in stato planctonico sia in stato aggregato in biofilm.
- Questa modalità di crescita protegge da una serie di sollecitazioni ambientali, tra cui la limitazione dei nutrienti, la predazione da parte di eucarioti unicellulari (protozoi) e l'attacco da virus batterici (batteriofagi).
- Anche se *V. cholerae* può formare biofilm su molte superfici biotiche e abiotiche, diversi studi sul campo hanno dimostrato che *V. cholerae* preferibilmente forma biofilm sul **fitoplancton**, sul **zooplancton** e sulla **chitina oceanica**.
- Gli esoscheletri del zooplancton contengono chitina, che *V. cholerae* può utilizzare come sua sola fonte di carbonio.
- La crescita sulla chitina induce anche la competenza naturale e consente alle cellule di acquisire nuovi materiali genetici.
- Come vettori fisici e fonti primarie di sostanze nutritive per il *V. cholerae*, lo zooplancton serve come serbatoi e vettori di colera.

Vibrioni e biofilm e ambiente

- Sebbene il *V. cholerae* sia trovato per tutto l'anno negli ambienti costieri ed estuari dove il colera è endemico, le epidemie sono stagionali e si correlano con i cambiamenti ambientali
- I **bloom fito e bioplanctoni**, influenzati dalla temperatura dell'acqua, dalle ore di sole, dalla profondità del mare, dalla pioggia e dalla salinità, sono considerati il principale fattore ambientale che contribuisce ai focolai stagionali.
- Le pratiche di filtraggio semplici che eliminano le particelle superiori a 20 μm sono state dimostrate efficaci in modo significativo per ridurre i casi di colera, il che suggerisce che la rimozione di *V.cholerae* associato a biofilm o a bioplancton dall'ambiente, riduce la trasmissione

Vibrio cholerae VBNC

- Tra un'epidemia e l'altra, si sono osservate, le cellule di *V. cholerae* «metabolicamente quiescenti» sia nello stato planctonico sia nei biofilm.
- All'interno di questi biofilm i batteri letteralmente “cambiano abitudini di vita”.
- La loro crescita tende a rallentare e i batteri passano alla fase di vita VBNC (Viable But Not Culturable cell) ossia di crescita stazionaria, di cellula viva, ma non vitale. Chiusi in questo stadio di vita, i batteri diventano molto più resistenti agli stress ambientali avversi quali il pH, la carenza di acqua libera, la presenza di soluti.
- Queste cellule sembrano contribuire alla persistenza di *V. cholerae*.
- Le cellule quiescenti possono perdere la loro forma tipica curva, diventando coccoide e non possono essere coltivate in condizioni di laboratorio standard.

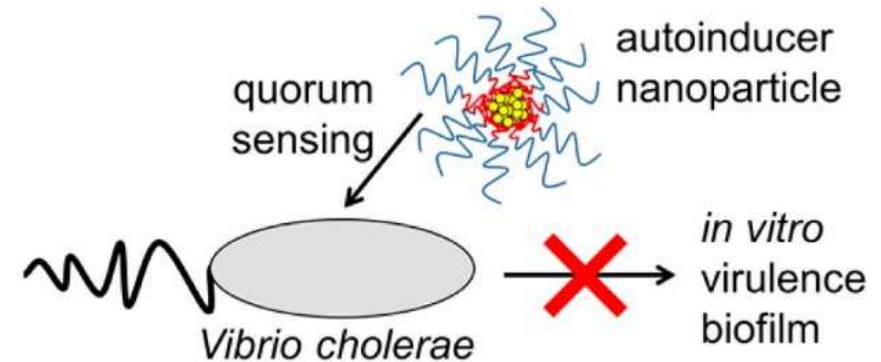
Vibrio cholerae **VBNC**

- Possono tornare in uno stato attivo in risposta ai segnali prodotti dalle cellule attive presenti nell'ambiente o con il passaggio attraverso un ospite, anche se il meccanismo dell'attivazione host-mediata è ancora sconosciuta.
- I biofilm contenenti *V.cholerae* in stato VBNC possono avere rilevanza biologica importante, in quanto le loro ridotte esigenze metaboliche e la crescita rallentata possono consentire loro di sopravvivere a condizioni ambientali difficili fino a quando le circostanze non migliorano, con riattivazione delle cellule e malattia!

V. cholerae & biofilm & cellule iperinfettanti

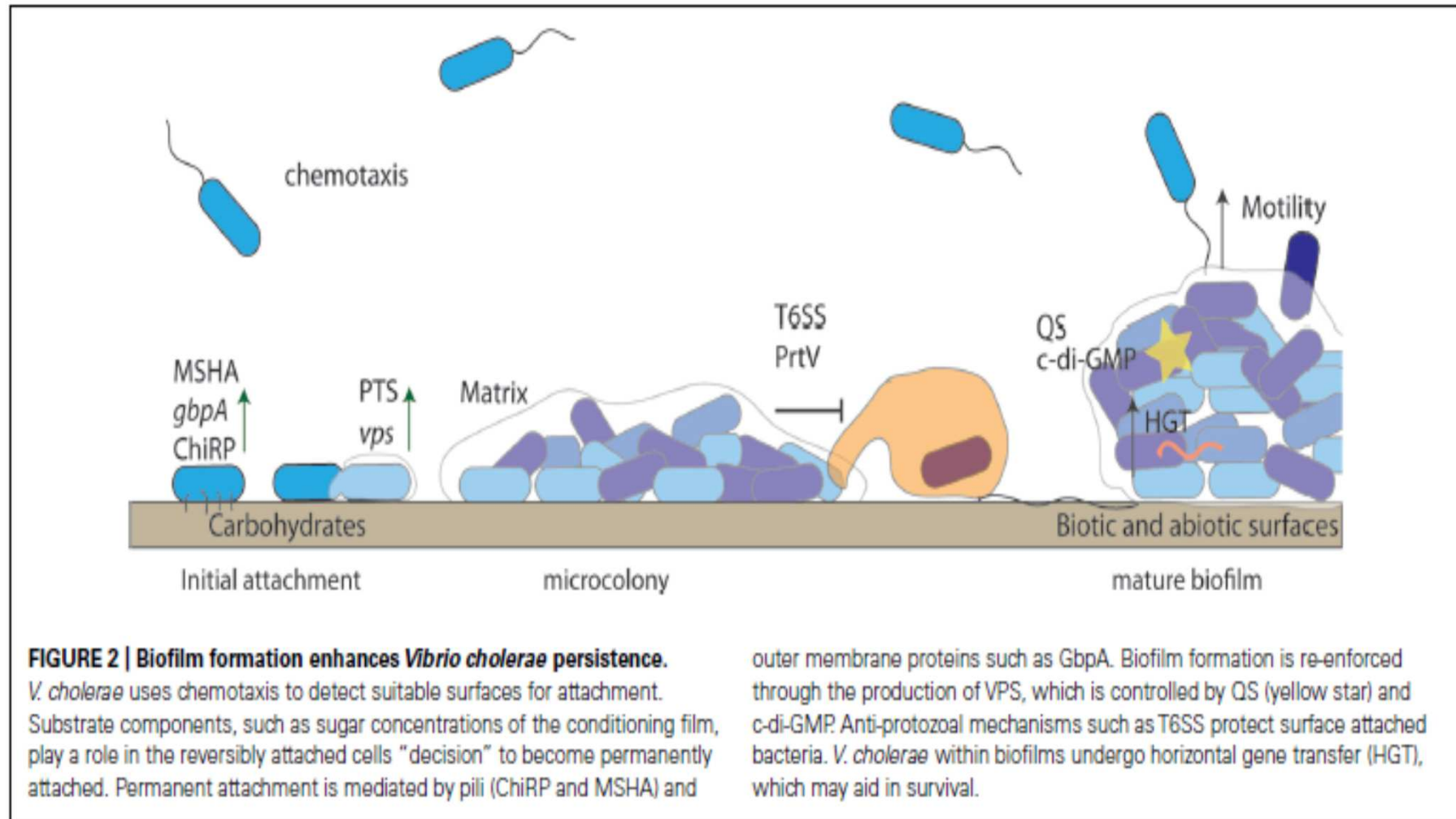
- I biofilm di *Vibrio cholerae* contengono concentrazioni più elevate di batteri «iperinfettanti» e quindi hanno un ruolo chiave nella trasmissione.
- La matrice extracellulare auto-prodotta o acquisita che racchiude le cellule del biofilm aumenta la resistenza batterica alle difese dell'ospite.
- Lo stato iperinfettante si riferisce ad una diminuzione del numero di cellule necessarie per causare la malattia.
- In altre parole, la dose infettiva richiesta per l'infezione è minore e il rischio di trasmissione di malattia è aumentato.
- Tuttavia, il ruolo della formazione di biofilm *V. cholerae* all'interno dell'ospite è poco compreso.
- I biofilm possono formarsi in vivo e successivamente essere eliminati con le feci.

Quorum sensing e *Vibrio cholerae*



- Nell'ambiente acquatico *V. cholerae* si trova nella sua forma planctonica altamente mobile e nella forma biofilm su zooplancton, fitoplancton, detriti e altre superfici, come i sedimenti.
- Dopo le fasi iniziali di adesione alle superfici abiotiche e biotiche, che coinvolgono i pili MSHA *type IV pili mannose-sensitive haemagglutinin*, le cellule iniziano a produrre la matrice extracellulare, che è essenziale per ottenere biofilm maturi con una struttura tridimensionale.
- Le epidemie stagionali da *V. cholerae* originano da fonti ambientali.
- Durante la colonizzazione intestinale, *V. cholerae* produce tossina co-regolata da pili (TCP).
- Sia le cellule in forma planctoniche che aggregate in biofilm si trovano nelle feci del paziente e queste possono reinfectare un nuovo ospite o tornare nell'ambiente acquatico.

La formazione di biofilm aumenta la persistenza di *Vibrio cholerae*

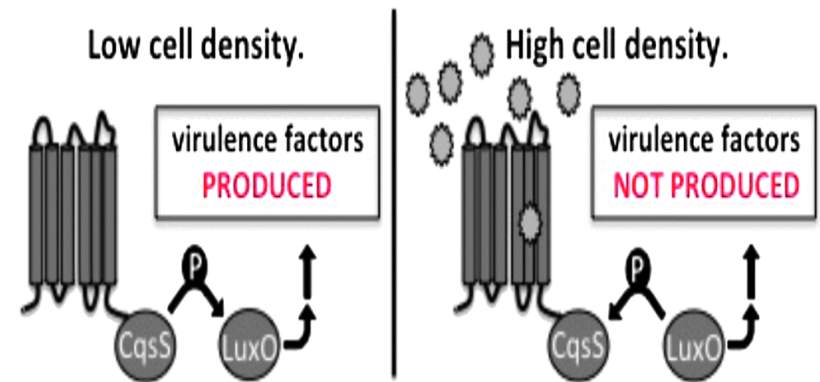


V. cholerae & biofilm & cellule iperinfettanti

- La matrice extracellulare auto-prodotta o acquisita che racchiude le cellule del biofilm aumenta la resistenza batterica alle difese dell'ospite.
- Sebbene il ruolo dei biofilm nella resistenza dell'ospite non sia stato ben chiarito, diversi studi suggeriscono che una componente chiave del biofilm di *V. cholerae* sia rappresentata dalla **vibrio-polisaccaride** (VPS) la principale componente dell'EPS di biofilm di *Vibrio Cholerae* prodotta durante l'infezione dell'ospite.
- La delezione di geni coinvolti nella produzione di VPS e della proteina della matrice extracellulare RbmA ha portato ad un difetto di colonizzazione intestinale nel modello murino sperimentale.
- Complessivamente, questi risultati indicano che i i biofilm giocano un ruolo chiave durante l'infezione da *V. cholerae*, ma ulteriori studi sono necessari per chiarire i meccanismi e le funzioni in vivo.
- Attualmente, gran parte di quanto conosciamo sulla struttura, funzione e regolazione del biofilm di *V. cholerae* si basa su risultati in vitro.

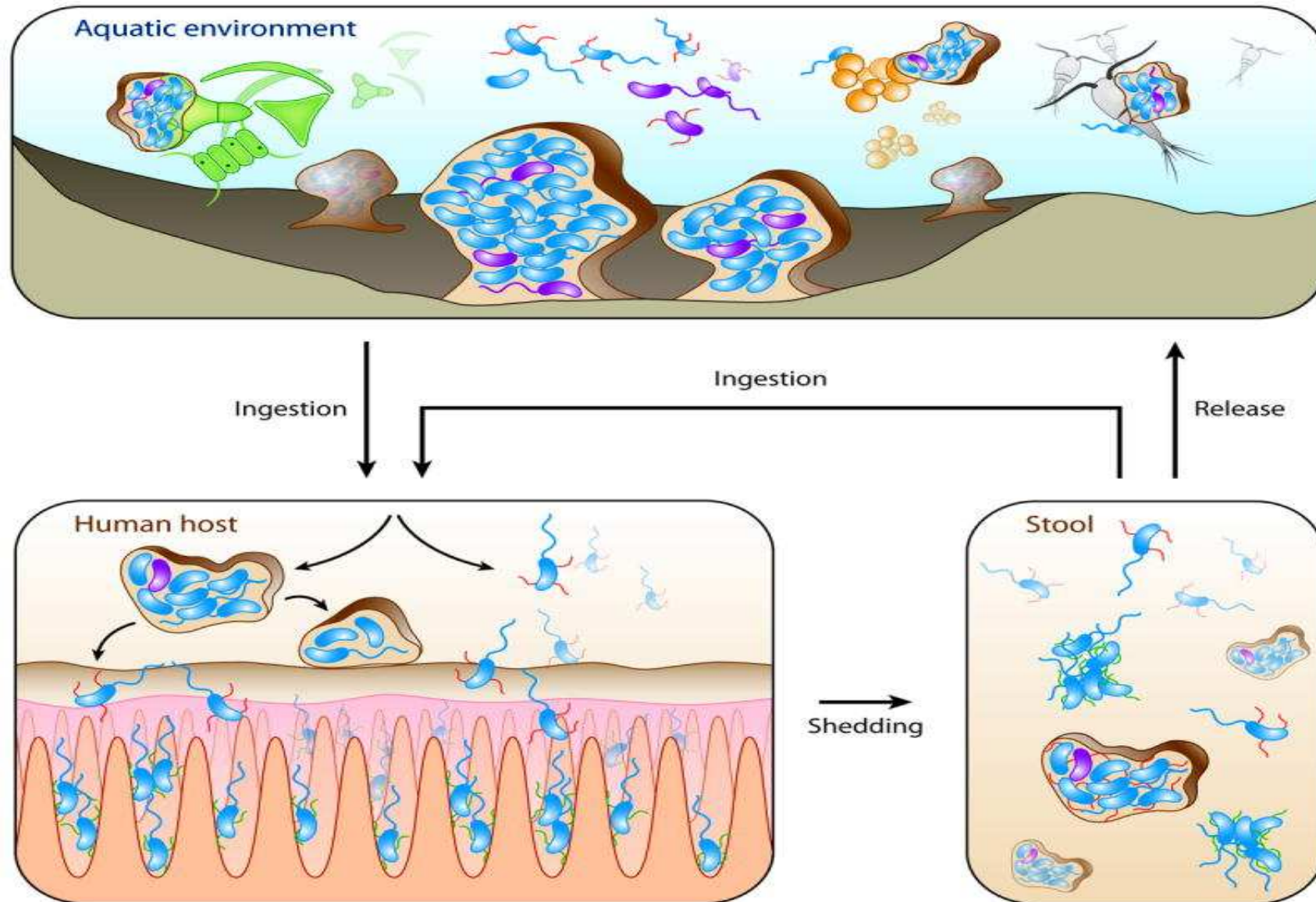
Quorum sensing e *Vibrio cholerae*

- In *Vibrio cholerae* la relazione tra *quorum sensing* e architettura del biofilm è stata meglio compresa.
- Il principale polisaccaride extracellulare espresso nei biofilm formati da questi batteri viene denominato **VPS** (essendo i geni *vps* responsabile della sua produzione).
- La produzione di VPS è regolata negativamente da HapR; i mutanti HapR producono colonie rugose e formano biofilm spessi con ristretti canali di acqua.

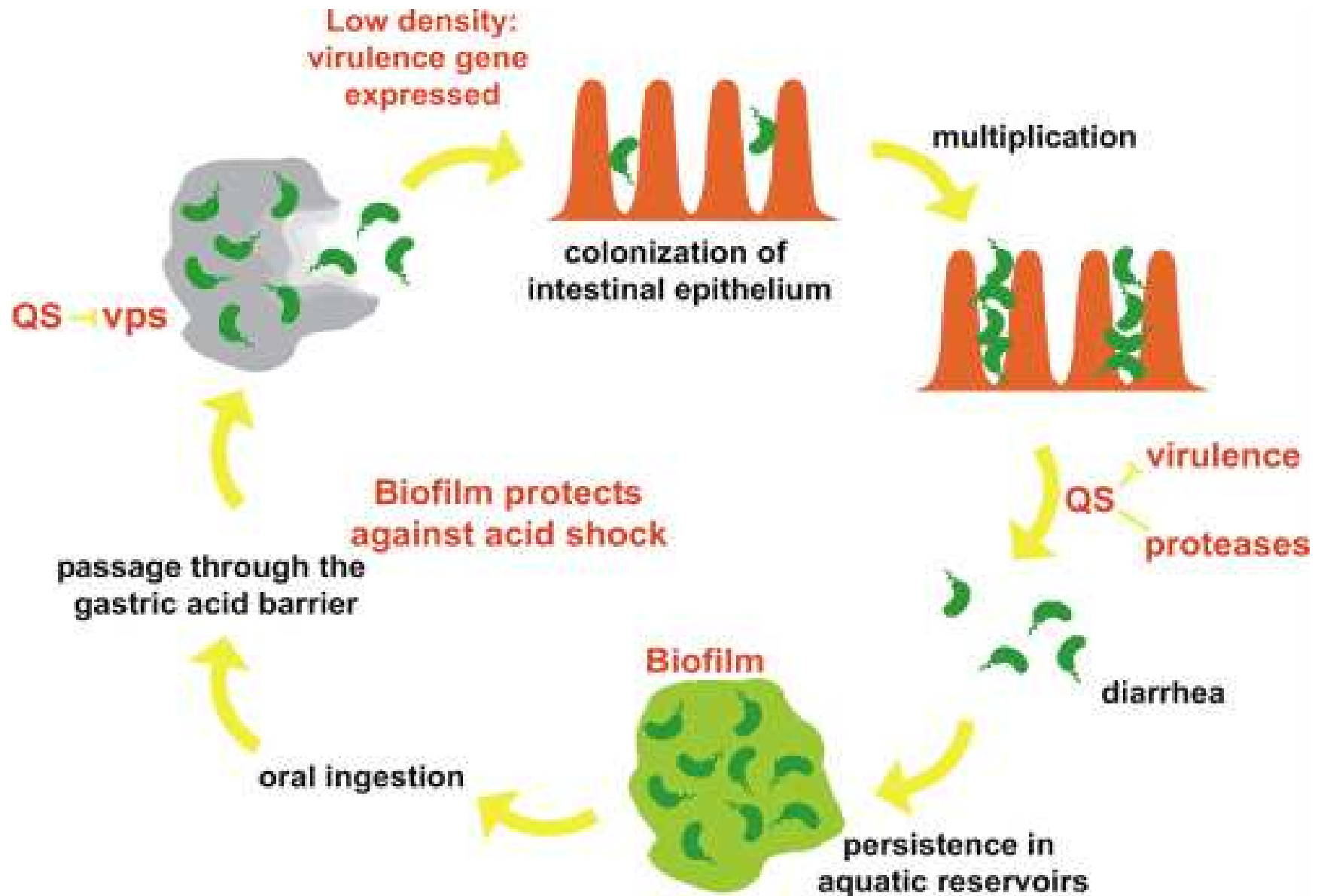


- Il gene HapR codifica un fattore di trascrizione conosciuto, perché inibisce l'espressione di AphA (un regolatore negativo della virulenza) e promuove l'espressione di HapA (il gene strutturale per Hap, una metalloproteina).
- Inoltre, la stessa espressione di HapR è indirettamente repressa da LuxO, un regolatore che risulta più attivo in condizioni di bassa densità cellulare.
- L'attività di LuxO è controllata da altri due segnali di quorum sensing minori, ma solo il lattone CAI-1 acilomoserina gioca un ruolo significativo nella formazione del biofilm.
- Queste osservazioni suggeriscono che, in condizioni di bassa densità cellulare, i livelli di CAI-1 sono abbastanza bassi da permettere al mediatore LuxO la repressione di HapR, con conseguente produzione di VPS.
- Quindi, questo particolare batterio sembra iniziare la produzione della matrice extracellulare in condizioni di bassa densità cellulare, presumibilmente prima della formazione di una comunità multicellulare.

Biofilms in *V. cholerae* life cycle



Biofilm e colera



Diagnosi

- Concentrazione vibrione nelle feci: $10^7 - 10^9/\text{ml}$
- Isolamento su **terreni selettivi**:
- Acqua peptonata pH 9 → terreni solidi (TCBS) → prove biochimiche, agglutinazione con antisieri specifici
- *NB: emocolture sempre negative !*



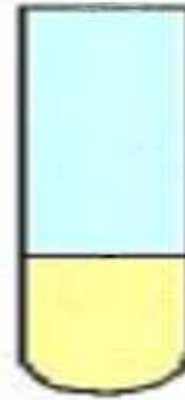
Diagnosi

Brodo di arricchimento:

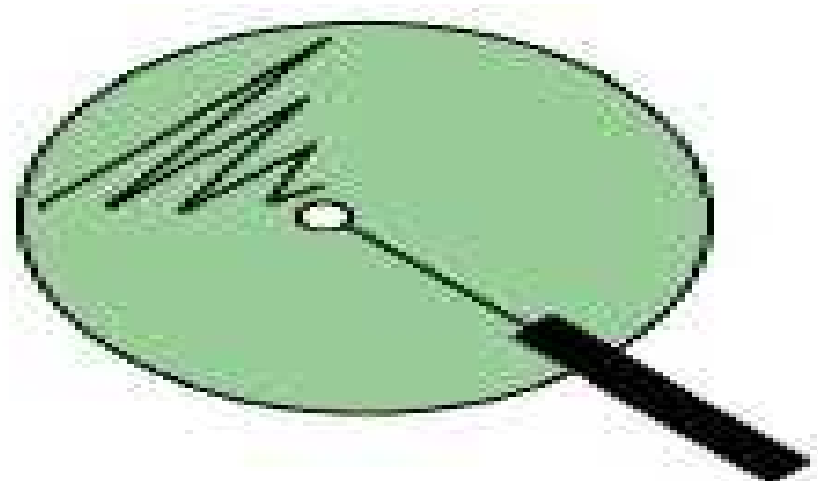
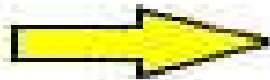
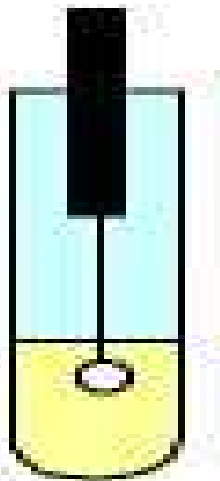
acqua peptonata alcalina (pH 8-9)

inibizione crescita enterobatteri

incubazione 8-12 ore



Prelevare dalla superficie e seminare su **Agar TCBS** (Tiosolfato Citrato Bile e Saccarosio)



Diagnosi

TCBS = terreno selettivo

Alcalino = azione batteriostatica su altri batteri (enterobatteri)

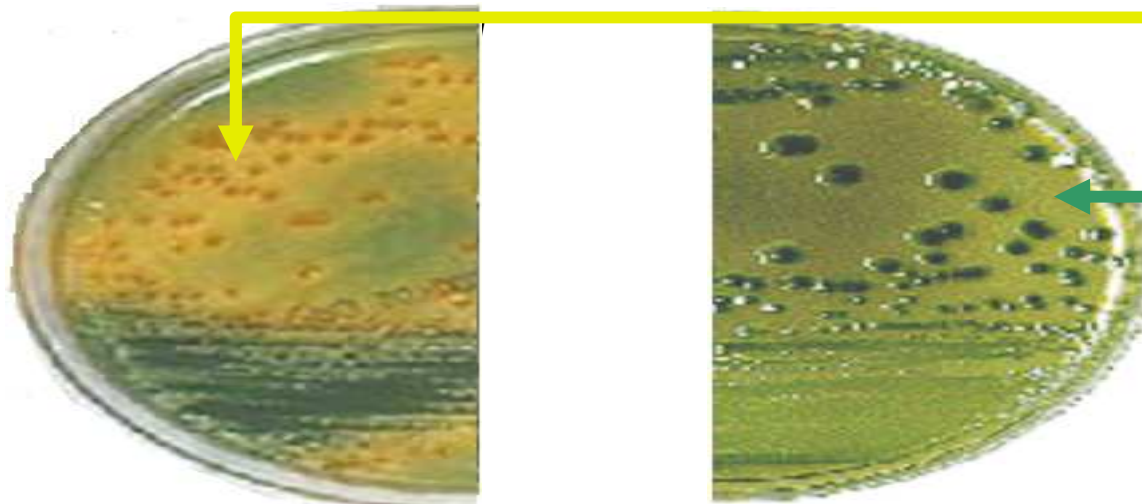
Bile = inibisce crescita enterococchi

Saccarosio = fermentato da *V. cholerae* (giallo)

non fermentato da altri *Vibrio* spp

Confermare con test dell'ossidasi (+)

Sieroagglutinazione con anti-O1



Terapia

- Exitus → disidratazione, acidosi, ipokaliemia, shock, insuff. renale
- Terapia reidratante:
 - Riduzione letalità da 60% a 0.5%
 - Soluzione sostitutiva equivalente a liquidi persi feci = K^+ 19, HCO_3^- 47, Na^+ 126, Cl^- 95 mEq/l
 - “Dacca solution” – “ 5.4.1” – per os o ev
 - $NaCl = 5g$, $NaHCO_3 = 4g$, $KCl = 1g$, in H_2O 1000 ml ($\pm$ amidi-riso in polvere, se per os)
- Terapia antibiotica



Terapia antibiotica

- Serve a ridurre ed eliminare quanto prima i vibrioni → diminuzione tossina prodotta → diminuzione diarrea
- Tetracicline 2 g in dose unica
- Fluorochinoloni (Ciprofloxacina 1 g dose unica)
- Eritromicina (nei bambini)
- CAF - Cotrimoxazolo



Vaccinazione

- La vaccinazione fornisce una **immunità limitata** e di **breve durata** tuttavia rappresenta un ulteriore strumento nella prevenzione del colera.
- Sono disponibili due vaccini orali:
- **Vaccino con cellule batteriche uccise**
 - contiene una miscela di 10^{11} cellule di *V cholerae* O1 El Tor e Classica uccise al calore e 1 mg di subunità B ricombinante della tossina colerica
 - Stimola una risposta immunitaria sia contro il batterio che contro la tossina
- **Svantaggi:**
- fornisce una protezione del 85% negli adulti e 50% nei bambini di 2-5 anni per i **primi 6 mesi** (in media 50% di protezione per **3 anni** solo negli adulti)
- necessaria la somministrazione di almeno 2 dosi

Vaccinazione

- **Vaccino con cellule batteriche vive attenuate**
- ottenuto dalla manipolazione genetica del ceppo di *V. cholerae* CVD 103-HgR
- **Vantaggi:**
 - Singola dose
 - Stimola una risposta immunitaria già dopo una settimana dalla somministrazione
 - conferisce protezione > 80% nei confronti di *V. cholerae* O1 sia biotipo classico che El Tor
- **Svantaggi :**
 - la protezione declina rapidamente dopo 6 mesi, soprattutto nei bambini
 - può indurre lievi sintomi della malattia (dolori addominali, diarrea)

Vaccinazione

- Il vaccino orale è composto da quattro diversi ceppi inattivati di vibroni colerici 01 e dalla subunità B non tossica ricombinante della tossina colerica .
- Per la maggior parte dei viaggiatori internazionali il rischio di contrarre il colera è basso, se si adottano corrette norme igieniche. Pertanto la vaccinazione è raccomandata solo per viaggiatori particolarmente a rischio, ad esempio lavoratori, operatori sanitari e volontari che si recano in zone colpite da disastri naturali o guerre in aree endemiche o in zone di epidemia.
- La vaccinazione anticolerica può conferire una protezione crociata solo nei confronti di alcune forme di diarrea del viaggiatore, cioè quelle sostenute da Escherichia coli enterotossigeno. Questo si spiega in quanto la tossina di Escherichia coli enterotossigena è strutturalmente, funzionalmente e immunologicamente simile alla tossina colerica: per questo motivo il vaccino anticolerico, indicato per la prevenzione dell'infezione colerica, può conferire protezione nei confronti di queste forme di diarrea del viaggiatore.

La vaccinazione fornisce una **immunità limitata** e di **breve durata** tuttavia rappresenta un ulteriore strumento nella prevenzione del colera.

Vaccinazione

- Ciclo vaccinale
 - Per gli adulti e i bambini di età pari o superiore a 6 anni, sono previste due dosi; per i bambini di età compresa tra 2 e 6 anni, sono necessarie tre dosi.
 - La confezione di Dukoral contiene due bustine di bicarbonato di sodio e due flaconcini contenenti il vaccino: ogni dose di vaccino anticolerico va preparata versando il contenuto di un flaconcino in una soluzione di acqua (circa 150 ml) e bicarbonato di sodio (1 bustina).
 - Se la persona da vaccinare è un bambino di età compresa tra i 2 e 6 anni, si elimina metà della soluzione di acqua e bicarbonato di sodio e in quella che rimane (circa 75 ml) si versa l'intero contenuto di un flaconcino di vaccino.
 - La soluzione deve essere bevuta entro 2 ore dalla sua preparazione e lontano dai pasti o dall'assunzione di medicinali (intervallo di almeno 1 ora prima e dopo).
 - Le dosi di vaccino (due o tre a seconda dell'età) vanno assunte ad una settimana di intervallo l'una dall'altra; se trascorrono più di sei settimane tra le due dosi, è indispensabile ripristinare l'intervallo corretto tra le due assunzioni. La vaccinazione deve essere completata almeno 1 settimana prima di arrivare in zona endemica.

Vaccinazione

- **Risposta anticorpale**
- Il vaccino induce la produzione di anticorpi secretori IgA antitossina, a livello intestinale, nel 70-100% delle persone correttamente vaccinate; nel siero si osservano anticorpi vibriocidi nel 35-55% e anticorpi antitossina nel 78-87% dei vaccinati.
- **Tempo di comparsa dell'immunità**
- Dopo almeno 1 settimana dal completamento del ciclo vaccinale di base.
- **Durata dell'immunità**
- 2 anni per adulti e bambini a partire dai 6 anni di età che hanno assunto le due dosi del ciclo vaccinale di base; 6 mesi per i bambini tra i 2 e i 6 anni che hanno assunto tre dosi. Nel caso in cui l'ultima somministrazione di vaccino anticolerico risalga a meno di 2 anni prima (per adulti e bambini a partire dai 6 anni di età) o a meno di 6 mesi prima (per i bambini tra i 2 e i 6 anni), sarà necessario somministrare una singola dose di richiamo. Nel caso il tempo trascorso sia superiore a quelli sopraindicati, sarà necessario ripetere il ciclo di base.



Profilassi specifica

- È una delle 5 malattie infettive sottoposte a controllo internazionale
- Denuncia; isolamento malati e sospetti; contumacia contatti per 5 gg
- Feci trattate con cloruro di calce
- Convalescenti dimessi dopo 3 coprocolture negative (a 3 gg da sosp. antibiotici e a distanza di 24h)

Profilassi aspecifica

Accurata eliminazione delle feci umane

Purificazione delle acque

Bere acqua bollita o confezionata in bottiglie sigillate, eliminare verdure crude o cibi facilmente contaminati, igiene personale (lavaggio mani)

Inattuabili nei Paesi poveri.

PRIMEVIEW VIBRIO spp. INFECTIONS

nature **DISEASE**
REVIEWS **PRIMERS**

For the Primer, visit doi:10.1038/s41572-018-0001-4



Bacteria of the *Vibrio* genus are widespread in the environment in warm, low-salinity water and fresh water. Several *Vibrio* spp. are human pathogens; *Vibrio cholerae* is the aetiological agent of cholera, a severe diarrhoeal disease, whereas non-cholera *Vibrio* spp., such as *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* cause vibriosis.

PATHOPHYSIOLOGY

In the small intestine, *V. cholerae* produces virulence factors, including cholera toxin, which prompts an intense secretory response of water and electrolytes from enterocytes that results in diarrhoea. Of note, *V. cholerae* is the only species that can spread via person-to-person transmission through the faecal-oral route. By contrast, the mechanisms of gastroenteritis caused by vibriosis are not completely understood. Individuals with liver disease are more susceptible to *V. vulnificus* infection.

LOSS OF FLUIDS



QUALITY OF LIFE

In areas with poor sanitation and without easy access to clean drinking water, cholera is still an important cause of morbidity and mortality. The expulsion of healthy gut commensal microbiota with diarrhoea and antibiotic therapy could promote colonization by drug-resistant pathogens. Although vibriosis does not usually have long-term consequences, *V. vulnificus* wound infections can often result in life-altering clinical interventions, such as limb or finger amputation.



EPIDEMIOLOGY

V. vulnificus has the highest case fatality rate (~50%) of any foodborne pathogen, and ~25% of wound infections are fatal.



Global climate change and rising sea surface temperatures favour the geographical spread and proliferation of *Vibrio* spp.



PREVENTION

Oral cholera vaccines (OCVs) are available and effective in preventing and managing outbreaks. The risk of vibriosis can be reduced by raising disease awareness and improving food safety in particular seafood processing.



MANAGEMENT

Patients with cholera should be treated with oral rehydration solution; in severe cases, emergency administration of intravenous fluids is necessary. Antibiotic therapy can shorten the duration of cholera, but it is usually not needed for vibriosis, unless the infection does not resolve or progresses to septicæmia. *V. vulnificus* wound infections can require tissue debridement or even limb amputation.



OUTLOOK

Most *Vibrio* spp. infections are seasonal and primarily driven by increased temperature, rainfall events and contamination of aquatic reservoirs with *Vibrio* spp. pathogens. Thus, these infections are expected to increase, owing to global climate change and limited access to safe drinking water and sanitation, particularly in areas affected by war, poverty or natural disasters. Improved surveillance systems to track the epidemiology of these pathogens will help understanding of the source and spread of outbreaks and understanding of the environmental factors that favour *Vibrio* spp. growth, which can potentially predict increased risk of infections.

doi:10.1038/s41572-018-0010-4 published online 12 July 2018; Article citation ID: 201816 4/7

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps.

Written by Lucia Berrington, designed by Laura Marshall



Marzo 1837 Giacomo Leopardi è a Napoli e scrive al padre: “ io grazie a Dio sono salvo dal colera, ma a gran costo.

Dopo aver passato in campagna più mesi tra incredibili agonie, correndo ciascun giorno seri pericoli di vita ben contati, imminenti e realizzabili di ora in ora.....il colera oltre che è attualmente in vigore in altre parti del Regno, non è mai cessato neppure a Napoli, essendovi ogni giorno o quasi, dei casi che il governo cerca di nascondere.

Anzi in questi ultimi giorni tali casi paiono moltiplicati e più e più medici predicono il ritorno del contagio in primavera o in estate, ritorno che anche a me pare assai naturale perchè la malattia non ha avuto sfogo ordinario forse a causa della stagione fredda....”

Leopardi morirà il 14 giugno 1837 di colera e verrà sepolto in una fossa comune.