



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Procedure di isolamento e caratterizzazione
di *Vibrio* spp. di importanza clinica**

G. Ripabelli, G. M. Grasso,
M. L. Sammarco e I. Luzzi

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

97/31

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Procedure di isolamento e caratterizzazione
di *Vibrio* spp. di importanza clinica**

Giancarlo Ripabelli (a)(b), Guido Maria Grasso (b),
Michela Lucia Sammarco (b) e Ida Luzzi (a)

(a) Laboratorio di BATTERIOLOGIA e MICOLOGIA MEDICA, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Cattedra di Igiene, Università degli Studi del Molise, Campobasso

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

97/31

Istituto Superiore di Sanità

Procedure di isolamento e caratterizzazione di *Vibrio* spp. di importanza clinica.

Giancarlo Ripabelli, Guido Maria Grasso, Michela Lucia Sammarco e Ida Luzzi
1997, v. 55 p. Rapporti ISTISAN 97/31

Ad esclusione dei noti focolai epidemici da *V.cholerae* O1 verificatisi negli anni trascorsi, non si hanno a disposizione dati epidemiologici definiti sulla reale incidenza in Italia delle infezioni da altri *Vibrio*. Esistono, tuttavia, concrete possibilità di una improvvisa introduzione nel nostro territorio di tutte le specie, incluso *V.cholerae* O1 e O139. Tra i fattori che concorrono alla possibilità che si verifichino tali evenienze si ricordano: l'aumentata mobilità per lavoro o turismo; il continuo arrivo di profughi da aree dove le infezioni da *Vibrio* sono più comuni di quanto non lo siano in Italia; l'abitudine di consumare prodotti ittici crudi o poco cotti. Il manuale ha, pertanto, lo scopo di sensibilizzare gli operatori dei laboratori sull'opportunità di ricercare i *Vibrio* in campioni clinici, alimentari ed ambientali e di fornire idonei protocolli che facilitino l'isolamento e l'identificazione, biochimica e sierologica, di *Vibrio* spp. Inoltre, la carenza di linee guida (normative, circolari, ecc.) sui provvedimenti da adottare in caso di isolamento di *Vibrio*, soprattutto da alimenti, le controversie sul ruolo patogenetico delle specie non tossigeniche, hanno suggerito di includere anche una sezione specifica sulla caratterizzazione molecolare degli isolati per la ricerca dei geni codificanti le tossine termolabile e termostabile.

Parole chiave: Epidemiologia, Microbiologia

Istituto Superiore di Sanità

Isolation and characterization of *Vibrio* species of clinical significance.

Giancarlo Ripabelli, Guido Maria Grasso, Michela Lucia Sammarco and Ida Luzzi
1997, v. 55 p. Rapporti ISTISAN 97/31 (in Italian)

Apart from the well know *V. cholerae* O1 outbreaks which occurred recently, definite epidemiological data on the actual incidence of other *Vibrio* infections in Italy are not available. However all species, included *V. cholerae* O1 and O139 may quite likely be introduced into our country. Among the different factors which can combine to bring about such a situation we can report: the increasing migrations for business or tourism; the steady influx of refugees from areas where *Vibrio* infections are more widespread than in Italy; the habit of eating seafood either raw or undercooked. The aim of this work is, therefore, to draw the attention of laboratory technicians on the need to investigate clinical, food and environmental samples for *Vibrio* and to supply adequate protocols to facilitate isolation as well as biochemical and serologic identification of *Vibrio* species. Moreover, the lack of guidelines on measures to be taken when *Vibrio* is isolated, especially in food products, and controversy on the pathogenetic role of non toxigenic strains, have led to include into this work a specific section dedicated to the molecular characterisation of isolated species for the investigation for the genes codifying toxins.

Key words: Epidemiology, Microbiology

INDICE

PRESENTAZIONE	v
1. OBIETTIVI DEL MANUALE	1
2. CLASSIFICAZIONE, HABITAT ED IMPORTANZA CLINICA	3
3. EPIDEMIOLOGIA E PROFILASSI DELLE INFEZIONI UMANE DA <i>VIBRIO</i>	7
3.1. Colera e <i>V. cholerae</i> sierogruppo O1	8
3.1.1. <i>Caratteristiche dell'infezione</i>	9
3.1.2. <i>Modalità di trasmissione</i>	9
3.1.3. <i>Prospettive di prevenzione</i>	10
3.2. Colera e <i>V. cholera</i> O139	11
3.2.1. <i>Caratteristiche dell'infezione</i>	11
3.2.2. <i>Modalità di trasmissione</i>	12
3.2.1. <i>Prospettive di prevenzione</i>	12
3.3. <i>V. cholerae</i> non-O1	12
3.3.1. <i>Caratteristiche dell'infezione</i>	12
3.3.2. <i>Modalità di trasmissione</i>	13
3.3.3. <i>Prospettive di prevenzione</i>	13
3.4. <i>V. mimicus</i>	13
3.4.1. <i>Caratteristiche dell'infezione</i>	13
3.4.2. <i>Modalità di trasmissione</i>	13
3.4.3. <i>Prospettive di prevenzione</i>	13
3.5. <i>V. parahaemolyticus</i>	14
3.5.1. <i>Caratteristiche dell'infezione</i>	14
3.5.2. <i>Modalità di trasmissione</i>	14
3.5.3. <i>Prospettive di prevenzione</i>	14
3.6. <i>V. hollisae</i>	15
3.6.1. <i>Caratteristiche dell'infezione</i>	15
3.6.2. <i>Modalità di trasmissione</i>	15
3.6.3. <i>Prospettive di prevenzione</i>	15
3.7. <i>V. fluvialis</i> e <i>V. furnissii</i>	15
3.7.1. <i>Caratteristiche dell'infezione</i>	15
3.7.2. <i>Modalità di trasmissione</i>	16
3.7.3. <i>Prospettive di prevenzione</i>	16
3.8. <i>V. vulnificus</i>	16
3.8.1. <i>Caratteristiche dell'infezione</i>	16
3.8.2. <i>Modalità di trasmissione</i>	16
3.8.3. <i>Prospettive di prevenzione</i>	17
3.9. <i>V. alginolyticus</i>	17
3.9.1. <i>Caratteristiche dell'infezione</i>	17
3.9.2. <i>Modalità di trasmissione</i>	17

3.9.3. Prospettive di prevenzione	17
3.10. Altri <i>Vibrio</i> a prevalente tropismo extraintestinale (<i>V. damsela</i>, <i>V. meschnikovii</i>, <i>V. cincinnatiensis</i> e <i>V. carchariae</i>)	17
3.10.1. Caratteristiche dell'infezione	17
3.10.2. Modalità di trasmissione	17
3.10.3. Prospettive di prevenzione	18
3.11. Resistenza agli antimicrobici	18
4. PRELIEVO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI	20
4.1. Prelievo dei campioni clinici	20
4.1.1. Campioni extraintestinali	20
4.1.1. Campioni di feci	20
4.2. Trasporto dei campioni clinici	20
4.1. Campioni alimentari	21
4.2. Campioni ambientali (acque superficiali)	22
5. ISOLAMENTO DI <i>VIBRIO</i> spp.	23
5.1. Considerazioni generali	23
5.2. Campioni extraintestinali	23
5.3. Campioni di feci	24
5.4. Campioni alimentari	26
5.5. Campioni ambientali (acque superficiali)	29
6. IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA	30
6.1. Aspetto delle colonie di <i>Vibrio</i> spp. sui terreni solidi di isolamento	30
6.2. Caratterizzazione biochimica delle colonie isolate di <i>Vibrio</i> spp.	31
6.3. Individuazione degli isolati falsi positivi: eliminazione dei non- <i>Vibrio</i>	34
6.3.1. Colorazione di Gram	34
6.3.2. Semina in TSI o KIA	34
6.3.3. Richiesta di NaCl per la crescita	34
6.3.4. Test dell'ossidasi	35
6.3.5. String test	35
6.4. Prove biochimiche per l'identificazione di <i>Vibrio</i> spp.	36
6.4.1. Decarbossilazione di lisina, arginina ed ornitina	36
6.4.2. Produzione di acido da saccarosio, D-galattosio, salicina e mio-inositolo	36
6.4.3. Produzione di gas da glucosio	38
6.4.4. Crescita in NB all'8% di NaCl	38
6.4.5. Produzione di indolo	39
7. PROVE SIEROLOGICHE DI IDENTIFICAZIONE	40
8. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E PROVE DI TOSSIGENICITA'	42
8.1. Prove di tossigenicità	42
8.2. Estrazione del DNA batterico	42

8.2.1. Estrazione del DNA secondo il metodo di Ezaki	42
8.2.2. Estrazione del DNA secondo la tecnica della bollitura	43
8.3. PCR per la ricerca del gene <i>ctx</i>	44
8.4. PCR per la ricerca del gene <i>sto</i>	45
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	46
INDIRIZZI INTERNET	47
APPENDICE 1 Conservazione dei ceppi isolati	48
APPENDICE 2 Fenomeno Kanagawa	49
APPENDICE 3 Terreni di coltura e reagenti: composizione e preparazione	50

PRESENTAZIONE

Come rilevano gli Autori nel capitolo che illustra gli obiettivi del manuale, del genere *Vibrio* e delle molteplici azioni che le numerose specie di questo genere esercitano nell'ambiente e nella patologia animale ed umana ci si occupa poco, eccetto poi a presentare allarmismi ingiustificabili quando si è in presenza di episodi o piccole epidemie di colera. E' un grande merito di questo manuale diffondere informazioni pratiche e puntuali sulla diagnostica microbiologica di questi germi, che è centrale per gli interventi di sanità pubblica nel settore.

Mentre è vero che il manuale nasce da una specifica esperienza e dalle ricerche previste nel progetto PRISMA per la salvaguardia del mare Adriatico, i suoi scopi e le informazioni in esso contenuti hanno valenza assai più generali e si inquadrano nella meritoria opera di diffusione di conoscenze corrette e di tecnologie validate che, insieme all'impegno professionale dei ricercatori e degli operatori sanitari, sono l'unico modo per affrontare le emergenze infettivologiche che colpiscono e sempre colpiranno anche i paesi con evolute conoscenze mediche.

Antonio Cassone
Direttore Laboratorio di Batteriologia e
Micologia Medica

1. OBIETTIVI DEL MANUALE

Le infezioni da *Vibrio* spp. sono considerate un evento piuttosto raro nel nostro Paese e, pertanto, se ne ritiene spesso superflua la ricerca. Tuttavia, numerosi fattori concorrono ad aumentare le probabilità di isolamento di questi batteri sia da campioni clinici, sia da alimenti, sia da campioni ambientali, anche in zone geograficamente lontane, o comunque non prossime alle coste, dove, generalmente, il problema delle infezioni da *Vibrio* non è particolarmente sentito. Tra questi fattori ricordiamo: l'aumentato consumo di pesce e di prodotti ittici in genere; l'abitudine, purtroppo ben radicata in alcune regioni italiane, di consumare molluschi poco cotti se non addirittura crudi; l'incremento degli scambi commerciali con Paesi di aree geografiche più a rischio, come, ad esempio, il Sud-Est Asiatico o il Sud America; alcune segnalazioni di isolamenti di *V. cholerae* non-O1 e di *V. parahaemolyticus* in alimenti importati (gamberetti, code di gambero, etc.); i sempre più frequenti viaggi, per lavoro o turismo, in zone in cui le infezioni da *Vibrio* sono endemiche. In alcune aree geografiche, infatti, le infezioni da *Vibrio* sono piuttosto comuni (diarrea da *V. parahaemolyticus* in Giappone, colera nei Paesi in via di sviluppo); inoltre, non bisogna dimenticare le recenti epidemie di colera nell'Europa dell'Est, in Albania in particolare, e le sue ripercussioni sul nostro territorio nazionale. In una tale situazione, anche se le condizioni socio-economiche del nostro Paese tendono sicuramente ad escludere la possibilità di focolai epidemici di rilevante entità, i laboratori diagnostici devono essere in grado non solo di fronteggiare evenienze contingenti, ma anche di tracciare un più dettagliato quadro epidemiologico al fine di valutare il reale impatto di questi microrganismi nel panorama sanitario nazionale. A quanto già detto, si aggiunge il problema della carenza di chiare normative che stabiliscano procedure a cui attenersi nel momento in cui, ad esempio, ci si trovi ad isolare un Vibrione da campioni alimentari. In aggiunta, allo stato attuale delle conoscenze, ancora persistono controversie sull'effettivo ruolo patogenetico di quei ceppi di *Vibrio* non produttori di tossine. Infatti, se da un lato ceppi non tossigenici dovrebbero essere considerati potenzialmente patogeni per l'uomo (sebbene non dotati delle stesse caratteristiche patogenetiche ed epidemiologiche dei ceppi produttori di tossine), dall'altro la loro presenza in un alimento destinato ad essere consumato esclusivamente dopo idonea cottura, non dovrebbe costituire un pericolo reale in termini di Sanità Pubblica. Pertanto, in questo manuale, sono descritte anche alcune tecniche di laboratorio per la determinazione del potenziale patogeno (produzione di tossine) degli isolati, al fine di fornire utili informazioni per intraprendere idonee azioni legali ed amministrative in caso di isolamento di *Vibrio* spp.

L'idea di scrivere questo manuale è nata anche considerando alcune peculiarità delle coste italiane; ad esempio, quelle del mare Adriatico offrono oltre la metà della recezione turistica annuale e del prodotto ittico nazionale. Inoltre, va tenuto conto che: a) le caratteristiche idrogeologiche di questo bacino sono particolari e tali da costituire un ambiente ideale per la circuitazione di eventuali fattori di rischio per la salute umana;

b) la sponda orientale dell'Adriatico rappresenta ormai una consolidata via di transito per profughi provenienti sia da paesi asiatici con alta endemia colerica, sia dall'Europa orientale; c) le esperienze accumulate nel corso delle grandi epidemie, in particolare quelle che hanno colpito il continente africano e latino americano, suggeriscono come il colera possa rapidamente diffondersi e divenire endemico anche in aree spesso caratterizzate da precarie condizioni socio-economiche, come molti Paesi dell'Europa orientale.

Tutto ciò ha suggerito la necessità di valutare attentamente quelle che potrebbero essere le nuove emergenze sanitarie per il nostro Paese (e, tra queste, sicuramente il problema delle infezioni da *Vibrio* spp.) e di verificare la preparazione delle strutture periferiche deputate all'isolamento e all'identificazione dei patogeni. Pertanto, nell'ambito delle attività di ricerca previste dal progetto PRISMA 2 per la salvaguardia del mare Adriatico, si è ritenuto opportuno scrivere questo manuale che ha lo scopo principale di sensibilizzare il Lettore sul problema della possibile presenza di *Vibrio* nell'ambiente, negli alimenti e nei campioni clinici e di fornirgli idonei strumenti per effettuare l'isolamento e la caratterizzazione biochimica, sierologica e molecolare.

2. CLASSIFICAZIONE, HABITAT ED IMPORTANZA CLINICA

Il nome *Vibrio* fu coniato da Pacini nel 1854, durante i suoi studi sul colera; lo stesso Pacini assegnò al bacillo del colera il nome di *Vibrio cholerae*, che rappresenta tuttora la "specie tipo" del genere *Vibrio*.

I dati sperimentali acquisiti negli ultimi venti anni hanno trasformato il genere *Vibrio* da un gruppo eterogeneo di batteri ad una serie di meglio definiti gruppi naturali; ciò è avvenuto grazie al trasferimento di "Vibrioni non fermentanti", "Vibrioni anaerobi" e "Vibrioni microaerofili" ad altri generi, come *Campylobacter*, *Wolinella*, *Pseudomonas* ed *Alteromonas*.

Il genere *Vibrio* è compreso nella Famiglia *Vibrionaceae*, che include un'ampia varietà di batteri molto importanti e piuttosto eterogenei (Tabella 1).

Tabella 1. - Nomenclatura e classificazione dei membri della famiglia *Vibrionaceae* e di microrganismi correlati.

Famiglia <i>Vibrionaceae</i> (Véron 1965)	Anno di prima descrizione
Genere tipo: <i>Vibrio</i> (Pacini 1854)	
Specie tipo: <i>Vibrio cholerae</i> (Pacini 2854)	
Ceppo tipo: ATCC 14035 (= NCTC 8021)	
Genere <i>Aeromonas</i>	1936
gruppo <i>A. hydrophyla</i>	
<i>A. caviae</i>	1936
<i>A. hydrophila</i>	1901
<i>A. media</i>	1983
<i>A. sobria</i>	1981
<i>A. schubertii</i>	1988
<i>A. veronii</i>	1987
<i>A. salmonicida</i>	1896
Genere <i>Photobacterium</i>	1899
<i>P. angustum</i>	1979
<i>P. leiognathi</i>	1967
<i>P. phosphoreum</i>	1878
Genere <i>Plesiomonas</i>	1962
<i>P. shigelloides</i>	1954
Genere <i>Vibrio</i>	1854
<i>V. aestuarianus</i>	1983
<i>V. alginolyticus</i>	1961
<i>V. anguillarum</i>	1909
<i>V. campbellii</i>	1971
<i>V. carchariae</i>	1984
<i>V. cholerae</i>	1854
<i>V. cincinnatiensis</i>	1896
<i>V. costicola</i>	1938

(continua)

Tabella 1. - (continua)

Famiglia Vibrionaceae (Véron 1965)	Anno di prima descrizione
<i>V. damsela</i>	1981
<i>V. diazotrophicus</i>	1982
<i>V. fischeri</i>	1896
<i>V. fluvialis</i>	1981
<i>V. furnissii</i>	1983
<i>V. gazogenes</i>	1980
<i>V. harveyi</i>	1936
<i>V. hollisae</i>	1982
<i>V. logei</i>	1980
<i>V. marinus</i>	1927
<i>V. mediterranei</i>	1986
<i>V. metschnikovii</i>	1888
<i>V. mimicus</i>	1981
<i>V. natriegens</i>	1961
<i>V. nereis</i>	1980
<i>V. nigripulchritudo</i>	1971
<i>V. ordalii</i>	1981
<i>V. orientalis</i>	1983
<i>V. parahaemolyticus</i>	1951
<i>V. pelagius</i>	1971
<i>V. proteolyticus</i>	1964
<i>V. salmonicida</i>	1986
<i>V. splendidus</i>	1900
<i>V. tubiashii</i>	1984
<i>V. vulnificus</i>	1979
Altri microrganismi*	
<i>Aeromonas</i> Gruppo 501	
Gruppo di Baumann B2 (vibrioni marini)	
Gruppo di Baumann E3 (vibrioni marini)	
NIH (Giappone) biogruppo 1875 (vibrioni marini)	

*Questi includono ceppi che sembrano appartenere alla famiglia ma che mancano del nome di specie e di genere.

Oltre al genere *Vibrio* (il "genere tipo"), fanno parte di questa famiglia anche i generi *Photobacterium*, *Plesiomonas* ed *Aeromonas*; la Tabella 2 elenca alcune caratteristiche utili alla differenziazione dei quattro generi citati.

Anche nell'ambito del genere *Vibrio* è presente una certa eterogeneità; infatti le varie specie non sono strettamente correlate tra loro e ciò è confermato da prove di ibridizzazione DNA-DNA e dalla differente struttura di molte proteine; tuttavia esperimenti più recenti di sequenziamento dell'RNA, in disaccordo con queste acquisizioni, hanno suggerito nuove ipotesi che, comunque, necessitano ancora di ulteriori conferme. Da tali esperimenti sono, inoltre, scaturite alcune chiare indicazioni come, ad esempio, che *V. cholerae* è strettamente correlato a *V. mimicus* ma non altrettanto strettamente agli altri *Vibrio*; *V. parahaemolyticus* presenta omologie con *V. alginolyticus*; *V. fluvialis* invece risulta simile a *V. furnissii* e *V. anguillarum* a *V. ordalii*.

Tabella 2. - Proprietà della maggior parte delle specie appartenenti ai quattro generi della famiglia *Vibrionaceae*.

Test o proprietà	<i>Vibrio</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>
Causa infezioni umane	+	-	+	+
Contenuto in GC del DNA (mol%)	38 - 51	40 - 44	57 - 63	51
Flagello polare con guaina	+	-		
Capacità di accumulare poli- β -idrossibutirrato ma senza utilizzarlo	-	+		
Richiesta di Na ⁺ per la crescita	+	+	-	-
Sensibilità al composto vibriostatico O129	+	+	-	+
Produzione di lipasi	+	V	+	-
Fermentazione del D-Mannitolo	+	-	+	-

+, la maggior parte dei ceppi (generalmente dal 90 al 100%) sono positivi; V, variazioni da ceppo a ceppo (generalmente dal 25 al 75% sono positivi); -, la maggior parte dei ceppi (generalmente sono positivi dallo 0 al 10%) sono negativi.

Le varie specie della famiglia *Vibrionaceae* occupano diverse nicchie ecologiche, sono normalmente presenti nell'ambiente e possono causare malattie negli uomini e negli animali. Va sottolineato che molti ceppi ambientali, ad esempio di *V. cholerae* e di *V. parahaemolyticus*, non sono patogeni; infatti, la maggior parte dei *V. cholerae* appartenenti sia al sierotipo O1 sia al non-O1 risultano tendenzialmente non-tossigenici. Egualmente, il 99% dei ceppi ambientali di *V. parahaemolyticus* sono non patogeni. Comunque, tale considerazione non deve condizionare o sminuire la necessità di ricercare i Vibrioni ambientali. Infatti, recenti acquisizioni epidemiologiche mostrano come alcuni test di laboratorio in uso per la determinazione della patogenicità (ad esempio il fenomeno di Kanagawa per *V. parahaemolyticus*, vedi Appendice 2), possono non essere sufficientemente indicativi per discriminare tra patogeni e non, e ciò a causa del mutamento di alcune caratteristiche, soprattutto biochimiche, che col tempo si stanno verificando nelle varie specie.

La distribuzione di *Vibrio* spp. nell'ambiente dipende da vari fattori, ma principalmente dall'ospite animale o vegetale, dalla temperatura, dalla salinità e dalla profondità per quelle specie isolate negli oceani. Comunque, delle oltre 30 specie sino ad oggi conosciute, solo 12 possono causare infezioni intestinali ed extraintestinali nell'uomo, o sono state isolate da campioni clinici di origine umana (Tabella 3).

Fra le specie sicuramente patogene per l'uomo, ricordiamo *V. cholerae* O1, O139 e *V. parahaemolyticus*. I primi, agenti eziologici del colera, possono causare sia forme lievi, indistinguibili da altre diarreie acquose, sia forme severe, ben caratterizzate da un punto di vista clinico; tali sierogruppi sono gli unici in grado di causare epidemie e pandemie. Inoltre, *V. cholerae* O1 è una delle poche specie chiaramente adattate all'ospite. Per quanto concerne *V. parahaemolyticus*, è chiaramente documentato il suo ruolo etiologico nelle gastroenteriti acute. I Vibrioni possono essere responsabili anche di infezioni extraintestinali, che spaziano da semplici ferite infette fino ad infezioni oculari o uditive e perfino setticemie letali; *V. vulnificus*, infatti, può causare setticemie anche mortali. Questi microrganismi sono stati anche isolati, sebbene raramente, da cistifellee

asportate chirurgicamente, da pazienti con meningite, polmonite o infezioni del tratto urogenitale.

Tabella 3. - Associazione tra alcune sindromi cliniche e *Vibrio* spp.

Specie	Sindromi cliniche				
	gastroenteriti	infezione di ferite	infezioni uditive	setticemia primaria	setticemia secondaria
<i>V. cholerae</i> O1	+++	+			
<i>V. cholerae</i> non O1	+++	++	+	+	+
<i>V. mimicus</i>	++		+		
<i>V. fluvialis</i>	++				
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	+		+
<i>V. alginolyticus</i>	(+)	++	++	+	
<i>V. cincinnatiensis</i>				+	
<i>V. hollisae</i>	++			+	
<i>V. vulnificus</i>	+	++		++	++
<i>V. furnissii</i>	(+)				
<i>V. damsela</i>		++			
<i>V. metschnikovii</i>	(+)			(+)	
<i>V. carchariae</i>		+			

+++ , riportato molto frequentemente; ++ , meno comune; + , raro; (+) , associazione non ancora sicura.

La maggior parte delle infezioni causate dai Vibrioni, sono associate ad una esposizione ad acque superficiali o a prodotti ittici marini. Questa considerazione è di fondamentale importanza per una valutazione strettamente economica sull'opportunità di effettuare la ricerca mirata di questi microrganismi in campioni clinici, in quanto, l'aggiunta di un terreno selettivo e differenziale per la ricerca di *Vibrio* spp., comporta sicuramente un aggravio di spesa, oggi difficilmente proponibile soprattutto nelle strutture del Servizio Sanitario Nazionale. Pertanto, salvo che per studi scientifici mirati, i laboratori di analisi microbiologica dovrebbero acquisire preventivamente, in assenza di specifici segni patognomonic, dati epidemiologici sul paziente, al fine di stabilire se lo stesso abbia potuto contrarre o meno l'infezione a seguito di una esposizione o di un comportamento a rischio (consumo di prodotti ittici crudi o poco cotti; essersi bagnati in acque superficiali; pulitura di pesce, molluschi, crostacei, etc.) e quindi decidere con solerzia la ricerca anche dei Vibrioni. L'acquisizione di questi dati epidemiologici può opportunamente indirizzare le indagini e velocizzare l'individuazione dell'agente patogeno; ciò è di estrema importanza soprattutto in quei soggetti defedati, con pregresse patologie (malattie epatiche, diabete, alcolismo) o immunocompromessi, nei quali una infezione da *Vibrio* può decorrere in maniera piuttosto grave, determinando non infrequentemente il decesso del soggetto.

3. EPIDEMIOLOGIA E PROFILASSI DELLE INFEZIONI UMANE DA *VIBRIO*

Il genere *Vibrio* comprende alcune specie che possono esplicare un effetto patogeno sull'uomo (*V. cholerae* O1, *V. cholerae* non-O1, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. hollisae*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, *V. alginolyticus*). La patogenicità di altre specie (*V. furnissii*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis* e *V. carchariae*) è ancora controversa.

Da un punto di vista patogenetico è utile una prima suddivisione generale in due grandi gruppi, in base al prevalente tropismo mostrato per l'uomo (intestinale o extraintestinale). Il primo gruppo (*Vibrio* a patogenicità esclusivamente o prevalentemente intestinale) comprende *V. cholerae* O1, *V. cholerae* O139, *V. cholerae* non-O1, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. hollisae*, *V. fluvialis* e *V. furnissii* (Tabella 4).

Tabella 4. - Principali caratteristiche di *Vibrio* spp. a prevalente tropismo intestinale

Organismo	Malattia	Meccanismo patogenetico	Fattori e veicoli di trasmissione
<i>V. cholerae</i> O1	colera	tossina colerica (CT)	ingestione di molluschi e prodotti ittici crudi; altri alimenti; acqua
<i>V. cholerae</i> O139	colera	tossina colerica (CT)	ingestione di molluschi e prodotti ittici crudi; altri alimenti; acqua
<i>V. cholerae</i> non-O1	diarrea, spesso con vomito e febbre; altre infezioni (rare)	tossina colerica (CT); tossina termostabile (ST); altre tossine	ingestione di molluschi e prodotti ittici crudi
<i>V. mimicus</i>	diarrea, spesso con vomito e febbre; otite esterna	tossina termostabile (ST); altre tossine	ingestione di molluschi e prodotti ittici crudi; acque marine
<i>V. parahaemolyticus</i>	diarrea, spesso con vomito e febbre; altre infezioni (rare)	emolisina (?)	ingestione di molluschi e prodotti ittici crudi
<i>V. hollisae</i>	diarrea, spesso con vomito e febbre	enterotossina (?)	ingestione di molluschi e prodotti ittici crudi (?)
<i>V. fluvialis</i>	diarrea (?)	enterotossina (?); altre tossine (?)	ingestione di molluschi e prodotti ittici crudi
<i>V. furnissii</i>	diarrea (?)	enterotossina (?)	ingestione di molluschi e prodotti ittici crudi

Nel secondo (*Vibrio* a patogenicità prevalentemente extraintestinale) possiamo includere *V. vulnificus*, *V. damsela*, *V. alginolyticus*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis* e *V. carchariae* (Tabella 5).

Tabella 5. - Principali caratteristiche di *Vibrio* spp. a prevalente tropismo extraintestinale

Organismo	Malattia	Meccanismo patogenetico	Fattori e veicoli di trasmissione
<i>V. vulnificus</i>	setticemia; infezioni di ferite; diarrea (rara)	proteasi; elastasi; emolisina	ingestione di molluschi e prodotti ittici crudi; contatto con acqua di mare
<i>V. alginolyticus</i>	infezione di tessuti molli; infezioni di ferite; infezioni uditive; infezioni oculari; batteriemie in soggetti immunocompromessi (rare)	(?)	contatto con acqua di mare
<i>V. damsela</i>	infezioni di ferite (?)	(?)	contatto con acqua di mare o con pesci
<i>V. metschnikovii</i>	(?)	(?)	contatto con acqua di mare (?)
<i>V. cincinnatiensis</i>	batteriemie; meningite	(?)	contatto con acqua di mare
<i>V. carchariae</i>	infezioni di ferite	(?)	morsi di squali

3.1. Colera e *V. cholerae* sierogruppo O1

Il colera è stato considerato fino a pochi anni fa una patologia causata esclusivamente da *V. cholerae* O1 produttore della caratteristica tossina colerica. *V. cholerae* O1 comprende due biotipi, classico ed El Tor, ciascuno dei quali può essere a sua volta suddiviso in tre distinti sierotipi, Inaba, Ogawa e Hikojima. *V. cholerae* O1, sia classico che El Tor, presenta, infatti, un antigene comune a tutti i sierotipi (denominato A), mentre questi ultimi si differenziano tra loro in base alla presenza di un altro antigene tipo-specifico: B per Ogawa e C per Inaba; il più raro sierotipo Hikojima contiene, oltre all'antigene comune A, entrambi gli antigeni tipo-specifici (B e C).

V. cholerae biotipo El Tor è il responsabile della settima pandemia tuttora in corso. La pandemia è iniziata nel 1961 in Indonesia e si è diffusa rapidamente in Asia Orientale e in Bangladesh (1963), in India (1964) e in Iran, Iraq ed ex-URSS (1965-66). Dal 1900 al 1965 non erano stati più segnalati casi di colera in Europa; dal 1965 l'epidemia ha interessato, successivamente, anche il Portogallo e la Spagna nel 1971, l'Italia nel 1973, il Portogallo nel 1974-75, la Spagna nel 1979, la Romania e di nuovo l'ex-URSS nel 1991. Tra il 1965 ed il 1993 furono notificati in Europa 6215 casi con 109 decessi. Nel 1994 il numero dei casi in Europa aumentò considerevolmente con 2339 notifiche e 47 decessi (nel 1993 erano stati notificati 73 casi); in quello stesso anno l'epidemia interessò anche l'Albania e in Italia furono segnalati 12 casi autoctoni. L'anno successivo (1995) i casi tornarono a diminuire (937 casi con 20 decessi) ed anche nel nostro Paese si verificò un solo caso, questa volta di importazione.

Nel 1970 la pandemia raggiunse l'Africa Occidentale, da dove mancava da oltre 100 anni, diffondendosi in molti paesi del continente. Nell'ultimo decennio due altri importanti eventi hanno caratterizzato l'epidemiologia del colera. Il primo è stato la inaspettata riemergenza, nell'America Latina nel gennaio 1991, dopo un'assenza di circa

un secolo, di *V. cholerae* O1 El Tor. Il secondo, forse più allarmante, è stato la comparsa, alla fine del 1992, nel sud dell'India, di un nuovo ceppo di *V. cholerae* non-O1, con spiccata capacità epidemica, classificato come *V. cholerae* O139 Bengal. Infatti, tutte le aree dell'India e di diversi paesi limitrofi (Bangladesh, Cina, Malaysia, Nepal, Pakistan, Sri Lanka), già considerate endemiche per *V. cholerae* O1, sono state invase dal nuovo ceppo di *V. cholerae* O139.

V. cholerae O1 è tradizionalmente considerato un batterio a spiccato tropismo intestinale ed umano e, quindi, presente nell'ambiente solo in seguito ad una contaminazione con feci di soggetti infetti. Tuttavia, in Bangladesh ed in Australia, è stata dimostrata l'esistenza di una riserva ambientale anche per questo patogeno, probabilmente associata ai copepodi ed al plankton. E' stata anche dimostrata la sopravvivenza del biotipo El Tor per lunghi periodi in acqua dolce. Sicuramente *V. cholerae* El Tor presenta, rispetto al biotipo classico, dei vantaggi ambientali che, insieme al gran numero di portatori asintomatici, possono aver favorito la sua diffusione pandemica.

3.1.1. Caratteristiche dell'infezione - La maggior parte dei soggetti infettati da *V. cholerae* O1 El Tor non mostra segni clinici sebbene elimini il microrganismo con le feci per 7-14 giorni. I casi sintomatici variano da forme lievi o moderate di diarrea acquosa (90% dei casi clinicamente evidenti), difficilmente distinguibili da altre forme di diarrea acuta, a forme gravi con profusa diarrea ad "acqua di riso" e con segni di moderata o grave disidratazione, tipici del colera. L'insorgenza della sintomatologia è generalmente brusca dopo un periodo di incubazione variabile da poche ore a 4-5 giorni. Le forme gravi, generalmente accompagnate anche da vomito ed inappetenza, possono, se non trattate, determinare rapida disidratazione, acidosi, collasso circolatorio, shock ipovolemico ed insufficienza renale. In mancanza di un trattamento adeguato il decesso può sopraggiungere in poche ore ed il tasso di mortalità può anche raggiungere il 50% dei casi. La pronta attuazione di idonee misure terapeutiche riduce la mortalità al di sotto dell'1%. Nella maggior parte dei casi può essere sufficiente la sola somministrazione orale di soluzioni saline reidratanti (senza antibiotici), anche se i pazienti più gravi richiedono necessariamente fluidi per via endovenosa. Nei casi gravi è utile associare una terapia antibiotica appropriata al fine di ridurre il volume e la durata della diarrea ed il periodo di eliminazione dei *Vibrio*. La tetraciclina viene ancora riportata come farmaco di scelta nel trattamento del colera, sebbene la resistenza nei confronti di questo antibiotico è in aumento. Infatti tutti i *V. cholerae* O1 isolati nelle epidemie del 1994 in Albania ed in Italia, sono risultati resistenti sia alla tetraciclina, sia al cotrimossazolo. Altri antibiotici utilizzabili, previa valutazione della loro sensibilità, sono l'eritromicina, la doxiciclina, il cloramfenicolo ed il furazolidone.

3.1.2 Modalità di trasmissione - *V. cholerae* O1 è un classico patogeno intestinale a trasmissione fecale-orale.

La diffusione epidemica dell'infezione colerica è notoriamente favorita dalla presenza di inadeguate condizioni igienico-sanitarie con frequente contaminazione delle risorse idriche e rapida diffusione dell'infezione. Più rara è la possibilità di trasmissione

mediante contatto diretto person-to-person. Nelle aree ad elevata endemia il colera è principalmente una malattia dei bambini ed i soggetti con infezione asintomatica hanno un ruolo importante nel trasporto del microrganismo da un luogo all'altro favorendo la diffusione dell'epidemia.

Nei Paesi a standard igienici più elevati, come il nostro, l'infezione non ha concrete possibilità di essere contratta dall'uomo se non attraverso l'acquisizione in aree endemiche e la successiva importazione o il consumo, senza previa cottura o con cottura inadeguata, di molluschi ed altri prodotti ittici contaminati. Per causare l'infezione è, infatti, necessaria l'ingestione di microrganismi vitali che aderiscono alla parete dell'intestino tenue ed elaborano la tossina colerica (CT), responsabile della caratteristica sintomatologia clinica. Studi su volontari hanno mostrato che, per causare un'infezione sintomatica, è necessaria l'ingestione di circa 1 milione di cellule vitali. L'uso di antiacidi o la presenza di una ridotta acidità gastrica riducono notevolmente la dose infettante. Maggiormente suscettibili all'infezione sono anche i soggetti che presentano una riduzione della risposta immunitaria o un deficit dello stato nutrizionale.

La tossina colerica è formata da una subunità A, responsabile dell'attività biologica, composta a sua volta da due subunità A1 e A2 e circondata da cinque subunità B. In seguito al legame delle subunità B con appositi recettori gangliosidici della parete intestinale, la subunità A attraversa la membrana cellulare bloccando l'assorbimento di sodio e promuovendo la secrezione di cloruri; questo processo è mediato dall'AMP ciclico.

3.1.3. Prospettive di prevenzione - Quando il colera compare in un territorio è essenziale assicurare:

- [1] un adeguato smaltimento delle feci umane;
- [2] un adeguato rifornimento di acqua sicuramente potabile;
- [3] buone pratiche di igiene alimentare.

Queste norme basilari non sono, ovviamente, specifiche per il colera ma valgono tal quali per tutte le malattie a trasmissione fecale-orale che riconoscono anche un serbatoio umano.

Le norme di buona prassi alimentare devono comprendere: (1) adeguata cottura degli alimenti e consumo immediato dopo la loro preparazione; (2) prevenzione della contaminazione crociata, evitando il contatto degli alimenti cotti con quelli crudi o con superfici e utensili contaminati e con insetti (mosche); (3) evitare il consumo di frutta fresca non sbucciata e di prodotti vegetali crudi se non adeguatamente lavati e disinfettati in acqua sicuramente potabile.

Il trattamento della popolazione con antibiotici (chemioprolifassi di massa) non ha effetto sulla diffusione dell'epidemia. Anche l'uso del vaccino ucciso a somministrazione parenterale, che conferisce solo un'immunità parziale (circa nel 50% dei vaccinati) per un periodo limitato (al massimo 3-6 mesi), non è raccomandato come misura di controllo dell'epidemia, anche perché può dare un falso senso di sicurezza nei soggetti vaccinati e nelle autorità a scapito di misure di prevenzione più efficaci.

In alcuni Paesi sono attualmente disponibili due vaccini orali che conferiscono elevati livelli anticorpali, protettivi per diversi mesi, e che possono essere efficacemente

utilizzati per coloro che si recano in aree a rischio. Il primo è un vaccino vivo monodose (ceppo CVD 103-HgR), mentre il secondo, dimostratosi efficace in sperimentazioni in campo, è composto da una miscela di *V. cholerae* O1 uccisi e di subunità B della tossina colerica, somministrabile in due sedute. Tutti questi vaccini non proteggono, però, dall'infezione da *V. cholerae* O139.

3.2. Colera e *V. cholerae* O139

Fino al 1992, epoca di individuazione di questo microrganismo, le epidemie e le pandemie di colera erano state causate solo da *V. cholerae* sierogruppo O1, mentre i *V. cholerae* non agglutinabili dall'antisiero O1 erano considerati responsabili solo di casi sporadici di gastroenterite ed, occasionalmente, di infezioni a localizzazione extraintestinale. Nel novembre 1992 vennero inviati al centro di riferimento nazionale dell'India per il colera (National Institute of Cholera and Enteric Disease, NICED, Calcutta) ceppi di *V. cholerae* non-O1 responsabili di una estesa ed esplosiva epidemia di colera; questa epidemia era iniziata il mese precedente nelle regioni meridionali dell'India e si era estesa, nei mesi successivi, alle coste del Bangladesh. Nello stesso periodo, si verificò un incredibile aumento degli isolamenti di *V. cholerae* non-O1 a scapito del sierogruppo O1, fino ad allora predominante, dalle feci dei pazienti affetti da colera e ricoverati nell'ospedale per malattie infettive di Calcutta. La caratterizzazione di questi ceppi, inviati in Giappone, dimostrò che: [1] nessuno dei ceppi era agglutinato dall'antisiero polivalente O1 o dagli anticorpi monoclonali contro i fattori A, B e C del sierogruppo O1; [2] nessuno dei ceppi era agglutinato dagli antisieri specifici contro tutti i 137 sierogruppi di *V. cholerae* non-O1 fino ad allora noti; [3] tutti i ceppi producevano la tossina colerica (CT), evento considerato raro per i *V. cholerae* non-O1. Studi a livello molecolare e genetico hanno successivamente mostrato una probabile origine di questo sierotipo da *V. cholerae* O1 El Tor; rimane da determinare come questo microrganismo abbia acquisito il nuovo antigene O. Un'ipotesi suggestiva ma verosimile è quella del trasferimento di geni da un ceppo non-O1 ad un ceppo O1 con modifica delle caratteristiche antigeniche del ceppo ricevente ed acquisizione di un vantaggio selettivo in una popolazione in gran parte immune al ceppo O1.

In Europa non si sono fino ad ora verificati casi autoctoni, ma sono stati riportati un numero limitato di casi di importazione. Quindi, sussiste sempre la possibilità di una introduzione di questo, come di altri *V. cholerae*, nel nostro Paese legata eventualmente all'importazione da Paesi endemici di derrate alimentari contaminate o dall'ingresso di portatori.

Nel corso di questi ultimi anni il numero delle segnalazioni è, però, diminuito e, nel 1995, solo nella regione del Myanmar sono stati segnalati casi di infezione da *V. cholerae* O139. La diffusione di questo microrganismo, almeno per il momento, sembra essersi fermata.

3.2.1. Caratteristiche dell'infezione - La malattia ha la stessa sintomatologia di quella provocata da *V. cholerae* O1 e, pertanto, viene anch'essa definita con il nome di

colera. Anche l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha richiesto alle diverse nazioni di segnalare i casi di infezione da *V. cholerae* O139 come colera.

3.2.2. Modalità di trasmissione - Sono le stesse di quelle considerate per *V. cholerae* O1. Il frequente isolamento di *V. cholerae* O139 da campioni ambientali suggerisce l'ipotesi che questo sierotipo possa sopravvivere meglio nell'ambiente rispetto al sierogruppo O1.

3.2.3. Prospettive di prevenzione - I dati epidemiologici, derivanti dallo studio dell'epidemia in India e Bangladesh, hanno mostrato che l'immunità nei confronti dell'infezione da *V. cholerae* O1, compresa la comparsa di anticorpi anti-CT, non conferisce protezione crociata dall'infezione da *V. cholerae* O139. L'esperienza acquisita nel corso delle ricerche effettuate per la preparazione del nuovo vaccino contro *V. cholerae* O1 ha permesso l'allestimento di diversi prototipi di vaccini vivi attenuati basati sul ceppo O139.

Per la profilassi generale valgono, ovviamente, le stesse considerazioni fatte per *V. cholerae* O1.

3.3. *V. cholerae* non-O1

Attualmente si contano oltre 180 sierogruppi di *V. cholerae* non-O1, che, sono, per definizione, quelli non agglutinabili da antisieri O1. Sono diffusi in tutti i Paesi del mondo e, a differenza del sierogruppo O1, non è stata mai messa in dubbio una loro riserva ambientale, riferibile, in particolare, alle acque superficiali soprattutto marine costiere e di estuari.

La circolazione di questi sierogruppi sembra piuttosto limitata nel nostro Paese, anche se tale constatazione è probabilmente determinata da una non efficiente ricerca di questo microrganismo.

3.3.1. Caratteristiche dell'infezione - L'infezione più frequente è quella intestinale caratterizzata, nei casi clinicamente evidenti, soprattutto da diarrea, dolori addominali e febbre. Vomito e nausea compaiono in circa il 25% dei casi sintomatici. Il meccanismo patogenetico non è ancora ben chiarito: alcuni ceppi producono una tossina termolabile simile a quella prodotta dal sierogruppo O1. Nel 25% dei casi nelle feci sono presenti anche muco e sangue; questa evenienza suggerisce la produzione di altre tossine, tra cui la tossina termostabile (ST), o l'invasione dei tessuti.

A differenza del sierogruppo O1, *V. cholerae* non-O1 può, quindi, determinare uno spettro più ampio di forme diarroiche: da diarree gravi acquose indistinguibili da quelle caratteristiche del colera a casi più lievi simili alla diarrea del viaggiatore comunemente causata da *E. coli* enterotossico.

Il microrganismo è stato anche isolato da tamponi auricolari, da ferite infette, da campioni di urina e da campioni ematici prelevati da soggetti con setticemia, in cui il

quadro clinico, a volte, presenta una sintomatologia sovrapponibile a quella causata da *V. vulnificus*. Il tasso di letalità nelle infezioni setticemiche è superiore al 60%.

Nella gran parte degli episodi diarroici non è necessario intraprendere alcun trattamento reidratante ed anche l'uso di antibiotici non è generalmente indicato.

3.3.2. Modalità di trasmissione - Non sono segnalate in letteratura grosse epidemie e, pertanto, si ritiene attualmente che le sue modalità di trasmissione siano legate soprattutto al consumo di molluschi crudi o poco cotti. Si ritiene, inoltre, necessaria, per causare l'infezione, la presenza di una elevata carica microbica (oltre un milione di cellule vitali).

3.3.3. Prospettive di prevenzione - Non essendo disponibile un vaccino, l'unica misura di prevenzione è quella di evitare il consumo di prodotti ittici crudi o poco cotti.

3.4. *V. mimicus*

Questo microrganismo, come suggerisce il suo nome, ha caratteristiche biochimiche simili a quelle di *V. cholerae* ed ha un habitat sovrapponibile a quello dei sierotipi non O1 con distribuzione soprattutto evidente nelle acque costiere. Anche se la maggior parte degli isolamenti proviene dall'India, la sua distribuzione può considerarsi ubiquitaria.

3.4.1. Caratteristiche dell'infezione - *V. mimicus* è stato isolato da casi di diarrea anche se l'esatto meccanismo patogenetico non è ancora noto. In alcuni casi è stata dimostrata la produzione di una enterotossina termostabile simile a quella prodotta da *V. cholerae* non-O1, in altri di una tossina termolabile simile a quella colerica. Il microrganismo è stato anche isolato da infezioni extraintestinali, in particolare da infezioni uditive.

3.4.2. Modalità di trasmissione - L'infezione enterica fa generalmente seguito al consumo di alimenti ittici non cotti o cotti inadeguatamente, soprattutto mitili. I casi di otite fanno generalmente seguito ad attività lavorative, sportive o ricreative (nuoto) in acque marine.

3.4.3. Prospettive di prevenzione - L'unica misura di profilassi delle forme diarroiche è quella di cuocere adeguatamente molluschi, crostacei ed altri prodotti ittici. Non esistono misure efficaci di prevenzione nei soggetti esposti all'acqua di mare per attività lavorativa, sportiva o ricreazionale.

3.5. *V. parahaemolyticus*

Fa parte della normale flora microbica delle acque costiere di gran parte dei Paesi del mondo. L'habitat di questa specie è, quindi, simile a quello di altri *Vibrio* alofili a diffusione marina. In particolare, nelle stagioni fredde il microrganismo viene soprattutto isolato dai sedimenti, mentre nelle stagioni calde si ritrova libero nelle acque costiere, nei molluschi e nei pesci. I ceppi isolati dall'ambiente o da alimenti non sono patogeni per l'uomo; è, quindi, necessario dimostrarne la patogenicità prima di poter considerare un ceppo isolato da un alimento o dall'ambiente responsabile di epidemie o di casi sporadici. L'infezione da *V. parahaemolyticus* è particolarmente frequente in Giappone dove rappresenta la principale causa di gastroenterite. Epidemie sono state, comunque, segnalate in ogni parte del mondo.

3.5.1. Caratteristiche dell'infezione - L'infezione da *V. parahaemolyticus* è nota fin dagli anni '50. I ceppi patogeni sono responsabili di gastroenteriti con diarrea generalmente acquosa (a volte con presenza di sangue), vomito e crampi addominali. La diarrea è accompagnata, in circa la metà dei casi, da febbre moderata e cefalea. Le infezioni sono generalmente lievi e autolimitanti: la terapia antibiotica non accorcia né il decorso clinico né la durata di escrezione fecale del microrganismo. Talvolta, si rende necessaria l'ospedalizzazione del paziente soprattutto se anziano e con patologie concomitanti e in età pediatrica. La durata media della sintomatologia è di 2-3 giorni, mentre il periodo di incubazione oscilla da poche ore ad alcuni giorni (in media 24 ore). L'infezione è correlata alla produzione di una emolisina (cosiddetto fenomeno Kanagawa, vedi Appendice 2) anche se l'esatto meccanismo patogenetico non è ancora chiaro. Sono stati segnalati anche rari casi di setticemia in pazienti immunocompromessi, di infezioni uditive e di ferite chirurgiche.

3.5.2 Modalità di trasmissione - La trasmissione può verificarsi attraverso il consumo di molluschi e crostacei, crudi o poco cotti, sia in seguito ad una contaminazione successiva alla cottura dell'alimento. In tali situazioni *V. parahaemolyticus* può rapidamente proliferare nell'alimento e raggiungere una concentrazione sufficiente a esplicare un effetto patogeno nel consumatore.

Una diffusione secondaria dell'infezione non è stata mai documentata sia nei Paesi occidentali che in Giappone, probabilmente per gli adeguati standard igienici e per la relativamente elevata dose infettante necessaria per produrre un effetto patologico. Casi secondari sono, comunque, rari anche nelle aree geografiche con standard igienico-sanitari inadeguati; ciò suggerisce che la dose infettiva necessaria è probabilmente il più importante fattore che ostacola una diffusione secondaria dell'infezione. *V. parahaemolyticus* è raramente isolato da soggetti asintomatici e non è stato identificato uno stato di portatore.

3.5.3. Prospettive di prevenzione - Semplici misure di educazione sanitaria sui rischi associati al consumo di frutti di mare crudi o poco cotti possono, se rispettate, impedire la trasmissione dell'infezione. Misura importante è la cottura dell'alimento a

temperature tali da distruggere il microrganismo. *V. parahaemolyticus* può rimanere vitale in gamberi e polpa di granchio per diversi minuti ad una temperatura di 80°C e per oltre 15 minuti a 60°C; è, quindi, importante assicurare una esposizione omogenea dell'alimento a temperature in grado di uccidere il microrganismo (almeno 70°C per 15 minuti). Il tempo di generazione di *V. parahaemolyticus*, in condizioni favorevoli, è inferiore ai 15 minuti e, pertanto, anche pochi microrganismi sopravvissuti alla cottura possono raggiungere rapidamente livelli sufficienti a causare la malattia se l'alimento viene lasciato per diverse ore a temperatura ambiente. Un'altra misura fondamentale di prevenzione è quella di consumare l'alimento immediatamente dopo la cottura o di refrigerarlo.

Non è noto se l'infezione conferisce immunità e non è disponibile nessuno strumento di profilassi immunitaria.

3.6. *V. hollisae*

E' probabilmente diffuso, come gli altri *Vibrio* alofili, nell'ambiente marino.

3.6.1. *Caratteristiche dell'infezione* - *V. hollisae* è stato implicato nell'insorgenza di casi di diarrea con vomito, febbre e dolori addominali, anche se l'esatto meccanismo patogenetico non è noto. I sintomi compaiono generalmente entro 5 giorni dall'ingestione dell'alimento contaminato e persistono per circa 24 ore.

3.6.2. *Modalità di trasmissione* - Come per gli altri *Vibrio* marini, gli episodi diarroici sono correlati al consumo di prodotti ittici crudi o poco cotti.

3.6.3. *Prospettive di prevenzione* - L'unica misura di prevenzione attualmente perseguibile è quella di cuocere adeguatamente molluschi, crostacei ed altri prodotti ittici.

3.7. *V. fluvialis* e *V. furnissii*

Sono presenti in acque marine costiere e in estuari. *V. furnissii*, in precedenza denominato *V. fluvialis* biovar II, è ora considerato una specie distinta. Hanno una diffusione ubiquitaria; *V. furnissii* è stato isolato da estuari in Inghilterra e da acque costiere degli Stati Uniti (isole Hawaii).

3.7.1. *Caratteristiche dell'infezione* - *V. fluvialis* è associato ad una gastroenterite simile a quelle provocata da *V. cholerae* non-O1. Tipicamente i sintomi che accompagnano la diarrea sono vomito (97%), dolori addominali (75%), disidratazione (67%) e febbre (35%). Sono generalmente colpiti bambini e giovani. Il meccanismo patogenetico non è completamente chiarito anche se probabilmente è in causa una tossina simile a quella prodotta dai *Vibrio* non-O1.

V. furnissii è stato isolato da campioni di feci durante alcuni episodi epidemici di gastroenterite acuta; il suo ruolo é, comunque, ancora da chiarire essendo stato isolato in associazione ad altri possibili patogeni (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* non-O1, *V. fluvialis*, *Salmonella*, *Pseudomonas*).

3.7.2. *Modalità di trasmissione* - Attraverso il consumo di prodotti ittici crudi o poco cotti.

3.7.3. *Prospettive di prevenzione* - Sono quelle già riportate per *V. cholerae* non-O1.

3.8. *V. vulnificus*

Ha una distribuzione ubiquitaria ed è ampiamente diffuso nell'ambiente marino. Nelle zone temperate riesce probabilmente a raggiungere concentrazioni sufficienti a provocare effetti patogeni nell'uomo solo nei periodi più caldi dell'anno. Può anche essere responsabile di infezioni nei pesci.

3.8.1. *Caratteristiche dell'infezione* - *V. vulnificus*, a differenza dei *Vibrio* fino ad ora trattati, non è associato primariamente a malattie diarroiche ma causa più frequentemente infezioni di ferite e setticemie anche mortali. Può, tuttavia, anche causare forme gastroenteriche. L'infezione può essere contratta mediante contatto di una ferita aperta con acqua o prodotti ittici o con l'ingestione di alimenti contaminati. A particolare rischio di forme gravi sono esposti i soggetti immunocompromessi, soprattutto quelli con epatopatie croniche preesistenti (cirrosi), diabete, leucemia, neoplasie polmonari, AIDS, asma. In tali soggetti il microrganismo ha la capacità di attraversare la mucosa intestinale ed invadere il torrente circolatorio. Il quadro clinico, ad insorgenza brusca, è, in questi casi, caratterizzato da febbre, spesso seguita da ipotensione (33%) e da comparsa di lesioni metastatiche cutanee (75%). Queste lesioni sono inizialmente eritematose e rapidamente evolvono in bolle e vescicole emorragiche e, successivamente, in ulcere necrotiche. La batteriemia da *V. vulnificus* è fatale in circa il 50% dei pazienti.

Nei soggetti sani, in seguito al contatto di ferite aperte con acqua di mare contaminata, *V. vulnificus* può determinare celluliti e vasculiti necrotizzanti con formazione di ulcere spesso associate a batteriemia. In tali soggetti l'ingestione di alimenti contaminati può determinare lo sviluppo di una forma diarroica.

3.8.2. *Modalità di trasmissione* - Per quanto concerne le infezioni delle ferite, la trasmissione avviene generalmente in seguito all'esposizione della lesione aperta all'ambiente marino o a prodotti ittici contaminati. Le altre forme patologiche insorgono generalmente dopo il consumo di un alimento crudo (generalmente frutti di mare, crostacei, etc.) o non sottoposto ad adeguata cottura. I casi di gastroenterite insorgono in media 16 ore dopo l'ingestione dell'alimento contaminato, mentre la setticemia insorge

dopo alcuni giorni. Tutti i soggetti che consumano alimenti contaminati con questo microrganismo sono suscettibili a contrarre le forme gastroenteriche.

3.8.3. Prospettive di prevenzione - Dal momento che *V. vulnificus* è probabilmente parte della flora normale dell'acqua marina nei climi temperati, non esistono misure efficaci di prevenzione nei soggetti esposti per attività lavorativa o ricreazionale se non quella di evitare il contatto delle ferite superficiali aperte con acqua di mare. A causa dell'elevato tasso di mortalità nelle forme setticemiche è fondamentale che i soggetti predisposti, particolarmente se affetti da cirrosi epatica, evitino il consumo di prodotti ittici crudi o poco cotti.

3.9. *V. alginolyticus*

Come gli altri *Vibrio* alofili, ha una diffusione ubiquitaria nell'ambiente marino. Nelle zone temperate riesce a raggiungere concentrazioni sufficienti a determinare effetti patologici solo nei periodi più caldi dell'anno. E' anche considerato patogeno per alcuni pesci.

3.9.1. Caratteristiche dell'infezione - E' associato ad infezioni dei tessuti molli e di ferite, nonché ad infezioni uditive e, meno frequentemente, oculari. *V. alginolyticus*, al pari di *V. vulnificus*, può occasionalmente causare batteriemie spesso fatali in soggetti immunocompromessi. Il suo meccanismo patogenetico non è ancora chiarito.

3.9.2. Modalità di trasmissione - Generalmente è riferita una esposizione di ferite aperte all'acqua di mare, un trauma in ambiente marino o anche la semplice attività natatoria in mare (infezioni uditive e oculari).

3.9.3. Prospettive di prevenzione - Dal momento che *V. alginolyticus* fa probabilmente parte della flora autoctona dell'acqua marina delle zone temperate, non esistono misure efficaci di profilassi nei soggetti esposti per attività lavorativa, ludica o ricreazionale.

3.10. Altri *Vibrio* a prevalente tropismo extraintestinale (*V. damsela*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis* e *V. carchariae*)

Sono tutte specie ampiamente diffuse in ambiente marino ed isolate da campioni di acqua di mare e da prodotti ittici, soprattutto pesci. *V. damsela* è responsabile di alcune lesioni cutanee nei pesci, anche in acquari tropicali domestici. *V. carchariae* è stato isolato da squali.

3.10.1. Caratteristiche dell'infezione - *V. damsela* può determinare infezioni di ferite anche se il suo ruolo causale deve essere ulteriormente documentato.

Il primo isolamento clinico di *V. metschnikovii* risale al 1981 dall'emocoltura di una anziana donna con peritonite e infezione della cistifellea. Sono segnalati anche alcuni isolamenti da campioni di urina e da ferite cutanee. Sono necessari ulteriori studi per stabilire con certezza il significato clinico di questo microrganismo.

V. cincinnatiensis è stato per la prima volta isolato nel 1986 da un caso di batteriemia e meningite.

V. carchariae è stato isolato da ferite provocate da morsi di squali.

3.10.2. Modalità di trasmissione - L'infezione da *V. damsela* si trasmette probabilmente per contatto di lesioni aperte con acqua di mare contaminata o pesci infetti.

Per quanto riguarda *V. metschnikovii* probabilmente la sua diffusione nell'ambiente marino può favorire il contatto con l'uomo che, occasionalmente, soprattutto in caso di deficit immunitario, può sviluppare forme patologiche.

La trasmissione all'uomo dell'infezione da *V. cincinnatiensis* avviene probabilmente per contatto con acque contaminate, mentre quella da *V. carchariae* si verifica con il morso di squali.

3.10.3. Prospettive di prevenzione - Non esistono efficaci misure di profilassi nei soggetti potenzialmente esposti.

3.11. Resistenza agli antimicrobici

L'approccio terapeutico al paziente colerico è principalmente e soprattutto legato alla somministrazione di liquidi ed elettroliti, in quanto la terapia antibiotica non rappresenta un presidio terapeutico fondamentale come in altre infezioni batteriche. Questo concetto è applicabile anche alle infezioni intestinali da *V. cholerae* non - O1 e da altri *Vibrio*, dove spesso l'andamento della malattia non è influenzata dalla somministrazione di antibiotici e chemioterapici. Nelle più rare forme extraintestinali, invece, anche in assenza di una provata efficacia, la somministrazione a dosi elevate di antibiotici rappresenta un momento terapeutico irrinunciabile, soprattutto nei casi ad andamento ingravescente e nei pazienti immunodepressi.

Le tetracicline (tetraciclina, doxiciclina) sono state i primi antibiotici utilizzati massivamente per il trattamento del colera e delle altre infezioni da *Vibrio* e rimangono tutt'oggi tra i farmaci più utilizzati. In alternativa possono essere impiegati l'eritromicina, il furazolidone, il trimetoprim-sulfametossazolo, il cloramfenicolo e, più recentemente, i nuovi chinolonici (norfloxacina). Tuttavia, nel corso degli ultimi venti anni sono stati sempre più frequenti gli isolamenti di ceppi resistenti alle tetracicline ed ai sulfamidici. Ad esempio, tutti i ceppi di *V. cholerae* O1 isolati in Italia nel corso del focolaio del 1994 erano resistenti alle tetracicline e al trimetoprim-sulfametossazolo; le infezioni da ceppi multiresistenti possono essere trattate con la norfloxacina ed, eventualmente, con gli altri nuovi chinolonici. E', comunque, di fondamentale importanza la valutazione in vitro della antibiotico-resistenza al fine di instaurare o di modificare una terapia in atto.

Sostanze ad azione antimicrobica nei confronti di *Vibrio* spp. sono state utilizzate anche a fini diagnostici. In particolare, la sensibilità al composto vibriostatico O/129 (2,4-diamino-6,7 diisopropil-pteridina fosfato) è stata sempre considerata una caratteristica distintiva dei batteri appartenenti al genere *Vibrio* ed utilizzata come test per differenziarli da altri microrganismi (*Aeromonas*, *Pseudomonas*, etc.). Attualmente, il crescente isolamento di *Vibrio* spp. resistenti al vibriostatico limita notevolmente l'importanza e l'applicabilità di questo test ai fini diagnostici. Ad esempio, fino ad oggi, tutti i ceppi di *V. cholerae* O139 isolati sono risultati resistenti al composto O/129.

4. PRELIEVO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

4.1. Prelievo dei campioni clinici

La maggior parte delle infezioni da *Vibrio* spp. sono localizzate a livello intestinale, pertanto verranno descritte in maniera più dettagliata le procedure relative a questi campioni clinici. Tuttavia, poichè i *Vibrio* possono causare anche infezioni extraintestinali (suppurazione di ferite, infezioni oculari ed uditive, setticemie, meningiti, polmoniti, etc.) verranno accennate anche le problematiche relative ai campioni extraintestinali.

4.1.1. Campioni extraintestinali. - Non sono richieste specifiche procedure o tecniche per il prelievo di campioni di origine extraintestinale da sottoporre alla ricerca di *Vibrio* spp. E' comunque preferibile, se possibile, il prelievo diretto di pus, fluidi corporei o tessuti, rispetto all'uso di tamponi. Il materiale prelevato deve essere protetto dall'essiccazione ed inoculato sui terreni colturali il più rapidamente possibile. Nel caso vengano utilizzati i tamponi, è indispensabile, per il trasporto in laboratorio, utilizzare un idoneo terreno di mantenimento, al fine di evitare il disseccamento del prelievo (vedi paragrafo 4.2.).

4.1.2. Campioni di feci. - I campioni di feci devono essere prelevati il più precocemente possibile, preferibilmente entro le prime 24 ore dall'insorgenza dei segni della malattia e prima che al paziente venga somministrato qualsiasi antibiotico.

Per l'esame colturale si può procedere sia al prelievo diretto delle feci con un idoneo contenitore sterile, sia al prelievo mediante l'uso di tamponi sterili. Il prelievo delle feci liquide può essere facilitato dall'inserimento di un catetere in gomma, sterile e lubrificato, nel retto. L'utilizzo dei tamponi nella fase acuta della malattia è altrettanto efficace, ma particolare cura deve essere posta nel prelevare anche il muco presente sulle pareti del retto e non limitarsi alla superficie perianale. Alcuni Autori consigliano l'utilizzo di tamponi in fibra di poliestere. Nei pazienti convalescenti o in quelli in fase asintomatica è preferibile il prelievo delle feci intere rispetto ai tamponi. Inoltre, è stato riportato un incremento nel numero di isolamenti dopo somministrazione di lassativi nei soggetti che eliminano pochi Vibrioni con le feci. Anche il vomito, se disponibile, può essere utilizzato per l'analisi microbiologica.

4.2. Trasporto dei campioni clinici

I campioni devono essere inoculati su terreni colturali al più presto, lasciando trascorrere il minor tempo possibile tra prelievo e semina. La vitalità di *Vibrio* è assicurata da un pH alcalino, tipico delle feci liquide "ad acqua di riso" dei pazienti affetti da colera, ma non è valutabile nelle feci formate. Di estrema importanza è la

considerazione che i Vibrioni sono molto sensibili alla disidratazione, pertanto il prelievo va accuratamente protetto da tale evenienza. Se è previsto un certo periodo di tempo tra il prelievo e la semina e soprattutto se il campione viene spedito, il tampone rettale o il materiale fecale deve essere posto in acqua peptonata alcalina con 1 - 3% di NaCl (per una semina ritardata al massimo di 8 ore) o nel terreno semisolido di trasporto di Cary and Blair (per un tempo di conservazione di più di 8 ore), che assicura una sopravvivenza di *Vibrio* spp. per più 4 settimane. In caso di indisponibilità di un idoneo terreno di trasporto, strisce di carta bibula possono essere intinte nelle feci liquide e conservate in bustine di plastica accuratamente chiuse per impedire l'entrata di aria; così mantenuti, i campioni di feci possono essere conservati per più di 5 settimane.

I campioni, prelevati e posti in terreno di trasporto, possono essere conservati ed inviati al laboratorio senza refrigerazione, attenendosi comunque a tutte le normali disposizioni per la spedizione e la conservazione di materiale potenzialmente patogeno.

4.3. Campioni alimentari

Oltre all'acqua, considerata la principale fonte di diffusione di *V. cholerae*, anche gli alimenti possono rivestire un importante ruolo nella trasmissione dei Vibrioni patogeni all'uomo. Diversi studi epidemiologici hanno confermato il ruolo degli alimenti (frutti di mare, carne, latte, riso, frutta, etc.) nella diffusione dell'infezione, soprattutto colerica, con modalità di contaminazione dei cibi diverse, potendo questa avvenire sia all'origine, sia successivamente durante le fasi di manipolazione e preparazione degli alimenti. Di particolare pericolosità sono gli alimenti di origine ittica e soprattutto i molluschi che, insieme ai crostacei, ai cefalopodi e ad alcuni tipi di pesce, permettono la sopravvivenza di *Vibrio* per alcune settimane, soprattutto se conservati a temperature di frigorifero.

Per l'analisi è necessario campionare una quantità sufficiente di alimento, rappresentativa di tutto il lotto da analizzare e, soprattutto nel caso di prodotti ittici (pesce, molluschi, crostacei), è importante disporre dell'animale intero da utilizzare così com'è o parzialmente. Per quanto riguarda i pesci è preferibile utilizzare i tessuti superficiali, l'intestino e le branchie; per i molluschi è necessario campionare l'intero animale, facendo attenzione a prelevare anche il liquido presente all'interno delle valve; anche per i crostacei è consigliabile utilizzare l'animale intero e se ciò non è possibile, va prelevata 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. Ciò favorisce la sopravvivenza dei Vibrioni presenti e impedisce lo sviluppo incontrollato della microflora marina indigena e di eventuali altri batteri patogeni. Nonostante sia accertata la labilità di *Vibrio* a condizioni estreme di riscaldamento o refrigerazione, nell'eventualità che il campione debba necessariamente essere congelato, si raccomanda, se possibile, la conservazione a temperature di -80°C.

4.4. Campioni ambientali (acque superficiali)

L'habitat naturale dei Vibrioni è l'ambiente acquatico ed in particolare quello marino e quello degli estuari. *V. cholerae* può essere isolato da acque temperate, subtropicali e tropicali di tutto il mondo, ma sembra scomparire dalle acque temperate durante la stagione fredda.

Per eseguire il campionamento è essenziale che l'acqua venga raccolta con bottiglie sterili, preferibilmente utilizzando una apposita pinza per reggere la bottiglia durante il prelievo; questa va immersa con l'apertura rivolta in direzione opposta alla corrente dell'acqua, se questa è apprezzabile. Il campionamento va eseguito ad una profondità di 25 - 30 cm dalla superficie immergendo la bottiglia con l'apertura rivolta verso il basso e, quindi, ruotandola una volta raggiunta la profondità voluta. L'analisi va eseguita il prima possibile e comunque nell'ambito della stessa giornata del campionamento; se ciò fosse assolutamente impossibile, i campioni devono essere conservati in condizioni di media refrigerazione e comunque a temperature comprese tra 4°C e 10°C.

5. ISOLAMENTO DI *VIBRIO* spp.

5.1. Considerazioni generali

I Vibrioni, come molti altri batteri Gram-negativi, riescono a crescere bene in presenza di livelli relativamente alti di sali biliari; inoltre essi sono batteri aerobi facoltativi e crescono bene in terreni colturali con pH alcalino. Il TCBS (tiosolfato-citrato-sali biliari-saccarosio) si è dimostrato un eccellente terreno colturale per l'isolamento di *Vibrio*, in particolare per *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Infatti il TCBS, che è raccomandato come il miglior terreno colturale utilizzabile da solo per l'isolamento di *Vibrio* spp. da campioni clinici umani, favorisce la crescita di queste specie inibendo la maggior parte dei non-*Vibrio*. È importante sottolineare che possono esserci notevoli variazioni tra i vari lotti di produzione del TCBS e tra i lotti dei vari produttori. È, pertanto, consigliata, almeno inizialmente, la verifica delle singole confezioni di terreno di coltura, associando sempre la semina di ceppi batterici di riferimento in parallelo ai campioni da analizzare.

Sfruttando la capacità dei Vibrioni di ben tollerare un ambiente alcalino, un buon brodo di arricchimento a pH elevato, normalmente utilizzato nei laboratori, è "l'acqua peptonata alcalina" (Alkaline Peptone Water, APW pH 8,4 - 8,6); in effetti, l'APW fornisce un ottimo substrato di arricchimento per *V. cholerae* solo per periodi di incubazione che non eccedono le 6-8 ore, in quanto periodi più lunghi permettono alla microflora competitiva presente in alcuni tipi di campioni (es. i mitili) di crescere più dello stesso Vibrione colerico. Tempi di incubazione di 16 - 18 ore (incubazione "overnight") possono essere un buon compromesso al fine di facilitare lo svolgimento della routine di laboratorio nelle normali ore di lavoro. Il brodo Tellurito - Sali biliari (pH 9,0 - 9,2) è un terreno di arricchimento maggiormente selettivo e può essere incubato overnight senza particolari problemi.

5.2. Campioni extraintestinali

Generalmente i campioni clinici di origine extraintestinale sono analizzati senza particolare attenzione per la ricerca di *Vibrio*; comunque, le 12 specie di importanza medica crescono bene sui comuni terreni colturali quali l'agar sangue (dove le colonie di *Vibrio* possono presentarsi come beta, alfa o non-emolitiche), l'agar cioccolato, il Nutrient Agar (NA) e il Mueller-Hinton agar e molti riescono a crescere anche sul MacConkey agar. Una mirata e minuziosa ricerca di *Vibrio* spp. deve però essere fatta saggiando le colonie per l'ossidasi o utilizzando un terreno selettivo e differenziale come, ad esempio, il TCBS. Se l'indagine è orientata all'isolamento di Vibrioni dal circolo ematico, è bene ricordare che *V. cholerae* sierogruppo 01 raramente riesce ad invadere e moltiplicarsi nel torrente circolatorio (vedi Tabella 3) poiché manca della capsula batterica; infatti sono stati riportati solo pochi casi di batteremia da *V. cholerae*

01. Nei pazienti affetti da colera il verificarsi di una batteremia è generalmente imputabile a infezioni nosocomiali, generalmente causate dalla contaminazione delle soluzioni o dei cateteri usati per le infusioni endovenose.

5.3. Campioni di feci

Le specie di *Vibrio* non sono in grado di crescere su molti dei terreni colturali selettivi e differenziali usati normalmente per la ricerca degli Enterobatteri, ma, come già detto, molti crescono su MacConkey agar o su MacConkey agar al sorbitolo. Su MacConkey agar le colonie di *Vibrio* sono generalmente lattosio-negative (vedi Tabella 8) con la possibile eccezione di *V. vulnificus*. Le colonie sospette sviluppatasi su questi o su altri terreni non specifici per *Vibrio* spp., vanno testate per l'ossidasi; è importante sottolineare che le colonie dei rari ceppi lattosio-positivi cresciute su terreni selettivi-differenziali possono dare dei risultati falsamente negativi alla prova dell'ossidasi. In caso di evidenze epidemiologiche e/o di chiari segni patognomici nel paziente, è possibile operare un metodo di screening rapido dei campioni fecali, effettuando una agglutinazione al lattice (*Vibrio cholerae* AD "SEIKEN", DENKA SEIKEN CO., LTD, Tokyo, Japan; ancora non disponibile in commercio in Italia) per l'identificazione di *V. cholerae* 01 direttamente sulle feci liquide, sebbene una coltura positiva è sempre necessaria per la diagnosi definitiva di infezione colerica (Figura 1).

E' inoltre possibile eseguire una colorazione di Gram direttamente sulle feci liquide cercando di evidenziare le classiche forme batteriche incurvate; va comunque precisato che, a causa del forte pleomorfismo di *Vibrio*, anche la sola colorazione di Gram non è accettabile e sufficiente per la diagnosi di colera.

In effetti, per la ricerca dei Vibrioni, il MacConkey agar può essere sufficiente per le esigenze di molti laboratori dislocati, geograficamente, nelle zone interne, dove le infezioni da *Vibrio* spp. dovrebbero essere piuttosto rare; non così nelle aree costiere e soprattutto durante le stagioni calde quando, per migliorare l'isolamento di *Vibrio* spp., è opportuno inserire nella normale batteria di terreni colturali anche una piastra di TCBS. E' importante ribadire che, soprattutto per motivi economici e di tempo, la prova dell'ossidasi sulle colonie sospette ed in particolare l'uso del TCBS in aggiunta ai normali terreni di coltura, va valutata alla luce di acquisizioni epidemiologiche sull'esposizione del paziente a potenziali sorgenti di infezione. Inoltre, sul TCBS non tutte le specie di *Vibrio* di importanza clinica crescono in maniera ottimale ed in particolare stenta a crescere *V. hollisae*, per la cui ricerca è preferibile l'uso di agar-sangue o di un agar al mannitolo-maltosio, incubato a 35 - 37°C per 18 - 24 ore. Quelle specie che crescono bene su TCBS possono formare colonie gialle o verdi, a seconda della capacità o meno di utilizzare il saccarosio presente nella formulazione (Tabella 6).

I batteri enterici, come i coliformi e i *Proteus*, che normalmente fanno parte della flora microbica dei campioni fecali, sono generalmente inibiti; infatti, solo rari ceppi di *Proteus* e di enterococchi riescono a crescere su TCBS formando piccole colonie,

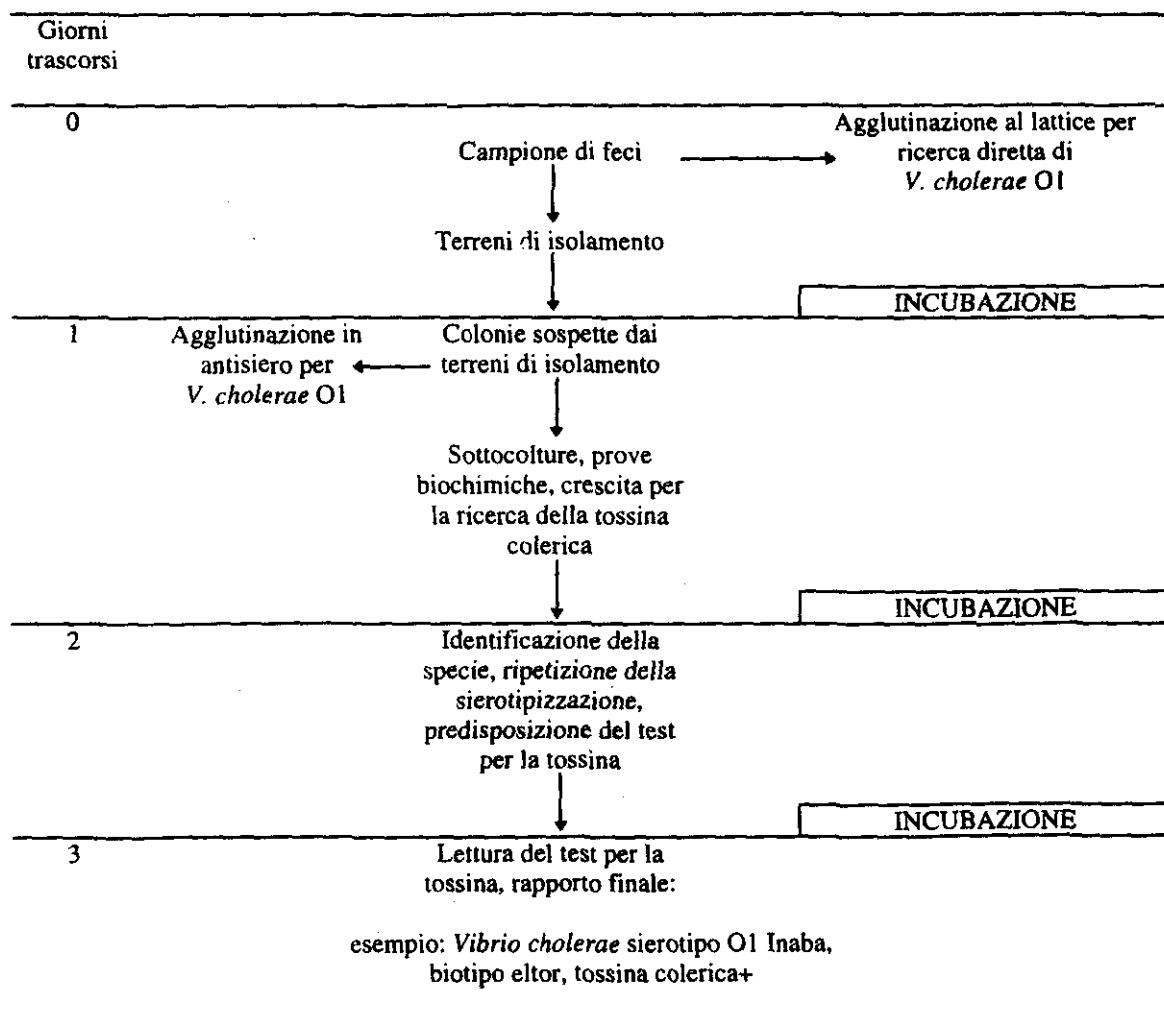


Figura 1. - Esempio di un possibile piano operativo con metodiche rapide per l'isolamento e l'identificazione di *V. cholerae*.

generalmente incolori, facilmente distinguibili. Per incrementare ulteriormente l'isolamento dei Vibriani è consigliato, in alternativa o in parallelo alla semina diretta dei campioni fecali, procedere ad un arricchimento selettivo, inoculando circa 1 grammo di materiale fecale (o il tampone, a seconda di cosa si ha a disposizione) in 20 ml di APW da incubare a 37°C per 5 - 8 ore; è possibile effettuare anche un arricchimento secondario inoculando 1 o 2 ml dell'arricchimento primario in altri 20 ml di APW. Al termine dell'incubazione si può procedere con la semina su TCBS, prelevando con un'ansa sterile (3 - 5 mm di diametro) dalla superficie della brodocoltura e strisciando sul terreno solido in maniera tale da ottenere colonie ben isolate (Figura 2).

Tabella 6. - Capacità di crescita e aspetto delle colonie di *Vibrio* spp. su agar TCBS.

Microorganismo	Aspetto delle colonie su TCBS (%) ^a		Capacità di crescita su TCBS
	Verdi	Gialle	
<i>V. cholerae</i>	0	100	Buona
<i>V. mimicus</i>	100	0	Buona
<i>V. metschnikovii</i>	0	100	Può essere ridotta
<i>V. hollisae</i>	100	0	Molto ridotta
<i>V. damsela</i>	95	5	Ridotta a 36°C
<i>V. fluvialis</i>	0	100	Buona
<i>V. furnissii</i>	0	100	Buona
<i>V. alginolyticus</i>	0	100	Buona
<i>V. parahaemolyticus</i>	99	1	Buona
<i>V. vulnificus</i>	90	10	Buona
<i>V. carchariae</i>	0	100	Buona
<i>V. cincinnatiensis</i>	0	100	Molto ridotta
Vibrioni marini	Variabile	Variabile	Variabile

^aPercentuale di ceppi che producono colonie gialle o verdi.

5.4. Campioni alimentari

Per l'analisi dei campioni alimentari (Figura 3) vanno prelevati, asepticamente, 25 grammi dell'alimento da analizzare (vegetali, prodotti ittici, etc.) e posti in un idoneo contenitore sterile. Se l'analisi riguarda molluschi bivalvi, è necessario, prima di procedere alla loro apertura, pulire accuratamente la superficie esterna delle valve mediante un energico spazzolamento seguito da un accurato risciacquo con abbondante acqua distillata sterile. Al campione vanno aggiunti 225 ml di APW, quindi il tutto viene omogeneizzato per almeno 1 - 2 minuti ad alta velocità (10.000 - 14.000 rpm); è possibile anche tagliare il campione (soprattutto vegetali e pesci) in pezzi piccolissimi utilizzando bisturi o coltelli molto affilati. Per migliorare la sensibilità del metodo, in parallelo, si può procedere con un secondo tipo di arricchimento utilizzando, però, 225 ml di brodo GSB (Gelatin Salt Broth). Una volta omogenato o tritato l'alimento nel terreno di arricchimento, mescolare accuratamente la brodocoltura agitandola ripetutamente in senso orario e in senso antiorario, quindi mettere il tutto ad incubare a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 6 - 8 ore per la ricerca di *V. cholerae* e per 18 - 24 ore per la ricerca in generale di *Vibrio*.

Per la ricerca mirata di *V. cholerae* è opportuno allestire una terza brodocoltura in APW da incubare per 6 - 8 ore a $42^\circ \pm 0,2^\circ\text{C}$, possibilmente a bagnomaria. Comunque, indipendentemente dalla temperatura di incubazione, se il campione alimentare di partenza era congelato o comunque processato, allora è opportuno, anche per *V. cholerae*, prolungare l'incubazione ed eseguire una seconda semina su piastra dopo un tempo totale di incubazione di 16 - 24 ore.

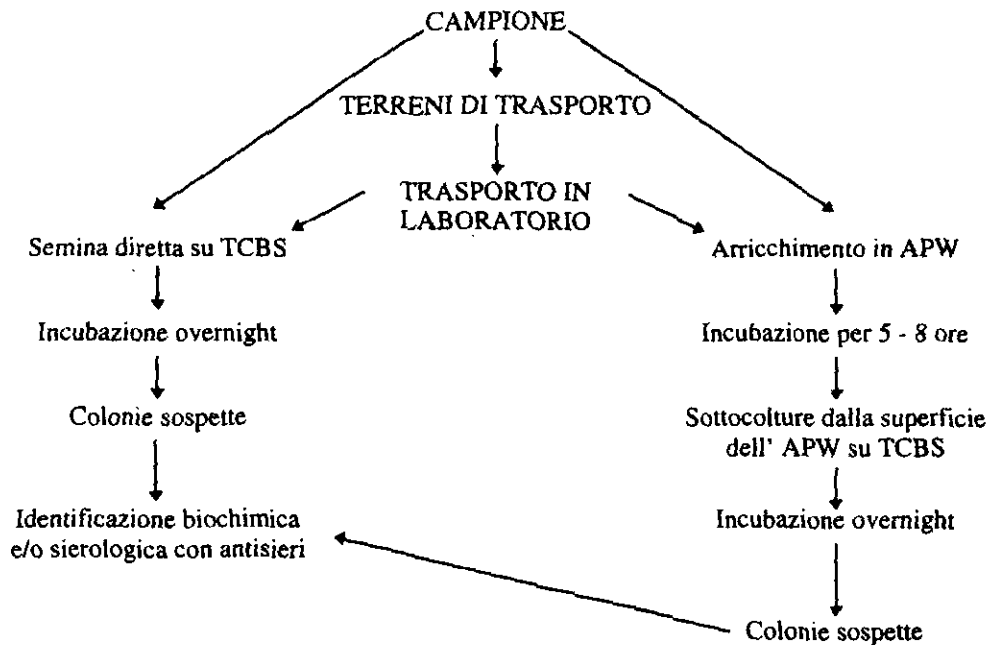
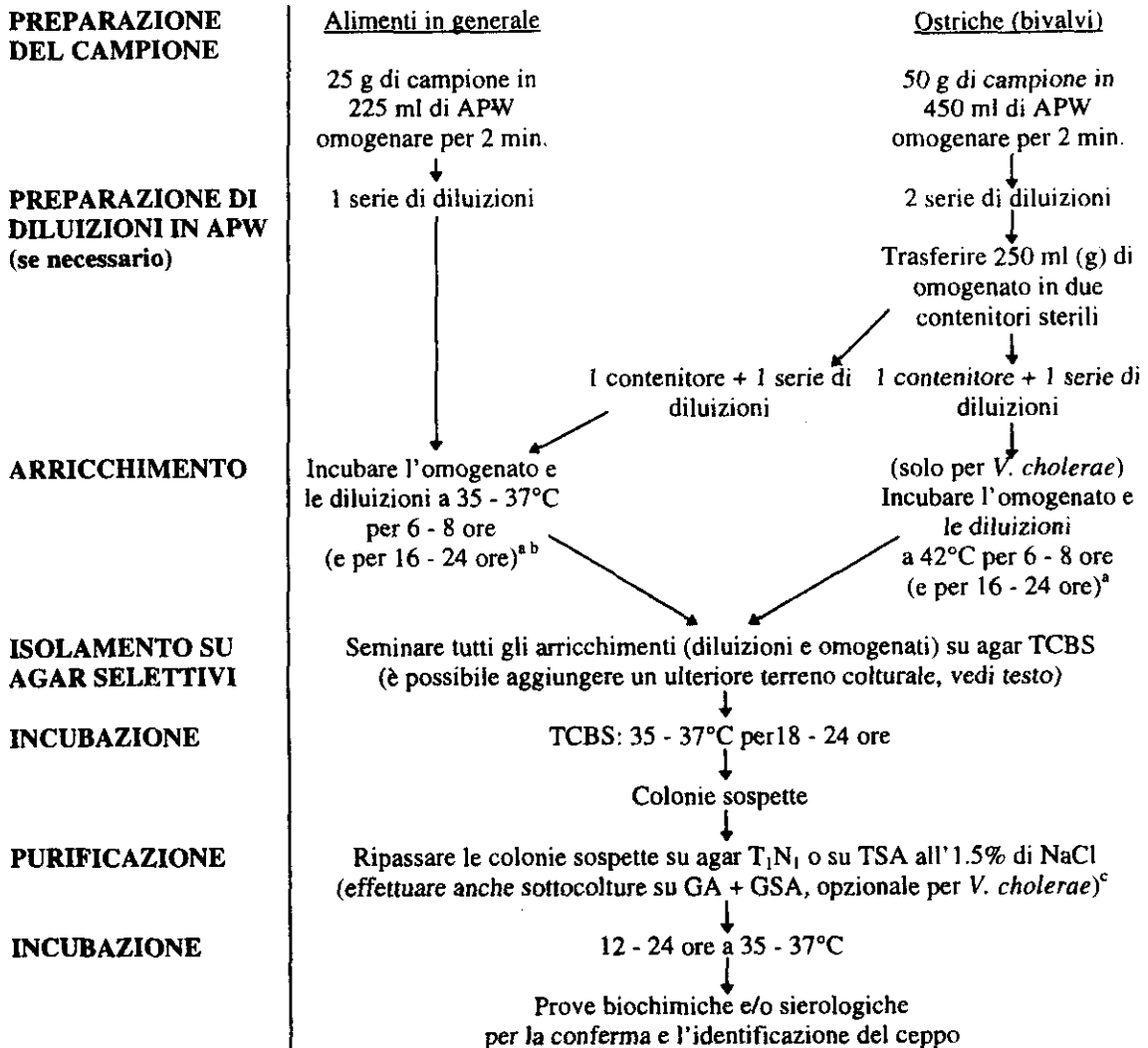


Figura 2. - Schema a flusso per l'isolamento di *Vibrio* spp. da campioni di feci.

Se l'alimento da sottoporre ad analisi per la ricerca di *Vibrio* spp. sono ostriche o, più in generale, molluschi bivalvi, è preferibile, disponendo di una quantità sufficiente di molluschi, pesare ed omogenare circa 200 grammi di campione, quindi prelevarne 25 grammi per la brodocoltura. Approssimativamente bisogna utilizzare 10 - 12 ostriche di taglia media e 20 - 50 bivalvi di piccola taglia.

Per l'isolamento su terreno solido, predisporre piastre asciutte di TCBS, a cui si può affiancare un terreno non selettivo, come ad esempio un Gelatin agar (GA) (non valido per la ricerca degli alofili e quindi utile soprattutto per *V. cholerae* e *V. mimicus*), o un Gelatin Salt Agar (GSA). Dopo l'incubazione, prestando la massima attenzione a non agitare i contenitori con le brodocolture, trasferire una ansata di inoculo (con ansa di 3 - 5 mm di diametro), prelevato dalla pellicola superficiale di crescita, sull'agar TCBS ed eventualmente sull'agar GA o sul GSA e distribuire il tutto in modo da ottenere colonie ben isolate (tecnica di semina a quattro quadranti, Figura 4). I terreni così inoculati vanno incubati a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e letti dopo 18 - 24 ore.

Alcuni campioni alimentari (vegetali, prodotti ittici, etc.) possono essere fortemente contaminati da Enterobatteri. In tal caso la crescita di questi microrganismi interferenti può ostacolare lo sviluppo e l'isolamento dei Vibrioni eventualmente presenti. E', quindi, possibile predisporre una diluizione finale di 1:100 del campione (ad esempio, 25 grammi di omogenato in 225 ml di APW ed il tutto in altri 2250 ml di APW) e proseguire con l'analisi come già descritto. Inoltre, al fine di ridurre una possibile competizione tra i Vibrioni non colerici con quelli colerici, è possibile anche effettuare diluizioni scalari di 1:100 e di 1:1000 ed oltre ponendo, ad esempio, 10 ml di omogenato in 90 ml di APW (o 1 ml in 9 ml).



^aSolo per alimenti congelati o comunque trattati: seminare su agar sia dopo 6 - 8 ore di incubazione, sia dopo 16 - 24 ore.

^bSe è prevista la ricerca di altre specie di *Vibrio* diverse da *V. cholerae*, seminare su agar dopo 16 - 18 ore.

^cLe specie di *Vibrio* alofile, non crescono su GA

Figura 3. - Diagramma schematico per l'isolamento di *Vibrio cholerae* e di *Vibrio* spp. da campioni alimentari.

Se è necessario valutare l'MPN (Most Probable Number) è possibile omogenare l'alimento utilizzando PBS (Phosphate buffered saline) a pH 7,2 - 7,5, predisponendo delle diluizioni a scalare di 1:10, inoculando una serie di 3 tubi di APW e seminando, dopo idonea incubazione, dalla superficie di ogni tubo su TCBS per valutare la presenza o l'assenza di *Vibrio* spp.

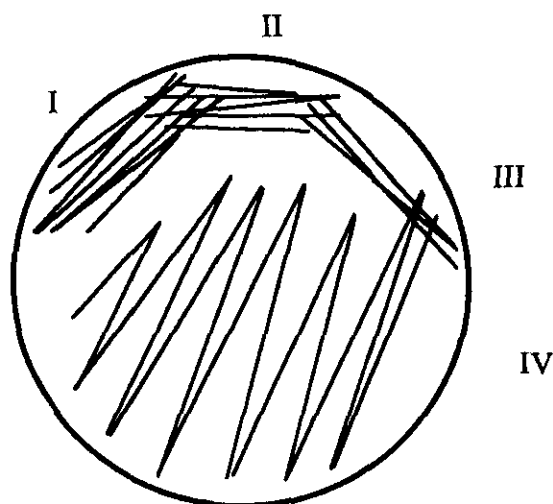


Figura 4. - *Tecnica di semina a quattro quadranti (indicati dai numeri romani). Sterilizzare l'ansa ad ogni cambio di quadrante.*

5.5. Campioni ambientali (acque superficiali)

L'isolamento dei Vibrioni dalle acque superficiali si effettua mediante la tecnica della filtrazione, utilizzando membrane filtranti con porosità di $0,45\ \mu\text{m}$ (esempio Millipore, Sartorius, etc.). Filtrare sterilmente 1000 ml di acqua, quindi porre la membrana in un contenitore sterile contenente 100 ml di APW ed incubare a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 6 - 8 ore per la ricerca di *V. cholerae*, per 16 - 24 ore per la ricerca delle altre specie di *Vibrio*.

Per la ricerca mirata di *V. cholerae* è possibile allestire un'altra brodocoltura di arricchimento da incubare a $42 \pm 0,2^\circ\text{C}$ per 6 - 8 ore. Al termine dell'incubazione seminare su TCBS come già descritto precedentemente.

6. IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA

6.1. Aspetto delle colonie di *Vibrio* spp. sui terreni solidi di isolamento

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* spp. possono apparire più o meno grandi, sia gialle che verdi, a seconda della capacità del ceppo di utilizzare o meno il saccarosio (vedi Tabella 6 e Tabella 7); è importante notare che alcuni ceppi di microrganismi correlati, come ad esempio *Aeromonas hydrophila*, riescono a crescere bene su questo terreno, sviluppando colonie simili a quelle di *Vibrio* spp.

Tabella 7. - Aspetto delle colonie di *Vibrio* spp. e di altri microrganismi su agar TCBS dopo 24 ore di incubazione a 35 - 37°C.

Specie	Aspetto delle colonie
<i>V. cholerae</i>	Gialle, piatte, larghe con diametro 2 - 3 mm
<i>V. parahaemolyticus</i>	Blu - verdi, soprattutto al centro, diametro 3 - 5 mm
<i>V. alginolyticus</i>	Gialle, larghe, diametro 3 - 5 mm
<i>V. metschnikovii</i>	Gialle, diametro 3 - 4 mm
<i>V. fluvialis</i>	Gialle, diametro 2 - 3 mm
<i>V. vulnificus</i>	Blu - verdi, diametro 2 - 3 mm
<i>V. mimicus</i>	Blu - verdi, diametro 2 - 3 mm
<i>Enterococcus</i> spp.	Generalmente inibite; se crescono, le colonie appaiono piccole, gialle o traslucide
<i>Proteus</i> spp.	Generalmente inibite; se crescono, le colonie appaiono piccole, gialle - verdi o traslucide
<i>Pseudomonas</i> spp ed <i>Aeromonas</i> spp.	Generalmente inibite; se crescono, le colonie appaiono piccole, blu - verdi

La lettura delle piastre di TCBS deve essere effettuata immediatamente dopo averle tolte dall'incubatore, poiché, se lasciate a temperatura ambiente o anche in frigorifero, le colonie gialle tendono a diventare verdi. Su terreni non selettivi a base di gelatina, l'identificazione sfrutta la capacità di alcune specie di *Vibrio* di idrolizzare tale componente formando un alone intorno alla colonia (Tabella 8). Su agar sangue le varie specie di *Vibrio* possono presentarsi come alfa, beta o non emolitiche, mentre su agar MacConkey generalmente sono lattosio-negative (vedi paragrafo 5.3). 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; su GA appaiono trasparenti e generalmente presentano una zona opaca o torbida intorno che si accentua ponendo le piastre per alcuni minuti in frigorifero; guardate in luce obliqua, le colonie di *V. cholerae* appaiono iridescenti, di colore da verde a bronzo e finemente granulati; su GSA le colonie sono piccole e trasparenti con un alone torbido od opaco.

Per l'isolamento di *V. hollisae* che, come già detto (vedi paragrafo 5.3), cresce male su TCBS, è preferibile utilizzare un agar al mannitolo-maltosio, non selettivo, su cui le colonie sospette presentano aspetto rotondeggiante, lucido-brillante, color porpora (non-mannitolo e non-maltosio fermentanti), mentre altre specie di *Vibrio* sono gialle (produzione di acido dal mannitolo e/o dal maltosio).

Ovviamente, su di un terreno non selettivo, la crescita concomitante di altri batteri può rappresentare un serio problema. Inoltre, possono essere presenti ceppi sciamanti che diffondono in tutta la piastra, inconveniente che può essere risolto aumentando al 4% la concentrazione di agar nei terreni solidi di isolamento.

6.2 Caratterizzazione biochimica delle colonie isolate di *Vibrio* spp.

Per una completa caratterizzazione biochimica degli isolati sono necessarie decine di prove di laboratorio (Tabella 8) che, tranne in un centro di riferimento, non sono proponibili in un normale laboratorio di microbiologia clinica, alimentare o ambientale.

Tabella 8. - Caratteristiche biochimiche che differenziano le specie di *Vibrio* isolate da campioni clinici.

Caratteristiche	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. carchariae</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
Produzione di indolo	[+]	+	-	-	[-]	[-]	+	+	[-]	+	+	+
Rosso metile	d	+	+	+	+	+	-	-	+	+	[+]	[+]
Voges-Proskauer	+	d	-	+	-	-	d	-	+	-	-	-
Citrato, Simmons	-	+	[-]	-	+	+	-	-	d	+	-	d
Produzione di H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Idrolisi dell'urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[-]	-
Fenilalanina deaminasi	-	-	-	-	-	-	NC	-	-	-	-	d
Lisina decarbossilasi	+	+	+	d	-	-	+	-	d	+	-	+
Arginina diidrolasi	-	-	-	+	+	-	-	-	d	-	+	-
Ornitina decarbossilasi	d	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	d
Motilità	+	+	+	d	+	+	-	-	d	+	+	+
Idrolisi della gelatina (22°C)	+	+	-	-	[+]	[+]	-	-	d	d	+	d
KCN, crescita	[-]	-	-	-	d	[+]	-	-	-	-	[-]	-
Utilizzazione del malonato	-	-	-	-	-	[-]	-	-	-	-	-	-
Produzione di gas da D-Glucosio	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

(continua)

Tabella 8. - (continua)

Caratteristiche	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. carchariae</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
Produzione di acido da:												
D-Glucosio	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+
Adonitolo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinosio	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	[+]	-
D-Arabitolo	-	-	-	-	d	[+]	-	-	-	-	-	-
Cellobiosio	-	-	+	-	d	[-]	d	-	-	-	-	+
Dulcitololo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritolo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galattosio	[-]	+	+	+	+	+	-	+	d	[+]	+	+
Glicerolo	[+]	d	+	-	-	d	-	-	+	[-]	d	-
<i>mio</i> -Inositolo	-	-	+	-	-	-	-	-	d	-	-	-
Lattosio	-	-	-	-	-	-	-	-	d	[-]	-	[+]
Maltosio	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Mannitolo	+	+	+	-	+	+	d	-	+	+	+	d
Mannosio	+	[+]	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+
Melibiosio	-	-	-	-	-	[-]	-	-	-	-	-	d
α -CH ₂ -D-Glucoside	-	-	d	-	-	-	-	-	[-]	-	-	-
Raffinosio	-	-	-	-	-	[-]	-	-	-	-	-	-
L-Ramnosio	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Sorbitolo	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-
Saccarosio	+	+	+	-	+	+	d	-	+	-	-	[-]
Trealosio	+	+	+	[+]	+	+	d	-	+	+	+	+
D-Xilosio	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tartrato, Jordans	+	[+]	+	-	d	[-]	d	d	d	[-]	+	[+]
Idrolisi dell'esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	d
Utilizzazione dell'acetato	-	+	[-]	-	d	d	-	-	[-]	[+]	-	-
Riduzione dei nitrati	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Ossidasi	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
DNasi (25°C)	+	+	[+]	d	+	+	+	-	d	d	+	d
Lipasi (olio di mais)	[+]	+	d	-	+	[+]	-	-	+	[-]	+	+
ONPG	-	+	[+]	-	d	d	-	-	d	+	-	d
Pigmento giallo (25°C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clearing della tirosina	d	[-]	-	-	d	d	-	-	-	d	[+]	d

(continua)

Tabella 8. - (continua)

Caratteristiche	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. carchariae</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
Crescita con:												
0% di NaCl	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1% di NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6% di NaCl	+	d	+	+	+	+	+	[+]	[+]	d	+	d
8% di NaCl	+	-	+	-	d	[+]	-	-	d	-	[+]	-
10% di NaCl	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12% di NaCl	[-]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sciamatura	+	-	-	-	-	-	[+]	-	-	-	[+]	-
String test	+	+	[+]	[+]	+	+	+	+	+	+	d	+
Sensibilità all' O/129	[-]	+	[-]	+	d	-	+	d	+	+	[-]	+
Sensibilità alla polimixina B	d	[-]	+	[+]	+	[+]	+	+	+	[+]	d	-

-, 0-10% positivi; [-], 11-25% positivi; d, 26-75% positivi; [+], 76-89% positivi; +, 90-100% positivi.

^bNC, Nessuna Crescita.

Inoltre, i sistemi commerciali miniaturizzati per batteri Gram-negativi (es. API 20 E, API 20 NE, etc.) non forniscono sempre una corretta identificazione per *Vibrio* spp.; se usati, bisogna sempre avere l'accortezza di preparare la sospensione batterica con una soluzione contenente l'1 - 3 % di NaCl. Pertanto, si è cercato di individuare un numero minimo di reazioni biochimiche, raccolte nel diagramma a flusso della Figura 2 e nella Tabella 10, da eseguire secondo i protocolli convenzionali delle prove in tubo, sufficienti, nella maggior parte dei casi, ad identificare il Vibrione in esame; se ciò risultasse impossibile, è necessario inviare il ceppo isolato presso un laboratorio di riferimento o presso l'Istituto Superiore di Sanità a Roma. Per la spedizione bisogna ripassare una colonia ben isolata, prelevata da un terreno colturale incubato overnight, in un tubo di NA o TSA solidificato a becco di clarino; questo va accuratamente tappato e spedito attenendosi alle normali procedure per l'invio di materiale potenzialmente patogeno.

Per l'esecuzione delle prove identificative, ed in particolare per la prova dell'ossidasi, di agglutinazione e per lo "String test", è opportuno ripassare una colonia sospetta e ben isolata da TCBS su TSA all'1 - 3% di NaCl, o su agar T₁N₁ (1% triptone + 1% NaCl), o su GA, o su GSA (tutti terreni non selettivi e privi di carboidrati fermentabili) ed incubare overnight a 37°C; ciò anche al fine di disporre di una coltura pura su cui condurre tutte le prove identificative. Se l'isolato da identificare è già presente su GA o GSA, è possibile prelevare direttamente le colonie da saggiare biochimicamente e sierologicamente.

6.3. Individuazione degli isolati falsi positivi: eliminazione dei non-*Vibrio*.

Soprattutto su terreni non selettivi come GA, GSA, ma anche sul TCBS, è possibile che riescano a crescere batteri diversi dai *Vibrio*. Pertanto, le prime prove di identificazione devono mirare a riconoscere quelle colonie false positive. Semplici prove da effettuarsi immediatamente sono:

- colorazione di Gram;
- semina in TSI o KIA;
- richiesta di NaCl per la crescita;
- test dell'ossidasi;
- String test.

6.3.1. Colorazione di Gram - Preliminarmente va effettuata una colorazione di Gram su colture di 18 - 24 ore: *Vibrio* spp. si presentano come bacilli dritti o ricurvi, di 0,5 - 0,8 μm in larghezza e 1,4 - 2,6 μm in lunghezza, privi di endospore e Gram-negativi; nelle colture vecchie o in colture con avverse condizioni di crescita per *Vibrio* spp., si possono avere delle involuzioni nella forma del batterio.

6.3.2. Semina in TSI o KIA - Altra prova di facile effettuazione è l'inoculazione, di colonie ben isolate, in tubi di TSI (Triple Sugar Iron) o di KIA (Kligler Iron Agar) a becco di clarino, seminando per infissione nel cilindro e striscio superficiale sul becco; incubare a 35 - 37°C per 18 - 24 ore prima di leggere (Tabella 9).

Tabella 9. - Reazioni biochimiche di alcune specie di *Vibrio* e di microrganismi correlati inoculati in TSI e KIA.

Microorganismo	KIA		TSI	
	Becco	Cilindro	Becco	Cilindro
<i>V. cholerae</i>	K	A	A (K raro)	A
<i>V. mimicus</i>	K	A	K (A raro)	A
<i>V. parahaemolyticus</i>	K	A	K	A
<i>V. alginolyticus</i>	K	A	A	A
<i>V. vulnificus</i>	K o A	A	K (A raro)	A
<i>A. hydrophila</i>	K o A	A	K o A	A
<i>P. shigelloides</i>	K o A	A	K o A	A

K, alcalino (rosso); A, acido (giallo); nessuna delle specie di *Vibrio* riportate in tabella producono solfuro di idrogeno (annerimento del terreno) o gas dal glucosio (rottura del terreno con formazione di bolle) in quantità apprezzabile nel TSI o nel KIA. Alcune specie di *Aeromonas* possono produrre gas in questi terreni culturali.

6.3.3. Richiesta di NaCl per la crescita - La richiesta di NaCl per la crescita è fortemente discriminante in quanto a concentrazione di 0% di NaCl, tra le specie di *Vibrio*, riescono a crescere solo *V. cholerae* e *V. mimicus*, più gli eventuali isolati di altre specie. Inoculare, in parallelo, tubi di NB (Nutrient Broth) (o di TB - Tryptone broth) allo 0% e all'1 - 3% di NaCl; incubare per 18 - 24 ore a 35-37°C. Reincubare i tubi negativi (mancanza di crescita batterica e, quindi, di intorbidimento del terreno) per

ulteriori 18 - 24 ore. Ad una concentrazione di 0% di NaCl crescono bene solo i non *Vibrio*, *V. cholerae* e *V. mimicus*; alla concentrazione di 1 e/o 3% di NaCl crescono tutte le specie di *Vibrio*; al 3% alcune specie batteriche non-*Vibrio* non riescono a crescere mentre alcuni ceppi di *V. cholerae* non-O1 crescono solo all'1 e al 3% di NaCl e non allo 0% (Tabella 10).

Tabella 10. - Richiesta di NaCl per la crescita

	0% di NaCl	1% di NaCl	3% di NaCl
<i>V. cholerae</i> O1	+	+	+
<i>V. cholerae</i> non-O1	+ (-)	+	+
<i>V. mimicus</i>	+	+	+
<i>Vibrio</i> spp. alofile	-	+	+
non- <i>Vibrio</i>	+	+	+ (-)

+, Presenza di crescita; -, assenza di crescita; (-), alcuni ceppi non riescono a crescere alle concentrazioni di NaCl indicate.

Per l'esecuzione di tale prova è importante controllare, se utilizzati, la composizione dei terreni colturali commerciali già pronti per l'uso, poiché questi possono presentare già delle aliquote di NaCl nella formulazione di base (generalmente allo 0,5% come ad esempio nel NB dell'Oxoid); questo, ovviamente, potrebbe falsare i risultati finali, in particolare quelli relativi alla capacità di crescita a concentrazioni di 0% di NaCl.

6.3.4. Test dell'ossidasi - Per la determinazione del test dell'ossidasi è indispensabile prelevare la colonia da un terreno privo di carboidrati fermentabili e subito dopo le 18 - 24 ore di incubazione. In commercio sono presenti vari prodotti già pronti all'uso, comunque, se questi non fossero disponibili, si può procedere come segue: porre della carta da filtro in una capsula di Petri e impregnarla con alcune gocce di reagente per l'ossidasi; con un bastoncino sterile in legno (ad esempio uno stuzzicadenti), o con un'ansa sterile di platino o di plastica (l'utilizzo di un'ansa in nichel-cromo o in acciaio può dare origine a reazioni falsamente positive) prelevare la colonia e stemperarla sulla carta impregnata. Gli organismi ossidasi positivi faranno virare il colore della carta al rosso porpora scuro o al blu in pochi secondi (massimo 1 minuto). Le specie di *Vibrio* sono generalmente ossidasi positive, eccetto *V. metschnikovii*.

6.3.5. String test - Lo String test ha un certo valore differenziale poiché molte specie di *Vibrio* sono String test-positivo, mentre molte altre specie batteriche, incluso *Aeromonas*, sono negative. Per l'effettuazione di tale prova si utilizza una soluzione di desossicolato di sodio allo 0,5%. Il desossicolato di sodio è un detergente in grado di lisare le cellule di *Vibrio* spp. che, rilasciando il loro DNA, rendono la soluzione viscosa ed in grado di formare "fili" di 2 - 3 cm di lunghezza quando questa viene toccata con un'ansa che poi viene lentamente sollevata. Per l'effettuazione della prova si preleva abbondante materiale batterico (per avere una sospensione piuttosto carica) da un terreno non selettivo e lo si stempera in una goccia (0,1 ml) di soluzione di desossicolato

di sodio allo 0,5%, posta su di un vetrino portaoggetto. Si considera positiva la reazione se entro 60 secondi la soluzione diviene viscosa ed è possibile apprezzare la formazione dello "string".

6.4. Prove biochimiche per l'identificazione di *Vibrio* spp.

Le prove biochimiche individuate e generalmente sufficienti per l'identificazione della specie (Figura 5 e Tabella 11) sono essenzialmente:

- decarbossilazione di lisina, arginina e ornitina;
- produzione di acido da saccarosio, *D*-galattosio, salicina e *mio*-inositolo;
- produzione di gas da glucosio;
- crescita in NB all'8% di NaCl;
- produzione di indolo.

Particolare attenzione deve essere posta alla composizione dei terreni colturali utilizzati per le prove biochimiche, che devono avere una concentrazione finale di NaCl dell'1-2%.

6.4.1. Decarbossilazione di lisina, arginina ed ornitina - Per la prova di decarbossilazione si utilizza il Moeller Decarboxilase Broth base o il Falkow Decarboxilase Broth base; si inoculano tre tubi contenenti ognuno uno dei tre aminoacidi più un quarto tubo contenente solo il brodo di base. Una volta inoculati, i tubi vengono ricoperti con uno strato di 1 - 2 cm di olio minerale sterile ed incubati a 35 - 37 °C per massimo quattro giorni, eseguendo, però, letture giornaliere. Il principio di funzionamento del brodo si basa sulla capacità del batterio di utilizzare il glucosio, acidificando il terreno e facendo virare l'indicatore di pH al giallo. Questo abbassamento di pH attiva gli enzimi ornitina decarbossilasi, lisina decarbossilasi e arginina diidrolasi, che, formando amine alcaline, rialzano il valore di pH del terreno facendolo tornare al colore porpora-violaceo iniziale (non così per il tubo di controllo che deve rimanere giallo). Quindi, un colore giallo indica reazione di decarbossilazione negativa, un colore porpora-violaceo indica una reazione di decarbossilazione positiva.

6.4.2. Produzione di acido da saccarosio, *D*-galattosi, salicina e *mio*-inositolo - Per la valutazione della produzione di acido, si può utilizzare il Phenol Red Broth base (o anche l'OF medium che permette di apprezzare anche la capacità fermentativa e/o ossidativa dei batteri), supplementato con le sostanze indicate. Si seminano tubi di terreno con un inoculo consistente e si incubano a 35 - 37°C fino a quattro giorni con letture giornaliere; il viraggio del colore del terreno da rosso a giallo indica una reazione positiva e quindi produzione di acido.

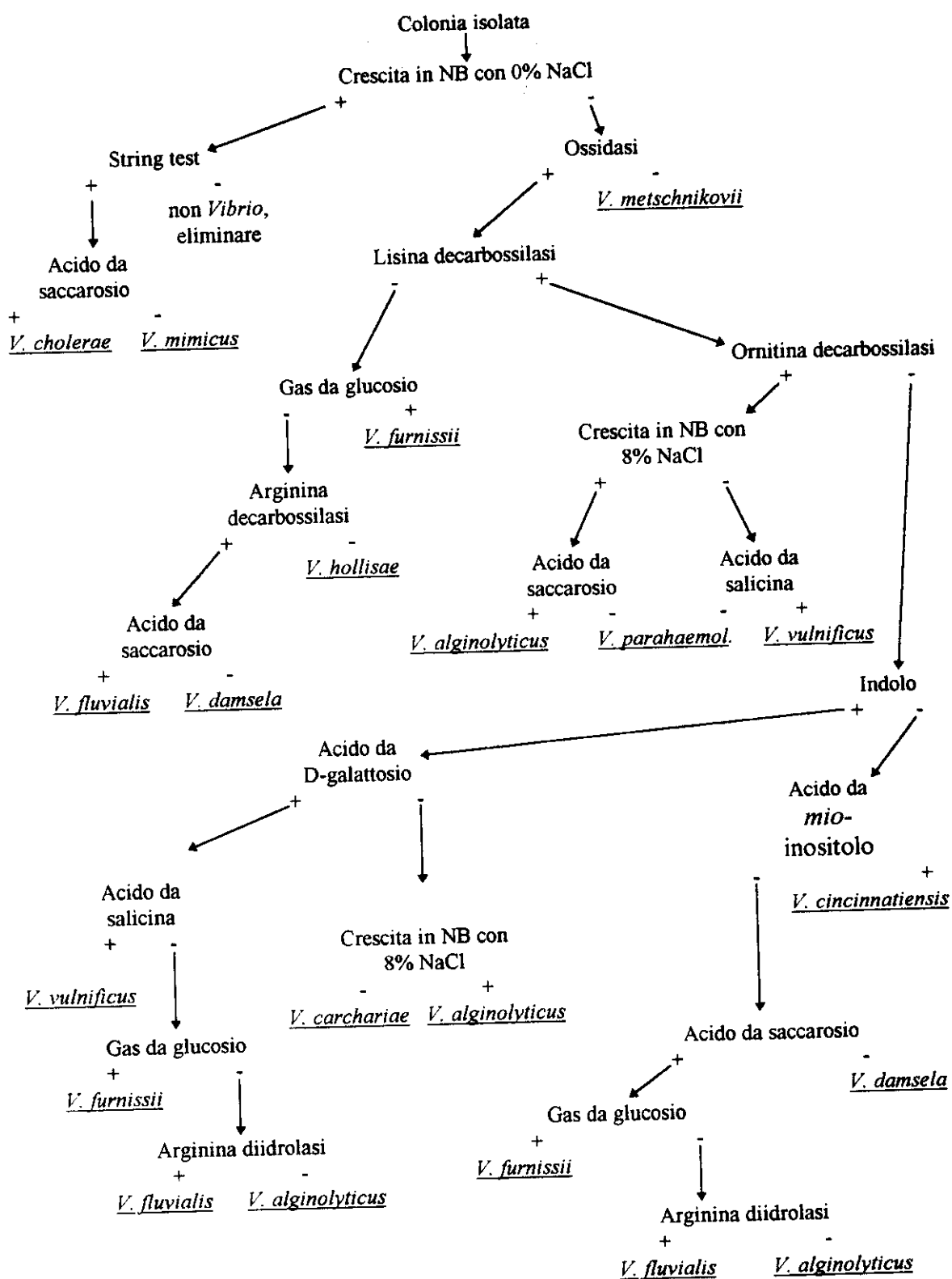


Figura 5. - Diagramma a flusso per l'identificazione biochimica di *Vibrio* spp.

6.4.3. *Produzione di gas da glucosio* - La produzione di gas da glucosio è valutabile utilizzando, come sopra, il Phenol Red Broth base supplementato con glucosio e dispensato in tubi contenenti la campanula di Durham.

Tabella 11. - Selezione delle prove biochimiche generalmente sufficienti per l'identificazione di *Vibrio* spp. di importanza clinica.

Caratteristiche	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. carchariae</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
Produzione di indolo	[+] (85)	+	-	-	[-] (13)	[-] (11)	+	+	[-] (20)	+	+	+
Lisina decarbossilasi	+	+	+ ^a	d	-	-	+	-	d	+	+	+
Arginina diidrolasi	-	-	-	+	+	+	-	-	d	-	-	-
Ornitina decarbossilasi	d	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	d
Ossidasi	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Produzione di gas da D-Glucosio	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Produzione di acido da:												
D-Galattosio	[-] (20)	+	+	+	+	+	-	+	d	[+] (82)	+	+
mio-Inositolo	-	-	+	-	-	-	-	-	d	-	-	-
Saccarosio	+	+	+	-	+	+	d	-	+	-	-	[-]
Salicina	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Crescita con:												
0% di NaCl	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
8% di NaCl	+	-	+ ^a	-	d	[+]	-	-	d	-	[+]	-
String test	+	+	[+]	[+]	+	+	+	+	+	+	d	+

-, 0-10% positivi; [-], 11-25% positivi; d, 26-75% positivi; [+], 76-89% positivi; +, 90-100% positivi.

I valori riportati in parentesi tonde () indicano la percentuale di ceppi positivi alla prova biochimica indicata;

^aIn bibliografia si trovano valori discordanti: alcuni Autori riportano il simbolo "+", corrispondente a oltre il 90% di ceppi positivi alla prova biochimica, altri invece riportano un valore di ceppi positivi pari rispettivamente al 57% e al 62%, corrispondente, in base alla simbologia utilizzata, a "d".

6.4.4. *Crescita in NB all'8% di NaCl* - La prova della crescita in NB all'8% di NaCl si esegue come quella all'1% di NaCl (vedi sottoparagrafo 6.3.3); un intorbidimento del mezzo di coltura indica reazione positiva.

6.4.5 Produzione di indolo - La prova dell'indolo può essere effettuata utilizzando terreni di coltura come il SIM (Solfito-Indolo-Motilità) o il MIO (Motilità-Indolo-Ornitina) o, più semplicemente, un brodo preparato con triptone (TW, Tryptone Water) che è ricco dell'aminoacido triptofano. I batteri che possiedono l'enzima triptofanasi sono in grado di idrolizzare e deaminare il triptofano con produzione di indolo, acido piruvico e ammoniaca. L'indolo prodotto può essere evidenziato sfruttando la sua capacità di reagire con il gruppo aldeidico della *p*-dimetilamino-benzaldeide formando un composto di colore rosso. Per l'esecuzione della prova si inocula il brodo con il ceppo in esame, si incuba a 35 - 37°C per 18 - 24 ore, quindi si aggiungono 10 - 15 gocce di reattivo di Kovacs per l'indolo; lo sviluppo, entro pochi secondi dall'aggiunta del reagente, di un colore rosso vivo nell'interfaccia tra il reagente ed il brodo indica produzione di indolo e positività della prova.

Una volta ottenuto il profilo biochimico completo, questo va sempre confrontato con i dati della Tabella 11. Una identificazione incerta richiede l'esecuzione di ulteriori prove biochimiche, come la prova di Voges-Proskauer, il test dell'ONPG, la lipasi, etc. (Tabella 8), per la cui esecuzione si rimanda ai testi di riferimento citati alla fine di questo manuale.

7. PROVE SIEROLOGICHE DI IDENTIFICAZIONE

Allo stato attuale, la sierotipizzazione di eventuali ceppi di *Vibrio* isolati in Italia ha senso solo per *V. cholerae*, al fine di identificare quei sierotipi (O1 e O139) potenzialmente in grado di dare epidemie, sebbene sia possibile tipizzare anche altri Vibrioni come ad esempio *V. parahaemolyticus*.

In commercio sono disponibili antisieri specifici per *V. cholerae* O1 e per *V. cholerae* O139. Per l'utilizzo di tali prodotti è opportuno fare riferimento alle istruzioni d'uso fornite dalle case produttrici. Di estrema importanza è, inoltre, la necessità di ottenere colonie in fase liscia, poichè la fase rugosa pregiudica la possibilità di tipizzare il ceppo in esame. Se le colonie sono presenti in fase rugosa, è necessario ripassarle in un brodo nutriente da incubare per alcune ore (mediamente 4 - 6 ore) a 37°C, quindi rieffettuare un isolamento su un terreno agarizzato. In generale, per eseguire una sierotipizzazione si procede come segue: prelevare una colonia da una sottocoltura pura di 18 - 24 ore su un terreno non selettivo (TSA, T₁N₁, etc.) e porla in due zone di un vetrino portaoggetto; aggiungere accanto (non sopra) una goccia di soluzione fisiologica allo 0,85% di NaCl, quindi, con un'ansa sterile, emulsionare gradualmente la patina batterica e la soluzione fisiologica; a questo punto aggiungere ad una sola delle due emulsioni una goccia di antisiero polivalente per *V. cholerae* O1 o per *V. cholerae* O139 e mescolare con un'ansa sterile. L'altra emulsione, contenente solo l'antigene, funge da controllo per l'autoagglutinazione. Una reazione positiva è indicata da una forte e rapida agglutinazione, meglio visibile se il vetrino è posto su carta scura. Durante le prove di sierotipizzazione è sempre preferibile includere, come controllo, un ceppo positivo all'agglutinazione.

Le colture positive con l'antisiero O1 (che identifica il sierogruppo), possono essere ulteriormente caratterizzate con gli antisieri per i sottogruppi Inaba (fattori AC) e Ogawa (fattori AB). Colture che agglutinano con entrambi gli antisieri, presentano tutti e tre i fattori (A, B e C) e sono sierotipo Hikojima (Tabella 12).

Tabella 12. - Sottotipi di *Vibrio cholerae* sierogruppo O1.

Sierogruppo O1 sottotipo	Antigeni	Agglutinazione con antisieri specifici per i sottogruppi	
		Ogawa	Inaba
Ogawa	A, B	+	-
Inaba	A, C	-	+
Hikojima ^a	A, B, C	+	+

^aAlcune Autorità non riconoscono il sottotipo Hikojima e riportano le colture unicamente come Inaba o Ogawa in base a quale dei due antisieri agglutina per primo ed in maniera più pronunciata.

Colture che agglutinano con l'antisiero polivalente O1 ma non con l'antisiero Ogawa o Inaba non possono essere tipizzati con questi antisieri. Colture che sono biochimicamente dei *V. cholerae* ma che non agglutinano con l'antisiero O1 oppure con

l'antisiero O139, sono *V. cholerae* non-O1 e non-O139. Colture che agglutinano anche con la soluzione fisiologica (autoagglutinazione), non possono essere tipizzate. Se si verifica tale evenienza, è necessario stemperare il ceppo in esame in un tubo contenente soluzione fisiologica e bollirlo a bagnomaria per 5 minuti, quindi ripetere le prove di agglutinazione utilizzando la soluzione bollita. Comunque, è anche possibile che il fenomeno della autoagglutinazione scompaia ripassando le colonie su di un terreno di crescita molto ricco, come l'Heart Infusion agar o il Brain Heart Infusion agar.

Oltre ad identificare il sierogruppo (O1) ed il sierotipo (Ogawa, Inaba o Hikojima), è possibile determinare anche il biotipo dei Vibrioni colerici, che sono: biotipo "Classical" e biotipo "El Tor". Le prove da effettuare per distinguere il biotipo sono riportate in Tabella 13; quelle di più semplice applicazione sono sicuramente la sensibilità alla polimixina B (50 unità), il test dell'emolisina su agar sangue al 5% di eritrociti di pecora ed il test di Voges-Proskauer effettuato con incubazione a 22°C. Per una più sicura identificazione del biotipo si consiglia di eseguire più di una delle prove riportate in tabella. E' necessario sottolineare, però, che la determinazione del sierotipo e del biotipo ha valore soprattutto per gli studi epidemiologici, pertanto la loro determinazione non è assolutamente indispensabile in quella fase dell'analisi che riguarda la diagnosi di possibile infezione colerica.

Tabella 13. - Prove per la differenziazione del biotipo di *Vibrio cholerae* O1.

Test	Biotipo	
	Classical	El Tor
Sensibilità al fago V El Tor	-	+
Sensibilità al fago IV Classical	+	-
Sensibilità alla polimixina B, 50 unità	+	-
	(alone di inibizione di 10-15 mm)	(alone di inibizione assente o al massimo di 7-8 mm)
β-Emolisi (su agar sangue al 5% di eritrociti di pecora)	-	variabile
Emoagglutinazione (eritrociti di pollo)	-	+
Voges-Proskauer (22°C)	-	+

8. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E PROVE DI TOSSIGENICITA'

8.1 Prove di tossigenicità

Tutti gli isolati identificati biochimicamente e/o sierologicamente come *V. cholerae* o *V. mimicus*, vanno saggiati per la produzione di enterotossina colerica termolabile (CT) e di citotossina (tossina termostabile, ST). I test diretti includono l'effetto della tossina in vitro su cellule surrenali Y-1 di topo o su cellule ovariche di criceto cinese (CHO) e il saggio in vivo su topino; i metodi immunologici sono l'ELISA e l'agglutinazione al lattice. Per quest'ultima metodica sono disponibili dei pratici kit commerciali che consentono la ricerca dell'enterotossina di *V. cholerae* (CT) mediante agglutinazione passiva al lattice in piastra microtitre (es. VET-RPLA, Oxoid); comunque, una più fine caratterizzazione del ceppo in esame può essere eseguita mediante la ricerca, tramite tecniche di PCR, delle sequenze geniche che codificano per la biosintesi delle tossine stesse. Di seguito riportiamo alcune metodiche che dovrebbero essere di facile esecuzione in buona parte dei laboratori interessati al problema.

8.2. Estrazione del DNA batterico

In questo paragrafo sono descritti due metodi di estrazione del DNA, uno, secondo Ezaki, che prevede l'utilizzo di fenolo-cloroformio-alcool isoamilico, l'altro, più rapido, che prevede la bollitura del ceppo isolato.

8.2.1. Estrazione del DNA secondo il metodo di Ezaki - Per l'esecuzione di questa metodica, che, come detto, richiede l'utilizzo di fenolo-cloroformio-alcool isoamilico, si procede come segue:

1. seminare i ceppi da esaminare in TSA ed incubare per 24 ore a 35 - 37°C;
2. prelevare un'ansata di materiale ed inoculare 10 ml di brodo LB;
3. incubare, in agitazione, il brodo LB a 35 - 37°C overnight;
4. centrifugare a 4000 rpm per 10 - 15 minuti;
5. scartare il sopranatante e risospendere il pellet in 10 ml di soluzione fisiologica sterile, quindi ripetere la centrifugazione;
6. risospendere il pellet in 1 ml di soluzione fisiologica sterile e centrifugare, in provette Eppendorf da 1,5 ml, per 5 minuti a 10.000 rpm;
7. risospendere il pellet in 400 µl di una soluzione a pH 8 di Tris-HCl 10 mM, Na₂EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, quindi aggiungere 20 µl di una soluzione di Ribonucleasi (con una concentrazione di 5 mg/ml), 60 µl di una soluzione di Proteinasi K (0,5mg/ml) e 20 µl di una soluzione di SDS al 10% (peso/volume);
8. incubare in agitazione a 50°C per 30 minuti;
9. fase di estrazione: aggiungere ad ogni campione un egual volume (500 µl) di una miscela di fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (in rapporto 25:24:1), miscelare le

- due fasi, centrifugare a 17.000 rpm per 15 minuti, quindi recuperare il sopranatante, prestando massima attenzione a non prelevare la fase inferiore; ripetere l'estrazione (punto 9) per tre volte;
10. eseguire sull'ultimo sopranatante recuperato un'altra estrazione utilizzando però una miscela di cloroformio-alcool isoamilico (in rapporto 24:1), centrifugando e recuperando il sopranatante;
 11. precipitare il DNA cromosomale aggiungendo 1 ml di etanolo assoluto freddo, agitare e lasciare a precipitare incubando la provetta a -20°C per 2 ore (o a -80°C per 30 minuti), quindi centrifugare a 14.000 rpm per 15 minuti; alla fine della centrifugazione dovrebbe essere visibile un piccolo pellet biancastro depositato in fondo alla parete dell'Eppendorf;
 12. eliminare l'etanolo assoluto, risospendere il pellet in 250 µl di etanolo al 70% freddo, centrifugare a 14.000 rpm per 5 minuti, eliminare l'etanolo quindi far asciugare le provette ponendole, aperte, sotto cappa a flusso laminare (o più semplicemente all'aria se non si dispone di una cappa);
 13. risospendere il pellet in 50 µl di acqua distillata sterile (o in tampone Tris-EDTA 10:1 mM) (questo punto può richiedere anche 30 minuti a temperatura ambiente per ottenere la completa dissoluzione) e conservare in frigorifero fino all'analisi.

Una volta risospeso, è necessario valutare la concentrazione del DNA estratto; per fare ciò ci si avvale dell'ausilio di uno spettrofotometro, con lunghezza d'onda impostata a 260 nm, ricordando che 50 µg di DNA corrispondono al valore 1 di densità ottica (1 O.D.). In pratica, l'esperienza suggerisce che l'aliquota di 5 µl della sospensione ottenuta al punto 13 è una quantità di template sufficiente per l'esecuzione dei protocolli di PCR.

Per concludere, è opportuno sottolineare che è preferibile affiancare ai ceppi isolati da caratterizzare, un ceppo di riferimento che risulti positivo per il gene in esame, al fine di valutare l'efficacia dell'estrazione con fenolo-cloroformio-alcool isoamilico.

8.2.2. Estrazione del DNA secondo la tecnica della bollitura - Prove di laboratorio hanno dimostrato che la semplice bollitura di una sospensione batterica può essere un metodo alternativo efficace, sbrigativo ed economico per l'estrazione del DNA. E' però sempre necessario affiancare ai ceppi isolati da caratterizzare, un ceppo di riferimento che risulti positivo alla ricerca del gene in esame, al fine di valutare l'efficacia della tecnica della bollitura, e ciò per evitare che eventuali problemi di inibizione, perdita o degradazione del campione possano risolversi in un risultato falso negativo. Per l'esecuzione dell'estrazione si procede come segue:

1. preparare una brodocoltura in NB o in TSB ed incubare a 35 - 37°C per 24 ore;
2. prelevare 2 ml di brodocoltura e centrifugare per 5 minuti a 10.000 rpm;
3. togliere il sopranatante e risospendere il pellet in acqua distillata sterile;
4. centrifugare di nuovo, eliminare il sopranatante e risospendere il pellet in 2 ml di acqua distillata sterile;
5. con l'ausilio di uno spettrofotometro, controllare, ad una lunghezza d'onda di 600 nm, la densità ottica (O.D.) della sospensione batterica e portarla a 1 O.D.;
6. diluire la sospensione 1:10;

7. aliquotare 100 μl della diluizione in una Eppendorf da 1,5 ml e incubarla a bagnomaria, in acqua bollente, per 10 minuti;
8. utilizzare 10 μl del bollito come template da sottoporre a PCR.

8.3. PCR per la ricerca del gene *ctx*

La reazione di amplificazione, per la ricerca del gene che codifica per la CT di *V. cholerae* O1 (gene *ctx*), si effettua in un volume finale di 100 μl , così come riportato nella tabella 14.

Tabella 14. - Esempio di schema per l'amplificazione di sequenze mediante la PCR.

REAGENTI	VOLUME PER CAMPIONE	VOLUME PER n CAMPIONI
H ₂ O dist. sterile	75,5 μl	75,5 μl x n
Buffer 10X	10 μl	10 μl x n
dNTPs	2 μl	2 μl x n
primer A 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1 μl	1 μl x n
primer B 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1 μl	1 μl x n
Taq	0,5 μl	0,5 μl x n
Template (DNA)	10 μl	n10 μl
VOLUME TOTALE	90 μl + 10 μl (100 μl)	90 μl x n + n10 μl

La miscela di reazione per l'amplificazione, in linea di massima, deve contenere le seguenti concentrazioni di reagenti per campione:

- 0,2 mM (200 μM) di una miscela dei quattro dNTP;
- 30 - 50 pmol di ogni primer (pari a circa 1 μl di una soluzione di 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$);
- 1 - 1,25 U di *Taq* DNA polimerasi.

Le sequenze dei primers da utilizzare per l'amplificazione del gene target *ctxAB* sono:

- primer senso: 5'-T GAA ATA AAG CAG TCA GGT G-3', formato da 20 basi, posizione 96-115;
- primer antisenso: 5'-G TGA TTC TGC ACA CAA ATC AG-3', formato da 21 basi, posizione 853-873.

Con questi primers si ottiene un prodotto amplificato di 779 paia di basi (bp).

I cicli di reazione da utilizzare per la PCR sono i seguenti:

- un ciclo di denaturazione a 94°C per 5 minuti;
- 40 cicli con:
 - denaturazione 94°C per 1 minuto;
 - appaiamento 60°C per 1 minuto;
 - estensione 72°C per 1 minuto;
- un ciclo di estensione finale a 72°C per 10 minuti;
- mantenere il tutto a 4°C fino alla corsa in gel di agarosio.

Per la corsa elettroforetica si prepara un gel di agarosio (ad esempio all'1,6%), in tampone TAE concentrato 1 x (da utilizzare anche per la corsa), con aggiunta di bromuro di etidio ad una concentrazione finale di 0,5 µg/ml. Le condizioni di corsa, in uso nei nostri laboratori, per un gel piccolo all'1,6% di agarosio sono: 90 Volt, 250 mA impostate (se richiesto dal trasformatore), 1 ora di corsa circa. Alla fine porre il gel sul transilluminatore ed osservare le bande di DNA amplificato, confrontandole con le bande di peso noto del marker. I prodotti dell'amplificazione possono essere confermati tramite l'analisi dei frammenti di restrizione, l'ibridizzazione con sonde specifiche o l'analisi della sequenza.

8.4. PCR per la ricerca del gene *sto*

Una enterotossina termostabile (ST) può essere prodotta da *V. cholerae* (soprattutto dai ceppi non-O1) e da *V. mimicus*. La produzione di ST è stata riconosciuta come uno dei meccanismi con cui *V. cholerae* non-O1 e *V. mimicus* sono in grado di causare severi episodi diarroici.

Per la ricerca del gene che codifica per la ST (gene *sto*) è stata egualmente proposta la bollitura del ceppo, come indicato per la CT, con un passaggio aggiuntivo finale che consiste nel centrifugare il bollito a 10.000 rpm per 1 minuto, prelevare il sopranatante ed utilizzare un'aliquota di quest'ultimo per la PCR. Però, esperienze personali degli Autori, consigliano l'utilizzo del protocollo di estrazione del DNA con fenolo-cloroformio-alcool isoamilico e comunque di utilizzare sempre, soprattutto se si usa la tecnica della bollitura, un ceppo di riferimento positivo per il gene *sto*.

Per l'esecuzione dell'amplificazione, si utilizzano 5 µl della sospensione ottenuta al punto 13 del protocollo di estrazione del DNA con fenolo-cloroformio-alcool isoamilico e si procede rispettando le concentrazioni e i volumi finali come indicato per la ricerca del gene *ctx* che codifica per la CT.

Le sequenze dei primers da utilizzare per l'amplificazione del gene target *sto* sono:

- primer senso: 5'-CAT GAG AAA CCT ATT CAT TGC-3', formato da 21 basi;
- primer antiseno: 5'-TTA ATT TAA ACA TCC AAA GCA AG-3', formato da 23 basi.

Con questi primers si ottiene un prodotto amplificato di 238 paia di basi (bp).

I cicli di reazione da utilizzare per la PCR sono i seguenti:

- un ciclo di denaturazione a 94°C per 5 minuti;
- 40 cicli con:
 - denaturazione 94°C per 45 secondi;
 - appaiamento 52°C per 30 secondi;
 - estensione 72°C per 45 secondi;
- un ciclo di estensione finale a 72°C per 5 minuti;
- mantenere il tutto a 4°C fino alla corsa in gel di agarosio.

Per la corsa in gel di agarosio dei prodotti di amplificazione, si procede come per la tossina CT.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ADAMS, M.R., Moss, M.O. *Vibrio*. *Food Microbiology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1995. p. 210-214.
- ANDREWS, W.H. Microbiological Methods - *V. cholerae* in Oysters. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*. P. Cunniff (Ed.). Arlington: AOAC International, 1995. Chapter 17 p. 106B-108.
- BAUMANN, P., Furniss, A.L., Lee, J.V. *Vibrio*. In *Bergey's, Manual of Systematic Bacteriology*. N.R. Krieg., J.G. Holt (Ed.). Baltimore, Hong Kong, London, Munich, Philadelphia, Sydney, Tokyo: Williams & Wilkins, 1984. p. 518-538.
- ELLIOT, E.L., Kaisner, C.A., Tamplin, M.L. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp. In *Bacteriological Analytical Manual*. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (Ed.). Arlington: AOAC International, 1992. p. 111-140.
- FARMER III, J.J. The Family Vibrionaceae. In *The Prokaryotes*. A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schlifer (Ed.). New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer-Verlag, 1992. p. 2939-2951.
- FARMER III, J.J., Hickman-Brenner, F.W. The Genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In *The Prokaryotes*. A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schlifer (Ed.). New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer-Verlag, 1992. p. 2952-3007.
- GREENBERG, A.E., Clesceri, L.S., Eaton, A.D. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington: American Public Health Association, 1992.
- GUGLIELMETTI, P., Bravo, L., Zanchi, A., Montè, R., Lombardi, G., Rassolini, G.M. Detection of the *Vibrio cholerae* heat-stable enterotoxin gene by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 1994, 8: 39-44.
- HOLT, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, Hong Kong, London, Munich, Philadelphia, Sydney, Tokyo: Williams & Wilkins, 1994.
- KAYSNER, C.A., Tamplin, M.L., Twedt, M.R. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. C. Vanderzant, D.F. Splittstoesser (Ed.). American Public Health Association, 1992. p. 451-473.
- KELLY, M.T., Hickman-Brenner, F.W., Farmer III, J.J. *Vibrio*. In *Manual of Clinical Microbiology*. A. Balows, W.J. Hausler Jr., K.L. Herrmann, H.D. Iseberg, H.J. Shadomy (Ed.). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1991. p. 384-395.
- KONEMAN, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R.Jr, Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C.Jr. *Testo Atlante di Microbiologia Diagnostica*. Roma: Antonio Delfino Editore, 1995.
- Manuale di Biosicurezza in Laboratorio. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 1995, Suppl. al N. 2 (31): p. 1-122.
- NAIR, G.B., Albert, M.J., Shimada, T., Takeda, Y. *Vibrio cholerae* O139 Bengal: the new serogroup causing cholera. *Reviews in Medical Microbiology* 1996, 7 (1): 43-51.
- OLSVIK, Ø., Popovic, T., Fields, P. PCR Detection of Toxin Genes in Strains of *Vibrio cholerae* O1. In *Diagnostic Molecular Microbiology - Principles and Applications*. D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover, T.J. White (Ed.). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1993. p. 266-270.
- SAMBROOK, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning- A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- WACHSMUTH, I.K., Blake, P.A., Olsvik, Ø. *Vibrio cholerae and Cholera*. Washington: ASM Press, 1994.
- *Weekly Epidemiological Record* 1994, 21: 157-164.

INDIRIZZI INTERNET

- Committee on International Science, Engineering, and Technology Policy (CISET): Global Microbial Threats in the 1990s; <http://www2.whitehouse.gov/wH/EOP/OSTP/CISET/html/toc.html>
- Euro Surveillance, European Communicable Disease Bulletin; <http://www.b3e.jussieu.fr/ceses/EuroSurv/e2.html>
- FDA-Center for Food Safety & Applied Nutrition; <http://vm.cfsan.fda.gov/list.html>
- Free MEDLINE; <http://www.nlm.nih.gov/databases/freemedl.html>
- National Center for Infectious Diseases; <http://www.cdc.gov/ncidod/ncid.htm>
- Pan American Health Organization; <http://www.paho.org/english/index.htm>
- Program for Monitoring Emerging Diseases (ProMED); <http://www.medscape.com/other/ProMED/public/promed.html> (è necessario registrarsi; la registrazione è gratuita)
- Travel Health online; <http://www.tripprep.com/index.html>
- World Health Organization; <http://www.who.ck/>
- World Health Organization, Regional Office for Europe; <http://www.who.dk/Welcome.htm>

APPENDICE 1

Conservazione dei ceppi isolati.

Per la conservazione dei ceppi è possibile utilizzare qualsiasi Nutrient Agar (NA), all'1 -3% di NaCl, privo di carboidrati fermentabili e solidificato a becco di clarino; si può anche inoculare, per infissione, un NA semisolido o un terreno per il test della motilità.

Per la conservazione dei ceppi si procede come segue: seminare il ceppo (sul becco o per infissione, a seconda del terreno), incubare a 35 - 37°C per 24 ore; a crescita avvenuta tappare accuratamente il tubo (per evitare la disidratazione) e conservare a temperatura ambiente. La conservazione a 4°C è assolutamente sconsigliata in quanto quasi tutti i ceppi di *Vibrio* non riescono a sopravvivere in tali condizioni. Per assicurare una migliore protezione della coltura dalla disidratazione, è possibile anche ricoprire completamente la superficie del terreno con 2 -3 cm di olio minerale sterile. I ceppi possono anche essere mantenuti per lunghi periodi in congelatore, utilizzando 1 ml di una brodocoltura incubata per 6 - 12 ore a 37°C in TSB al 2% di NaCl; dispensare in criotubi, aggiungere 0,1 - 0,2 ml (10 - 20%) di glicerina, congelare immediatamente (meglio se in azoto liquido) e conservare a -70°C. Anche la liofilizzazione è stata proposta come metodo per la conservazione dei campioni: prelevare, dal becco di un NA incubato per 18 - 24 ore a 37°C, la patina batterica e risospenderla in un tubo per liofilizzazione contenente 0,5 ml di "Skimmed milk" al 10% di peso/volume; congelare rapidamente la sospensione batterica (in azoto liquido, in congelatore a -70°C o in un bagno di ghiaccio secco ed acetone) e porre il tubo nel liofilizzatore per 10 - 12 ore. Per la ricostituzione del ceppo, risospendere la polvere del liofilizzato in 0,5 ml di un NB all'1 - 3% di NaCl, quindi seminare un ansata di materiale su un agar appropriato (meglio se con la stessa composizione del NA usato per preparare la patina da liofilizzare) e la restante parte in 4 ml del NB usato per la ricostituzione.

In commercio sono, comunque, disponibili pratiche vials contenenti piccole biglie porose immerse in un brodo colturale, capaci di legare i microrganismi e preservarne la vitalità.

APPENDICE 2

Fenomeno Kanagawa

Recentemente sono stati isolati ceppi patogeni di *V. parahaemolyticus* risultati negativi al fenomeno Kanagawa; pertanto, come già detto precedentemente in questo manuale (vedi Capitolo 2 e Paragrafo 3.5.1) tale prova potrebbe risultare insufficiente a valutare la reale patogenicità di un isolato. Comunque, ulteriori studi sono necessari per derimere questi dubbi e quindi, allo stato attuale delle conoscenze e vista la facilità di esecuzione del test, il fenomeno Kanagawa può ancora ritenersi utile come informazione aggiuntiva, ma non sufficiente, sulla possibile patogenicità di ceppi di *V. parahaemolyticus*.

La reazione di Kanagawa su Wagatsuma agar dimostra la presenza di una specifica emolisina diretta termostabile (Termostable Direct Hemolysin, TDH), dal peso molecolare di 42.000, citotossica e cardiotossica ma il cui significato clinico è ancora incerto. Una reazione positiva è strettamente correlata con la patogenicità di ceppi di *V. parahaemolyticus*, sebbene una reazione negativa ormai non è più sufficiente a dimostrare l'assenza di patogenicità. Alcuni ceppi isolati da campioni clinici producono emolisine correlate ma non la TDH. Inoltre, sono anche state isolate e purificate altre emolisine con omologie di sequenza con la TDH che però non producono emolisi su Wagatsuma agar.

Per la preparazione del Wagatsuma agar è necessario disporre di eritrociti umani o di coniglio freschi (prelevati da non più di 24h). Seminare sull'agar una piccola goccia di una brodocoltura del microrganismo in esame ed incubare a 35 - 37°C per 20 - 24h. Ceppi che producono una zona di β - emolisi di 3 o più mm sono Kanagawa positivi e probabilmente sono patogeni; gli isolati che producono una zona di emolisi inferiore a 3 mm, possono risultare debolmente patogeni e vanno ulteriormente testati con altre tecniche. E' importante sottolineare che devono essere sempre testati in parallelo all'isolato in esame, ceppi di controllo positivi e negativi. Inoltre, la lettura del Wagatsuma agar dopo più di 24h di incubazione risulta inattendibile.

APPENDICE 3
Terreni di coltura e reagenti: composizione e preparazione

Le seguenti formulazioni dei terreni sono quelle di base e pertanto il contenuto in NaCl va adeguato per la ricerca di *Vibrio* spp., come indicato nel manuale.

— **ACQUA PEPTONATA ALCALINA**

(vedi Alkaline Peptone Water, APW)

— **CARY-BLAIR MEDIUM**

Sodio fosfato monoacido	1,1 g
Sodio tioglicollato	1,5 g
Sodio cloruro	5,0 g
Calcio cloruro	0,09 g
Agar	5,6 g
Acqua distillata	1 litro
pH finale $8,4 \pm 0,2$	

Portare lentamente ad ebollizione per sciogliere l'agar. Distribuire in piccoli flaconi e sterilizzare immergendoli in vapore fluente per 15 minuti. Lasciare raffreddare e serrare i tappi a vite.

— **GELATIN AGAR (GA)**

Peptone	4 g
Estratto di lievito	1 g
Gelatina	15 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1 litro
pH finale $7,2 \pm 0,2$	

Portare ad ebollizione per sciogliere l'agar e la gelatina agitando continuamente. Autoclavare per 15 minuti a 121°C. Raffreddare a 45-50°C e quindi dispensare in capsule Petri.

— **GELATIN SALT AGAR (GSA)**

Utilizzare gli stessi ingredienti del GA aggiungendovi 30 g/L di NaCl.

— **GELATIN SALT BROTH (GSB)**

Utilizzare gli stessi ingredienti del GA, escludendo però l'agar.

— **KLIGLER IRON AGAR (KIA)**

Peptone	20,000 g
Lattosio	20,000 g
Destrosio	1,000 g
Ammonio ferrico citrato	0,500 g

Sodio tiosolfato	0,300 g
Rosso fenolo	0,025 g
Agar	15,000 g
Acqua distillata	1 litro
pH finale 7,4 ± 0,2	

Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa dissoluzione. Dispensare in tubi ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Solidificare a becco di clarino.

– **LB**

Casaminoacidi	10 g
NaCl	10 g
Estratto di lievito	5 g
Acqua distillata	1 litro
pH finale 7,5	

Riscaldare fino a completa dissoluzione, distribuire in provetta e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

– **MACCONKEY AGAR**

Peptone	20,000 g
Lattosio	10,000 g
Sali biliari n.3	1,500 g
Sodio cloruro	5,000 g
Rosso neutro	0,030 g
Cristal violetto	0,001 g
Agar	15,000 g
Acqua distillata	1 litro
pH finale 7,1 ± 0,2	

Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa dissoluzione. Raffreddare, autoclavare a 121°C per 15 minuti, raffreddare a 45-50°C e distribuire in capsule Petri.

– **MACCONKEY SORBITOL AGAR**

Utilizzare gli stessi ingredienti del MacConkey agar, sostituendo il lattosio con il sorbitolo.

– **MANNITOLO MALTOSIO AGAR**

Fitone peptone	5 g
Polipeptone	5 g
Estratto di carne	5 g
D-mannitolo	10 g
Maltosio	10 g
NaCl	20 g
Agar	13 g

1000X dye stock solution*	1 ml
Acqua distillata	1 litro
pH finale 7,8 ± 0,2	

Portare ad ebollizione, autoclavare per 15 minuti a 121°C e dispensare in capsule Petri sterili.

*1000X dye stock solution: Blu di bromotimolo	4 g
Rosso cresolo	4 g
Etanolo 95%	100 ml

— MOELLER DECARBOXYLASE BROTH BASE

Peptone	5,000 g
Estratto di carne	5,000 g
Piridossale	0,500 g
Glucosio	0,500 g
Rosso di bromo cresolo	0.010 g
Acqua distillata	1 litro
pH finale 6,0 ± 0,1	

Aggiungere gli aminoacidi ad una concentrazione finale dell'1% di peso/volume. Se necessario, riaggiustare il pH. Distribuire in aliquote di 1-1,5ml in piccoli tubi, ricoprire con paraffina liquida e sterilizzare a 121°C per 15 minuti.

— NUTRIENT AGAR (NA)

Estratto di carne	3 g
Peptone	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1 litro
pH 6,8 ± 0,2	

Portare ad ebollizione per dissolvere gli ingredienti, distribuire in tubi o in capsule Petri ed autoclavare per 15 minuti a 121°C.

— NUTRIENT BROTH (NB)

Utilizzare gli stessi ingrediente dell'NA, escludendo l'agar.

— PHENOL RED BROTH BASE

Triptone	10,000 g
Estratto di carne	1,000 g
Rosso fenolo	0,018 g
Acqua distillata	1 litro
pH finale 7,4 ± 0,2	

Aggiungere i carboidrati ad una concentrazione finale dell'1-2% di peso/volume, distribuire in tubi e autoclavare per 10 minuti a 118°C. In alternativa, autoclavare il brodo di base per 15 minuti a 121°C, quindi aggiungere, asepticamente, le soluzioni dei carboidrati precedentemente sterilizzate per filtrazione.

– **SOLUZIONE DI DESOSSICOLATO DI SODIO ALLO 0,5%**

Desossicolato di sodio	5,0 g
NaCl	8,5 g
Acqua distillata	1 litro

– **TIOSOLFATO CITRATO SALI BILIARI SACCAROSIO (TCBS)**

Estratto di lievito	5,00 g
Peptone	10,00 g
Saccarosio	20,00 g
Sodio tiosolfato	10,00 g
Sodio citrato	10,00 g
Bile di bue	8,00 g
Sodio cloruro	10,00 g
Ferrico citrato	1,00 g
Blu di bromotimolo	0,04 g
Blu timolo	0,04 g
Agar	15,00 g
Acqua distillata	1 litro

pH finale $8,6 \pm 0,2$

Riscaldare agitando frequentemente fino a completa dissoluzione. Portare ad ebollizione per 1-2 minuti. Non autoclavare. Distribuire in piastre sterili e far asciugare prima dell'uso.

– **TRIPLE SUGAR IRON AGAR (TSI)**

Estratto di carne	3,000 g
Estratto di lievito	3,000 g
Peptone	20,000 g
Sodio cloruro	5,000 g
Lattosio	10,000 g
Saccarosio	10,000 g
Glucosio	1,000 g
Ferrico citrato	0,300 g
Sodio tiosolfato	0,300 g
Rosso fenolo	0,024 g
Agar	12,000 g
Acqua distillata	1 litro

pH finale $7,4 \pm 0,2$

Riscaldare a bagnomaria fino a completa dissoluzione, distribuire in provette e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Lasciare solidificare a becco di clarino con un fondo di circa 4 cm.

— **TRYPTONE 1% NaCl 1% AGAR (T₁N₁)**

Triptone	10 g
NaCl	10 g
Agar	20 g
Acqua distillata	1 litro

Portare ad ebollizione per dissolvere l'agar, autoclavare per 15 minuti a 121°C, raffreddare a 45-50°C e dispensare in capsule Petri. Per preparare il terreno a becco di clarino, dispensare in tubi prima di autoclavare.

— **TRYPTONE BROTH (TB)**

Triptone	10 g
Acqua distillata	1 litro
	pH 6,9 ± 0,2

Sciogliere bene, distribuire in tubi e autoclavare per 15 minuti a 121°C.

— **TRYPTONE SOYA AGAR (TSA)**

Triptone	15 g
Fitone peptone	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1 litro
	pH finale 7,3 ± 0,2

Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa dissoluzione, autoclavare per 15 minuti a 121°C, raffreddare a 45-50°C e distribuire in capsule Petri.

— **TRYPTONE SOYA BROTH (TSB)**

Triptone	17,0 g
Fitone peptone	3,0 g
NaCl	5,0 g
Potassio fosfato monoacido	2,5 g
Glucosio	2,5 g
Acqua distillata	1 litro
	pH finale 7,3 ± 0,2

Sciogliere, distribuire in tubi e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

— **TRYPTONE WATER**

Vedi Tryptone Broth.

— WAGATSUMA AGAR

Estratto di lievito	3,000 g
Peptone	10,000 g
NaCl	70,000 g
D-mannitolo	10,000 g
Potassio fosfato monoacido	5,000 g
Cristal violetto	0,001 g
Agar	15,000 g
Acqua distillata	1 litro

pH finale 8,0

Portare ad ebollizione, raffreddare a 50°C ed aggiungere eritrociti umani ad una concentrazione del 5% di volume/volume. Può essere utile autoclavare il terreno di base prima di aggiungervi gli eritrociti.

*Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità
e Responsabile scientifico: Giuseppe Benagiano*

Direttore responsabile: Vilma Alberani

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, dicembre 1997 (n. 4) 5° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*