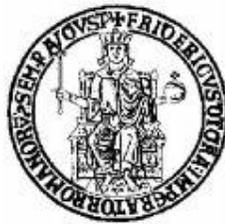


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

*DIPARTIMENTO DI SCIENZE ZOOTECNICHE ED ISPEZIONE DEGLI
ALIMENTI*



TESI DI DOTTORATO

IN

Produzione e sanità degli alimenti di Origine Animale

XX CICLO

*Influenza di alcuni fattori nel trasferimento del gene VT-2 da ceppi di
Escherichia coli produttori di verocitossina a ceppi di Escherichia coli non
patogeni*

Tutor:

Ch.ma Dott.ssa Tiziana Pepe

Coordinatore:

Ch.ma Prof.ssa Maria Luisa Cortesi
Manuela Ranzo

Candidata:

Dott.ssa

Anni Accademici
2004-2007

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	Pag.1
1.1	
Eziologia.....	Pag.1
1.2	
E.coli.enterotossigeni(ETEC).....	Pag 5
1.3-E.coli.enteroinvasivi(EIEC).....	Pag 6
1.4-	
E.coli.enteroaggregativi(EaggEC).....	Pag.7
1.5-	
E.coli.enteropatogeni(EPEC).....	Pag.8
1.6-	
E.coli.enteroemorragici(EHEC).....	Pag.10
1.7-	
SottogruppoVTEC(STEC).....	Pag.12
1.8 - E. coli O157:H7.....	Pag.13

2. – EPIDEMIOLOGIA.....	Pag.17
3. – PATOGENESI E SINTOMATOLOGIA.....	Pag.20
3.1 – Colite emorragica (HC).....	Pag.21
3.2 – Sindrome uremico emolitica (SEU).....	Pag.22
3.3 – Porpora trombotica trombocitopenica (TTP).....	Pag.23
4.BATTERIOFAGI.....	Pag.26
5. – INDUZIONE BATTERICA.....	Pag.32
6.TRASDUZIONE.....	Pag.33

PARTE SPERIMENTALE

7.ANALISI.MEDIANTE.PCR.....	Pag.40
8.SCOPO.DELLA.RICERCA.....	Pag.45
9.MATERIALI.E.METODI.....	Pag.47
10.RISULTATI.....	Pag.52
11. – CONCLUSIONI E SVILUPPI DELLA RICERCA.....	Pag.54
BIBLIOGRAFIA.....	Pag.57

1. – INTRODUZIONE

1.1 - Eziologia

Escherichia coli è un batterio Gram negativo identificato per la prima volta nel 1885 dal batteriologo tedesco Theodore Escherich. Appartiene alla famiglia delle Enterobacteriaceae e al genere Escherichiae, di cui fanno parte altre cinque specie: E. adecarboxylate, E. fergusori, E. hermani, E. vulneris, ed E. blattae. E' un germe di forma bastoncellare, con dimensioni di 1.1-1.5/2.0-6.0 mm (vivente) o 0.4-0.7/11.0-3.0 (se essiccato e colorato), aerobio-anaerobio facoltativo, mobile per la presenza di flagelli peritrichi, asporigeno, acapsulato, catalasi positivo, ossidasi negativo.

Cresce rapidamente sui comuni terreni colturali, in agar origina colonie lisce, leggermente convesse, umide, con margini netti, grigiastre e facilmente emulsionabili, pure colonie rugose, secche e non emulsionabili; è possibile anche riscontrare colonie mucose.

Quando le condizioni colturali sono sfavorevoli come ad esempio per la presenza di antibiotici, si presenta in lunghi filamenti. La crescita in brodo, se in fase S, determina un intorbidimento uniforme del mezzo con deposito sul

fondo che, dopo agitazione, si risospende facilmente; le forme in fase R danno origine ad un anello superficiale e ad un deposito sul fondo che anche in seguito ad agitazione, non si risospende uniformemente (15).

E. coli è un ospite normalmente presente nell'organismo umano e animale in cui rappresenta la specie predominante di tutta la flora batterica aerobia - anaerobia facoltativa residente nell'intestino crasso.

Caratteristiche biochimiche principali:

- riduce i nitrati a nitriti
- produce indolo
- utilizza l'acetato come unica fonte di carbonio
- presenta reazione positiva al rosso metile

E. coli produce acidi dai seguenti glicidi: arabinosio, mannitolo, sorbitolo, trealosio, maltosio, lattosio. Quest'ultima proprietà non è costante, la reazione infatti può essere ritardata, irregolare, o mancare del tutto per i ceppi mutanti e fu proposta nel 1893 da Teobald Smith come carattere che potesse aiutare a differenziare E. coli dai maggiori enterobatteri patogeni con localizzazione intestinale.

Un criterio di classificazione è fondato sulla sierotipizzazione dei ceppi di E. coli; la sierotipizzazione è stata l'unica classificazione possibile fino alla scoperta dei fattori di virulenza e valuta la presenza degli antigeni:

- **somatico O** di natura polisaccaridica, facente parte della parete lipopolisaccaridica del batterio e costituente l'endotossina. Sono stati riscontrati 171 tipi antigenici

- **capsulare o microcapsulare K** con 80 tipi antigenici, di natura polisaccaridica

- **flagellare H** di natura proteica, presente unicamente nei batteri mobili in quanto lo si trova sui flagelli

- **fimbriale F** di recente riconoscimento, favorisce i processi di adesione e di colonizzazione.

È possibile associare determinati sierogruppi di E. coli con alcune patologie ma non sono i soli antigeni a conferire virulenza al ceppo in esame. Tuttavia, per la classificazione di ceppi patogeni, la maggior parte degli Autori (14) considera i seguenti fattori:

- virulenza
- modalità di azione sulla mucosa intestinale
- epidemiologia
- sintomatologia indotta

I fattori di patogenicità di E. coli sono codificati principalmente da plasmidi ed isole di patogenicità, due strutture genetiche ad alta mobilità (13).

Si distinguono pertanto, sei gruppi principali (Tabella 1):

E. coli enterotossigenici (ETEC)

E. coli enteroemorragici (EHEC)

E. coli enteropatogeni (EPEC)

E. coli enteroaggregativi (EAEC)

E. coli enteroinvasivi (EIEC)

E. coli produttori di tossine Shiga-like (STEC)

1.2 - E. coli enterotossigeni (ETEC)

I ceppi di E. coli produttori di tossine (Stx) sono responsabili delle “diarree dei viaggiatori” e delle diarree con disidratazione nei bambini nei paesi in via di sviluppo. L'uomo è il principale serbatoio di questo ceppo, la cui caratteristica principale è la produzione di tossine LT-1 ed Sta.

L'infezione si contrae mediante ingestione di acqua e di alimenti contaminati. I ceppi colonizzano il tratto prossimale dell'intestino tenue grazie ad adesine fimbriali. Alla colonizzazione segue la produzione di tossine termostabili (STa) o termolabili (LT-1), che inducono secrezione di liquidi all'interno dell'intestino. La sintomatologia dell'infezione è caratterizzata da: diarrea acquosa, nausea e crampi addominali (sindrome coleriforme). È stato accertato che l'enterotossina LT-1 possiede il 75% degli aminoacidi in comune con la tossina del colera (CT) e può provocare, quindi, la comparsa di manifestazioni diarroiche della stessa gravità di quelle coleriche.

Dati ottenuti da volontari umani hanno rivelato che per determinare la malattia è necessaria una concentrazione di microrganismi pari a 10^8 - 10^{10} .

1.3 - E. coli enteroinvasivi (EIEC)

I batteri appartenenti a questo gruppo causano una sindrome del tutto simile a quella provocata da Shigella, caratterizzata da febbre alta, crampi addominali, diarrea acquosa seguita rapidamente da dissenteria con feci frequenti ma poco abbondanti. I ceppi EIEC hanno caratteri biochimici e antigenici simili a Shigella. Sono immobili, lattosio negativi, lisina decarbossilasi negativi ed i loro antigeni O danno reazioni crociate con quelli di alcune Shigelle. Come per queste ultime, la capacità di invasione è associata alla presenza di un plasmide da 140 MDa che codifica per le proteine di membrana che aderiscono alla mucosa dell'intestino crasso e ne invadono le cellule per endocitosi. La differenza sostanziale tra i due microrganismi è da porre in relazione alla maggiore patogenicità di Shigella rispetto ai ceppi EIEC, poiché la diversa struttura delle proteine di membrana ne conferisce maggiore resistenza nell'ambiente gastrico. L'uomo è il maggiore serbatoio di EIEC ed i sierotipi più frequenti associati a malattie sono: O28, O29, O112, O124 (più comune), O136, O143. Sul piano tassonomico gli EIEC formano un tratto di unione perfetto tra i geni di Escherichia e Shigella e, sulla base dell'omologia del loro patrimonio genetico, alcuni autori affermano che si tratti della stessa specie batterica (3).

1.4 - E. coli enteroaggregativi (EaggEC)

I batteri appartenenti a questo gruppo sono stati recentemente associati a diarrea persistente nei bambini. La loro caratteristica principale è la capacità di produrre un particolare tipo di aderenza aggregativa nei confronti delle cellule dell'epitelio intestinale, associata alla presenza di un fattore di aderenza (AAF/I).

Il gene *agg* che codifica per AAF/I è presente all'interno di un plasmide di 60 MDa. Inoltre gli EaggEC producono una enterotossina termolabile di 120 KDa e non manifestano attività emolitica. Il 56% dei ceppi contiene il gene plasmidico *astA* che codifica una enterotossina parzialmente stabile al calore chiamata EAST 1.

1.5 - E. coli enteropatogeni (EPEC)

Tali ceppi non producono alcun tipo di tossina, ma presentano ugualmente attività patogena. Infatti, cellule epiteliali intestinali coltivate in vitro hanno mostrato, in presenza di tali microrganismi, caratteristiche lesioni “*attaching-effacing*” risultanti da una stretta lesione dei batteri all’epitelio, associata alla distruzione dei microvilli. Al di sotto del luogo di adesione avvengono importanti riarrangiamenti delle proteine del citoscheletro, in particolare dell’actina.

Altra caratteristica, necessaria alla patogenicità di tali geni, è la produzione di una fimbria di adesione denominata BFp (*binding factor pili*) che innesca l’adesione alle cellule in microcolonie compatte.

La sequenza per il BFp è localizzata nel plasmide EAF (*EPEC adherence factor*). Le lesioni cellulari sono collegate alla presenza del locus LEE (*locus of enterocyte effacement*) in cui sono stati identificati tre geni: *eaeA* (E. coli adesione ed eliminazione), *esp* (proteine di secrezione degli EPEC), e *sep* (proteina di secrezione di E. coli).

Il gene cromosomale *eaeA* codifica per l’intimina, una proteina di 94KDa coinvolta nel processo di adesione dei batteri alla mucosa intestinale

dell'ospite durante la fase di infezione. Negli anni '50 gli EPEC erano responsabili della maggior parte delle gastroenteriti infantili, mentre attualmente rimangono la principale fonte di diarree infantili nelle nazioni sviluppate.

La patologia determinata da questi germi si presenta comunemente nei bambini e in passato era associata al clima caldo per cui era denominata diarrea estiva; oggi si presenta più frequentemente nelle comunità ospedaliere. La colonizzazione dell'intestino da parte di questi germi deve essere massiva, circa 10^5 - 10^{10} , perché si determini la patologia.

La diarrea è riconducibile alla perdita dei microvilli ed alla ridotta capacità di assorbire i liquidi da parte dell'intestino.

I maggiori gruppi associati a questo ceppo sono: O55, O86, O111ab, O119, O125ac, O126, O127, O128ab e O142, alcuni dei quali sono in grado di produrre tossine.

1.6 - E. coli enteroemorragici (EHEC)

Questo ceppo causa coliti emorragiche accompagnate da diarrea sanguinolenta e da forti dolori addominali.

Appartengono a questo gruppo i ceppi O26:H11, O111, ed il ceppo O157:H7 considerato il principale sierotipo di EHEC isolato da pazienti negli USA, Canada e Giappone, responsabile della sindrome emolitico uremica nell'uomo. Negli animali gli EHEC sono in grado di colonizzare il tratto terminale dell'ileo, il cieco ed il colon e posseggono la capacità di aderire alla mucosa intestinale causando una peculiare lesione istopatologica ultrastrutturale definita attacco ed eliminazione "*attaching and effacing*", simile a quella indotta dagli EPEC, caratterizzata dalla distruzione dei microvilli e da uno stretto contatto del batterio con la membrana cellulare. Questa capacità adesiva è governata da numerosi geni associati in un locus definito LEE (*locus of enterocyte effacement*) simile a quello degli EPEC. All'interno del locus LEE è presente anche il gene *eae* che codifica per l'intimina che è una adesina batterica. Il gene *eae* coincide all'86% col gene *eaeA* dei ceppi EPEC.

La patogenicità dei ceppi EHEC è legata soprattutto alla produzione di due tossine Shiga-simili (SLT-1 ed SLT-2), chiamate così perchè molto simili

strutturalmente alla tossina prodotta da *Shigella dysenteriae* tipo 1, dette anche verotossine VT1 e VT2, da cui la sigla VTEC usata in Italia per questo ceppo.

Tuttavia non si può affermare con sicurezza che tutti i ceppi EHEC dispongano della capacità di elaborare Verocitossine per cui nell'ambito degli EHEC è distinto un sottogruppo, denominato VTEC, che comprende i ceppi E. coli produttori di Verocitossina.

1.7 - Sottogruppo VTEC (STEC)

La scoperta del sottogruppo VTEC risale al 1977, ma solo nel 1983 è stato compreso il suo ruolo nel determinismo di patologie nell'uomo.

Le infezioni determinate dai ceppi VTEC sono considerate importanti, sebbene poco frequenti, poiché esitano in patologie molto gravi soprattutto nei bambini, negli anziani e nei malati (5).

Il sottogruppo VTEC produce verocitossine (VT-1 e VT-2), una famiglia di proteine citotossiche capaci di determinare effetto citopatico sulle cellule Vero, una linea cellulare derivante dal rene di scimmia verde africana. Tali tossine esprimono il recettore glicolipidico globotriaosylceramide (Gb3) ed hanno funzione simile all'rRNA-N-glicosidasi inibendo la sintesi proteica nelle cellule target. Inoltre è stato dimostrato che le VT tossine possono indurre apoptosi nelle cellule dei tubuli renali (2). I ceppi VTEC isolati nell'uomo possono elaborare le tossine VT1, VT2 o entrambe.

Le tossine VT-1 sono simili alle *Stx* prodotte da *Shigella dysenteriae* tipo 1, mentre le tossine VT-2 mostrano solo il 55% di omologia con la sequenza aminoacidica di Shigella; per tale motivo sono indicate da alcuni autori come *Shiga-like toxin* (SLT), per cui questi batteri sono anche indicati con la sigla STEC (E. Coli produttori di shigatossine).

1.8 - E. coli O157:H7

Il sierotipo E. coli O157:H7 è considerato il capostipite del sottogruppo VTEC. È stato identificato nel 1982 in occasione di una epidemia umana verificatasi nel Nord America e provocata dal consumo di hamburger contaminati. E. coli O157 è stato incluso nella lista dei patogeni emergenti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) e rappresenta un grave problema di sanità pubblica. E. coli O157:H7 risulta maggiormente indagato per la gravità della patologia conseguente all'infezione e per l'ubiquità nell'ambiente.

I caratteri distintivi di E. coli O157:H7 sono la mancata capacità di fermentare il sorbitolo, negatività alla prova d'idrolisi del MUG (4-metilumbelliferil-beta-D-glucuronide) ed è sensibile al blu di bromotimolo ad alte temperature (44-45°C). Queste caratteristiche sono sfruttate ai fini diagnostici nella routine di laboratorio per l'identificazione microbiologica del microrganismo. Peculiarità di E. coli O157:H7 è la resistenza alle basse temperature, infatti può resistere per nove mesi alla temperatura di -80°C, con successivo stoccaggio a -20°C. Una importante caratteristica, che può incidere sulla capacità di colonizzare l'intestino umano è la resistenza all'acidità dello stomaco. È noto che l'esposizione di batteri enterici ad un pH basso induce

una risposta acido-tollerante e ciò incrementa la sopravvivenza di *E. coli* O157:H7 in alimenti moderatamente acidi.

Tale patogeno, oltre che dalla produzione di VT, è caratterizzato anche dalla presenza di un plasmide di 60 MDa, che codifica per fattori di virulenza quali fimbrie ed enteroemolisine. Pertanto tale plasmide influenza notevolmente la patogenicità del batterio, controllando l'espressione dell'adesività e della sintesi di enterotossine.

Altro fattore di virulenza, comune anche agli EPEC, è dato dalla presenza di un locus genico associato con la lesione AE (*attaching and effacing*). Nel contesto di tale locus è presente il gene *eaeA*, codificante per la produzione di *intimina*, una proteina di 97 KDa, responsabile dell'adesività del batterio alle cellule epiteliali dell'intestino e della successiva loro distruzione.

L'antigene flagellare H7, codificato da una porzione del gene *flic*, aumenta la virulenza del sierotipo O157:H7 attraverso vari meccanismi. Esso facilita, infatti, il superamento dello strato di muco che riveste le mucose e, di conseguenza, aiuta l'adesione e la colonizzazione.

E. coli O157:H7 presenta pili di adesione tramite i quali realizza l'attacco alle cellule intestinali. La sede di elezione è rappresentata dal tratto intestinale, dove questo patogeno elabora le tossine che in seguito esplicano azione a livello del colon (colite emorragica o HC) o a livello sistemico (sindrome

uremico-emolitica o HUS e porpora trombocitopenica o TPP). Differenze di tipo quantitativo permettono di classificare i ceppi VTEC in tre sottocategorie:

- produttori di tossina in traccia
- produttori di tossina a bassi livelli
- produttori di tossina ad alti livelli

Le tossine Stx rappresentano il fattore di maggior patogenicità, e si rendono responsabili dello sviluppo di molte complicanze extraintestinali, come la HUS. Dal punto di vista strutturale le tossine prodotte dai ceppi VTEC sono costituite da una subunità A (attiva) e da diverse subunità B (“binding”-leganti). La tossina si lega ad un recettore specifico sulla superficie cellulare per mezzo delle subunità B; a ciò fa seguito l’interiorizzazione della subunità A che interrompe le funzioni cellulari interagendo con gli specifici componenti della struttura subcellulare.

È stata osservata produzione di tossina Shiga-like a bassi livelli da parte di ceppi non patogeni, come E. coli K12, così come con ceppi di *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus* di provenienza umana ed ambientale, ma non ci sono prove di associazione tra questi gruppi di batteri e la colite emorragica o la sindrome emolitica uremica.

	ETEC	EHEC	EIEC	EAggEC	EPEC	STEC
Tipo di diarrea	Acuta, acquosa, simile alla sindrome da colera	Acuta, acquosa, coliti emorragiche	Acuta, acquosa, dissenteria	Acuta, acquosa, persistente	Acuta, acquosa, persistente	Acuta, acquosa, persistente
Localizzazione intestinale	Piccolo intestino	Colon	Colon	Piccolo intestino	Dal piccolo intestino al retto	Colon
Sierogruppi O associati	6,8,12,15,20,25,78,80,85,92,114,128,139,148	157,26,111	28,29,124,136,143,144,152,164,167	3,15,44,51,77,778,86,91,92,111,113,126,141,146	26,55,86,111,114,119,125,126,127,128,142,158	11,15,18,21,75,83,128
Età a rischio	<2 anni, adulti	>1anno, anziani	Bambini, adulti	Bambini	<6 mesi	2-6 anni, adulti
Zone geografiche	In via di sviluppo	Sviluppate	Sviluppate ed in via di sviluppo	In via di sviluppo	Sviluppate ed in via di sviluppo	Sviluppate ed in via di sviluppo
Adesione	/	<i>eae</i>	/	<i>agg</i>	EAF, <i>eae</i>	<i>afa</i> , AIDA
Tossine	LT-I,Sta	SLT-I, II	/	/	/	
Invasione	/	/	<i>ial</i>	/	/	

Tabella 1 - Caratteristiche principali dei diversi ceppi

2. – EPIDEMIOLOGIA

E. coli fa parte della comune microflora intestinale degli animali a sangue caldo, e di conseguenza anche dell'uomo.

Non tutti i ceppi sono però innocui: ne esistono infatti alcuni responsabili di disturbi intestinali ed extraintestinali. I ceppi responsabili di disturbi extraintestinali causano diarrea, setticemia, infezioni del tratto urinario e meningite (8). Tra questi i più diffusi e pericolosi sono quelli che causano diarrea e “sindrome emolitico-uremica” (SEU).

La maggior parte delle infezioni sostenute da E. coli O157:H7 sono legate al consumo di bevande ed alimenti contaminati, in particolar modo all'ingestione di carne bovina macinata impropriamente conservata, consumata cruda o poco cotta. Il bovino, infatti, rappresenta il serbatoio naturale di E. coli O157:H7 ed è in grado di albergare il microrganismo ed altri ceppi VTEC a livello intestinale senza manifestare alcuna sintomatologia.

La principale fonte di contaminazione delle derrate alimentari è rappresentata dalle feci bovine e, in particolar modo durante alcune fasi della macellazione, le carcasse possono essere contaminate con materiale fecale.

L'escrezione del patogeno, di durata variabile ed intermittente, fa sì che l'infezione persista per lungo tempo all'interno dell'allevamento colpito. In genere il numero di soggetti escretori aumenta nei mesi estivi e coincide con l'aumento dei casi di sindrome emolitico uremica dell'uomo. Il bovino adulto è quindi da considerarsi il principale serbatoio di infezione, ma non si deve escludere la trasmissione del batterio attraverso altre specie animali quali suini, agnelli e polli nei quali numerosi ricercatori hanno evidenziato la presenza di ceppi VTEC, ed in particolare di E. coli O157:H7 nelle feci.

Altra fonte di contagio per l'uomo è rappresentata dal latte non pastorizzato o ricontaminato dopo trattamento termico, ed inoltre formaggi freschi, vegetali e frutta non sufficientemente lavati, lavati con acqua contaminata da materiale fecale o contaminati da liquami zootecnici.

La contaminazione può avvenire attraverso l'uso di attrezzature non ben sanificate ed anche tramite persone infette. Infatti, dopo la comparsa dei sintomi, l'uomo elimina il microrganismo con le feci per settimane e nei bambini è stato isolato il patogeno anche 20 giorni dopo la comparsa dei primi sintomi. È inoltre possibile la contaminazione crociata tra alimenti diversi, soprattutto se manipolati senza rispetto delle norme igieniche. Inoltre E. coli O157:H7 è stato isolato anche nei prodotti della pesca ed in particolare nei molluschi eduli lamellibranchi.

In Italia il primo caso di infezione da E. coli O157 è stato descritto nel 1998, quando è stato stabilito un sistema di sorveglianza nazionale della sindrome emolitica uremica causata dai ceppi appartenenti al gruppo degli E. coli enteroemorragici (EHEC).



Figura n. 1 Escherichia coli

3. – PATOGENESI E SINTOMATOLOGIA

L'uomo contrae l'infezione per via orale. Il germe giunto a livello gastrico supera la barriera dello stomaco in quanto resiste al pH acido e colonizza l'intestino. Alcuni ceppi di E. coli si rendono responsabili di forme gastroenteriche. Si tratta di ceppi patogeni che, a differenza delle forme saprofitiche che si localizzano nel basso intestino, tendono a colonizzare la parte alta dell'intestino.

La patogenesi da E. coli O157:H7 nell'uomo si esplica attraverso la produzione delle tossine nell'organismo.

E. coli O157:H7, giunto in sede intestinale, grazie ad un meccanismo utilizzato anche dagli E. coli enteropatogeni e conosciuto come “attaching-effacing”, aderisce e colonizza la mucosa del colon, sede d'elezione. Nella fase successiva E. coli O157:H7 produce le verocitossine che in seguito vengono assorbite e riversate in circolo, scatenando nell'uomo un ampio quadro di manifestazioni cliniche sia a livello intestinale che sistemico.

In alcuni casi l'infezione può decorrere in modo asintomatico, ma normalmente la patologia da E. coli O157:H7 è caratterizzata dalla presenza di diversi quadri clinici.

3.1 – Colite emorragica (HC)

La colite emorragica ha carattere autolimitante anche se negli anziani determina un alto tasso di mortalità. Questa sindrome si manifesta con la comparsa di improvvisi e dolorosi crampi addominali, seguiti da diarrea, che compare entro 24 ore, inizialmente acquosa poi emorragica, definita da alcuni autori anglosassoni “all blood and no stool” cioè tutto sangue e niente feci (6). I sintomi possono essere accompagnati da nausea e vomito, mentre la febbre è assente o lieve e ciò permette di differenziare tale patologia da quelle causate da altri ceppi di E. coli, come E. coli EIEC e da *Shigella dysenteriae*.

Il periodo di incubazione e la durata della malattia variano da tre a nove giorni. Circa il 5% dei casi è complicato dalla sindrome emolitica-uremica (SEU) che è caratterizzata dall'anemia emolitica, dalla trombocitopenia e dall'insufficienza renale acuta.

Questa sindrome è talvolta diagnosticata come porpora trombotica trombocitopenica (PTT) quando si verifica negli adulti.

3.2 – Sindrome uremico emolitica (SEU)

La sindrome uremico emolitica può presentarsi in forma primaria o come evoluzione della colite emorragica. Viene trasmessa per via alimentare o oro-fecale e sono colpiti prevalentemente soggetti immunodepressi, bambini ed anziani, nei quali può avere un decorso grave fino ad essere, talvolta, mortale. Generalmente i casi di SEU si presentano in forma sporadica, mentre focolai epidemici possono manifestarsi sia in ambito familiare che in comunità (asili nido, scuole, ecc.) e sono riconducibili all'esposizione a fonti comuni di infezione da VTEC. Tale sindrome è caratterizzata da trombocitopenia, anemia emolitica microangiopatica ed insufficienza renale acuta (7).

Talvolta possono subentrare anche complicazioni a carico dell'apparato cardiovascolare o al SNC con encefalopatie. L'esito della malattia è spesso letale e le lesioni renali sono permanenti, infatti i soggetti colpiti da tale sindrome vengono sottoposti a dialisi e trasfusioni di sangue.

3.3 – Porpora trombotica trombocitopenica (TTP)

La porpora trombotica trombocitopenica (TTP) si presenta in forma più generalizzata rispetto alla sindrome uremico-emolitica (HUS) nella quale il bersaglio principale è rappresentato dall'endotelio della microvascolatura renale, per tale motivo tali patologie vengono considerate come entità distinte, la differenza è solo nel grado dell'insufficienza renale.

Il danno vascolare si verifica simultaneamente in diversi organi e di conseguenza il quadro clinico ed ematologico è più grave.

La sintomatologia è in parte simile a quella della HUS, tranne che per una maggiore gravità e il costante coinvolgimento del sistema nervoso centrale, a carico del quale si rileva una elevata incidenza di disturbi.

La TTP, che si presenta soprattutto negli adulti, è tipicamente un'affezione acuta, potenzialmente letale, caratterizzata da grave trombocitopenia, frammentazione dei globuli rossi (cellule a elmetto, globuli rossi a forma triangolare, globuli rossi con aspetto distorto), con evidenza di emolisi (caduta del tasso emoglobinico, policromasia, aumento dei reticolociti, alto tasso di LDH sierico), insufficienza renale acuta, febbre e manifestazioni variabili di ischemia in molti organi (Kwaan, 1987).

Queste manifestazioni includono segni a carico del SNC, quali la confusione e il coma, ittero fluttuante (la bilirubina diretta e indiretta sono elevate a causa della combinazione di emolisi e danno epatocellulare), proteinuria, ematuria ed insufficienza renale acuta. I pazienti possono lamentare dolori addominali e aritmie da danno miocardico. Questi reperti si associano con caratteristiche lesioni patologiche che coinvolgono i vasi di organi multipli e soffici trombi costituiti da piastrine e fibrina (senza infiltrati di granulociti dentro e attorno alle pareti vasali caratteristici di vasculite) localizzati primariamente alle giunzioni arteriocalillari, descritti come microangiopatia trombotica.

Le varie sindromi cliniche di TTP sono indistinguibili, con l'eccezione che la malattia epidemica dei bambini associata con l'*Escherichia Coli* enteroemorragico 0157 e con batteri, che producono la correlata tossina Shiga, è più spesso associata con remissioni spontanee.

Nella maggior parte dei pazienti la TTP compare improvvisamente e spontaneamente senza cause apparenti. L'incapacità di distinguere la TTP da sindromi correlate, come ad esempio la pre-eclampsia, è enfatizzata da una identica microangiopatia trombotica dimostrata alla biopsia renale.

Dati forniti dal centro di sorveglianza per la HUS presso la clinica pediatrica di Bologna, indicano che nel 73% dei casi c'è guarigione, nel 19% persistono

danni renali cronici, il 6.7% dei pazienti deve subire un trapianto di reni mentre risulta letale per l'1.3% dei soggetti.

Queste sindromi si sviluppano tipicamente nella seconda settimana di malattia, possono essere annunciate da un aumento della temperatura e dei globuli rossi e sono molto più frequenti nei bambini di età inferiore ai 5 anni e negli anziani. Sono letali specialmente negli anziani e nei soggetti debilitati e possono manifestarsi con o senza complicanze.

4. – I BATTERIOFAGI



I batteriofagi o fagi sono virus che infettano i batteri e sono costituiti da una molecola di acido nucleico (DNA o RNA) racchiusa in un involucro protettivo proteico che può essere semplice o complesso (20). Differiscono dai plasmidi per la capacità di produrre tale involucro proteico e quindi di vivere, ma non di duplicarsi, anche al di fuori della cellula ospite. Sono parassiti intracellulari obbligati e per tale motivo possono moltiplicarsi esclusivamente all'interno della cellula batterica ospite, metabolicamente attiva e competente.

I batteriofagi possono essere classificati sulla base di tre proprietà:

- A. Tipo di acido nucleico
- B. Numero di eliche dell'acido nucleico
- C. Presenza o assenza di un involucro membranoso

Il fago T (da T1 a T7) che infetta E. coli è tra i batteriofagi più comunemente utilizzati per la ricerca. Il ciclo vitale del batteriofago T4 è rappresentativo del ciclo vitale di tutti i fagi. La struttura del batteriofago T4 è riportata in figura 2.

Si possono distinguere:

- una **testa**, costituita da varie proteine che assumono una struttura icosaedrica, un poliedro a 20 facce. All'interno della testa è contenuta una singola molecola di DNA a doppia elica.
- una **coda** è attaccata alla testa tramite il **collare**, ed è costituita da due tubi vuoti coassiali, uno interno, detto nucleo centrale, ed uno esterno, detto guaina che è contrattile.
- le **fibre** della coda, che il fago utilizza per trovare i batteri da infettare, sono attaccate alla struttura terminale della coda, la **piastra basale**.
- le **spine** sulla piastra basale ancorano il virus alla cellula ospite durante l'infezione.

Dopo l'assorbimento la guaina della coda si contrae e spinge il nucleo centrale attraverso la membrana cellulare. Il DNA fagico passa

attraverso il nucleo centrale nella cellula ospite, dove viene replicato ed impaccato nelle particelle virali figlie. Le proteine del capsid non penetrano nella cellula ospite. Il batteriofago attacca il batterio fissando le fibre su un punto preciso della superficie dell'ospite e con un meccanismo di contrazione inietta l'acido nucleico. Una volta iniettato il genoma fagico può seguire due vie, il ciclo litico o il ciclo lisogeno.

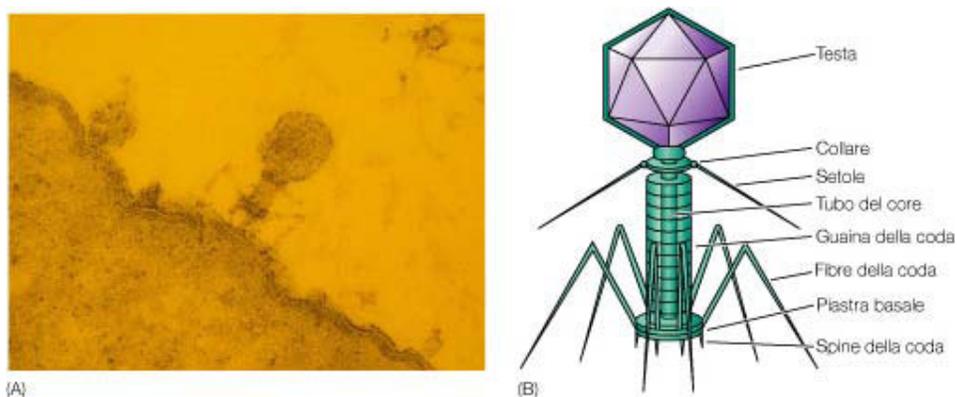


Figura 2 - Schema della struttura di un batteriofago T4

I batteriofagi possono essere distinti in virulenti e temperati, a seconda che il loro genoma abbia o meno la capacità di inserirsi nel cromosoma del batterio ospite e a replicare con esso. Mentre i primi seguono un ciclo litico, i secondi seguono un ciclo lisogeno.

Nel **ciclo litico** (tipico dei batteriofagi T) il fago entra nel batterio, i geni del fago vengono trascritti ed il materiale genetico viene replicato.

Infine il batterio ospite viene distrutto ed il ciclo si ripete nel momento in cui i fagi infettano nuovi ospiti. La particella risultante viene detta “trasducente”.

Alla lisi della cellula, queste particelle vengono rilasciate ed il lisato contiene una miscela di virioni normali, cioè singole particelle virali capaci di infettare nuove cellule, e virioni trasducenti.

Le particelle trasducenti non possono iniziare un normale ciclo di infezione in quanto privi di parte o tutto il genoma virale e per tale motivo si definiscono “difettive”. I geni batterici trasdotti possono invece ricombinare o integrarsi con il genoma dei batteri ospiti, dando luogo a mutazione e riarrangiamenti genici. Il fago utilizzerà l'apparato di replicazione dell'ospite per produrre nuove particelle fagiche e la distruzione dell'ospite batterico avverrà per lisi. Al termine del ciclo litico si formeranno nuove particelle virali ed alcune di esse avranno questo DNA “misto”: questo DNA virale con l'aggiunta dei geni batterici potrà essere inserito in altri batteri in caso di successiva infezione dei batteriofagi.

Nel **ciclo lisogeno** (tipico dei fagi temperati e del fago λ) il genoma fagico si integra in un punto specifico del cromosoma batterico (*att λ*). La lisogenia permette al genoma del fago di entrare a far parte dell'informazione genetica del batterio. In questo stato integrato, il fago latente nel genoma batterico viene chiamato "profago", mentre il batterio che contiene un profago è detto "lisogeno", cioè restare latente fino alla presenza di condizioni ideali, quando diventerà litico e comincerà a riprodursi.

Visto che molti virus si inseriscono sempre in locus ben definiti sul cromosoma, in questi casi trascineranno con loro sempre gli stessi geni, ovvero quelli adiacenti il sito di inserimento.

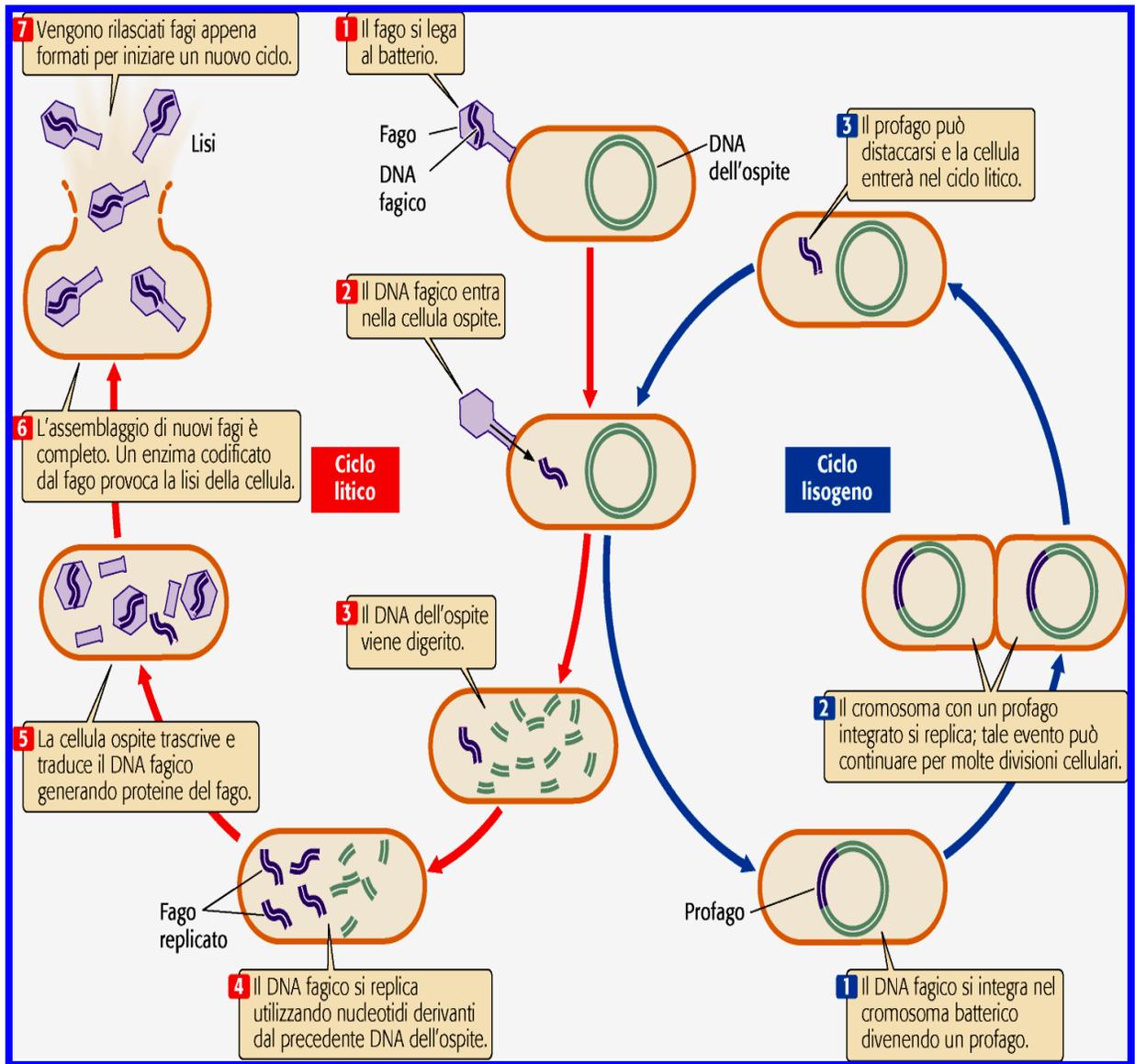


Figura 3- Ciclo litico e ciclo lisogeno

5. – INDUZIONE BATTERICA

Le normali funzioni cellulari possono essere compromesse da diversi fattori capaci di provocare interruzioni nella sequenza dei nucleotidi che costituiscono la molecola di DNA: ciò avviene quando i batteri sono esposti a determinati stress. In questi casi viene attivato un processo di induzione, la SOS risposta, per poter “riparare” il DNA. La Sos risposta costituisce un vero e proprio sistema di autoriparazione della molecola di DNA che è stata danneggiata e si potrebbe definire come un processo di “accensione” dell’espressione dei geni in risposta ad una sostanza presente nell’ambiente.

I principali fattori che possono compromettere le funzioni cellulari possono essere di natura ambientale, quali i cambiamenti di pH, i raggi ultravioletti, le variazioni di temperatura, o di natura chimica come il perossido di idrogeno, determinati antibiotici che inibiscono la sintesi di DNA (ad esempio la Norfloxacin). Normalmente la riparazione avviene ad opera di alcuni enzimi ma, quando questi falliscono nel restauro, viene indotta la riparazione Sos che provvede a riparare i “vuoti” con altro materiale genetico ponendolo in un ordine casuale. Si tratta di una soluzione imperfetta, come spiegano gli autori di uno studio pubblicato su *Molecular Cell*, ma generalmente sufficiente a

ristabilire la funzionalità del gene danneggiato. Talvolta questa mutazione prodotta dalla risposta Sos può essere vantaggiosa per l'organismo: un esempio è fornito dai batteri, nei quali si sono evoluti ceppi resistenti agli antibiotici.

6. – TRASDUZIONE

Negli organismi eucarioti i processi di ricombinazione si associano frequentemente all'acquisizione da parte del microrganismo di DNA eterologo e ciò avviene attraverso la riproduzione sessuata. Nei batteri il trasferimento genetico è definito parasessuale, in quanto la ricombinazione avviene per meccanismi diversi dalla meiosi e l'acquisizione di DNA eterologo avviene attraverso tre meccanismi distinti/ principali di scambio genetico:

- **Trasformazione** ovvero il processo attraverso il quale una molecola di DNA del donatore viene presa dall'ambiente esterno ed incorporata nel genoma di una cellula ricevente.
- **Coniugazione** processo di trasferimento di DNA da una cellula all'altra, mediato da plasmidi
- **Trasduzione** processo di trasferimento di DNA da una cellula all'altra, mediato da un batteriofago

La trasduzione, scoperta nel 1952 da Joshua Lederberg e da Norton Zinder, consiste nel trasferimento di materiale genetico tra batteri mediata da fagi.

La trasduzione è un meccanismo diffuso di scambio genico e di ricombinazione nei batteri e, come la trasformazione e la coniugazione, risulta estremamente importante per la mappatura dei geni batterici.

A seconda del meccanismo con cui avviene il trasferimento dei geni tra i batteri si parla di trasduzione generalizzata o specializzata. Un'importante differenza tra trasduzione specializzata e generalizzata risiede nel meccanismo con cui si origina il fago trasducente.

Nella **trasduzione specializzata** il DNA trasducente che verrà incorporato nel fago si origina mediante induzione, provocata ad esempio mediante raggi ultravioletti, di una cellula batterica che segue il ciclo lisogeno. Nella trasduzione specializzata l'integrazione del fago avviene in un sito specifico del genoma batterico e per tale motivo essa è effettuata solo da virus lisogeni. Questi fagi sono in grado di incorporare e trasferire solo i geni batterici posti vicino al sito di integrazione del profago lisogeno. Il fago lambda (λ) è in grado di effettuare questo tipo di trasduzione. Lambda, al contrario dei fagi T, è un fago temperato, cioè quando infetta una cellula può scegliere se innescare il ciclo litico, come il fago T, e distruggere così la cellula ospite, oppure stabilire una relazione lisogenica con l'ospite, circolarizzando ed integrando il suo DNA nel cromosoma dell'ospite, in un sito specifico. Il fago λ può iniziare un ciclo lisogeno od un ciclo litico, a seconda della proteina regolatrice attivata che agisce sul repressore di λ o sulla proteina Cro. Tali proteine occupano i siti operatori chiave che controllano la trascrizione del genoma del fago λ . Lo stato lisogenico viene mantenuto dal controllo del repressore di λ (22).

Durante la lisogenia il genoma di λ integrato, detto profago, è geneticamente inattivo, ma può essere indotto all'escissione in vari modi. Quando il profago

si escinde impropriamente può portarsi dietro solo i geni che fiancheggiano il punto di inserzione nel cromosoma batterico.

Una molecola di λ che si origina in questo modo è difettiva, in quanto ha lasciato nel genoma batterico una parte dei suoi geni. Quando il cromosoma di λ escisso impropriamente viene impaccato in un involucro proteico, forma particelle trasducenti specializzate, costituite da materiale genetico batterico e virale. Dopo la lisi della cellula ospite, la particella di trasduzione specializzata inietta il suo DNA in un altro batterio trasportando così i geni batterici da una cellula ad un'altra. Tuttavia il DNA difettivo di questa particella non è in grado di dirigere la sintesi di questa progenie virale, a differenza dei geni batterici che, trasportati dalla particella di trasduzione specializzata, ricombinano con quelli della cellula infettata e vengono incorporati nel suo genoma. Lambda si inserisce in una regione specifica del genoma di *E. coli* detta λ *att* (sito di *attacco*). Le particelle di trasduzione specializzata possono essere utilizzate per mappare i siti di attacco fagico e per analizzare i geni strettamente associati ad essi.

In entrambi i tipi di trasduzione le particelle virali saranno difettive in quanto i geni batterici avranno sostituito tutti o alcuni geni virali fondamentali per le funzioni del virus.

Nella **trasduzione generalizzata**, invece, il fago trasducente può originare sia con questo stesso meccanismo, sia mediante l'infezione di una cellula non lisogena con un fago temperato a cui segue la replicazione del fago stesso e la lisi cellulare.

La trasduzione generalizzata si verifica al termine del ciclo vitale del fago, nel momento in cui alcuni frammenti di DNA del batterio rimangono incorporati per errore nel capside fagico in sostituzione del genoma del fago. La dimensione della testa fagica determina la quantità di DNA batterico che può essere impaccato. Questo tipo di errore genera una particella fagica contenente DNA batterico, le cui dimensioni possono variare, ma che in genere rappresentano l'1 o il 2% del genoma batterico. Una particella fagica contenente DNA batterico del donatore viene rilasciata durante la lisi cellulare e le proteine dell'involucro del fago fungono da veicolo per il trasferimento del DNA batterico da una cellula ad un'altra. Questa particella *trasducente* non contiene DNA fagico e non è in grado di compiere un ciclo vitale. Il DNA iniettato deve essere incorporato nel genoma dell'ospite per poter continuare ad esistere. Il fago può trasferire qualunque segmento del genoma batterico in

un altro batterio e determinare trasduzione; quali e quanti frammenti possono inserirsi è casuale, da cui il nome trasduzione generalizzata.

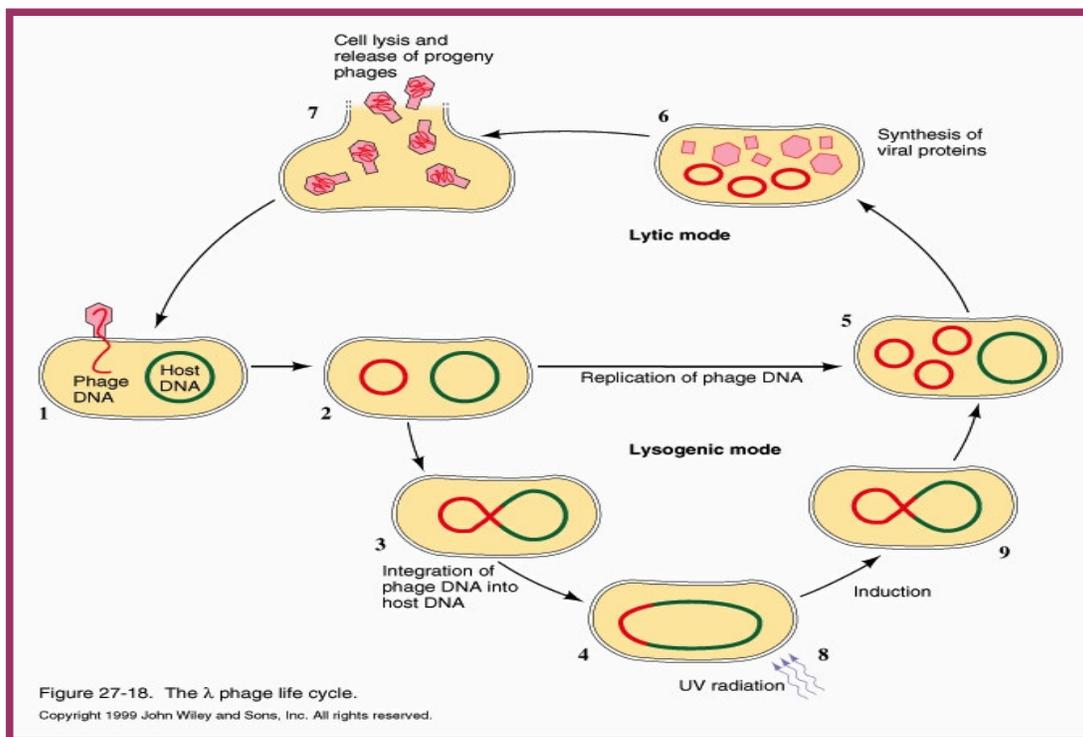


Figura n. 4 – Ciclo vitale del fago λ

PARTE SPERIMENTALE

7. – ANALISI MEDIANTE PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction o reazione a catena della polimerasi) è una tecnica altamente sensibile e specifica che permette la sintesi ciclica *in vitro* di segmenti di DNA a doppia catena, e l'amplificazione della sequenza target milioni di volte in tempi brevi (poche ore).

La PCR è il più comune metodo di ricerca in grado di produrre un numero elevato di copie di una specifica sequenza di DNA.

Tale tecnica è stata messa a punto nel 1983 da Kary Mullis (Mullis 1990), ed ha rivoluzionato la genetica molecolare rendendo possibile un tipo di approccio del tutto nuovo per lo studio e l'analisi dei geni (10).

Partendo da un DNA “stampo” denaturato è possibile ottenere un secondo filamento, grazie alla capacità enzimatica della DNA polimerasi.

La miscela di reazioni comprende quattro desossiribonucleotidi (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), opportune concentrazioni saline ($MgCl_2$), un tampone, la Taq polimerasi termostabile, estratta dal *Thermus aquaticus*, un batterio isolato per la prima volta nelle pozze termali del parco nazionale dello Yellowstone negli Stati Uniti. La notorietà di questo batterio è dovuta alle caratteristiche di estrema termostabilità di un suo enzima, la DNA polimerasi

(commercialmente detta *Taq polimerasi*). Questa polimerasi ha un optimum a 72°C e resiste alle alte temperature usate negli step di denaturazione permettendo di organizzare la reazione in ripetizioni cicliche, ed aumentando la specificità della reazione. Esistono oggi numerose varianti della *Taq polimerasi*, come le polimerasi isolate da *Thermus flavus* (Tfl polimerasi), *Thermus thermophilus* (Tth polimerasi) e molte altre. Inoltre la miscela di reazioni comprende oligonucleotidi a singolo filamento che, fiancheggiando il segmento stampo, funzionano da inneschi o “primers” per l’attività enzimatica. I primers sono orientati con le loro estremità 3’ uno di fronte all’altro, in modo che la sintesi da parte della DNA polimerasi, che catalizza la crescita di nuovi filamenti in direzione 5’-3’, si estenda lungo il segmento di DNA tra loro interposto.

La reazione a catena della polimerasi è composta generalmente da un ciclo di tre reazioni successive:

- **denaturazione (denaturation) del DNA** nella quale il duplex di DNA da amplificare viene separato in due filamenti a singola elica mediante riscaldamento a temperature di circa 95°C

- **fase di attacco (annealing)** ovvero l'appaiamento degli oligonucleotidi “*primers*” alle sequenze complementari presenti sulle due catene di DNA bersaglio, precedentemente formatesi, con la formazione di legami a idrogeno. Ciò avviene ad una temperatura di circa 60°C

- **fase di allungamento (extention o elongation)** in cui si ha l'attivazione della DNA *polimerasi termostabile*, la Taq polimerasi, che sintetizza due nuovi filamenti di DNA complementari alla sequenza bersaglio, a partire dalle terminazioni 3'OH dei primers delle due molecole di innesco e dai nucleotidi trifosfati presenti nella miscela di reazione.

Questi tre passaggi costituiscono un ciclo di PCR, ma una completa amplificazione prevede il susseguirsi di queste tre fasi per circa 30-35 volte.

Al termine del primo ciclo, sono presenti due coppie del segmento, ciascuna

formata da un filamento nuovo ed uno vecchio. I prodotti di questo primo ciclo sono a loro volta utilizzati come stampo nei cicli successivi.

Mediante ripetuti cicli di denaturazione, ibridizzazione dei primers (annealing) ed estensione dei primers si ottiene un accumulo esponenziale del frammento target la cui lunghezza è definita dall'estremità 5' dei due primers utilizzati. La specificità delle PCR è determinata dalla scelta dei primers i quali, per poter assicurare unicità di amplificazione di una sequenza dovrebbero avere una lunghezza media di circa 20 paia di basi (bp) (16).

Infatti primers troppo corti risultano essere poco specifici avendo alte probabilità di legarsi a zone di complementarietà presenti nel genoma. Inoltre esistono altri parametri che possono influenzare la funzionalità di un primer, quali i rapporti adenina/timida (A/T) e guanina/citosina (G/C), la presenza di sequenze ripetute o complementari (18).

Attualmente l'utilizzo di specifici programmi software permette di ottimizzare le sequenze oligonucleoidiche da utilizzare come primer nella reazione di amplificazione (17).

Inoltre l'ottimizzazione dei diversi parametri intervengono nella reazione, quali la concentrazione dei primers, dei sali, del DNA stampo, il numero di cicli e la temperatura di annealing permettono di far ottenere un buon test di PCR (Wolcott, 1992; Mullis *et al.*, 1994; Karch *et al.*, 1995).

Così come la lunghezza media dei frammenti di DNA è un importante parametro, infatti è essenziale che la dimensione media dei frammenti di DNA nel campione non sia significativamente più piccola della sequenza bersaglio nell'analisi (12). La degradazione del DNA presente nel campione da amplificare dipende soprattutto da processi chimici, fisici o enzimatici che esso subisce.

Le metodiche di estrazione devono inoltre assicurare l'assenza di inibitori della PCR (18).

La reazione a catena della polimerasi, a partire dal 1985 è il metodo correntemente utilizzato per l'amplificazione degli acidi nucleici ed ha assunto un ruolo di preminenza nella diagnostica medica e nell'analitica (19).

La PCR quantitativa è una tecnica basata sulla reazione a catena della polimerasi che è in grado di misurare la concentrazione iniziale di una sequenza target in un campione biologico (25).

In particolare la PCR quantitativa e la PCR Real Time hanno trovato numerose applicazioni, in primo luogo nell'ambito della diagnostica medica, con recenti applicazioni nelle indagini analitiche degli alimenti.

8. – SCOPO DELLA RICERCA

Oggetto del presente lavoro di tesi è stato lo studio del trasferimento dei geni che codificano per i fattori di virulenza, da ceppi di E. coli produttori di verocitossine a ceppi di E. coli che non producono verocitossine. Lo studio è stato condotto valutando l'influenza di alcuni fattori su tale trasferimento; quest'ultimo può avvenire mediante uno dei seguenti meccanismi: trasduzione, trasformazione e coniugazione. Alcuni autori (26) hanno dimostrato che i chinoloni, una famiglia di antibiotici chemioterapici, sono in grado di inibire il meccanismo di coniugazione batterica. Tali antibiotici bloccano la sintesi del DNA inibendo l'enzima batterico DNA girasi coinvolto nella spiralizzazione della molecola di acido nucleico. La mancata spiralizzazione interferisce sul meccanismo di replicazione del DNA (Hooper, 2000; Alovero et al., 2000). In particolar modo, l'interazione di questi agenti battericidi con l'enzima girasi inibisce l'attività di avvolgimento della doppia elica formando un complesso chinolone-enzima-DNA che contiene solo frammenti di DNA (24).

L'inibizione di questo enzima comporta un effetto battericida poiché il batterio perde la capacità di replicazione del DNA (23).

I chinoloni, oltre ad essere potenti agenti battericidi, hanno la capacità di eliminare i plasmidi dalle cellule batteriche inibendo il meccanismo di coniugazione che è mediato da plasmidi, e che permette il trasferimento di DNA da una cellula ad un'altra. Partendo da queste considerazioni nel presente studio è stato valutato se i chinoloni avessero anche una influenza sul meccanismo di traduzione fagica. È stato studiato se tali antibiotici siano in grado di inibire il trasferimento dei geni, mediato da batteriofagi, tra ceppi di E. coli. Dal momento che i geni che codificano per le verocitossine (VT-1 e VT-2) di E. coli possono essere sintetizzati all'interno del genoma fagico, è importante ostacolare la diffusione di tali geni tra ceppi selvaggi di E. coli, per impedire lo sviluppo di nuove linee cellulari produttrici di verocitossine. Tali batteri patogeni possono essere trasferiti all'uomo tramite derrate di origine animale provenienti da soggetti infetti.

In particolar modo è stato monitorato l'effetto della Norfloxacin, un antibiotico chemioterapico appartenente alla famiglia dei chinoloni sottogruppo dei fluorochinoloni di prima generazione o short acting (21).

9. – MATERIALI E METODI

Sono stati selezionati ceppi di E. coli da due linee cellulari differenti: ceppi di E. coli produttori di verocitossine e resistenti al cloramfenicolo (Cm^{R}) e ceppi non patogeni. All'interno dei ceppi produttori di verocitossine, utilizzati come ceppi donatori, è stato integrato il fago $\Phi 3538$ che codifica per le tossine VT_2 (stx_2). Il fago $\Phi 3538$ è stato isolato dal ceppo 3538/95 di E. coli O157:H7. Il ceppo 3538/95 di E. coli O157:H7 fu identificato per la prima volta nel 1995 in un paziente in Germania, Würzburg. Questo ceppo possiede geni che codificano per i fattori di virulenza stx_2 , eae e E-hly , ed è citotossico per le cellule Vero.

È stato utilizzato come ricevente il ceppo MC1061 non patogeno, appartenente ad E. coli K12, che risulta essere resistente alla streptomicina (Str^{R}).

In provette contenenti 10 ml di LB (Luria Bertani) sono stati inoculati 5 μl di brodocolture contenenti il ceppo MC1061 e 5 μl di brodocolture contenenti il ceppo all'interno del quale è stato integrato il fago $\Phi 3538$.

Le colture batteriche sono state poste ad incubare a 37°C in bagnetto oscillante per 24 ore.

È stato effettuato un esperimento di lisogenia sui trasduttanti risultati resistenti sia al cloramfenicolo (Cm^{R}) che alla Streptomicina (Str^{R}) al fine di far integrare il genoma fagico all'interno del cromosoma batterico del ceppo ricevente.

Su entrambe le linee cellulari è stato effettuato un saggio di PCR, utilizzando primers che amplificano per una regione interna del gene *stx₂* che produce un frammento di DNA di 1,259 bp (1) per confermare l'inserzione del fago.

Successivamente le colture sono state testate in un esperimento di trasduzione del fago utilizzando come agente inducente l'antibiotico Norfloxacina, per valutare se veniva favorito il trasferimento del batteriofago $\Phi 3538$ da un ceppo ad un altro in presenza dell'antibiotico.

In due provette, A e B, contenenti 10 ml di LB (Luria Bertani) sono stati inoculati 5 μl di brodocolture contenenti il ceppo MC1061 e 5 μl di brodocolture contenenti il ceppo all'interno del quale è stato integrato il fago $\Phi 3538$.

Le due provette sono state poste ad incubare a 37°C in bagnetto oscillante. Dopo 4 ore di incubazione sono stati aggiunti 20 μl di Norfloxacina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ norfloxacina) nella sola provetta A. Entrambe le colture batteriche sono state poste ad incubare a 37°C per 24 ore.

Sono stati seminati 100 µl di subcoltura batterica su terreno solido selettivo LB agar per monitorare la presenza del fago dei ceppi batterici cresciuti in brodo che conteneva la Norfloxacin rispetto a quelli cresciuti in brodo non antibiotato, successivamente sono state allestite diluizioni scalari, fino alla 10^{-8} per i ceppi donatori, riceventi e trasduttanti.

Le piastre sono state poste ad incubare in stufa per 24 h a 37° C. Dopo incubazione, le piastre sono state esaminate ed è stato valutato il livello di crescita batterica. La PCR è stata eseguita sui trasduttanti, prelevando singole colonie e stemperandole in 10 ml di LB. Il DNA è stato estratto dalle colonie batteriche utilizzando il kit Dneasy Blood & Tissue (Qiagen).

Per poter confermare l'integrazione del fago all'interno del genoma del ceppo ricevente è stato effettuato un saggio di PCR (9-10).

Le analisi mediante PCR sono state effettuate utilizzando i primers **HSB1** ed **HSB3** che amplificano una regione interna del gene *stx₂*, che produce un frammento di 1,259 bp (1).

La reazione di amplificazione è stata condotta in GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems) utilizzando 50 µl di miscela, in acqua bidistillata sterile, costituita da:

- 200 μ M dNTPs
- 5 μ l di buffer
- 2.0 U di Taq (Perkin-Elmer)
- $MgCl_2$ 25 mM
- 30 pmol di ciascun primer HSB1 e HSB3

HSB1 5'-CCC GGT ACC ATG AAG TGT ATA TTA TTT AAA TGG-3'

HSB3 5'-CCC GCA TGC TCA GTC ATT ATT AAA CTG CAC-3'

Ciascuna reazione è stata ripetuta per 30 cicli costituiti da:

- denaturazione a 94°C per 30"
- annealing a 56°C per 1'
- extension a 72°C per 1' e 30"

Il primo ciclo è stato preceduto da una *denaturazione* condotta a 94°C per 5 minuti.

Al termine dei 30 cicli è stata eseguita una fase di *extension* a 72°C per 5 minuti.

I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5% a 60 V e visualizzati mediante transilluminatore UV previa colorazione con bromuro di etidio.

Come riferimento è stato utilizzato un ladder Lambda DNA/EcoRI + Hind III Markers (Promega).

E. coli K-12 che proviene dal ceppo C600 è stato usato come controllo positivo nell'esperimento di trasduzione del fago Φ 3538 e come indicatore del ceppo.

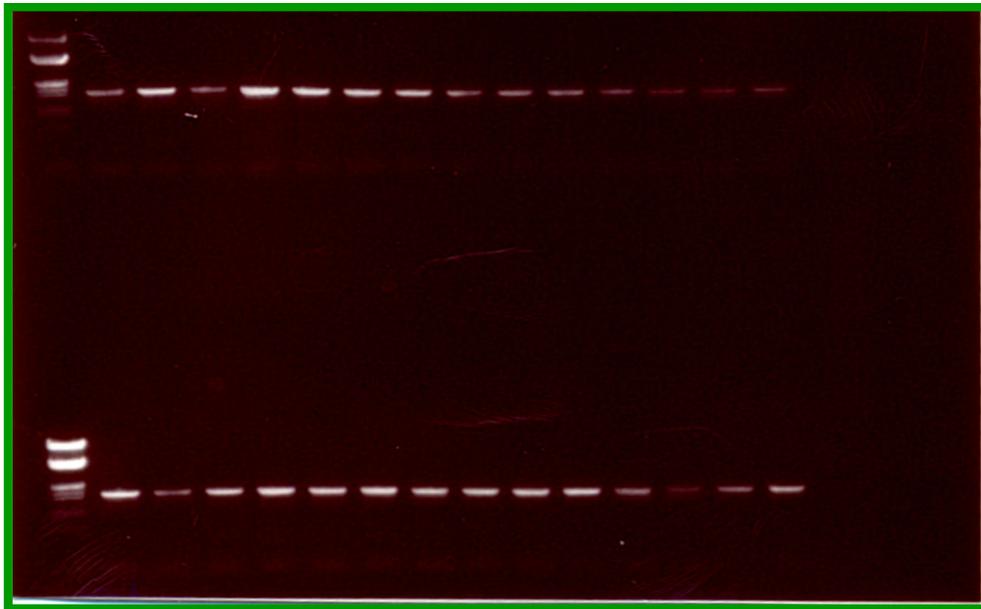
10. – RISULTATI

L'elevata specificità della reazione di PCR, applicata alle colonie batteriche, ha consentito di visualizzare e monitorare l'inserzione del batteriofago all'interno del ceppo MC1061. La PCR può essere applicata direttamente a colture di arricchimento. Il tempo richiesto per il test è considerevolmente inferiore alle metodiche tradizionali di isolamento ed identificazione.

È stato accertato che il trasferimento del batteriofago che codifica per i geni produttori di VT-2 avviene in egual misura sia in presenza che in assenza dell'antibiotico Norfloxacin; la presenza del fago all'interno del ceppo MC1061 si mantiene costante, infatti si è calcolata una frequenza di trasduzione di $1-5 \times 10^{-3}$ (trasduttore/donatore).

I risultati del presente lavoro hanno mostrato che il trasferimento del batteriofago che codifica per i geni produttori di VT-2, avviene in egual misura sia in presenza che in assenza dell'antibiotico Norfloxacin. Tale antibiotico non esplica pertanto alcun meccanismo di inibizione nel trasferimento del fago Φ 3538 da ceppi di E. coli produttori di verocitossine a ceppi di E. coli non patogeni.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



→ 1,259 bp

→ 1,259 bp

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Foto n.1

Lane 1 e 16: ladder Lambda DNA/EcoRI + Hind III Markers (Promega)

Lane 2-15 e 17-30: Stx₂ 1,259 bp

11. – CONCLUSIONI E SVILUPPI DELLA RICERCA

Considerando la gravità delle infezioni provocate da tale microrganismo e la complessità epidemiologica che lo caratterizza, si rende necessario monitorare la presenza dei ceppi patogeni negli animali da allevamento. Da un punto di vista sanitario è importante ostacolare la formazione di nuovi ceppi difficilmente eradicabili ed in particolar modo dei ceppi produttori di verocitossine. È importante porre attenzione ai ceppi di E. coli produttori di tossine ed allo sviluppo di nuovi ceppi, dal momento che i geni che codificano per le verocitossine (VT-1 e VT-2) di E. coli possono essere sintetizzati all'interno del genoma fagico; ciò potrebbe favorire la diffusione di tali geni tra ceppi selvaggi di E. coli e provocare anche il successivo sviluppo di nuovi ceppi produttori di tossine. E. coli patogeno è trasferibile all'uomo tramite derrate di origine animale provenienti da soggetti infetti.

Identificare strategie in grado di ridurre il trasferimento dei geni che codificano per i fattori di virulenza da ceppi di E. coli produttori di verocitossine a ceppi di E. coli non produttori, potrebbe ostacolare la formazione di nuovi ceppi patogeni.

Dal presente studio si evince che la presenza dell'antibiotico Norfloxacin non influisce sul trasferimento del fago. La Norfloxacin non solo non è da considerarsi come fattore inducente il trasferimento del fago tra ceppi di *E. coli* ma inoltre non esplica alcun meccanismo di inibizione in tale trasferimento. La Norfloxacin, pur non incidendo direttamente sul processo di trasduzione, attiva, come è noto, il sistema SOS che interviene quando viene bloccata la sintesi del DNA cellulare. Questo sistema interviene in caso di blocco della divisione cellulare come sistema di riparazione del DNA. In conclusione la Norfloxacin non blocca direttamente il processo di trasduzione, ma permette l'attivazione dei sistemi SOS che andranno a "riparare" il DNA danneggiato.

I geni che codificano per le verocitossine (VT-1 e VT-2) di *E. coli* possono essere sintetizzati all'interno del genoma fagico ma, dal momento che l'utilizzo dell'antibiotico Norfloxacin non è stato in grado di inibire il meccanismo di trasduzione, la presente indagine procederà allo studio di ulteriori fattori che possano influire sul trasferimento genico per impedire la diffusione di geni di virulenza tra ceppi di *E. coli*.

Il trasferimento dei fattori di virulenza potrebbe essere inibito da variazioni di temperatura, utilizzo di altri antibiotici, stress, variazioni di pH. Sarà

pertanto interessante prendere in considerazione questi parametri dal momento che potrebbero influire, in natura, sul trasferimento genico nei prodotti di origine animale. In particolar modo potranno essere utilizzati terreni di crescita con differenti valori di pH (pH 7, 5.6, 4) in cui potrà essere seminato un ugual volume di coltura batterica composta dal ceppo donatore, ricevente e ceppo trasducente, per evidenziare eventuali variazioni di pH durante il trasferimento del fago dal ceppo donatore al ceppo ricevente. Inoltre saranno valutate le curve di crescita del ceppo donatore, ricevente e trasducente e monitorare il trasferimento del fago. La tecnica di PCR verrà applicata per confermare l'avvenuta trasduzione del fago.

Inoltre in uno studio separato si potrebbe identificare il sito di inserzione del batteriofago Φ 3538 in diversi ceppi di E. coli utilizzando la tecnica di PCR inversa (11).

BIBLIOGRAFIA

1) Schmidt, H., Bielaszewska, M., and Karch, H. (1999)

Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage phi3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 65: 3855-3861

2) Livny, J., and Friedman, D.I. (2004)

Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system. *Mol Microbiol* 51: 1691-1704

3) Miller, J H.

Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press

4) Bell B. P., Goldoft M., Griffin P. M., Davis M. A., Gordon D. C., Tarr P. I., Bartleson C. A., Lewis J. H., Barrett T. J., Wells J.G., Baron R., Kobayashi J.

A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. JAMA. 1994;**272**:1349–1353

5) Griffin, P M.

Escherichia coli O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infection of the gastrointestinal tract. New York, N. Y: Raven Press; 1995 pp. 739-762

6) Remis R. S., MacDonald K. L., Riley L. W., Puhr N. D., Wells J. G., Davis B. R., Blake P. A., Cohen M. L.

Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7 Ann. Intern. Med. 101:624-626 1984

7) Karmali M. A., Petric M., Lim C., Fleming P. C., Arbus C. S., Lior H.

The association between idiopathic haemolytic uremic syndrome and infection
by verotoxin producing Escherichia coli

The J. of Infect. Disease 5: 775-782 1985

8) E. Bocchietto, C. Cantoni, L. Marossi, A. Milanesi

Ricerca di E. coli O157:H7 e di sierogruppi contenenti il gene eae mediante
PCR Industrie Alimentari – XXXVII (1998) dicembre

9) Karch H., Schwarzkopf A. and H. Schmidt

Amplification methods in diagnostic bacteriology (selected examples)

J. Microbiol. Methods., 23: 55-73

10) Mullis K.B., Ferré F. and R.A Gibbs The Polymerase chain reaction.

Birkäuser – Verlag (eds.), Basel.

11) Wolcott M.J.

Advances in nucleic-acid based detection methods.

Clin. Microbiol. Rev., 5: 370-386

12) Berry A.J. and J.B. Peter

DNA probes for infectious disease. Deagn. Med., 7:62-72

13) International Journal of Food Microbiology 108 (2006) 15 – 21

14) Padhye N. V., Doyle M. P.

Escherichia coli O157:H7: epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food.

J. Food Prot. 55, 7: 555-565 1992

15) March S. B., Ratman S.

Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis.

J. Clin. Microbiol. 23: 869-872

16) Berry A., Dal Sasso D., Manera C.

DNA probes for infectious disease

Deagn. Med. 7: p.62-72

17) Meyer P. (1995)

Understanding controlling transgene expression. Trends in Biotechnology 13:
p. 332-337

18) Hemmer W.

Foods derived from genetically modified organism and detection methods
BATS- Report 2/97, BATS, Clarastrasse 13, 4058, Switzerland

**19) Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S. J., Higuchi R., Horn G. T.,
Mullis K. B., Erlich H. A.**

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA
polymerase. Science, p. 482-487

20) Snustad D. P., Simmons M., J.

Principles of genetics-2nd ed. 2000

21) Kreuzer, K.N., Cozzarelli N.R.

Escherichia coli mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth.

J.Bacteriol. 140:424-435

22) Kreuzer, K.N., K. McEntee, A.P. Geballe, Cozzarelli N.R.

Lambda transducing phages for the *nalA* gene of *Escherichia coli* and conditional lethal *nalA* mutations. *Molec. Gen. Genet.* 167:129-137

23) Lewin, C.S., B.M.A. Howard, Smith J.T.

4-Quinolone interactions with gyrase subunit B inhibitors

J. Med. Microbiol. 35:358-362

24) Goodman and Gilman

Le basi farmacologiche della terapia, 2003

25) Orlando C., Pinzani P., Pazzagli M.

Development in quantitative PCR. Clin. Chem Lab Med. 36 (5): p. 255-269

26) S. Roveta, A. Marchese, E.A. Debbia

Bollettino di Microbiologia e Indagini di Laboratorio news vol. 9, n. 2, 2003,

Editore Sirse Srl