



I CONVEGNO AISSA#UNDER40

16-17 maggio 2019 - San Donà di Piave (VE)



DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Risorse naturali e Ambiente

ter@volute
FESTIVAL DELLA BONIFICA

Studio dell'espressione dei geni di virulenza di *Arcobacter butzleri* durante l'infezione simulata di modelli intestinali umani

Davide BUZZANCA*, Cristian BOTTA, Luca COCOLIN, Valentina ALESSANDRIA, Kalliopi RANTSIOU

Dipartimento di scienze agrarie, forestali ed alimentari (DISAFA), Università degli Studi di Torino, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO), ITALIA.

*Davide BUZZANCA, davide.buzzanca@unito.it

INTRODUZIONE

Arcobacter butzleri è un batterio patogeno alimentare emergente appartenente alla famiglia delle **Campylobacteriaceae**, gram negativo, frequentemente isolato da **carni bovine, suine e di pollo** e di conseguenza da campioni fecali. *A. butzleri* è inoltre considerato un patogeno contaminante di **acque dolci e salmastre**. Le infezioni provocate da questo batterio possono causare **sintomi gastrointestinali** quali diarrea, febbre e dolori addominali in uomo e animali. Nel caso di infezioni in campo veterinario gli animali maggiormente colpiti risultano essere suini, bovini e polli. Il **potenziale di patogenicità** di *A. butzleri* è tuttavia attualmente **sottostimato** a causa della carenza di informazioni riguardanti i suoi meccanismi metabolici, genomici e di virulenza. Questo lavoro ha come **obiettivo principale** quello di **studiare**, in condizioni di interazione ospite-patogeno, **l'espressione dei geni attualmente considerati correlati alla virulenza** (per corrispondenza genica con geni di virulenza di *Campylobacter jejuni*) di *A. butzleri* LMG 10828^T: a tale scopo è stata messa a punto una metodica qPCR (*Real Time PCR*) per studiare **l'espressione di tali geni in condizioni di interazione tra il batterio e le tre linee cellulari** diverse (Caco-2, HT29 MTX e misto 9/1) dopo 90 e 150 minuti dall'inoculo batterico iniziale. Parallelamente sono state eseguite prove fisiologiche al fine di descrivere la patogenicità del batterio in oggetto sulle linee cellulari citate.

METODI

Per descrivere **l'espressione dei geni imputati alla virulenza (*cadF*, *ciaB*, *cj1349*)**, sono stati disegnati **primers ex novo** sul genoma di riferimento del ceppo LMG 10828^T per ottenere un'amplificazione in **Reverse Transcriptase (RT)-quantitative(q)PCR** specifica in condizioni di co-incubazione con differenti linee cellulari. Il **design** di questi primers è stato ottimizzato con diversi test sul cDNA di linee cellulari umane e *A. butzleri* in gradiente termico e tramite il sequenziamento dei prodotti PCR al fine di confermare il corretto appaiamento dei primers nelle regioni **target**. L'espressione relativa dei geni citati è stata quantificata con la metodica RT-qPCR, utilizzando diversi geni *housekeeping* (*gyrA*, *slyD*, *tuf*, *rpoA*, *ilvC*) in condizioni di co-incubazione ospite-patogeno. Brevemente, i modelli cellulari intestinali *in vitro* produttori di muco (**HT29 MTX e Caco-2 + HT29 MTX 9/1**) e non (**Caco-2**) sono stati co-incubati con il batterio in oggetto e successivamente si è proceduto estraendo l'RNA totale a differenti tempistiche (90 e 150 minuti). Allo stesso tempo si è proceduto tramite conte batteriche per descrivere le capacità di colonizzazione e traslocazione di *A. butzleri*, tramite l'impiego rispettivamente, di modelli a due dimensioni (**2D**) e a tre dimensioni (**3D**). In particolare, i **modelli 3D** hanno consentito di studiare la **degradazione dello strato cellulare e il passaggio batterico** attraverso lo stesso attraverso conte batteriche e la misurazione del TEER (Resistenza Elettrica Trans-epiteliale) (Figura 1).

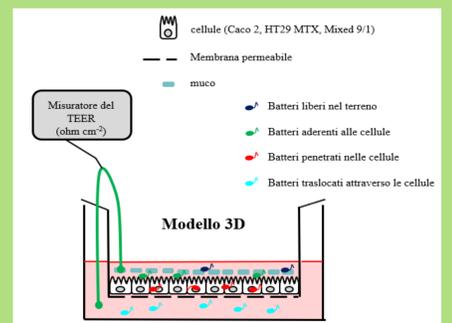


Figura 1. schematizzazione di un modello cellulare intestinale umano in cui è possibile osservare le diverse fasi di colonizzazione batterica.

RISULTATI

Messa a punto RT-qPCR: è stato **ottimizzato un protocollo RT-qPCR**, impiegabile per la quantificazione in **condizioni di co-incubazione** dell'espressione genica relativa ai tre geni considerati maggiormente imputati alla virulenza. Dopo **l'ottenimento dei primers ex novo**, la metodica risultata migliore per l'estrazione dell'RNA è risultata quella che vede l'impiego del TRIZOL[®] (Fischer Molecular Biology).

Risultati delle prove fisiologiche/traslocazione:

Per quanto riguarda le prove di fisiologiche 2D, è stata osservata una **maggiore colonizzazione** di *A. butzleri* nella **linea mista** mentre **l'invasione** è risultata **maggiore nella linea Caco-2** (Figura 2).

Nel caso dei **modelli 3D**, le conte batteriche nel compartimento basolaterale suggeriscono un **passaggio batterico** di una carica batterica pari all'inoculo iniziale già **dopo le prime 24 ore** senza una corrispondente diminuzione del TEER (Figura 3).

Risultati delle prove di espressione genica:

Oltre all'ottenimento di un protocollo idoneo all'analisi dell'espressione relativa dei 3 geni di virulenza, sono stati ottenuti i primi risultati di espressione genica sulla linea Caco-2. I geni ***cj1349* e *cadF* (adesione)**, ***ciaB* (invasione)** risultano **sotto-espressi** dopo 90 minuti dall'inoculo del batterio (tempo 0) e **sovra-espressi dopo 150 minuti** (Figura 4).

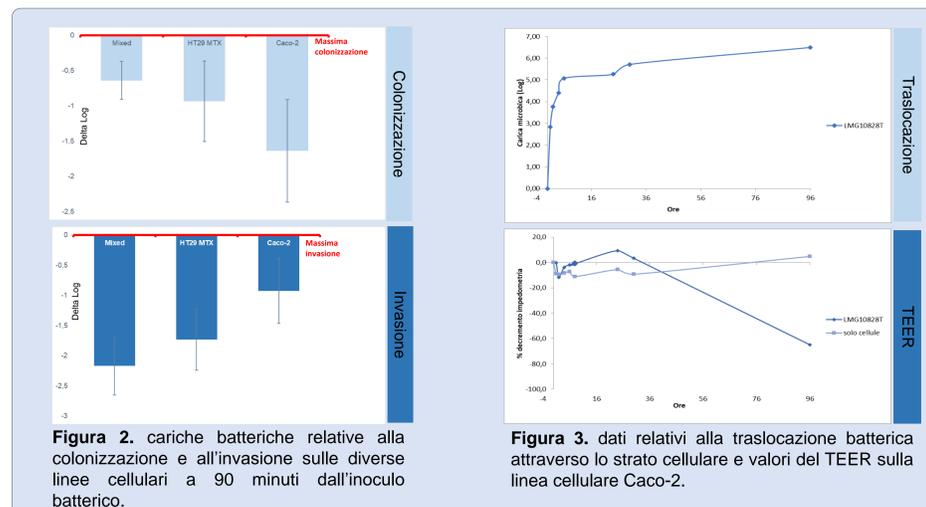


Figura 2. cariche batteriche relative alla colonizzazione e all'invasione sulle diverse linee cellulari a 90 minuti dall'inoculo batterico.

Figura 3. dati relativi alla traslocazione batterica attraverso lo strato cellulare e valori del TEER sulla linea cellulare Caco-2.

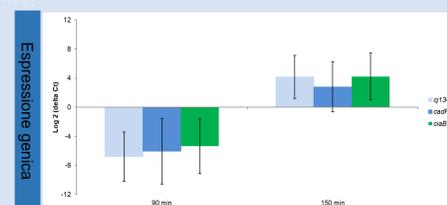


Figura 4. espressione genica dopo 90 e 150 minuti dall'inoculo batterico iniziale. La sovra-espressione dei tre geni si può osservare dopo 150 minuti. L'espressione genica è relativa al gene *housekeeping slyD*.

CONCLUSIONI

- ✓ **Colonizzazione** maggiore in modelli **misti** (Caco-2 + HT29 MTX)
- ✓ **Traslocazione totale** del batterio attraverso lo strato cellulare **dopo 24 ore** dall'inoculo non accompagnata dalla diminuzione del TEER
- ✓ Ottenimento di un **protocollo RT-qPCR** per lo studio dell'espressione dei **geni di virulenza**
- ✓ **Sovra-espressione** dei 3 geni di virulenza presi in esame **dopo 150 minuti**

Obiettivi futuri:

- ✓ Le prove successive saranno indirizzate allo **studio dell'espressione di ulteriori geni** considerati di virulenza in bibliografia.

