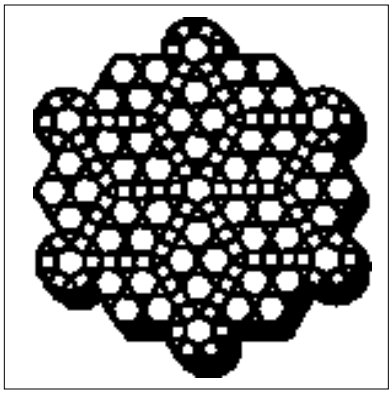
Caleidoscopio



Gianfranco Santini
Stefania Fornasiero
Giorgio Mucignat
Giancarlo Basaglia
Giuseppe Tarabini-Castellani
Luisa Pascoli

Le sonde di DNA e la virulenza batterica

Servizio di Microbiologia ed Immunologia
Ospedale Civile (PN)

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

67

MEDICAL
SYSTEMS S.P.A.

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. (010) 83.401
Ristampato a Genova 1992.

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

Informazioni generali. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors.* Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

Testo. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi ed allo stesso tempo chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare solo proprie personali opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

Frontespizio. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono e fax) responsabile della corrispondenza.

Bibliografia. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

Tabelle e figure. Si consiglia una ricca documentazione iconografica esplicativa (in bianco e nero eccetto in casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure devono essere realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, quando pubblicati, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro ed in particolare dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

Unità di misura. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

Abbreviazioni. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

Presentazione della monografia. Riporre le fotografie e le diapositive in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh, se MS-DOS il testo dovrà essere in formato RTF ed i grafici in formato PC.TIF o PC.Paintbrush.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spedite al Direttore Responsabile con una lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Editoriale

Col termine di virulenza si intende la potenzialità patogena intrinseca di un organismo. Questo concetto va inteso in senso relativo in quanto la capacità dell'agente patogeno specifico di causare la malattia dipende dalla interazione tra la sua virulenza e la capacità di difesa dell'ospite responsabile del contenimento e della neutralizzazione della minaccia infettiva.

Alla luce di questa premessa risulta facilmente comprensibile come, ad esempio, agenti infettivi con bassa virulenza possano essere causa di gravi malattie in pazienti affetti dalla sindrome da immuno deficienza acquisita. Ciascun agente infettivo ha degli specifici fattori di virulenza caratteristici che sono responsabili della capacità dell'organismo di proliferare, colonizzare, invadere e distruggere i tessuti dell'ospite. Il recente sviluppo delle sonde di DNA ha permesso ulteriori sviluppi nella caratterizzazione dei fattori di virulenza, e proprio questi aspetti vengono sviluppati in questa monografia.

Veniamo così alla presentazione degli Autori di questo volume che, i nostri lettori abituali, già hanno avuto modo di conoscere ed apprezzare.

Il Professor Gianfranco Santini, caposcuola, è il Primario del Servizio di Microbiologia-Immunologia dell'Ospedale Civile di Pordenone e del Centro di Riferimento Oncologico di Aviano. Specialista in Anatomia Patologica e Tecniche di Laboratorio, in Malattie del Sangue, in Igiene, ed in Biochimica e Chimica Clinica è Professore di Immunologia, Genetica e Tecniche Immunologiche presso la Scuola di Microbiologia dell'Università di Brescia. Membro del Direttivo della Società Italiana di Microbiologia Clinica, Membro della Società Italiana di Microbiologia, di quella Italiana di Immunologia ed Immunopatologia e di quella Italiana di Biochimica Clinica, simpaticissimo veneto, ha una fecondità scientifica strabiliante ed instancabile, guida sicura per un gruppo di ricercatori che sicuramente, con un tal Maestro, dovranno "tenere un buon passo".

Il dottor Giancarlo Basaglia allievo e collaboratore del Professor Santini presso il Servizio di Microbiologia, Immunologia e Virologia dell'Ospedale Civile di Pordenone e del Centro di Riferimento Oncologico di Aviano, è Specialista in Ematologia Generale (Clinica e Laboratorio). Si è occupato, tra l'altro, oltre che di Microbiologia, di Immunologia dei tumori, Radioimmunologia ed Immunologia Cellulare.

Il Dottor Giorgio Mucignat è laureato in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Padova e specializzando in Microbiologia, Immunologia e Virologia presso l'Università degli Studi di Brescia. E' collaboratore Biologo, presso il settore di batteriologia del Servizio di Microbiologia-Immunologia e Virologia del Servizio di Pordenone. E'

membro della Società Italiana di Microbiologia Clinica (AMCLI) e della Società Europea di Microbiologia Clinica e Malattie Infettive (ESCMID). Si occupa particolarmente di metodologie automatizzate per la batteriologia e dell'identificazione dei markers di patogenicità batterica.

La Dottoressa Pascoli Luisa è Coadiutore Biologo presso il Servizio di Microbiologia, Immunologia e Virologia dell'Ospedale di Pordenone.

E' membro della Società Italiana di Microbiologia Clinica (AMCLI) e membro della Società Europea di Microbiologia Clinica e Malattie Infettive (ESCMID). Si occupa particolarmente di Stafilococchi, Micoplasmi e Campilobacter, ricercando ed affinando metodiche di isolamento e determinazione di markers di patogenicità.

La Dottoressa Fornasiero Stefania, laureata in Scienze Biologiche, è borsista presso il servizio di Microbiologia, Immunologia e Virologia.

Il Dottor Tarabini-Castellani Giuseppe si è laureato in Medicina e Chirurgia presso l'Università di Valencia (Spagna), specializzato in Malattie Infettive ed in Patologia Generale presso l'Università di Roma "La Sapienza". E' attualmente Aiuto corresponsabile presso il Laboratorio di Microbiologia-Immunologia e Virologia dell'Ospedale "Santa Maria degli Angeli" di Pordenone. E' membro dell'AMCLI, dell'ILA e della Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.

Sergio Rassu

Generalità

Le tecnologie della biologia molecolare, inizialmente nate per indagini speculative a livello del genoma, successivamente hanno trovato applicazione anche per indagini pratiche, e, in considerazione appunto delle loro caratteristiche, sensibilità e specificità, rapidità e convenienza, attualmente stanno trovando applicazione non solo nella identificazione microbiologica, ma anche nella evidenziazione di marcatori di virulenza batteriologici, nel tentativo di diventare ulteriori alternative diagnostiche alle lente tecniche tradizionali e di schiudere nuovi orizzonti diagnostici (30).

Data la multifattorialità e la estrema complessità della virulenza ne deriva che i suoi marcatori sono argomenti di corrente ed intenso studio e quindi ancora in via di definizione. Attualmente obbedendo ad uno scolastico schematismo patogenetico, vengono considerati marcatori di virulenza di primo impatto:

ADESIVITA',
TOSSICITA',
INVASIVITA'
e di secondo impatto:
FERRO-CAPTAZIONE,
SIERO-RESISTENZA,
RESISTENZA alle IMMUNOGLOBULINE (31).

Per ognuno di tali marcatori non è possibile stabilire una gerarchia di importanza isolata, in quanto essi si integrano tra loro e con gli altrettanti fattori di controvirulenza dell'ospite. Quindi la loro definizione distintiva diventa una limitazione; tale limitazione si riflette inevitabilmente sulla classificazione dei probes deputati al loro riconoscimento. Con queste riserve noi indicheremo alcuni esempi paradigmatici di probes identificanti, geneticamente, il carattere fenotipico dell'Adesività, Tossigenicità, Invasività, della Scissione delle IgA e della Siero-Resistenza.

Adesività

Per l'Adesività limiteremo l'indagine ai probes identificanti le sequenze genomiche codificanti le adesine di Escherichia coli implicati nelle infezioni delle vie urinarie (1, 2, 16, 21, 31). Per le infezioni urinarie umane l'accertamento dell'importanza delle adesine di E.coli è complesso, in quanto l'infezione progredisce attraverso un numero di stadi coinvolgenti la colonizzazione di differenti superfici in cui l'adesina può giocare un ruolo chiave:

a) a livello delle aree periuretrali, che divengono così riserva di microorganismi infettanti;

b) a livello della vescica, per opporsi al flusso urinario e mantenere lo stato di infezione;

c) anche a livello degli ureteri e dei reni, nelle pielonefriti siano esse ascendenti o discendenti.

Senza addentrarsi in un'analisi della diversa importanza delle varie adesine di E.coli nelle urinary tract infection (UTI), si può affermare che un ruolo importante viene svolto sia dalle adesine Mannitolo-Resistenti (MRA) quali le adesine di tipo P, di tipo F e di tipo X, sia le adesine Mannitolo-Sensibili (MSA) di tipo 1. L'adesina P, che riconosce il disaccaride α-D-galactosyl-(1 --> 4)-β-D-galactopyranosio (Gal-Gal) dell'antigene P, è codificata da un operon, denominato pap (pili associated with pyelonephritis), presente in un frammento di 15 Kb (EcoRI) del cromosoma di E.coli, da cui infatti è stato clonato in un ceppo di E.coli nefritogeno (J96) (Fig. 1).

In tale operon sono identificabili i seguenti segmenti genici: I, B, A, H, C, D, E, F, G, che concorrono alla sintesi del pilo P, che è un eteropolimero, costituito da subunità denominate piline, in cui la pap H potrebbe avere un ruolo nella polimerizzazione e nel trasporto, ed è presente in poche copie localizzate alla base del pilo; la C e la D avrebbero rispettivamente un ruolo nella polimerizzazione e nel trasporto dei prodotti del pap A, che in numero di circa 1000 costituiscono il pilo, alla cui sommità sono localizzate le piline pap E, F, G; in cui la pap G rappresenta la subunità legante il Gal-Gal, la pap F sarebbe la subunità modificante la configurazione di pap G, mentre alla pap E verrebbe riservata la funzione di aggancio della suscritta subunità con la subunità A. La trascrizione di tale cluster genico sarebbe attivata da pap B e pap I. Per tali sequenze geniche sono stati approntati specifici probes: L (E1-S1 fragment) identificante le sequenze geniche pap I, B, A, H; HCD (S1-S2 fragment) identificante le sequenze geniche pap H, C, D; HC (P1-P2 fragment) identificante le sequenze geniche pap H, C; CD (P4-P5 fragment) identificante le sequenze pap C, D; EFG (S3-S4 fragment) identificante le sequenze E, F,

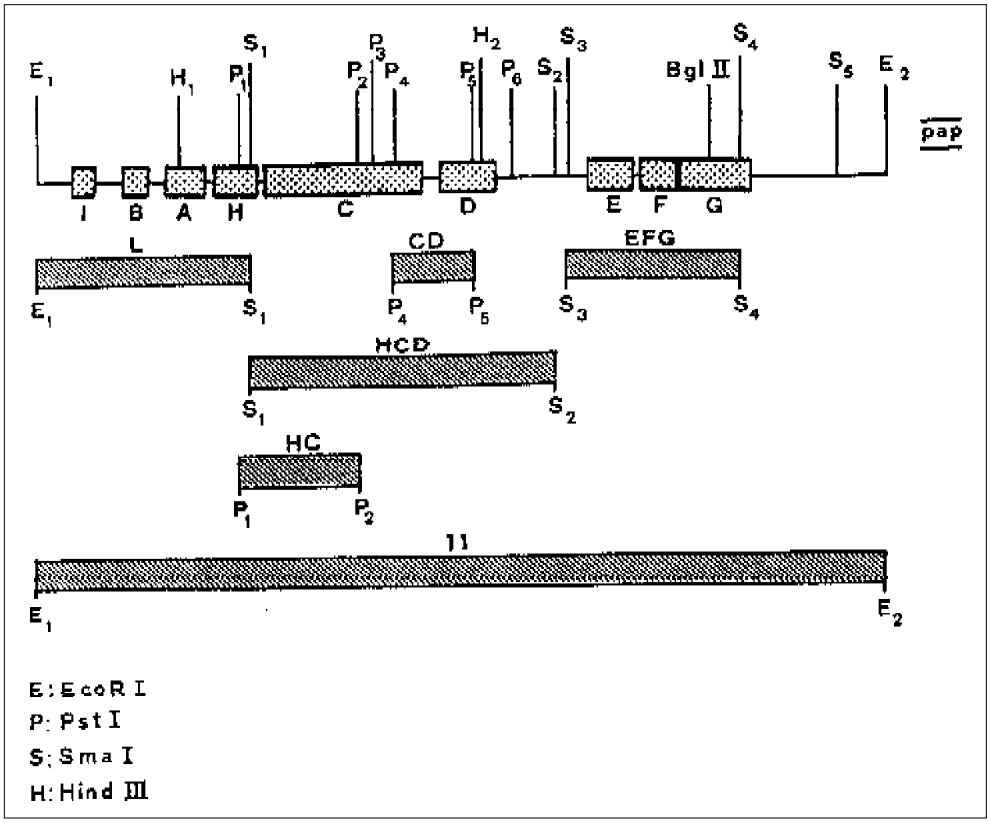


Figura 1. Frammento EcoRI di 15kb del cromosoma di E. coli J96 contenente l'operon pap codificante per l'adesina P in cui sono contenuti i vari segmenti genici identificati con i pap-probes: L-CD-EFG-HCD-HC-11-.

G. Accanto a tali probes suboperonici sono stati approntati anche probes operonici, che identificano l'intera lunghezza dell'operon, come il pap11 (Tab. A).

Per quanto riguarda l'adesina F, che riconosce l'antigene di Forsmann, è codificata essa pure da un operon, che, per la sua stretta correlazione strutturale e funzionale con il pap, è stato denominato prs (pap-related-sequence); il prs è compreso in un segmento cromosomico di 19 Kb (EcoRI). I segmenti genici presenti nei due operoni, occupanti regioni cromosomiche distinte, presentano notevoli omologie, tali da renderli indistinguibili con l'utilizzo dei suscritti probes (Fig. 2).

In generale in questo contesto è opportuno ricordare che le sequenze geniche, codificanti le varie piline, si presentano altamente conservate nelle regioni N e C terminali, con l'eccezione per la pilina G che presenta omologia in C, mentre diversifica in N e questo è da correlare con la sua funzione legante specifica; nonostante però questa loro specificità, sperimentalmente dimostrata (mediante transcomplementazione) e per

DNA di origine CROMOSOMICO	FRAMMENTO OTTENUTO	VETTORE PLASMIDICO	PLASMIDE RICOMBINANTE	PROBES OTTENUTI	
E. coli pielo-nefritico ceppo J96	pap-OPERON frammento E1-E2 15Kb	pBR322	pRHU845	EcoRI → pap 11 (E1-E2)	15Kb
				EcoRi-SmaI → papL (E1-S1)	4Kb
				PstI → papHC (P1-P2)	1.7Kb
				PstI → papCD (P4-P5)	1.0Kb
E. coli pielo-nefritico ceppo J96	prs-OPERON Frammento E1-E2 19Kb	pACYC184	pPAP601	SmaI → papHCD (S1-S2)	5.0Kb
				SmaI → papEFG (S3-S4)	5.0Kb
E. coli pielo-nefritico ceppo KS52	pil-OPERON frammento Sa1-Sa2 15Kb	pBR322	pSH2	BamHI-PvuII → C (B1-PvuII)	2Kb
				PstI BC → (P1-P2)	1.0Kb
E. coli pielo-nefritico ceppo J96	afaI OPERON frammento Sau3a 7Kb	pBR322	pLL14	PstI C → (P2-P3)	0.5Kb
				SmaI-BamHI → CDE (S1-B1)	3.0Kb

Tabella A. Schema costruttivo dei probes per il rilevamento diagnostico dei geni relativi ai fattori di virulenza adesinici.

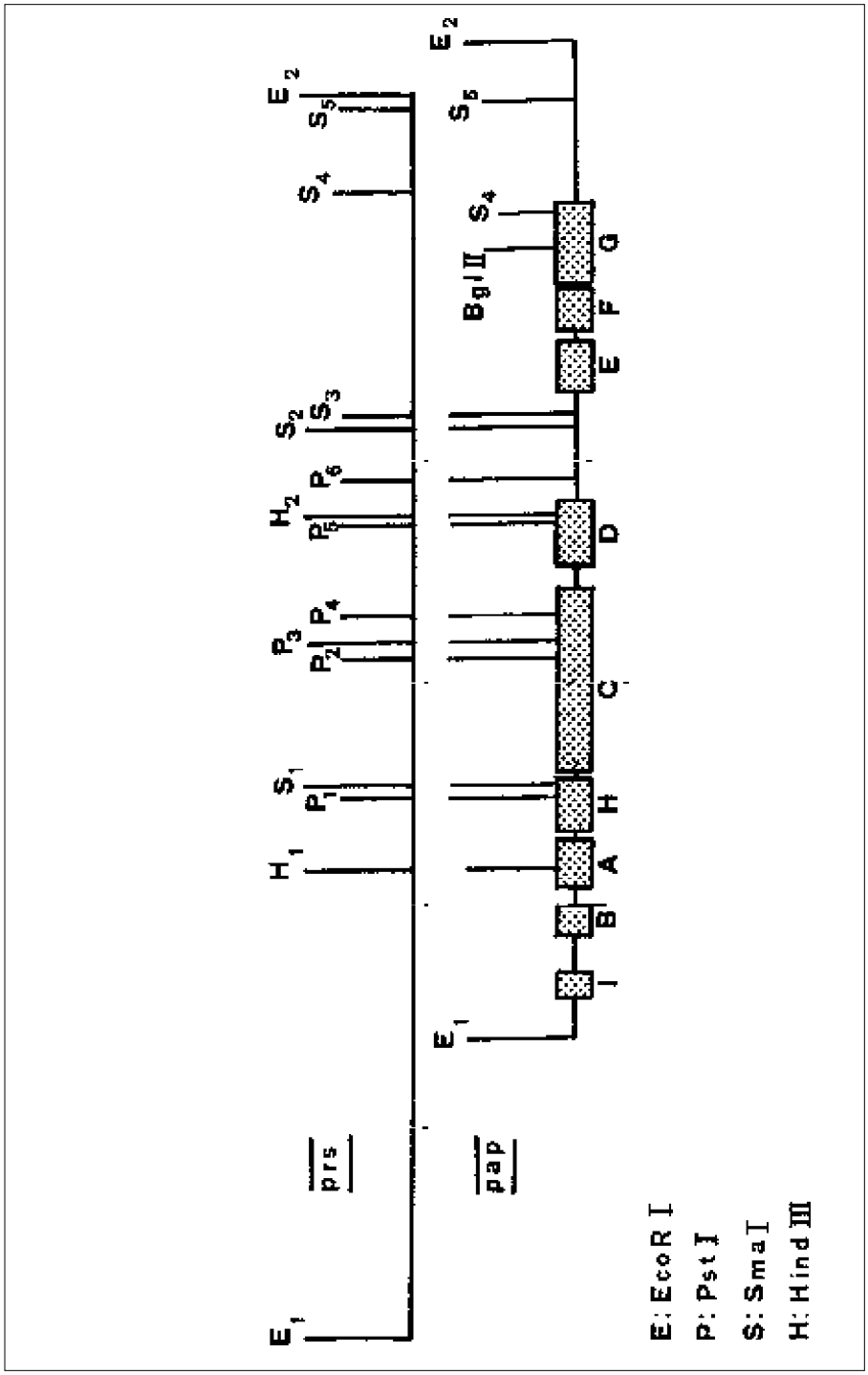


Figura 2. Confronto delle omologie presenti nei siti di restrizione fra gli operoni pap e prs codificanti rispettivamente per adesina P e adesina F.

pap G verso l'antigene P e per prs G verso l'antigene F, i probes verso la regione genetica E, F, G non sono in grado di distinguerle. In definitiva i due cluster genici pap e prs, presenti in E.coli (J96), e con esso in numerosi altri isolati di E.coli UTI, sono strutturalmente omologhi e pur differendo nella loro capacità legante, sono indistinguibili con la tecnica della Spot-Hybridization: tutto questo è indice dell'esistenza di una stringente similarità tra gli operoni pap e prs e tra gli operoni di J96 e degli E.coli urinari, e di una loro ampia diffusione; e quindi per distinguere pap da prs vi è la necessità di determinare il fenotipo agglutinante P e/o F. Dai risultati ottenuti, utilizzando i vari probes suboperonici è possibile classificare gli E.coli urinari in quattro classi di ibridizzazione, che possono essere distinte a loro volta in subclassi in rapporto al fenotipo agglutinante P o F. La prima classe di ibridizzazione è caratterizzata dalla positività dei quattro probes (pap L, pap HC, pap CD, pap EFG) che associatamente ricoprono l'intera lunghezza del pap/prs operon; questa classe è suddivisibile in quattro sottoclassi fenotipiche esprimenti o P, o F, P e F, o nessuna delle due. La seconda classe è caratterizzata dalla positività con i probes pap L e pap EFG, (e dall'assenza fenotipica di P e F). La terza classe è caratterizzata dalla positività con il probe pap L e dall'assenza di P e F. La quarta classe è contrassegnata da negatività sia genotipica che fenotipica

CLASSI DI IBRIDAZIONE	**POSITIVITA' AI SEGUENTI PROBES**	**ESPRESSIONE FENOTIPICA**			
		P+	**F+**	**P+F+**	**P-F-**
I°	papL-papHC-papCD papEFG	+	+	+	+
II°	papL-papEFG	-	-	-	+
III°	papL	-	-	-	+
IV°	nessuno	-	-	-	+

Tabella B. Classificazione dei E. coli urinari in gruppi di ibridizzazione con l'utilizzo dei probes sub-operonici e verificandone l'espressione fenotipica per adesine P e/o F.

(Tab. B).

Da questi dati si ricava, in generale, che per l'espressione delle adesine P e F vi sarebbe la necessità della presenza degli operoni in maniera completa; una loro parziale presenza non ne permetterebbe l'espressione. Questo non è vero in senso assoluto, in quanto pur in assenza di pap A, il complesso adesivo è espresso sulla superficie batterica, che però è priva del corrispettivo pilo, come anche nei mutanti in pap E, i batteri presentano la loro specifica capacità adesiva e sulla loro superficie è presente il corrispettivo pilo. Deve anche essere tenuta in considerazione la possibilità, che, pur in presenza di tali operoni, le adesine risultino assenti. A livello della prima classe di ibridizzazione, per i fenotipi P+, F+, P+F+, l'indagine condotta sulle mappe di restrizio-

ne con pap 11, da PstI mediante Southern- Blot-Hybridization (con EcoRI), non si evidenzia polimorfismo, con conservazione delle cinque bande proprie di J96 e tutto questo deporrebbe per una mancanza di polimorfismo a livello dei siti di restrizione, nelle sequenze omologhe dei geni pap H, pap C, pap D, che codificano le proteine essenziali per il trasporto e la polimerizzazione del pilus a capacità adesive. Polimorfismo, invece a livello dei siti di restrizione per i ceppi P-F- ed in questa loro mancata espressione, delle adesine P ed F. Sempre a livello della prima classe di ibridizzazione si può puntualizzare che negli E. coli a fenotipo P+F+ sono state evidenziate due o tre copie di tali cluster genici (anche se questo non è stato verificato per tutti i ceppi), mentre gli E.coli a fenotipo P+ hanno un solo cluster genico, come anche gli E.coli a fenotipo F+ (anche se questo non è stato verificato per tutti i ceppi). Infine negli E.coli a fenotipo P-F- è presente un cluster genico. Non tutti però gli E.coli presentano questa semplice configurazione genica (1, 2, 3 clusters), infatti si possono riscontrare dei ceppi che oltre al classico cluster genico, presentano copie multiple di sequenze pap-correlate; tali sequenze pap-correlate possono essere parziali oppure complete (che quindi si trovano ad essere in sovrannumero rispetto al numero di adesine espresse) e potrebbero essere elementi genetici correlati solo parzialmente al pap-operon (questo sia per i ceppi di E.coli P+F+ o F+).

A livello invece della seconda classe di ibridizzazione, la S.-B. evidenzia che gli elementi parzialmente correlati al pap-operon non sono associati, bensì occupano regioni separate del cromosoma. A livello infine della terza classe di ibridizzazione gli elementi parzialmente associati al pap-operon sono accostati da sequenze vicinali al pap-operon. A questa fondamentale omologia genica a livello dei due operoni pap e prs, che li rende indistinguibili con la Spot-Hybridization, che viene riconfermata nelle mappe di restrizione a livello delle sequenze geniche L, H, C, D, mediante la Southern-Blot-Hybridization indicandone così la loro conservazione, si deve puntualizzare una nota di diversificazione a livello delle sequenze geniche E, F, G; tali sequenze infatti (nel ceppo J96) nel pap G presentano un sito di restrizione BglII, invece nel prs G tale sito di restrizione non è conservato in tutti gli isolati urinari di E.coli. La regione quindi E, F, G, a differenza della H, C, D, non è conservata e questo indubbiamente è un rilievo estremamente importante, in quanto in tale sequenza risiede la codifica per la capacità di legare l'antigene. Tale mancata conservazione ha portato di conseguenza in tale regione E, F, G un alto polimorfismo che consente, a livello della prima e seconda classe di ibridizzazione, una sua distribuzione in dieci gruppi (A-J), (quando si usano le endonucleasi PstI e PstI-EcoRI) per il probe EGF oppure in tre classi (quando si usa PstI e BglII), di cui una clivabile con BglII: pap G; una non clivabile con BglII: prs G; ed una clivabile con PstI, distinta quindi da pap G e da prs G.

Questo alto polimorfismo sarebbe da rapportare non solo alla variabilità di individuali cluster genici, ma anche alla combinazione di distinti cluster genici.

Questo estremo polimorfismo del gene adesinico non è comunque una caratteristica peculiare discriminante verso specifiche e distinte capacità di legame, in quanto è possibile evidenziare una apparente e stretta correlazione tra cluster genici codificanti per diverse specificità. Tutto questo suggerirebbe che la specificità di legame richieda una indagine più fine e coinvolgente singoli aminoacidi.

Senza approfondire il rapporto tra genotipo, fenotipo e patogenicità è utile segnalare

che gli E.coli pielonefritici sono più frequentemente Pap+, rispetto agli E.coli cistitici e agli E.coli fecali, con la prevalenza della duplice espressione P+F+; prevalenza non evidenziabile per gli E.coli cistitici rispetto agli E.coli fecali, in quanto i primi sarebbero più frequentemente P+ rispetto ai secondi che invece sarebbero più frequentemente F+. Questi risultati quindi suggerirebbero che le due adesine pap-correlate, da sole o associate, potrebbero avere differenti ruoli patogenetici come fattori di virulenza; ed appunto la loro differenziata presenza a livello dei vari isolati può dare luogo a numerose speculazioni sul piano patogenetico e questa loro differenziata espressione ne giustifica, sotto il profilo clinico, la loro ricerca sia genetica che fenotipica.

Per la loro evidenziazione genetica si può ricorre ai seguenti probes: pap L (EcoRI-SmaI:E1-S1), pap HC (PstI-PstI:P1-P2), pap CD (PstI-PstI:P4-P5), pap HCD (SmaI-SmaI:S1-S2), pap EFG (SmaI-SmaI:S3-S4), pap 11 (EcoRI-EcoRI:E1-E2) da pRHU845 o da pPAP601 o da pPAP5, mediante la Colony-Hybridization (generalmente si utilizza pap HC o pap CD o pap EFG).

Per quanto riguarda l'adesina X, essa riconosce recettori, sempre negli eritrociti umani, antigenicamente diversi da P; (Fig. 3) tale pluralità recettoriale è giustificata dalla pluralità delle adesine X e quindi possono essere codificate da operoni, diversi e tra loro non correlati. Uno di questi è afa 1, di cui è stata determinata la mappa che consiste di cinque sequenze geniche A, B, C, D, E, codificanti appunto una adesina X ed è

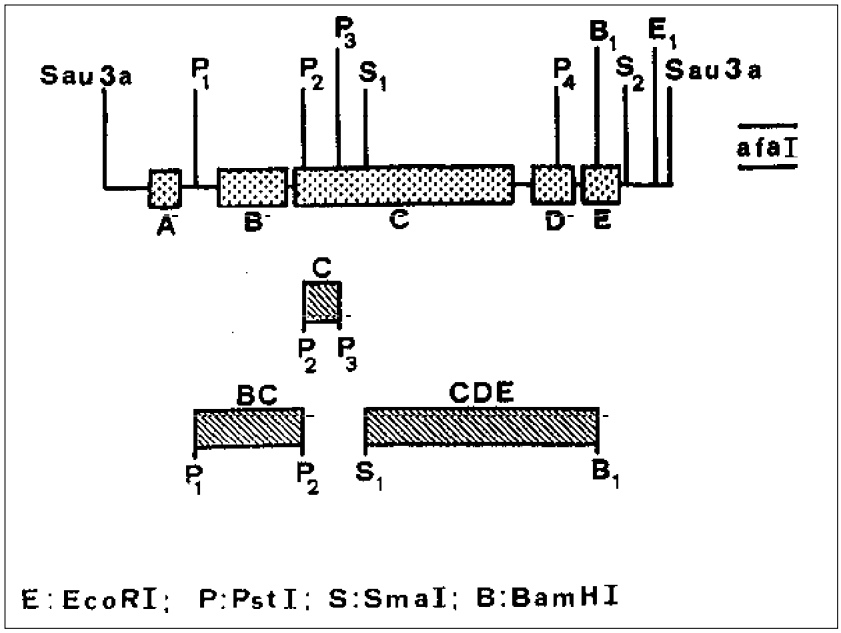


Figura 3. Frammento Sau3a per l'operone afaI che concorre alla formazione di adesine X presenti in E. coli urinari. Sono utilizzati quali probes i frammenti di restrizione BC-C-CDE.

relativamente frequente a livello del cromosoma degli isolati di E.coli urinari, pur non essendone l'unico operone, per essi, codificante adesine a fenotipo X e precisando: l'alta incidenza delle adesine a fenotipo X negli E.coli uropatogeni concorderebbe con l'alta incidenza di sequenze genomiche afa 1 correlate negli E.coli cistitici mentre correlerebbe con sequenze afa1 non correlate in E.coli pielonefritici.

L'incidenza comunque delle adesine X negli E.coli uropatogeni non è stata studiata in maniera approfondita come per le adesine P e F, per cui tale studio avrà un indubbio valore patogenetico. Per tale studio possono essere utilizzati quali probes: i frammenti di restrizione BC(PstI-PstI:P1-P2), C(PstI-Pst:P2-P3) CDE(SmaI-BamHI:S1-B1), da pil14, mediante "Colony-Hybridization" (Tab. A). Per quanto riguarda l'adesina di tipo 1, che

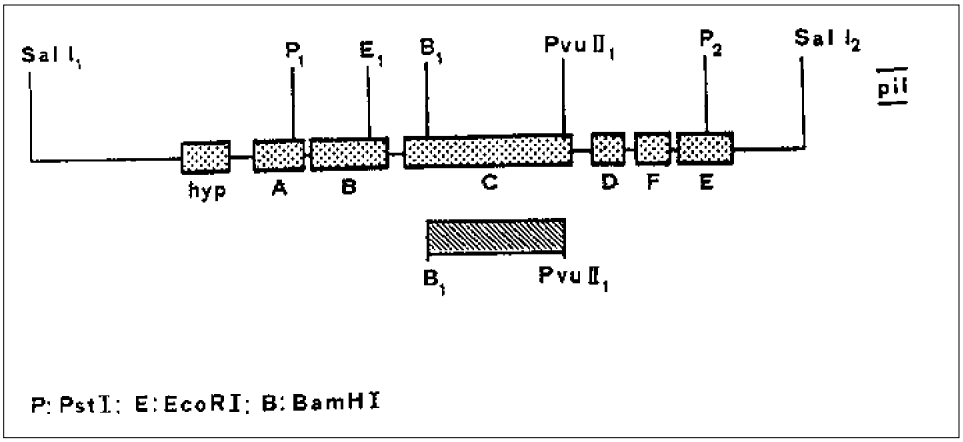


Figura 4. Frammento di restrizione Sal I_1 - Sal I_2 in cui è contenuto l'operone pil che codifica per l'adesina di tipo 1 presente in E. coli isolati da infezioni extraintestinali e uropatogeni. Il frammento presenta un cluster genetico di cui è evidenziato il frammento C (B1-PvuII1).

riconosce un recettore di minima quale l'α-D-Mannosio, è codificata dall'operone "pil", di cui riconosce la mappa di restrizione ed i cluster genici hyp,A,B,C,D,F,E (Fig. 4).

Sequenze cromosomiche "pil-operon" correlate sono state evidenziate nella maggioranza di E.coli isolati da infezioni extraintestinali, e quindi anche in E.coli uropatogeni, sia pielonefritici sia cistici, anche se solo una minoranza di essi le esprimono.

Tale cluster genico può essere evidenziato mediante "Colony-Hybridization", utilizzando quale probe il frammento C (Bam HI - Pvu II: B1-P1) da pSH2 (Tab. A).

Si ritiene opportuno ricercare anche questa sequenza genica associatamente a quelle delle adesine P, F, X, in maniera da precisare e definire una varietà di classi adesiniche per E. coli UTI; tali classi genetiche devono a loro volta associarsi alle classi fenotipiche e da questa complessità di dati si possono ottenere delle informazioni per una più approfondita comprensione dell'Adesività, quale marker di virulenza per gli E.coli UTI.

Tossigenicità

Per laTossigenicità limiteremo l'indagine ai probes identificanti le sequenze genomiche delle Tossine Termolabili (LT) e Termostabili (ST) di ETEC e delle Shiga-like-toxins di EHEC (19, 20, 22, 34, 35, 37, 44, 45). La LT è codificata da plasmidi; la hLT, la pLT e CT sono formate da una unità A che stimola il sistema cAMP e da 5 unità B che si uniscono al GM-1 cellulare e presentano antigeni in comunione ed antigeni diversi. La regione di DNA plasmidico necessaria per la produzione di LTh è di 2,4 Kb (HindIII, Ha-Hc).

Tale operon consta di almeno due geni: toxA, codificante LThA (927bp) e toxB, codificante LThB (375bp) (Fig. 5).

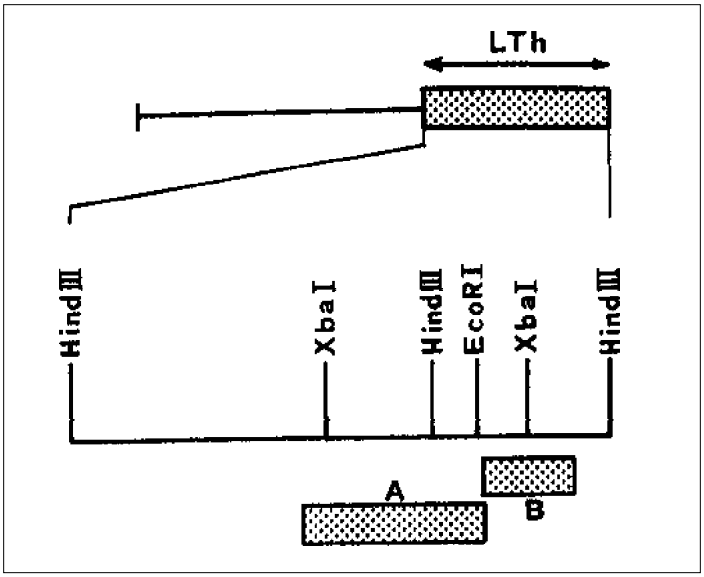


Figura 5. Frammento Hind III contenente l'operon che codifica LTnA e LTnB di ETEC.

Tale operon viene presumibilmente trascritto come mRNA singolo. Il gene toxA, codificante LThA è stato sequenziato mediante il metodo chimico di Maxam-Gilbert, per il 100% per lo strand 5'-3' e per il 99% per lo strand 3'-5' e di esso è stata costruita la mappa di restrizione (FokI-HinfI) (Fig. 6).

Il gene toxB, codificante per LThB è stato mappato (EcoRI-HindIII) e sequenziato, come per LThA, ne è stata determinata la sequenza aminoacidica (Fig. 7).

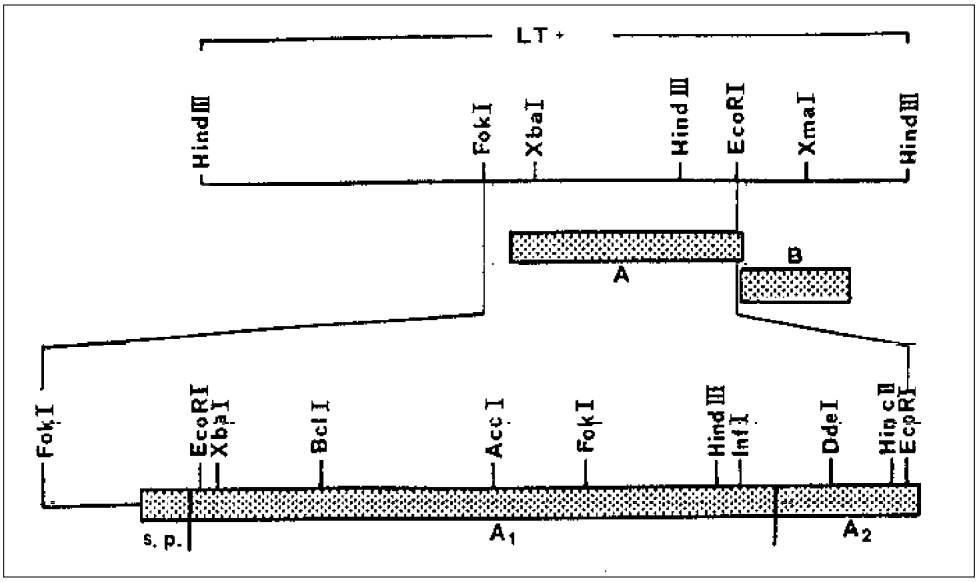


Figura 6. Frammento FokI - EcoRI contenente il gene tox A codificante la LTn-A (92Fpb) con relativa mappa di restrizione.

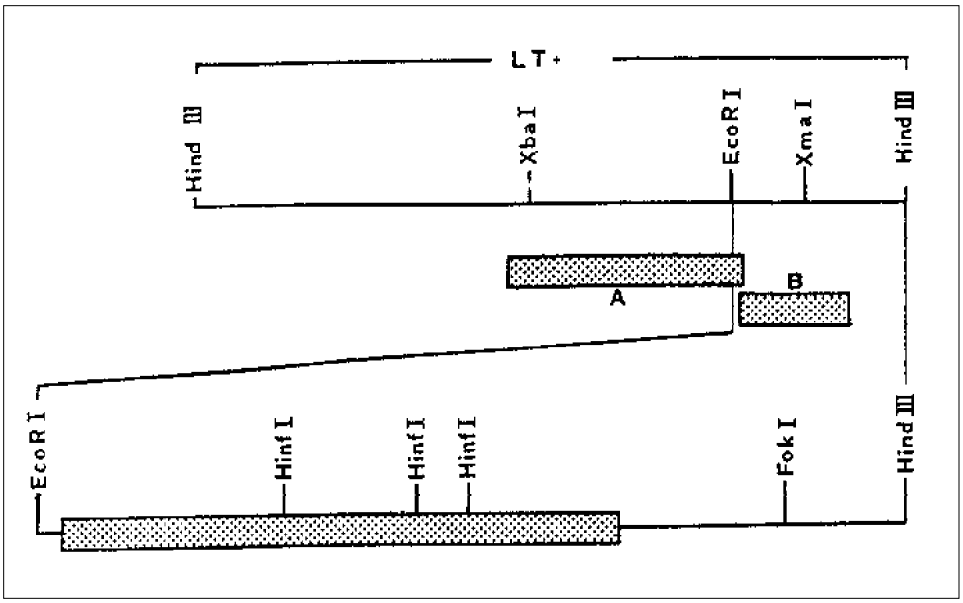


Figura 7. Costruzione della mappa di restrizione del frammento EcoRI-Hind III contenente il gene tox B che codifica per LTh B(375 pb).

La sequenza genica di toxB è stata paragonata alla sequenza di eltB (codificante per LTpB) ed ha presentato una omologia del 98%, inoltre presenta ampie zone di omologia con CT (evidenziabili in condizioni di bassa stringenza). Il termine distale di toxA si sovrappone al termine prossimale di toxB e sono fiancheggiati da sequenze β di DNA ripetitivo ed entrambi i geni codificano alle loro estremità N-terminali il peptide segnale, devoluto al trasporto delle subunità A e B attraverso la membrana citoplasmatica. Comparando le sequenze aminoacidiche di LTh e LTp è risultata una omologia del 96%, comparando invece le sequenze aminoacidiche di LTh e CT è risultata una omologia del 81%.

Per i fini diagnostici sono stati approntati sia probes polinucleotidici che probes oligonucleotidici; dal loro uso, sia utilizzando probes verso LTA, sia verso LTB, viene suggerito che entrambi i probes per il rilevamento dell'operone LT sono altamente omologhi e questa omologia è stata confermata per un'ampia varietà di sorgenti. Anche per questo fine è stato clonato il plasmide P307 (in pBR313) ed il pJY11 (in pACYC177), che naturalmente sono risultati omologhi; è stato utilizzato in diagnostica un frammento ottenuto con HindIII e EcoRI da pEWD299 (Tab. C).

DNA di origine PLASMIDICA	FRAMMENTO CLONATO	VETTORE PLASMIDICO	PLASMIDE RICOMBINANTE	PROBES OTTENUTI
Plasmide pJy11 E. coli entero-tossigenico H10407 (sierotipo 078:H11)	LT-h-gene Hind III 2.4Kb	pACYC177	pJy27	Frammento Hind III (Ha-Hc) 2.4Kb
Plasmide p307 E. coli K12C600	LT-h-gene Hinc II 1.2Kb	pBR313	pEWD299	Frammento Hinc II-ECORI (porzione A del gene 927pb) (H-E)

Tabella C. Schema costruttivo dei probes per il rilevamento diagnostico del gene per LT-h in E.coli (ETEC).

Questi probes polinucleotidici sono stati impiegati nella Colony-Hybridization e sono risultati altamente sensibili; mentre la loro preparazione, consistente in separazione e digestione plasmidica, separazione e marcatura dei frammenti, richiede una certa manualità per garantirne la necessaria purezza, e per evitare falsi risultati positivi. Questa laboriosità è evitabile ricorrendo ai probes oligonucleotidici che si sono rivelati altamente specifici. Questa specificità viene garantita se la sequenza oligonucleotidica selezionata appartiene ad un segmento importante nel codificare l'attività tossica, e che

quindi è altamente conservato. Questa alta conservazione evita i falsi negativi, da degenerazione del codice genetico ed i falsi positivi, da mutazioni, delezioni, ed inversioni; quindi la loro sensibilità è insidiata anche da piccoli cambiamenti (mismatchers) della sequenza-target. Globalmente i risultati sono veramente ottimi: per la LT si ha una sensibilità ed una specificità del 100%. Riporto due sequenze utilizzate:

(5') GCT GTG AAC TTT GTT GTA ATC C (3')
(5') A CGT TCC GGA GGT CTT ATG CCC AGA GGG CAT AAT (3')

La ST è codificata da plasmidi ed agisce sul sistema cGMP, in realtà si tratta di un sistema di tossine eterogeneo, un gruppo delle quali, distinguibile per la solubilità in metanolo e per l'azione sul topino lattante, viene indicato come ST-I (STa) ed un altro gruppo insolubile in metanolo e ad azione sull'ansa ileale di cavia, viene indicato come ST-II (STb); il gruppo ST-I (STa) include almeno due geni diversi: STIa (STaI)(STP) ed il STIb (STaII)(STH).

STIa è stato isolato da E.coli bovino e da E.coli porcino, e quest'ultimo è stato utilizzato per identificare gli ETEC umani, che identificava, in condizioni di forte stringenza, le omologhe sequenze STIa (Fig. 8a) mentre, in condizioni di bassa stringenza, evidenziava sequenze STIb, permettendone l'isolamento in un frammento (TaqI) di circa 840 bp e quindi un ulteriore frammento ristretto (HpaII) di circa 215 bp, sempre da un clone (pSLM004) producente STI (Fig. 8b).

Tale frammento contenente la sequenza codificante per STIb è stato sequenziato e confrontato con la sequenza, già determinata, codificante per STIa; tale confronto evidenzia le divergenze tra i due geni risultanti tutte da sostituzioni e che su 216 nucleotidi (appartenenti al codon 1-72) differiscono in 67 posizioni, di cui 16 conserva-

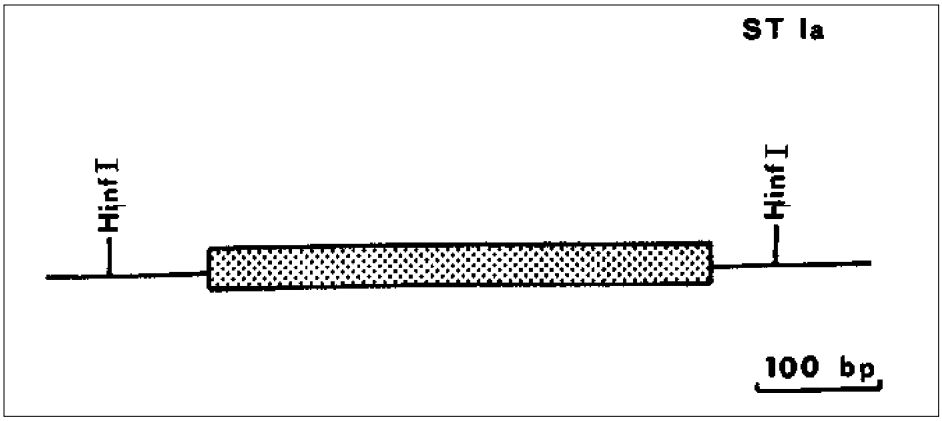


Figura 8a. Frammento di restrizione Hinf I contenente i geni codificanti per ST I a isolato da E. coli bovino e porcino e usato per identificare gli ETEC umani in condizioni di forte stringenza.

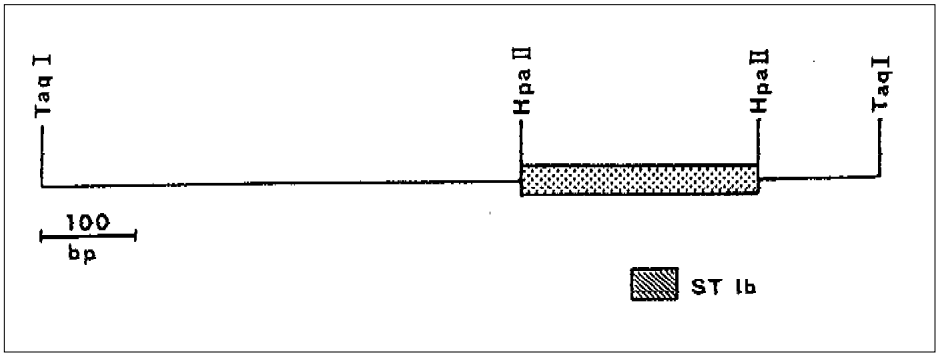


Figura 8b. Frammento Taq I (840 pb) suddiviso ulteriormente in HpaII (215 pb) contenente il gene per ST I b evidenziato in condizioni di bassa stringenza.

tive, per polarità e carica, con una divergenza globale del 30% . Nonostante questo grado di divergenza i due geni presentano struttura simile, che testimonia per una loro comune origine; entrambi infatti presentano una quasi uguale sequenza codificante il peptide di trasporto transmembrana ed ugual numero e posizionamento di cisteine, suggerendo appunto una similare associazione intramolecolare; la maggior omologia, comunque, tra i due geni è rilevabile tra i codoni 53-68, suggerendone quindi un ruolo funzionale fondamentale. Tali geni plasmidici possono essere presenti in ceppi di ETEC diversi, come anche in uno stesso ceppo ETEC, che alberga i due distinti geni su plasmidi diversi. Tali geni sono adiacenti ai geni LT e dentro a sequenze β , e fiancheggiate da sequenze invertite α.

Gli ETEC quindi possono essere LT+ ST+, LT+ ST-, LT- ST+ e per la loro identificazione bisogna ricorrere a tre probes, di cui due per ST. I probes per questi ultimi geni possono essere o polinucleotidici od oligonucleotidici (Tab. D).

Tra i probes polinucleotidici riporto il:

STaI:pDAS 101 (157 bp da pRIT 10036 - HinfI in pUC8) EcoRI-BamHI
STaII: pDAS 100 (215 bp da pSLM 004 - StaII in pUC8) BamHI-PstI

Tra i probes oligonucleotidici riporto il:

STaI:(5') GAA CTT TGT AAT CCT GCC TGT GCT GGA TGT (3')
STaII:(5') GAA TTG TGT AAT CCT GCT TGT ACC GGG TGC (3')

Completa corrispondenza tra i risultati ottenuti con i probes polinucleotidici ed oligonucleotidici e buona corrispondenza cui i tests biologici per una sensibilità del 100% ed una specificità del 97% ; sempre con la riserva che i tests biologici possono a

DNA ORIGINARIO	FRAMMENTO CLONATO kb	VETTORE PLASMIDICO	PLASMIDE RICOMBINANTE	PROBES OTTENUTI pb
DNA PLASMIDICO pRIT 10036 E. coli K12C600	dal StaI-gene frammento 0,157 HinfI	pUC 8	pDAS 101	STaI (STP) frammento 157 EcoRI-BamHI
DNA PLASMIDICO E. coli 153837-2	dal STaII-gene frammento 1,9 BAmHI	pBR 322	pSLM 003	STaII (STH) frammento 840 TaqI
DNA PLAMIDICO E. coli 153837-2	dal STaII-gene frammento 0;84 Taq I	pBR 322	pSLM004	STaII (STH) frammento 215 HpaII
DNA PLASMIDICO PSLM004 E. coli C600	dal STaII-gene frammento 0,215 HpaII	pUC 8	pDAS 100	STaII (STH) frammento 216 BamHI-PstI

Tabella D. Schema costruttivo dei probes per il rilevamento diagnostico dei geni STP (STaI) e STH (STaII) in E.coli.

volte non evidenziare basse dosi di tossine o che tali tossine possono non essere prodotte nei sistemi in vitro. Altri probes oligonucleotidici da ricordare sono:

STP: (5') GCT GTG AAC TTT GTT GTA ATC C (3')
STH: (5') GCT GTG AAT TGT GTT GTA ATC C (3')

I suscritti probes pur differenziandosi in due soli nucleotidi non danno cross-reazioni perchè utilizzati in appropriate condizioni di Colony-Hybridization.

La SLT (Shiga-Like-Toxin) o VT (Verocitoxin), distinguibili in I.II o 1.2, sono prodotte da EHEC; la SLTI(VT1) è identica a Shiga-Toxin, prodotta da Shigella Dyssenteriae tipo 1, con omologia genetica del 85% con la SLTII(VT2) da cui possono essere distinte immunologicamente, ma non geneticamente. Questi geni sarebbero considerati dei markers di virulenza propri degli EHEC e non degli ETEC, EIEC ed EPEC e quindi i probes da essi derivati evidenziano la produzione di SLT solo per gli E. coli e per S.dyssenteriae tipo 1; tali geni codificano per due subunità (A, B). E' interessante in questo contesto ricordare che nei ceppi EHEC esisterebbe una famiglia di batteriofagi-SLT-convertenti (t.c.p.: toxin-coverting-phage), per cui è estremamente importante determinare il grado di associazione tra differenti sequenze fago-specifiche e differenti sequenze SLT-geniche. A questo fine sono stati costruiti due DNA-probes verso il DNA

dei t.c.p. e cioè il J (6.0 Kb - EcoRI-fragment da fago H19A / 933J) ed il W (7.4 Kb PvuII-fragment da fago 933W) (Tab. E).

Questi due probes che non sono associati con le sequenze codificanti SLT, vengono usati simultaneamente con probes che sono associati con le sequenze geniche codificanti le SLT e cioè SLTI-probe e SLTII- probe. Da questo uso combinato dei quattro probes I . II . J . W ne è risultato un quadro variabile di combinazioni e questo suggerirebbe l'esistenza di eterogenicità a livello del DNA di t.c.p.; l'estensione di tale eterogenicità non è definibile, in quanto l'omologia fra porzioni di DNA-fagico, non preclude l'esistenza di differenze tra le altre regioni del genoma fagico. Questi rilievi nei ceppi

DNA ORIGINARIO	FRAMMENTO OTTENUTO	VETTORE PLASMIDICO	PLASMIDE RICOMBINANTE	PROBES OTTENUTI kb
FAGO H194/933J	J frammento 6,0 EcoRI	pBR 328	pNN53-329	frammento J 6,0 EcoRI
FAGO 933W	W frammento 7,4 PvuII	pUC 19	pNN162-19	frammento W 7,4 PvuII

Tabella E. Schema costruttivo dei probes per il rilevamento diagnostico dei T.C.P. J e W in EHEC (SHIGA-LIKE)

EHEC rilevano anche una certa correlazione fra la presenza di determinate sequenze fagiche e la presenza di determinate sequenze codificanti SLT; anche una correlazione tra la presenza di fagi e la sintesi della SLT è stata ormai ben stabilita e cioè i ceppi SLTI+ / II+ per il 93% sono J+W+, i ceppi SLTI+ per l'87% sono J+, i ceppi SLTII+ per il 77% sono W+ . Questi rilievi sembrerebbero significare che la maggioranza dei SLTI-c.p. potrebbero essere correlati al fago di origine del J probe, cioè il fago H19A / 933J, originariamente utilizzato per isolare il gene strutturale della SLT-I; mentre una consistente quota dei SLT-II-c.p. potrebbero essere diversi dal fago 933W, (come anche potrebbero essere associati ad un fago non convertente, correlato al fago H19A / 933J con un SLT-II-c.p. correlato al fago 933W). Sempre in questo contesto è da segnalare la presenza di sequenze fago-correlate in ceppi mancanti di sequenze geniche codificanti le tossine, per cui si possono anche ipotizzare, per questi ceppi, ulteriori meccanismi patogenetici. Comunque per quanto riguarda gli EHEC, anche se presentano qualche eccezione, essi ibridizzano con questi probes fagici. Quindi per gli EHEC, quali sonde per i markers di virulenza, si possono usare per primi i probes derivati da frammenti clonati dal gene SLT

(Toxin Gene Probes), per secondi i probes derivati da frammenti fagici non associati con la sintesi della SLT (Toxin-Converting-phage Probes).

Per i Toxin gene probes riportiamo:

L'SLTI-probe (dal frammento TagI-HindII, 1142bp, del gene strutturale SLTI, codificante la subunità A per il 98% e tutta la subunità B) da plasmide ricombinante PJN37-19 (per riassemblaggio in pUC19 di HincII-HindIII in pUC18 e di TagI-Hind II in pUC19); L'SLTII-probe (dal frammento SmaI-PstI, 842bp, del gene strutturale SLTII, codificante la subunità A per il 95% da plasmide ricombinante pNN111-19 (per clonaggio in pUC18 e sub-clonaggio in pUC19) (Fig. 9) (Tab. F).

Tali probes si sono dimostrati molto sensibili e specifici, quando usati in condizione di forte stringenza, che permette una ibridizzazione di omologia pari al 80%.

Con tali probes gli EHEC si sono dimostrati per il 54% SLT-I+ / SLT-II+, per il 17% SLT-I+ e per il 29% SLT-II+.

Il VT1 probe (dal frammento HincII, 664bp, dal gene strutturaleSLT-I, codificante la subunità A per il 47% e la subunità B sarebbe equivalente al SLT-I probe; questo

DNA ORIGINARIO	FRAMMENTO CLONATO	VETTORE PLASMIDICO	PLASMIDE RICOMBINANTE	PROBES OTTENUTI bp
DNA-fagico di EHEC 0157:H7	SLTI-gene frammento HincII-HindIII	pUC 18	pJN37-19	SLTI-probe 1142
	SLT1 frammento TaqI-HincII	pUC 19		TaqI-HincII
	SLTI-gene VT1 frammento HindIII	pUC 18	pJN37-19	VT-I-probe 664 HincII
DNA-fagico di EHEC 0157:H7	SLTII-gene frammento SmaI-Pst I	pUC 18	pNN111-19	SLTII-probes 842
	SLT2 frammento StaI-SmaII	fusione pUC 19		SmaI-PstI
	SLTII-gene VT2 frammento SmaI-PstI	pUC 18	pNN111-19	VTII-probe 850 AvaI-PstI

Tabella F. Schema costruttivo dei probes per il rilevamento diagnostico dei geni relativi alla tossina shiga-like in E.coli.

frammento infatti è stato clonato da un t.c.p., strettamente correlato o uguale al fago da cui è stato clonato il gene SLT-I; il VT2 probe (dal frammento AvaI-PstI, 0.85 bp, del gene strutturale SLT-II, codificante la subunità A), sarebbe l'equivalente del frammento SmaI-PstI del SLT-II; non si conoscono le relazioni tra Vt2 c.p. e SLT-II c.p. da cui sono derivati i rispettivi frammenti per la costruzione dei probes (Tab. F).

Per i toxing-converting-phage probes richiamiamo i già descritti probes J e W.

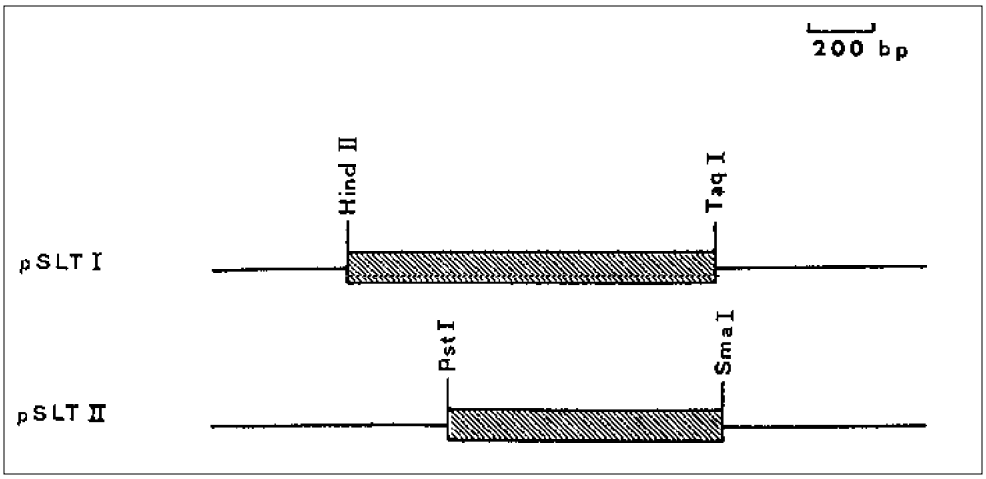


Figura 9. Frammenti di restrizione utilizzati per la costruzione dei probes per SLT 1 e SLT 2 per Shiga like toxin.

Invasività

Per l'Invasività limiteremo l'indagine ai probes identificanti le sequenze genomiche codificanti per i determinanti di invasione e più precisamente gli Ipa-gene (invasion plasmid antigen), della Shigella spp. e degli EIEC (3, 5, 11, 12, 17, 18, 27, 28, 29, 32, 33, 40, 41, 42, 43).

I batteri del genere Shigella, come anche gli EIEC, sono in grado di causare, mediante processo di penetrazione, moltiplicazione intracellulare e di disseminazione extracellulare, una infezione che normalmente è limitata alle cellule epiteliali del colon; questo complesso fenomeno di virulenza è geneticamente multideterminato e da parte di un grosso plasmide criptico non autoconiugantesi, e da parte di regioni multiple cromosomiche ampiamente separate tra di loro.

Shigella sonnei possiede un plasmide di 120 Md che sarebbe necessario per l'espressione delle catene O del LPS nella costruzione della forma I del corrispettivo antigene, mentre Shigella flexneri possiede un plasmide di 140 Md, che non sarebbe coinvolto nell'espressione del LPS. L'affermazione che questi grossi plasmidi siano associati con il carattere fenotipico della virulenza si basa sulle seguenti osservazioni: tale grosso plasmide è invariabilmente presente nei ceppi virulenti di Shigella; la perdita del grosso plasmide si accompagna sempre alla perdita della virulenza; i ceppi privi di plasmide, avirulenti, acquistando il plasmide da ceppi di specie omologhe divengono virulenti. Questi due plasmidi non sono identici.

Infatti i profili di restrizione del 120 Md di S.s., ottenuti con EcoRI e BamHI, mentre sono abbastanza omologhi all'interno della specie (indice di alta omologia di sequenza), non lo sono rispetto a quelli ottenuti dal 140 Md di S.f.(sierotipi 1.3.5), nè con quelli del plasmide di E.coli (Shiga-like), con cui presentano pochi frammenti di omologia. Una certa omologia invece viene affermata dai patterns di ibridazione ottenuta con i probes (da S.f.5) ed è distribuita per l'intera molecola e per la totalità dei ceppi appartenenti ai generi Shigella ed EIEC.

Tutto questo è compatibile con una comune origine ancestrale del plasmide e che tale plasmide si sia evoluto in maniera indipendente all'interno delle differenti specie enteroinvasive e dei differenti sierotipi, andando appunto incontro a micromutazioni riflettentesi a livello dei siti di restrizione, mentre i primordiali geni plasmidici di virulenza si sarebbero conservati, come è stato dimostrato dal ripristino della virulenza, da parte del plasmide pWR110 (di S.f.5 M90T) in altri sierotipi di S.f. e di EIEC e, mediante opportune manipolazioni genetiche anche e in altre Enterobacteriaceae tra cui E.coli non enteroinvasivi, in Salmonella Tiphymurium e Serratia Marcescens.

In questo contesto è da ricordare che i suscritti plasmidi appartengono al gruppo di incompatibilità FI, e quindi alla famiglia RepFIIA dei repliconi e che tali plasmidi FI quando introdotti nelle specie enteroinvasive possono essere in grado di inibire la virulenza e questo contrasta paradossalmente con gli FI di Shigella e di EIEC. Un altro aspetto strano di questi plasmidi di virulenza è la loro estrema instabilità e quindi la facilità della loro perdita; perdita particolarmente grave in S.s. in quanto perderebbe così i geni che controllano la sintesi dell'antigene somatico (tale plasmide è stato inizialmente denominato pFormI) che hanno un indubbio peso nel comportamento biologico del microorganismo, tra cui la virulenza, anche se sono stati descritti ceppi avirulenti FormI positivi. E' da ricordare inoltre che a tale antigene inizialmente era stato riservato proprio un ruolo nel processo stesso dell'invasività che però si può verificare anche con ceppi ruvidi e che quindi hanno perso le catene O, carattere appunto codificato dal plasmide in S.s. . E' comunque indubbio che i prodotti genici di tali plasmidi rivestono un ruolo importante nel definire il carattere fenotipico di virulenza, che in laboratorio viene accertato mediante i tests di invasione delle cellule HeLa (HeLa-Inv) o di altre cellule, mediante il test di induzione della cheratocongiuntivite in cavia (Sereny-Test:ST) e la produzione di fluido nell'ansa ileale legata di coniglio. Il primo test quindi è un vero e proprio rivelatore del marker fenotipico dell'invasività, mentre il secondo ed il terzo test sono rivelatori del marker fenotipico della flogisticità, che globalmente si compendiano nel carattere della virulenza, a cui contribuiscono sia loci plasmidici che loci cromosomici. Dall'utilizzo dei suscritti test, nel rilievo del fenotipo di virulenza, si è tentato di valutare il peso genetico del plasmide e del cromosoma nella virulenza e per essa nell'invasività e nella flogisticità. Tutto questo è reso possibile mediante tecniche di ibridizzazione coinvolgenti la globalità polinucleotidica, mediante coniugazione ed integrazione di materiale genetico, tra E.c e S.f.5, in doppio senso, reso appunto possibile dalla loro reciproca alta omologia.

Questa omologia genetica e questa facilità di trasferimento di materiale genetico ha reso possibile dare un peso al plasmide e al cromosoma, nel fenotipo di virulenza, e definire in quest'ultimo le aree di virulenza; questa definizione deve però essere considerata in maniera critica in quanto nei ceppi ibridi è di difficile valutazione la grandezza dell'exogenote trasferito e quindi il carattere fenotipico acquisito. In sintesi comunque, dai trasferimenti da E.c. a S.f.5 si è avuta perdita della capacità di indurre cheratocongiuntivite con il trasferimento del locus purE, e della capacità di indurre flogosi intestinale con il trasferimento del locus xyl-rha, che venivano riacquisite con il trasferimento del locus glpK (da S.f.5 virulenta) e del locus malB (da E.c. K12), mentre l'invasività per HeLa rimaneva immutata. Nei trasferimenti da S.f.5 a E.c. non si è avuta acquisizione delle capacità flogistiche con il trasferimento dei loci purE, xil-rha; tali caratteristiche virulente non venivano acquisite neppure con l'espressione dell'antigene O, mentre invece venivano acquisite con l'introduzione, contemporanea, del plasmide di virulenza.

L'introduzione del plasmide di virulenza (pWR110) induceva l'acquisizione della capacità invasiva in HeLa con minime lesioni a livello intestinale. Queste ultime venivano esaltate con la contemporanea introduzione dei loci purE/Kcp e hys (mentre quest'ultimo, da solo, introduceva modesta reazione infiammatoria intestinale), lesioni che venivano ulteriormente esaltate, con produzione di fluido, dalla contemporanea

introduzione dei loci arg e mtl. Quest'ultima introduzione provocava anche l'induzione di cheratocongiuntivite (che non si verificava in assenza del locus hys, pur essendo presenti i loci purE/Kcp, arg, mtl), come non si verificava in assenza di arg e mtl, pur essendo presenti purE/Kcp e hys e naturalmente il plasmide di virulenza.

Complessivamente quindi il fenotipo di virulenza, sotto il suo profilo flogistico, verrebbe mediato dai tre loci cromosomici hys a cui sono legati gli antigeni O (3,4), che conferirebbero ai ceppi capacità moltiplicative all'interno delle cellule epiteliali intestinali, purE/Kcp, che aumenterebbe la capacità di sopravvivenza batterica all'interno degli enterociti inducendone una marcata reazione infiammatoria, arg e mtl potenzianti tale reazione; mentre il fenotipo di virulenza, sotto il profilo dell'invasione, verrebbe mediato dai loci presenti nel plasmide, per cui è stato denominato pInv. Per inciso, ma senza addentrarci ulteriormente nel problema, in questa dicotomica separazione confinante in pInv, l'invasività, ma non la flogisticità, viene mitigata dagli studi condotti sul plasmide di virulenza (280Kb) di Shigella flexneri 2a in cui vi è la possibilità di distinguere tre regioni di virulenza, la G, la BPHD e la F: la prima delle quali avrebbe capacità inducenti l'infiammazione, ma non l'invasività, mentre le seconde avrebbero capacità inducenti sia l'infiammazione che l'invasività. Essendo gli ipa-gene probes il confine del nostro scivere, non sconfineremo sui VirF-gene probes, che indubbiamente sono importanti, anche per i rapporti con i primi, nel rilevare i markers di virulenza.

Ritornando quindi al pInv (120-140 Md), esso è presente in tutte e quattro le specie di Shigella ed in EIEC, e codifica peptidi di membrana (non presenti nei ceppi avirulenti), che permettono l'invasione cellulare. La sequenza genetica che codifica questa capacità invasiva è contenuta in un tratto di DNA di circa 37 Kb, il cui trasferimento in ceppi avirulenti è sufficiente a renderli invasivi (HeLa-Inv+) (Fig. 10).

A questa sequenza minima di invasività si è pervenuti mediante manipolazioni genetiche di mutagenesi indotta da Tn5 (trasposone) che hanno permesso di individuare (in pWR100 di S.f.5) tre frammenti EcoRI di 7.6, 11.5, 17.0 Kb, che, appunto mutagenizzanti, inducono singolarmente la perdita dell'invasività, non ripristinabile da loro

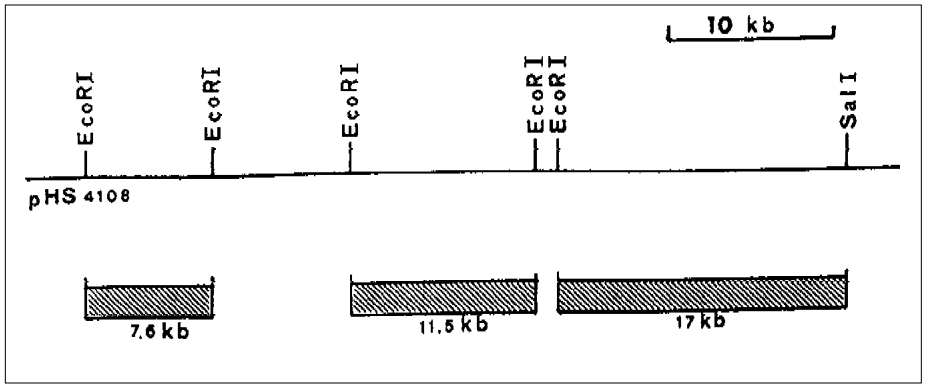


Figura 10. Frammento EcoRi - Sal I con relativi probes (frammenti EcoRI) contenente i geni codificanti per la capacità invasiva di EIEC.

singolarmente, bensì dal loro insieme. Sempre mediante tecniche di ingegneria genetica, utilizzando plasmidi ricombinanti ed opportuni enzimi di restrizione, è stato possibile ricostruire una mappa di restrizione di questi frammenti che sono in grado di reindurre l'invasività in ceppi precedentemente resi avirulenti per mutagenesi; come si può vedere tali inserzioni mutagenizzanti sono avvenute sia a livello del frammento 7.6 Kb, sia del frammento 11.5 Kb, sia del frammento 17.0 Kb; e tali segmenti non sono contigui, bensì separati; le sequenze di separazione potrebbero essere non codificanti oppure sequenze di non virulenza, i cui geni potrebbero essere individuati a livello delle mutazioni, ma che potrebbero esserne ugualmente essenziali nell'espressione dell'invasività. Tali sequenze, al pari della virulenza, sono termoregolate, non sono in grado di indurre placche di lisi, non sono in grado di positivizzare il Sereny-Test, mentre sono in grado di indurre polipeptidi a proprietà invasiva tra cui quattro identificabili con le lettere a, b, c, d con peso molecolare in Kd di 78, 57,43, 39, come è stato dimostrato in minicells con plasmidi ricombinanti. Infatti mediante la tecnica delle minicells i ceppi virulenti risulterebbero sintetizzanti dai 15 ai 20 peptidi, e comunque almeno 10, mentre i ceppi avirulenti ne sintetizzerebbero circa 6 o anche meno. Per i ceppi invasivi di S.f. e E.c. tale complesso peptidico amonterebbe a 7 (a, b, c, d, e, f, g) e tali peptidi presenterebbero somiglianze, per peso molecolare, per punto isoelettrico, per capacità antigeniche, tra i ceppi di S.f., S.s. e E.c.. Quattro di essi (a, b, c, d) hanno caratteristiche antigeniche dominanti e proprio questi potrebbero funzionare quali determinanti del fenotipo di invasione; gli altri 3 (e, f, g) dato il loro carattere basico potrebbero essere proteine regolatorie, leganti il DNA o proteine di trasporto o di ancoraggio. Comunque questi sette peptidi potrebbero non essere gli unici determinanti di invasità, in quanto altri peptidi, che sono presenti in numero di circa 30 per i plasmidi di classe FI e che hanno indubbie funzioni regolatorie fondamentali per l'esistenza vitale del plasmide, potrebbero affiancarli e potrebbero anche non essere evidenziabili per limitazioni tecniche.

Come suscritto i quattro peptidi a, b, c, d sono codificati da sequenze incluse nei tre segmenti 7.6-11.5-17.0 Kb, mentre questo non può essere affermato per i peptidi e, f, g. Dei tre segmenti codificanti, il frammento 17.0 Kb è altamente conservato, caratteristica questa che lo indica quale probe utilizzabile nella DNA-ibridizzazione per indicare i ceppi virulenti; questa conservazione nell'omogeneità delle basi è probabilmente l'attributo base che permette ad un microrganismo enterico di indurre la sua endocitosi da parte degli enterociti: omogenicità e stabilità che è la causa di antigeni di superficie cross-reagenti tra i ceppi degli enterobatteri invadenti; e, data la loro importanza biologica, quali determinanti di invasività, vengono riconosciuti dal sistema immune, che, in base alla loro presenza è in grado di distinguere gli enteroinvasivi dagli entero non invasivi. Grande importanza quindi rivestono questi ipotetici peptidi di invasione; per la loro codifica sarebbe sufficiente un segmento di DNA pari a 8 Kb.

In effetti la sequenza codificante i peptidi a, b, c, d è stata ristretta ad una sequenza reale di 6.7 Kb (derivata da pSS120 di Shigella sonnei) che è in grado di ripristinare l'invasività in ceppi mutati non più invasivi e di indurre in minicells la sintesi dei quattro peptidi. L'identificazione di tale frammento di minima invasività è stato reso possibile dalla tecnica della conduzione Tn1-mediata, che permette appunto un efficiente trasferimento di un plasmide, non trasferibile, da un ceppo all'altro, in maniera più semplice

del vettore cosmidico impaccato in fago lambda (che aveva permesso l'individuazione della sequenza 37 Kb) , di rilevare la mutazione Tn1 indotta e di rilevare i siti di inserzione sui frammenti di restrizione enzimatica (ottenuti con HindIII) che sono risultati essere quattro, di dimensioni pari a 15.0-9.1-8.8-7.6, presentanti mappe di restrizione diverse, che hanno permesso, mediante opportuni clonaggi su plasmidi ricombinanti, di identificare e quindi di mappare le rispettive regioni, i ricombinanti in grado di ripristinare l'invasività.

Tale regione consiste di due sequenze contigue di 4.1 e 2.6 e codifica i quattro peptidi a, b, c, d (80)(47)(41)(38) (Fig. 11).

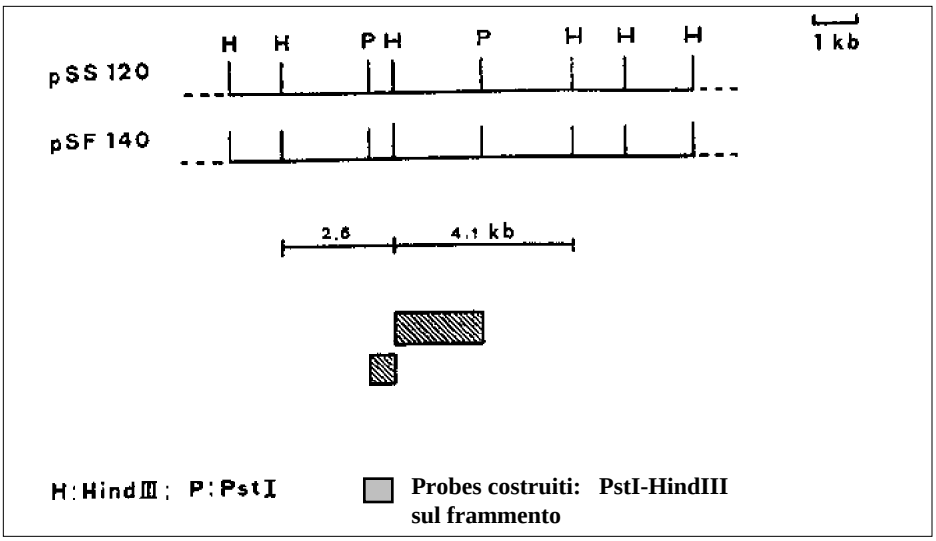


Figura 11. Frammento Hind III clonato su plasmidi ricombinanti contenente la regione consistente in due porzioni (2.6 - 4.1 kb) contigue che codifica i quattro peptidi a, b, c, d.

Questa sequenza di 6.7 Kb, non esclude che altre sequenze siano impegnate nella invasività; certamente esse ne rappresentano un minimum ulteriormente restringibile alla sequenza 4.1 Kb, che codifica una proteina di 38 Kd, che potrebbe essere il determinante dell'invasione cellulare e questo verrebbe anche suggerito dall'alta conservazione della sequenza 4.1 non solo nei ceppi di S.s., ma anche di S.f. e di EIEC. Per l'invasione certamente hanno un ruolo anche gli altri tre peptidi, per la cui sintesi è richiesta la contiguità 4.1 + 2.6 (una delezione di 1.6 in 4.1 è causa della mancata sintesi dei quattro polipeptidi di 78(a), 57(b), 43(c), 38(d) D a cui si associa un quinto di 58 D (h), sempre presente nell'outer membrana. Sono importanti immunogeni e questa loro caratteristica, utilizzando appunto antisieri di coniglio di screening e purificati per affinità, specifici per gli antigeni di invasione ipaB (57), ipaC (43), ipaD (39), e ipaH (58) (del plasmide di invasione M90T), ha permesso, da una libreria del DNA pWR110 espressa in lgt11, di caratterizzare i quattro geni responsabili della loro sintesi, mappandoli con esattezza (Fig. 12).

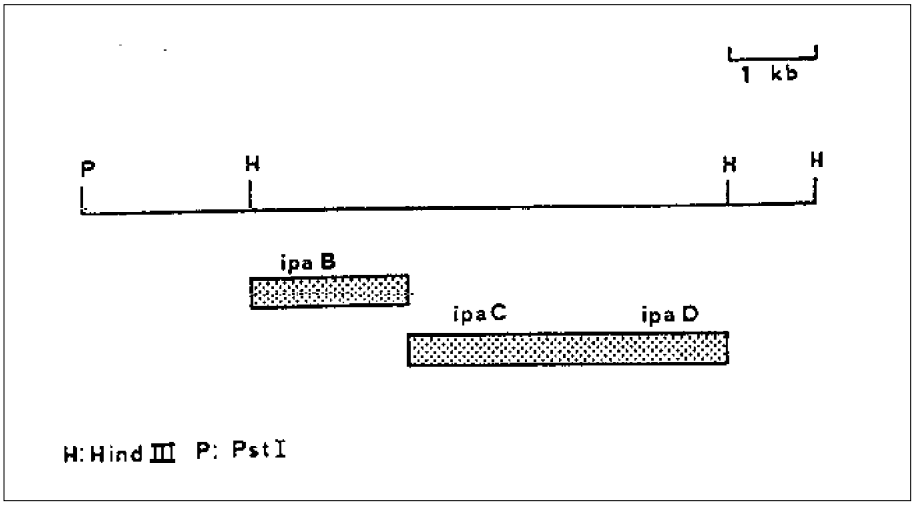


Figura 12. Probes ipaB, ipaC, ipaD, costruiti sul frammento di restrizione PstI - HindIII contenente i geni codificanti per i peptidi a, b, c, d presenti in EIEC.

Tale mappa genica mostra che i geni ipaB, C, D sono in stretto linkage e mappano su un contiguo frammento di 4.6 e 1.0 Kb, di frammenti HindIII, contenuti in un più esteso frammento (BamHI) di 23 Kb.

L'ipaH gene è invece separato e occupa una diversa posizione nel plasmide di invasione.

Questi geni responsabili della sintesi degli antigeni di 57 KD (ipaB), 43 KD (ipaC), 39 KD (ipaD) e 58 KD (ipaH), possono essere immaginati quali cluster genico di separate unità trascrizionali, regolate da un regolatore termosensibile oppure quali una singola unità policistronica, a trascrizione regolata da un soppressore.Tralasciando questi modelli, è stato fatto notare come la mappa di restrizione dei geni ipaB, C, D (su pWR 110) assomiglia a quella costruita sul frammento di 37 Kb (costruita per il clone cosmidico pHS4108) e quantunque una tale somiglianza non sia stata verificata mediante ibridizzazione, sembrerebbe ragionevole assumere che il frammento 8.0 e i due frammenti più piccoli fiancheggianti della mappa degli Ipa geni corrispondano al frammento 7.6 (EcoRI) del 37 Kb (pHS4108), data anche la somiglianza dei peptidi sintetizzati. E' anche stato fatto notare che i geni ipaB, C, D sono localizzati in un segmento contiguo di 1.0+4.6 Kb di frammenti HindIII, (S.f. 5), come anche il segmento di minima 4.1 e 2.6 di due frammenti contigui HindIII (S.s.) e quest'ultimo segmento ibridizzava con S.flexneri, S.boydii, S.dyssenteriae e con EIEC. Anche per questi segmenti non stati condotti studi di ibridizzazione per stabilirne la somiglianza.

Per inciso, i frammenti ipaB, ipaC, ipaD, ibridizzano in maniera specifica con il DNA plasmidico di numerosi bacilli dissenterici e quindi sono degli ottimi probes. E' da notare come la separata localizzazione di ipaH, richiami l'analoga separazione dei VirF, VirC, e BPHD di S.F.2a.

Il gene ipaH sarebbe inoltre presente in più copie, sia a livello plasmidico, sia a livello cromosomico (in Shigella flexneri sarebbe presente in cinque coppie) nelle varie speci di Shigella studiate ed in EIEC. Questi geni quindi sono altamente conservati, oltre che essere presenti in tutte le Shigelle virulente ed in EIEC, ed i loro prodotti, come già scritto sono forti immunogeni, specialmente ipaB ed ipaC. Questi dati genetici e sierologici suggeriscono che ipaB e ipaC (come anche ipaD) siano strettamente associati con il fenotipo invasivo, confermati anche dalla evidenziazione di IgA secretorie intestinali verso ipaB,C.

Quindi è importante identificare, mediante MAbs, gli epitopi antigenici e, mediante tecniche genetiche simili alle precedenti, ma utilizzanti i MAbs quali selezionatori dei ricombinanti, corrispondenti sequenze geniche. Seguendo questa strategia è stato possibile costruire la mappa genetica degli epitopi B e C, che si basa, tra l'altro, ipotizzando che gli epitopi identificati dai MAhr siano lineari e non conformazionali e quindi codificati da piccole regioni contigue di DNA.

In tale mappa sono identificabili le sequenze dei tre epitopi di ipaB occupanti un tratto N-terminale di 700 bp: 2F1 (320bp), 1H4 (240bp), 4C8 (140bp); sono anche identificabili le sequenze dei tre epitopi di ipaC occupanti un tratto N-terminale di 640bp: 5H1, 9B6, 5B1, la cui orientazione non è stato possibile individuare; questi 3 epitopi di ipaC distano dagli epitopi di ipaB 940bp e di circa 50bp da un quarto epitopo C (2G2 di 150bp) (Fig. 13).

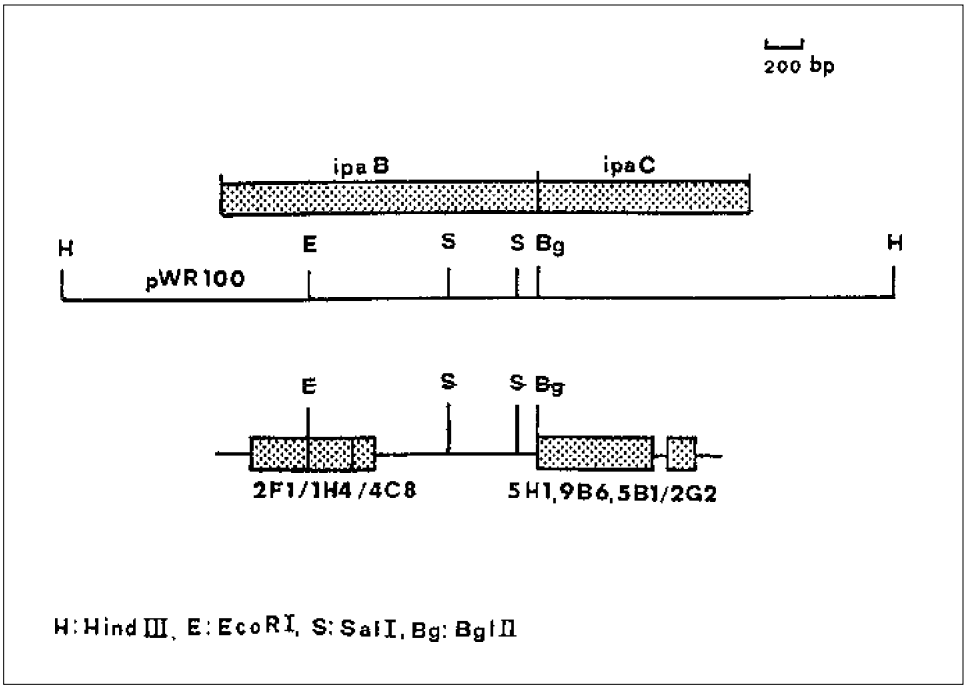


Figura 13. Mappa di restrizione del frammento HindIII clonato su pWR100 con relativi probes ipaB, ipaC, contenenti sequenze specifiche per i 3 epitopi di ipaB (tratto N-terminale di 700 pb: 2F1, 1H4 e 4C8) e i 3 epitopi di ipaC (tratto N-terminale di 640 pb: 5H1; 9B6, 5B1) e un quarto epitopo C: 2G2 (150 pb).

Questi sette epitopi di superficie si sono altamente conservati in Shigella spp. e in EIEC (e non sono stati evidenziati epitopi cross-reattivi in altri batteri invasivi quali Salmonella, Yersinia, Campylobacter spp.), pur essendo sottoposti, data la loro localizzazione, a forti stress mutazionali ambientali, e quindi essi devono avere un ruolo essenziale nell'invasività. In questo senso l'inibizione della formazione delle placche da MAb vs 2F1 supporterebbe l'idea che ipaB sia attivamente coinvolto quel processo invasivo, in cui però non è identificabile la tappa, sia essa l'adesione, l'endocitosi, la fuoriuscita fagosomica, la replicazione e la sopravvivenza endocellulare; in tale ruolo svolto da ipaB, sembrerebbero coinvolti, almeno in maniera cruciale come 2F1, gli altri epitopi. Anche l'ipaC deve avere un qualche ruolo nell'invasione, infatti il MAb vs 2G2 aumenta la formazione delle placche. Nonostante quindi la conoscenza degli ipa geni sia appena iniziata, la loro individuazione ne costituisce un sicuro marker di virulenza; e per questo fine sono già stati utilizzati dagli idonei probes, che, qui di seguito riporterò in breve. Sono stati utilizzati quali probes, i tre EcoRI fragments, derivati dalla regione di minima di 37 Kb e cioè i frammenti 7.6, 11.5, 17.0 clonati in BR325, con l'utilizzo quali probes dei plasmidi ricombinanti pHS3188, per 7.6, pSH4011, per 11.5, e pH54033, per 17.0 (Tab. G).

DNA ORIGINARIO	FRAMMENTO OTTENUTO kb	VETTORE PLASMIDICO	PLASMIDE RICOMBINANTE	PROBES OTTENUTI kb
S. f. 5 pWR100	frammento 7,6 EcoRI	pBR325	pSH3188	frammento 7,6 EcoRI
S. f. 5 pWR100	frammento 11,5 EcoRI	pBR325	pSH4011	frammento 11,5 EcoRI
S. f. 5 pWR100	frammento 17,0 EcoRI	pBR325	pSH5033	frammento 17,0 EcoRI

Tabella G. Schema costruttivo dei probes per il rilevamento diagnostico dei geni IPA in S. f. 5.

Il frammento 17 Kb può identificare tutti i ceppi di Shigella delle 4 specie e di EIEC, mentre i frammenti 7.6 e 11.5 presentano una sensibilità minore, che potrebbero riflettere una mancanza di conservazione delle sequenze di DNA tra i plasmidi di invasione a livello delle differenti specie. Ugualmente sensibile e specifico si è dimostrato il pMR17, che contiene sempre il frammento EcoRI 17.0. E' da tener presente che questo probe identifica solo un potenziale patogenetico, per cui si deve considerare la possibilità di discrepanze con le prove biologiche, che possono trovare una spiegazione in fenomeni di mutazione a livello dei loci plasmidici e non solo di essi, ma anche a livello cromosomico (come è dato riscontrare tra DNA-probe assay positivi e Sereny-Test negativi).

Comunque l'utilizzo del probe 17 Kb si è dimostrato sensibile e specifico quanto il Sereny-Test e il VMA-Test (Elisa) con la tecnica della Colony-Hybridization; non così

con la Stool-Blot, che si è dimostrata notevolmente meno sensibile soprattutto per le Shigelle e per gli EIEC (lattosio-). E' stato anche utilizzato un frammento di 2.5 Kb (HindIII) da un segmento 6 Kb da EIEC.

Tale frammento, a cui non è stata associata una funzione e che non cross-ibridizza con il 17.0 Kb, avrebbe dimostrato una buona sensibilità e specificità, con risultati identici al 17.0 Kb per la Shigella ed EIEC.

Sono stati infine utilizzati, quali DNA-probes, quelli ottenuti mediante Nick-Traslation, da ipaB (375bp EcoRI fragment da lgt11 ricombinante: S12); da ipaC (1750bp EcoRI fragment da lgt11 ricombinante: W22); da ipaD (870bp EcoR fragment da lgt1 ricombinante: S10) (Tab. H) (Fig. 14).

DNA ORIGINARIO		FRAMMENTO CLONATO	VETTORE PLASMIDICO	PLASMIDE RICOMBINANTE	PROBES OTTENUTI
S. f. 5	pWR100	frammento ipa B 0,375	pUC8	λgt11HC17	frammento S 12 375 bp EcoRI
S. f. 5	pWR100	frammento ipa C 1,75	pUC8	λgt11HC17	frammento W22 1750 bp EcoRI
S. f. 5	pWR100	frammento ipa D 0,87	pUC8	λgt11HC17	frammento S10 870 bp EcoRI
S. f. 5	pWR390	frammento ipa H 2,9	pBR322	λgt11	frammento EcoRI 2.9 kb

Tabella H. Schema costruttivo dei probes per il rilevamento diagnostico dei geni relativi agli IPA-gene in S. f. 5.

Tali probes ibridizzano solo con il plasmide di invasione di tutti i ceppi di S.flexneri 5, con S.sonnei, con S.boydii, con S.dyssenteriae, con EIEC e non invece con il plasmide di ceppi non invasivi; ibridizzano nei Southern-blot con una banda di 4.6 Kb, di un frammento HindIII solo e sempre da plasmidi di invasione e non in ceppi avirulenti. Tale banda è ottenuta in condizioni di stringenza e quindi indica per Shigella ed EIEC una omologia superiore all'80%, mentre le loro mappe di restrizione, come precedentemente scritto, presentano pochi frammenti in comune. L'omologia del DNA d'altra parte rimane anche dimostrata dal ritrovamento di antigeni d'invasione in comune fra questi ceppi (evidenziati da antisieri verso S.f.2a).

Tutto questo indica che queste sequenze possono costituire degli eccellenti probes diagnostici per la ricerca degli enterobatteri invasivi. La loro applicazione infatti con la

tecnica della Colony-Hybridization ne ha dimostrato la loro alta specificità in quanto reagenti con tutte le Shigelle invasive e con gli EIEC (Pcr+, HeLa-Inv+, S-T+), e non reagenti con oltre 300 enterobatteri patogeni, gram-negativi e non dissenterici, come anche non reagenti con i ceppi di S.flexneri non HeLa invasiva, (su cui la Western-blot non evidenziava antigeni di invasione).

Questa alta specificità non potrebbe essere mantenuta per i probes impieganti il frammento EcoRI di 17 Kb, la cui ampiezza non può che limitare la specificità della reazione di ibridizzazione e questo frammento conterrebbe almeno una copia IS1, che è un componente comune ai cromosomi ed ai plasmidi degli enterobatteri. Accanto all'utilizzo dei plasmidi ipaB, C, D quali probes può essere proposta l'utilizzazione di plasmidi ipaH (tra cui il pWR390). Tali probes verso ipaH-gene ibridizzano con tutte le Shigelle e gli EIEC, indipendentemente dalla loro capacità invasiva, mentre non ibridizzano con altri germi enterici e non enterici; sono quindi probes specifici per Shigelle e per EIEC e possono evidenziare ceppi con delezioni a livello degli altri ipa-gene (come ipaC) e a livello del 17 Kb EcoRI-fragment.

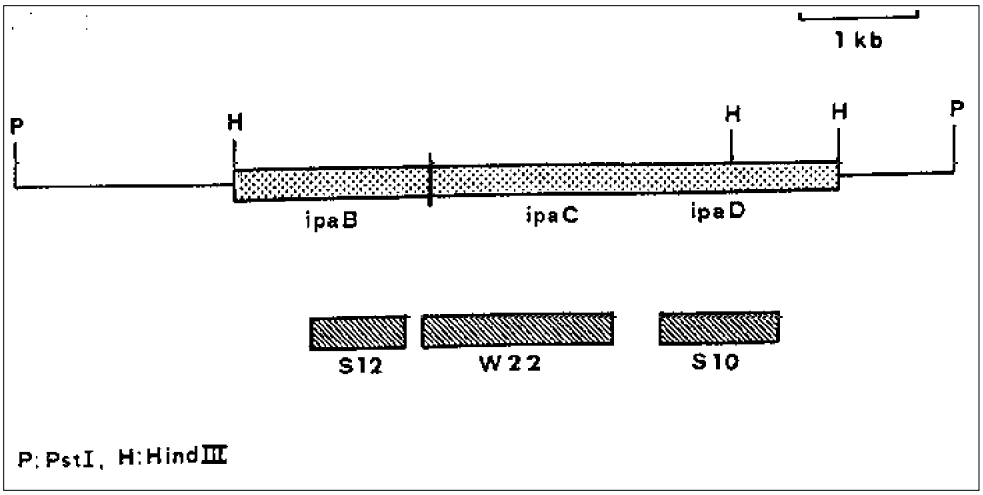


Figura 14. DNA probes utilizzati per l'identificazione dei frammenti ipaB (S12), ipaC (W22), ipaD (S10) sul frammento di restrizione HindIII (2.5 kd).

Sistemi di resistenza alle Ig

Per quanto riguarda le IgA-1-proteasi, che vengono fatte rientrare nei sistemi di Resistenza alle Immunoglobuline, sono in effetti degli importanti determinanti di patogenicità e quindi di virulenza. Tenendo presente, infatti, che le superfici mucose rappresentano la maggior porta di entrata dei batteri patogeni è evidente che le IgA, in tale sede, rappresentano un baluardo difensivo nella critica interazione battere-ospite.

Le IgA possono essere idrolizzate da IgA-proteasi batteriche prodotte dai batteri patogeni quali: Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, mentre i membri non patogeni appartenenti a questi generi non producono le IgA-proteasi (4, 8, 14, 15, 23, 24, 26, 36, 38).

E' da premettere che tali endopeptidasi batteriche presentano proprietà in comune, quali la loro natura extracellulare, il loro peso molecolare e la loro specificità di azione verso le catene α1; presentano inoltre proprietà non in comune, quali il loro punto isoelettrico, la loro inibizione da parte dei metalli chelanti, il loro sito di idrolisi a livello della catena α, e le loro specificità antigeniche. Per quanto riguarda il sito di idrolisi esse possono essere distinte in tipo1, idrolizzanti il ponte Pro231-Ser232, in tipo2, idrolizzanti il ponte Pro235-Tre236 e tipo3, idrolizzanti due ponti non identificati. Sempre in questo contesto è interessante richiamare l'attenzione che in Haemophilus influenzae tale specificità di idrolisi correla fortemente con il sierotipo capsulare e cioè il tipo1 con i sierotipi a, b, d, f, il tipo2 con i sierotipi c, e, il tipo3 con ceppi non sierotipizzabili, quantunque anche ceppi non capsulati possano produrre tali proteasi. Anche nel genere Neisseria si riscontrano proteasi tipo1, come in Neisseria meningitidis 16123, e di tipo2, come in Neisseria meningitidis 15894 e in Neisseria gonorrhoeae F62. Per quanto riguarda la diversità antigenica sono stati segnalati 15 tipi diversi di IgA-1-proteasi, e per quanto riguarda le proteasi di tipo1 e di tipo2 da N.m. esse possono venir inibite da sieri convalescenti da meningiti meningococciche di ceppi produttori dei corrispettivi tipi 1 e 2 di IgA-1-proteasi. Quindi in un singolo genere vi è una estrema complessità di enzimi proteasici tra loro strettamente correlati. Non addentrandoci in tale complessità di correlazioni, focalizziamo la nostra attenzione prevalentemente sul gene codificante le IgA-1-proteasi gonococcica.

Tale gene, del ceppo N.g. F62, è stato clonato in pBR322 ed espresso in E.coli K12(HB 101) e nel ricombinante pVD105 (Fig. 15) è stata eseguita la mappa di restrizione e, mediante procedimenti di inserzione da Tn5 e di delezione, è stata evidenziata una sequenza che inizia a circa 1000bp a sinistra del sito AvaI e che viene trascritta verso sinistra, terminando al sito HindIII, che è responsabile dell'espressione dell'attività IgA-

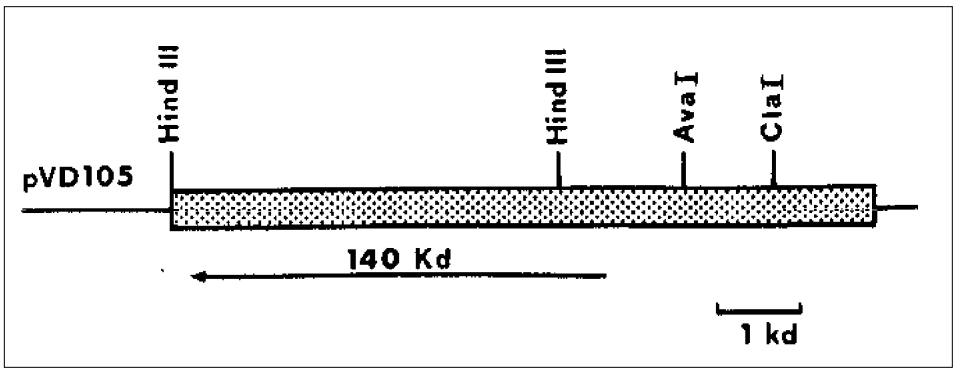


Figura 15. Frammento di restrizione HindIII - ClaI' clonato in pBR322 contenente una sequenza (circa 1000 pb) a sinistra di AvaI responsabile della espressione dell'attività IgA-proteasica.

1-proteasica. Questa sequenza può essere tagliata sia con HindIII in un frammento di 4.2 Kb, che contiene la maggior parte del gene (iga), mancante soltanto della sequenza codificante la parte amino-terminale, sia con HindIII e ClaI in un frammento di 2.7 Kb che contiene 400-500bp codificanti la porzione amino-terminale, associatamente a uno di 2.2 Kb che non è correlato all'espressione dell'IgA-1-proteasi in E.coli.

Questi due frammenti possono essere utilizzati quali probes per verificare la presenza e le omologie (Tab. I).

Tale gene è stato anche clonato da un frammento di 5 Kb da N.g. MS11, ed è stato denominato, come precedentemente scritto, iga.

Tale sequenza genica consta di 4596bp in cui è possibile distinguere le sequenze promotor (-43,-35,-10), la sequenza S-D (Shine-Dalgarno) ed il Start-Codon (ATG), la sequenza del domain aminoterminale del leader-peptide, la sequenza del domain proteasico, con la presenza di due cistine, possibilmente associate al centro attivo dell'enzima, la sequenza del domain carbossiterminale del "helper-peptide", con i siti a, b, c, autoproteolitici, ricchi in purina e che permettono una distinzione tra subdomains α e β. Da queste sequenze viene sintetizzato un precursore che, per una serie di autoclivaggi a livello del peptide leader e del peptide helper, originerà l'enzima maturo ed uno stabile frammento α.

Un buon metodo per evidenziare l'iga o sequenze ad esso omologhe è la Colony-Hybridization, che può essere condotta sia in condizioni di forte stringenza, con positività per omologia >78%, che in condizioni di bassa stringenza, con positività per omologia >89%; tali omologie sono anche rilevabili con la Southern-Blot. In condizioni di alta stringenza tutti i ceppi di N.g. hanno presentato omologia con il probe 4.2 Kb (HindIII) come anche con il probe 2.7 Kb (HindIII-ClaI).

Tali probes hanno dato ibridizzazioni positive anche con N.m. (sierogruppo A,B,C,E,Z,W); i ceppi di N. commensali non hanno segnalato positività con il 4.2 Kb, mentre con il 2.7 Kb N.lactamica, N.sicca, N.cinerea davano positività, che non era

DNA ORIGINARIO	FRAMMENTO CLONATO kb	VETTORE PLASMIDICO	PLASMIDE RICOMBINANTE	PROBES OTTENUTI kb
Neisseria gonorrhoeae F62	da IgA-I- -proteasi gene frammento 8 kb HindIII	pBR322	pVD105	1) frammento 4,2 HindIII 2) frammento 2,7 HindIII-ClaI
Neisseria meningitidis 15894	da IgA-I- -proteasi gene frammento 14 kb ClaI	pBR325	pVD113	1) frammento 4,2 EcoRI (pVD114) 2) frammento 3,5 HindIII (pVD115)

Tabella I. Schema costruttivo dei probes per il rilevamento dei geni relativi all'IgA-I-proteasi in neisseria.

rilevabile invece con N.flava, N.perflava, N.subflava e N.mucosa; questo segnale di positività, non evidenziabile in E.coli ed in Branhamella catarrhalis, poteva essere evidente, come poteva essere leggero e quindi di bassa omologia per la presenza di qualche sequenza in comune all'interno del frammento 2.7 Kb per le Neisserieae.

Quindi solamente N.g. e N.m. IgA-1-proteasi producenti presentano omologie con il probe 4.2 Kb (HindIII) che è quindi specifico per iga, e sebbene N.lactamica, N.cinerea, N.sicca posseggano omologia di sequenza o con il terminale aminico dell'iga o con sequenze immediatamente adiacenti a questo gene, rilevate dal probe 2.7 Kb, nessuna delle altre N.commensali posseggono omologie significative o con il gene iga o con sequenze adiacenti legate a tale gene.

La maggioranza quindi delle specie commensali, non patogene del genere Neisseria non contengono nè sequenze omologhe a iga, nè sequenze omologhe alle sequenze iga-adiacenti; quindi questi microorganismi non patogeni non producono l'enzima, in quanto sono privi del gene iga come quei microorganismi commensali pure privi del gene iga, ma recanti sequenze iga-adiacenti, che non sono quindi coinvolte con il gene strutturale in sè stesso, anche se la loro distribuzione è limitata per lo più alle specie patogene.

Quindi i gonococchi e i meningococchi presentano omologia di sequenza e le sequenze omologhe, dai dati ottenibili in Southern- blot, sono contigue e possono presentare siti di restrizione diversi (per cui i vari pattern ottenibili sono diversi sia come numero che come dimensione dei frammenti).

In condizioni di bassa stringenza, l'ibridizzazione su DNA (N.g. F62) trattato con opportune endonucleasi di restrizione, con la tecnica dello Southern-blot con il probe 4.2 Kb, ha evidenziato i frammenti presenti in condizione di forte stringenza (pattern dell'alta stringenza) associati ad altri frammenti aggiuntivi di minore intensità (pattern della bassa stringenza) e tali frammenti aggiuntivi aumentavano con il probe 2.7 Kb.

Questo ampio numero di sequenze cromosomiche di N.g. reagenti con i probes gonococcici per le IgA-1-proteasi si sono rilevate anche in N.m.

Questa ampliata cross-reattività viene evidenziata anche per i ceppi di N.commensali, non reagenti in condizioni di alta stringenza con i probes gonococcici per le IgA-1-proteasi, quindi queste extra omologhe sequenze non sono correlate al gene delle IgA-1-proteasi, in se stesso, pur essendo uniche per le Neisserieae. Analoga ampia reattività, in condizioni di alta stringenza, è evidenziabile utilizzando probes gonococcici relativamente piccoli (ca. 60bp) e questi rilievi potrebbero essere spiegati ipotizzando la presenza di una sequenza ripetitiva, quale quella a funzione captante il DNA, presente nei probes gonococcici; questa sequenza sarebbe presumibilmente presente sul gene delle IgA-1-proteasi, dal momento che il gene clonato può essere trasferito da E.coli e N.g. per trasformazione.

Tutto questo depone per una base comune di omologia all'interno del genus Neisseria e soprattutto per N.g. e N.m., in cui già precedenti ricerche, mediante trasformazione DNA-mediata, ne avevano evidenziata la correlazione.

Comparando, mediante clivaggio con endonucleasi di restrizione, l'iga di N.g. con l'iga di N.m. (clonato in pVD113) è stato evidenziato l'alto livello di organizzazione genica in comune tra di essi, quantunque la distribuzione dei siti di restrizione tra cui anche quelli fiancheggianti, appaiono essere meno conservati (Fig. 16).

L'iga di N.m., clonato da N.m. 15894 (ClaI) in pBR325 in E.coli K12 (HB101), denominato pVD113, contiene un frammento di 14 Kb, di cui è stata determinata la mappa di restrizione; in tale clone la sequenza responsabile per l'attività IgA-1-proteasica è contenuta in un frammento EcoRI mancante, ad un suo estremo, di un tratto pari a 3.5 Kb, che viene denominato pVD114; mentre la sequenza HindIII-derivata, deleta ad un suo estremo di una sequenza pari a 4 Kb, che viene denominata pVD115, non è in grado di indurre attività IgA-1-proteasica (Tab.I).

Sempre nell'ambito delle omologie dell'iga si è estesa l'indagine ai geni codificanti l'iga in Haemophilus influenzae, utilizzando i probes gonococcici 4.2 e 2.7 Kb. Essi, mentre in condizioni di alta stringenza non ibridizzavano, come era prevedibile anche dalla disparità del loro contenuto in G e C, in condizioni di bassa stringenza hanno presentato con entrambi i probes frammenti di restrizione omologhi delle dimensioni di 7 Kb (EcoRI), 11 Kb (ClaI), 8 Kb (PstI), possibili candidati genici per la codifica della IgA-1-proteasi e questo veniva confermato clonando il 7 Kb (EcoRI) di H.i. in pBR325/E.c.HB101(Fig. 17).

Tale plasmide contenente il frammento codificante la IgA-1-proteasi è stato denominato pVD116; di esso è stata determinata la mappa di restrizione, in cui un frammento privo di 2.2 Kb (ClaI) che detiene sequenze ancora in grado di codificare l'IgA-1-proteasi, è denominato pVD117, mentre un altro frammento (PstI) privo di 2.8 Kb che non detiene sequenze codificanti l'enzima, è stato denominato pVD118 (Tab. L).

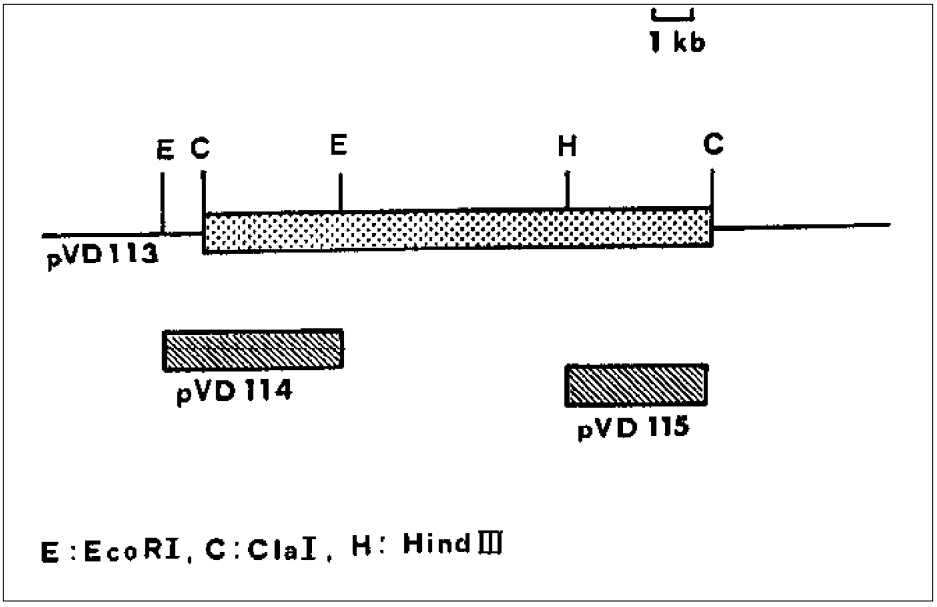


Figura 16. Frammento di restrizione ClaI contenente il gene iga di N.m. clonato in pBR325 responsabile dell'attività IgA-I-proteasica e due frammenti probes pVD114-pVD115 (vedi testo).

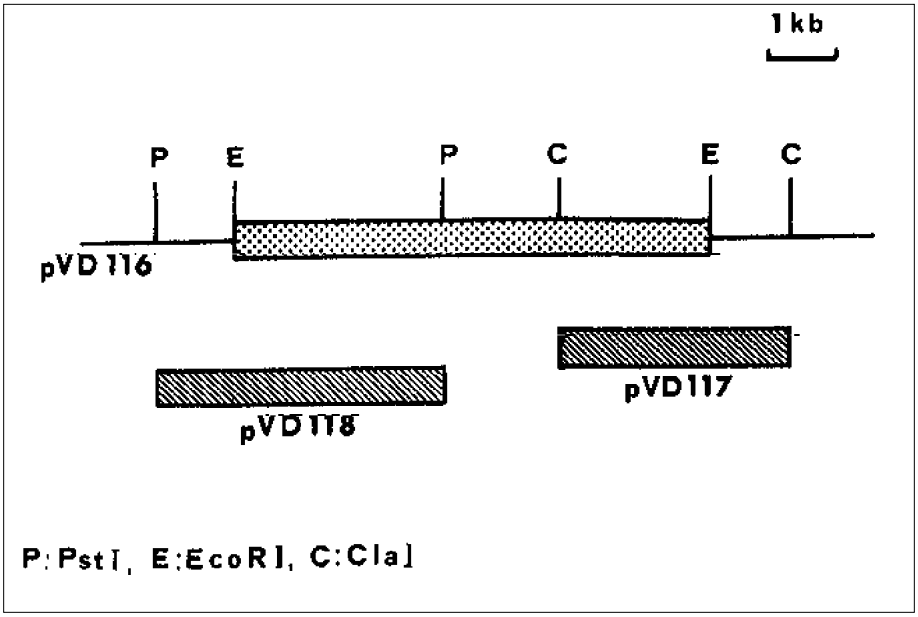


Figura 17. Frammento PstI-ClaI sul plasmide pVD116 codificante la IgA-I-proteasi con relativi probes: pVD117 (2.2 kb) e pVD118 (2.8 kb).

DNA ORIGINARIO	FRAMMENTO CLONATO	VETTORE PLASMIDICO	PLASMIDE RICOMBINANTE	PROBES OTTENUTI
H. influenzae Rd-/b+	da IgA-I- -prot. gene frammento 7 kb Eco RI	pBR325	pVD116	1) frammento 2,2 ClaI pVD117 2) frammento 2,8 PstI pVD118

Tabella L. Schema costruttivo dei probes per il rilevamento dei geni relativi all'IgA-I-proteasi in H. influenzae.

L'utilizzo di tali probes in condizioni di alta stringenza hanno evideziato la presenza di iga in tutti i ceppi di Haemophilus influenzae (a, b, d, f,), non invece in H.parainfluenzae, H.hominis e H.pleuropneumoniae e questi risultati indicherebbero che i geni strutturali delle IgA-1-proteasi di H.influenzae hanno pronunciata similarità strutturale, pur presentando differenze nei siti di clivaggio delle endonucleasi, mediante le quali si ottengono patterns specifici di restrizione per ciascun sierotipo di H.i. e all'interno di ciascun sierotipo vi è la possibilità di ottenere ulteriori pattern di restrizione distinti, correlabili con le specificità antigeniche delle IgA-1-proteasi, che sarebbero appunto determinate dall'intima struttura del gene, che ne determina anche la specificità dell'azione enzimatica.

Quindi le IgA-1-proteasi di H.i. sarebbero codificate da un set di geni altamente omologhi, ma polimorfi. Tali probes, per concludere, in condizioni di bassa stringenza non evidenziano patterns di extra-omologia nè per il DNA cromosomico del H.i., nè per il DNA cromosomico del genus Neisseria (naturalmente evidenziando la cross-reattività con il DNA, per iga, di N.g. e N.m.).

Questi rilievi evidenzianti la presenza di iga omologhi in due specie appartenenti a generi diversi e tra loro distanti e la loro assenza in specie appartenenti allo stesso genere pone il problema, non comune in microbiologia, dell'origine di questi geni e per il quale le risposte sono solo ipotetiche. Rimane comunque fermo che queste famiglie geniche associate alla virulenza non sarebbero confinanti da fattori tassonomici, ma da fattori ancillari sempre coinvolti nel determinare la virulenza.

Sistemi di Siero-Resistenza

Per quanto riguarda la Siero-Resistenza, che viene fatta rientrare nei sistemi di resistenza all'azione battericida del Sistema Complementare, sia esso mediato dalla via classica (CCP : Classical Complementary Pathway), sia attraverso l'attivazione della via alternativa (ACP: Alternative Complementary Pathway) è un indubbio marker di virulenza, anche se attualmente non è possibile trarre delle conclusioni nè sulle sue modalità di azione nè sul suo determinismo a livello genetico (13, 31).

Data la complessità dell'argomento, limiteremo la nostra indagine a Salmonella Typhi-murium (6, 7, 9, 10, 25, 39), in cui la resistenza a livello battericida del siero, complemento-mediato è stata attribuita alla composizione del LPS, in cui infatti le mutazioni fenotipiche da smoth(S) a rough(R) correlavano con una aumentata sensibilità al siero, mentre una sua diminuzione correlava con il grado di difetto della fase R : rapportabili entrambi con la parte del core che viene esposta e alla parte e al numero delle unità O ripetitive, per core del LPS.

Tali chemotipi S ed R influenzano anche le vie di attivazione del sistema complementare, per cui i ceppi in fase S sarebbero più sensibili all'azione battericida del Complemento, APC-mediata, rispetto ai ceppi R; mentre i ceppi in fase R sono più sensibili di quelli in fase S all'azione del Complemento via CCP, pur essendo entrambi in grado di attivare, (e quindi di subirne l'azione battericida), il Complemento mediante CCP.

Queste differenze sarebbero da rapportare al grado o alla maniera con cui o i componenti iniziali (tra cui C1q), o i componenti finali (tra cui il MAC stesso) si agganciano alla membrana batterica. Globalmente quindi la resistenza al siero sarebbe da rapportare al LPS, anche se si conoscono forme di resistenza al siero da esso indipendenti, per cui può essere distinta in LPS-dipendente e LPS-indipendente.

Dato il pleiomorfismo di tali forme di resistenza è logico che esso sia un riflesso del suo determinante genetico, in cui si possono riconoscere sia geni cromosomici che geni plasmidici; in Salmonella typhi-murium la Siero-Resistenza sar ebbe legata non ad un determinante cromosomico, ma ad un determinante plasmidico, a cui sarebbero attribuibili anche altri caratteri di virulenza. A tale plasmide infatti è stata attribuita, oltre alla Siero-Resistenza, la capacità di Adesività e di Invasività e globalmente di virulenza sul topo, esprimentesi fondamentalmente nelle tappe della colonizzazione delle Placche di Peyer, di invasione dei linfonodi mesenterici e della milza con successiva morte (mouse model).

Tali caratteristiche di virulenza sono emerse da studi sui ceppi di S.typhi-murium CR6600 e CR6260, alberganti e non alberganti il plasmide di virulenza pCF601 e sui

ceppi CR8500 e CR8100, alberganti e non alberganti il plasmide di virulenza pCF801. Studi sui ceppi P9144 e J41 di S.typhi-murium LT-2 alberganti il plasmide criptico di virulenza e il ceppo J42 non albergante tale plasmide hanno confinato sui geni cromosomici l'Adesività e l'Invasività e sui geni plasmidici la Siero-Resistenza, la Resistenza alla Fagocitosi, al Killing-Macrofagico e la Virulenza sul topo, limitandola alle fasi di invasione dei linfonodi mesenterici e della milza.

Tali ceppi avevano la caratteristica di essere in fase R e di resistere al siero in toto o associato ad alte concentrazioni anticorpali. Privando tali ceppi virulenti del plasmide (~100Kb) da Siero-Resistenti divengono Siero-Sensibili e perdono anche la virulenza sul topo : quindi tale plasmide criptico potrebbe codificare il gene o i geni medianti la Siero-Resistenza; ed in effetti tali sequenze sono state isolate da un plasmide ricombinante (pADE001), ottenuto per clivaggio del plasmide di virulenza con Sau3A, impaccandolo in pcosZEMBL ed esprimendolo in E.c.K12 (E381) : tale clone (pADE001) risultava Siero-Resistente ed esprimeva a livello dell'outer-membrana una nuova proteina di 11 Kd. Dal clone, per successive restrizioni del frammento clonato si è isolata una sequenza di minima ancora in grado di conferire la Siero-Resistenza e di codificare la proteina di 11 Kd; tale sequenza è contenuta nel clone pADE016 , in essa non sarebbe contenuto il promotore e la sequenza genica sarebbe localizzata verso l'estremo PstI del frammento di 2.1 Kb (ClaI-PstI) (Fig. 18) (Tab. M).

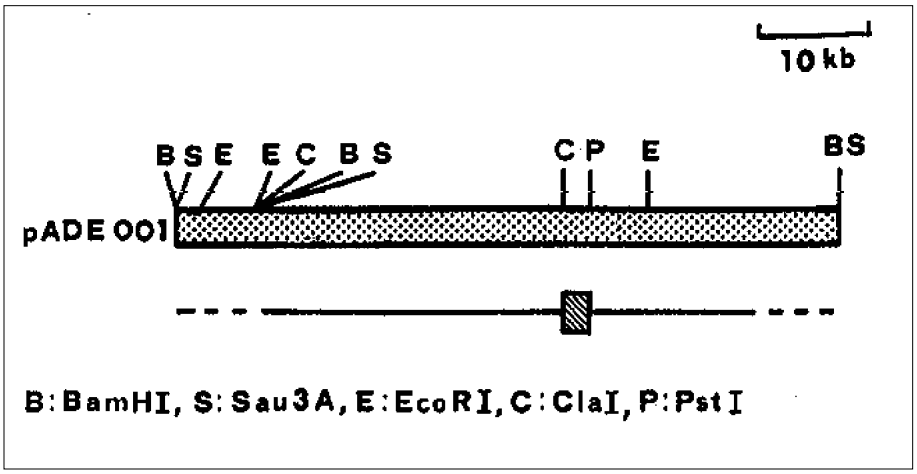


Figura 18. Frammento di restrizione BamHI-Sau3A clonato su pADE001 contenente la sequenza codificante la proteina di 11 kb.

Questo plasmide può essere proposto quale marker, in fase di studio, della Siero-Resistenza : esso infatti è in grado di ripristinarla in ceppi R e di S.typhi-murium e di E.coli K12, mediante la sintesi della proteina di 11 Kd dell'outer-membrana. Questa proteina conferirebbe la Resistenza al Siero sia ACP, sia CCP e questo non concorda con

DNA ORIGINARIO	FRAMMENTO CLONATO	VETTORE PLASMIDICO	PLASMIDE RICOMBINANTE	PROBES OTTENUTI	kb
S. typhi murium P9144 o J41	frammento Sau3A	pCosZEMBL	pAEDO16	frammento ClaI-PstI	2,1

Tabella M. Schema costruttivo dei probes per il rilevamento diagnostico dei geni relativi alla proteina 11 kd di S. typhi murium.

la Siero-Resistenza CCP, sempre plasmide-determinata, evidenziata su ceppi in fase S 7003 (con plasmide pCF601) e 7007 (privi di plasmide) di Salmonella typhi-murium.

Questa non uniformità di risultati si riflette (o ne è un riflesso) sulla funzione svolta dal LPS nella Siero-Resistenza : i ceppi P9144, J41, J42 erano in fase R, anche se in essi un qualche antigene O veniva sintetizzato, per cui non sarebbe da escludere una qualche funzione biosintetizzante del plasmide criptico per LPS, mentre invece i ceppi 7003 e 7001 erano in fase S e tra essi non vi erano differenze quantitative o qualitative riguardanti LPS.

A questo punto critico riguardo il ruolo del plasmide della Siero-Resistenza sulla biosintesi del LPS e quindi sulla Siero-Resistenza LPS-dipendente ed LPS-indipendente, si può aggiungere un ulteriore punto di incertezza, in quanto è stato possibile negare a tale plasmide la capacità inducente della Siero-Resistenza. Infatti studi condotti su ceppi in fase S LT2Z (pStLT100), SL1344 (pStLT100), SR-11 (pStSR100) avrebbero dimostrato nessuna differenza nei confronti della Siero-Resistenza tra i ceppi con plasmide e ceppi senza plasmide e tale Siero-Resistenza non era trasferibile in E.c. K12, nonostante l'introduzione di plasmidi portanti sequenze che erano in grado di conferire virulenza, per il topo, in ceppi batterici privi di plasmide; per cui per il plasmide viene ipotizzato un ruolo interferente sulla fagocitosi e sul killing-macrofagico.

Da questi dati contrastanti non è possibile trarre conclusioni sulla validità di pADE016, quale probe per l'individuazione della Siero-Resistenza, che a mio parere merita di essere considerato, in quanto non sarebbe da escludere che la Siero-Resistenza possa dipendere in alcuni ceppi di Salmonella typhi-murium dal plasmide, mentre in altri ceppi non dipenderebbe dal plasmide.

Bibliografia

1] Artur M., Johnson C.E., Rubin R.H., Arbeit R.D., Campanelli C., Kim C., Steinbach S., Agarwal M., Wilkinson R., and Goldstein R. 1989. Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic Escherichia coli. Infect.Immun. 57:303-313.

2] Arthur M., Campanelli C., Arbeit R.D., Kim C., Steinbach S., Johnson C.E., Rubin R.H. and Goldstein R. 1989. Structure and copy number of gene clusters related to the pap P-adhesin operon of uropathogenic Escherichia coli. Infect.Immun. 57:314-321.

3] Boileau C.R., d'Hauteville H.M., and Sansonetti P.J. 1984. DNA hybridization technique to detect Shigella species and enteroinvasive Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 20:959- 961.

4] Bricker J., Mulks M., Moxon E.R., Plaut A.G. and Wright A. 1985. Physical and genetic analysis of DNA regions encoding the immunoglobulin A proteases of different specificities produced by Haemophilus influenzae. Infect.Immun. 47:370-374.

5] Buysse J.M., Stober C.K., Oaks E.V., Venkatesan M. and Kopecko D.J. 1987. Molecular cloning of invasion plasmid antigen (ipa) genes from Shigella flexneri: analysis of ipa gene products and genetic mapping. J. Bacteriol. 169: 2561- 2569.

6] Gulig P.A. and Curtiss III R. 1987. Plasmid-associated virulence of Salmonella typhimurium. Infect.Immun. 55: 2891- 2901.

7] Gulig P.A. and Curtiss III R. 1988. Cloning and trasposon insertion mutagenesis of virulence genes of the 100-kilobase plasmid of Salmonella typhimurium. Infect.Immun. 56: 3262- 3271.

8] Haas R. and Mayer T.R. 1986. The repertoire of silent pilus genes in Neisseria gonorrhoeae: evidence for gene conversion Cell. 44: 107-115.

9] Hackett J., Kotlarski I., Mathan V., Francki K., and Rowley D. 1986. The colonization of Peyer's patches by a strain of Salmonella typhimurium cured of the cryptic plasmid. J.Infect.Dis. 153: 1119-1125.

10] Hackett J., Wyk P., Reeves P., and Mathan V. 1987. Mediation of serum resistance

in Salmonella typhimurium by an 11- kilodalton polypeptide encoded by the cryptic plasid. J.Infect.Dis. 155: 540-549.

11] Hale T.L., Sansonetti P.J., Schad P.A., Austin S., and Formal S.B. 1983. Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in Shigella flexneri, Shigella sonnei, and Escherichia coli. Infect.Immun. 40: 340-350.

12] Hale T.L., Oaks E.V., and Formal S.B. 1985. Identification and antigenic characterization of virulence-associated, plasmid-coded proteins of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli. Infect.Immun. 50: 620-629.

13] Joiner K.A. and Frank M.M. Molecular Mechanisms in the antibacterial action of complement. In: Prog.Immun.VI - 1986 Acad.Press. Orlando - Florida. Cinader B. and Miller R.G.(Ed) 282-290.

14] Koomey J.M., and Falkow S. 1984. Nucleotide sequence homology between the immunoglobulin A1 protease genes of Neisseria meningitidis, and Haemophilus influenzae. Infect. Immun. 43: 101-107.

15] Korch C., Hagblom P., Ohman H., Goransson M., and Normark S. 1985. Cryptic plasmid of Neisseria gonorrhoeae: complete nucleotide sequence and genetic organization. J.Bacteriol. 163: 430-438.

16] Lund B., Lindberg F., Marklund B.I., and Normark S. 1987. The PapG protein is the α-D-galactopyrnosyl-(1-4)-β-D-galac- topyranose-binding adhesin of uropathogenic Escherichia coli Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 84: 5898-5902.

17] Maurelli A.T., Baudry B., d'Hauteville H., Hale T.L., and Sansonetti P.J. 1985. Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by Shigella flexneri. Infect.Immun. 49: 164-171.

18] Mills J.A., Buysse J.M., and Oaks E.V. 1988. Shigella flexneri invasion plasmid antigens B and C: epitope location and characterization with monoclonal antibodies. Infect.Immun. 56: 2933-2941.

19] Mosely S.L., Echeverria P., Seriwatana J., Tirapat C., Chaicumpa W., Sakuldapeira T., and Falkow S. 1982. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. J.Infect. Dis. 145: 863-869.

20] Newland J.W., and Neill R.J. 1988. DNA probes for Shiga-like toxin I and II and for Toxin-converting Bacteriophages. J.Clin.Microbiol. 26: 1292-1297.

21] Nicoletti M., Superti F., Conti C., Calconi A., and Zagaglia C. 1988. Virulence Factors of lactose-negative Escherichia coli strains isolated from children with diarrhea in Somalia J.Clin.Microbiol. 26: 524-529.

22] o'Brien A.D., Newland J.W., Miller S.F., Holmes R.K., Smith H.W., and Formal S.B. 1984. Shiga-like toxin-converting phages from Escherichia coli strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science. 226: 694-696.

23] Perine P.L., Totten P.A., Holmes K.K., Sug E.H., Ratnam A.V., Widy-Wersky R., Nsanze H., Habte-Gabr E., and Westbrook W.G. 1985. Evaluation of a DNA-Hybridization Method for detection of african and asian strains of Neisseria gonorrhoeae in men with urethritis. J.infect.Dis. 152: 59-63.

24] Pohlner J., Halter R., Beyreuthert K., and Meyer T.F. 1987. Gene structure and extracellular secretion of Neisseria gonorrhoeae IgA protease. Nature. 325: 458-462.

25] Poppe C., Curtiss III R., Gulig P.A., and Gyles C.L. 1989. Hybridization studies with a DNA probe derived from the virulence region of the 60 Mdal plasmid of Salmonella tuphimurium. Can.J.Vet.Res. 53: 378-384.

26] Poulsen K., Hjorth J.p., and Kilian M. 1988. Limited diversity of the immunoglobulin A1 protease gene (iga) among Haemophilus influenzae serotype b strains. Infect.Immun. 56: 987-992.

27] Sakai T., Sasakawa C., Makino S., and Yoshikawa M. 1986. DNA sequence and product analysis of the virF locus responsible for Congo red binding and cell invasion in Shigella flexneri 2a. Infect.Immun. 54: 395-402.

28] Sansonetti P.J., Kopecko D.J., and Formal S.B. 1981. Shigella sonnei plasmid: evidence that a large plasmid is necessary for virulence. Infect.Immun. 34: 75-83.

29] Sansonetti P.J., Hale T.L., Dammin G.J., Kapfer C., Collins Jr H.H., and Formal S.B. 1983. Alteration in the pathogenicity of Escherichia coli K-12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from Shigella flexneri. Infect.Immun. 39: 1392-1402.

30] Santini G.F., Borean M., Jus A., Crovatto M., Martelli P., Modolo M.L., Tommasini A., Ceccherini-Nelli R., Pistello M., Mandler F. 1989. DNA-probes in microbiologia. In: Nuove applicazioni in microbiologia clinica. Ed. Microbiolologia Medica. 47-121.

31] Santini G.F., Crovatto M., Chiaradia V. 1986. Markers di virulenza in E.coli. Soluzioni. 30: 7-12.

32] Sasakawa C., Kamata K., Sakai T., Makino S., Yamada M., Okada N., and Yoshikawa M. 1988. Virulence-associated genetic regions comprising 31 Kilobases of the 230-kilobase plasmid in Shigella flexneri 2a. J.Bacteriol. 170: 2480-2484.

33] Silva R.M., Saadi S., and Maas W.K. 1988. A basic replicon of virulence-associated plasmid of Shigella spp. and Enteroinvasive Escherichia coli Is homologous with a basic replicon in plasmid of IncF groups. Infect.Immun. 56: 836- 842.

34] Sommerfelt H., Henning Kalland K., Raj P., Moseley S.L., Bhan M.K., and Bjorvatn B. 1988. Cloned polynucleotide and synthetic oligonucleotide probes used in colony hybridization are equally efficient in the identification of Enterotoxigenic Escherichia coli.J.Clin.Microbiol. 26: 2275- 2278.

35] Sommerfelt H., Grewal H.M.S., and Bhan M.K. 1990. Simplified and accurate nonradioactive polynucleotide gene probe assay for identification of Enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin.Microbiol. 28: 49-54.

36] Stern A., Brown M., Nickel P., and Meyer T.F. 1986. Opacity genes in Neisseria gonorrhoeae: control of phase and antigenic variation. Cell. 47: 61-71.

37] Taylor D.N., Echeverria P., Pitarangsi C., Seriwatana J., Sethabutr O., Bodhidatta L., Brown C., Herrmann J.E., and Blacklow N.R. 1988. Application of DNA hybridization techniques in the assessment of diarrheal disease among refugees in Thailand. Am.J.Epidemiol. 127: 179-187.

38] Totten P.A., Holmes K.K., Handsfield H.H., Knapp J.S., Perine P.L., and Falkow S. 1983. DNA hybridization technique for the detection of Neisseria gonorrhoeae in men with urethritis. J.Infect.Dis. 148: 462-471.

39] Vandenbosch J.L., Rabert D.K., and Jones G.W. 1987. Plasmid- associated resistance of Salmonella typhimurium to complement activated by the classical pathway. Infect.Immun. 55: 2645-2652.

40] Venkatesan M., Buysse J.M., Vandendries E., and Kopecko D.J. 1988. Development and testing of invasion-associated DNA probes for detection of shigella spp. and Enteroinvasive Escherichia coli. J.Clin.Microbiol. 26: 261-266.

41] Venkatesan M.M., Buysse J.M., and Kopecko D.J. 1989. Use of Shigella flexneri ipaC and ipaH gene sequences for the general identification of Shigella spp. and Enteroinvasive Escherichia coli. J.Clin.Microbiol. 27: 2687-2691.

42] Watanabe H., and Nakamura A. 1986. Identification of Shigella sonnei Form I plasmid genes necessary for cell invasion and their conservation among Shigella species and Enteroinvasive Escherichia coli. Infect.Immun. 53: 352-358.

43] Wood P.K., Morris J.G.,jr., Small P.L.C., Sethabutr O., Toledo M.R.F., Trabulsi L., and Kaper J.B. 1986. Comparison of DNA probes and the Sereny-Test for identification of invasive Shigella and Escherichia coli strains. J.Clin.Microbiol. 24: 498-500.

44] Yamamoto T., and Yokota T. 1983. Sequence of heat-labile Enterotoxin of Escherichia coli pathogenic for humans. J.Bacteriol. 155: 728-733.

45] Yamamoto T., Tamura T., and Yokota T. 1984. Primary structure of heat-labile Enterotoxin produced by Escherichia coli pathogenic for humans. J.Biol.Chem. 259: 5037-5044.

Indice

Istruzioni per gli autori..... pag. 2
Editoriale..... » 3
Generalità..... » 5
Adesività ..... » 6
Tossigenicità ..... » 14
Invasività..... » 23
Sistemi di resistenza alle Ig ..... » 33
Sistemi di Siero-Resistenza..... » 39
Bibliografia ..... » 42
Indice ..... » 46
Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio..... » 47
Concorso Internazionale di Pittura "La Scoperta dell'America"..... » 49
Concorso per una borsa di studio "I retrovirus" ..... » 50
Prossima attività: Kaleidoscope..... » 51

Volumi pubblicati nella Collana Caleidoscopio

Medical Systems S.p.A.

TECNOLOGIA

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La ß-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico ed fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. **Cingolani M.:** ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**
31. **Kubasik N.P.:** ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**
32. **Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.:** ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**
33. **Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.:*****Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo '88.**

34. **Guastella G., Cefalù E., Carmina M.:** ***La fecondazione in vitro.*** **Maggio '88.**
35. **Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.:** ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno ’88.**
36. **Baccini C.:** ***Le droghe d’abuso (2).*** **Luglio ’88.**
37. **Piantino P., Pecchio F.:** ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre ’88.**
38. **Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.:** ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio ’89.**
39. **Sommariva D., Branchi A.:** ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. **Butturini U., Butturini A.:** ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. **Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.:** ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. **Palleschi G.:** ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. **Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.:** ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. **Fanetti G.:** ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. **Contu L., Arras M..:** ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. **Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.:** ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. **Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E. :** ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
48. **Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P. :** ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
49. **Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.:** ***L'immunologia del diabete mellito*****. Marzo '90.**
50. **Cappi F.:** ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio*****. Aprile '90.**
51. **Tortoli E., Simonetti M.T.:** ***I micobatteri*****. Maggio '90.**
52. **Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.:** ***Anticorpi antinucleo*****. Giugno '90.**
53. **Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.:** ***Le macchine in terapia intensiva.*** **Luglio '90.**
54. **Goracci E., Goracci G.:** ***Gli allergo-acari.*** **Agosto '90.**
55. **Rizzetto M.:** ***L'epatite non A non B (tipo C).*** **Settembre '90.**
56. **Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.:** ***Infezione da HIV-1:patogenesi ed allestimento di modelli animali*****. Ottobre '90.**
57. **La Vecchia C.** ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (I).*** **Gennaio '91.**
58. **La Vecchia C.** ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (II).*** **Febbrauio '91.**
59. **Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.:** ***Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti.*** **Marzo '91.**
60. **Bedarida G., Lizioli A.:** ***La neopterina nella pratica clinica.*** **Aprile '91.**
61. **Romano L.:** ***Valutazione dei kit immunochimici.*** **Maggio '91.**
62. **Dondero F. e Lenzi A.:** ***L'infertilità immunologica*****. Giugno '91.**
63. **Bologna M. Biordi L. Martinotti S.:** ***Gli Oncogèni*****. Luglio '91.**
64. **Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.:** ***Infezione-malattia da HIV in Africa*****. Agosto '91.**
65. **Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.** ***L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni.*** **Settembre '91.**
66. **Gentilomi G.A.:** ***Sonde genetiche in microbiologia*****. Ottobre '91.**
67. **Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Basaglia G., Tarabini-Castellani G. e Pascoli L.:** ***Le sonde di DNA e la virulenza batterica.*** **Gennaio '92.**

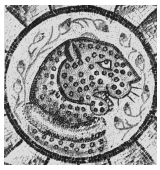
Ad ogni passo nasce un pensiero!!!!!

Abbiamo una esperienza ultradecennale.
Abbiamo pubblicato riviste in italiano, inglese, francese, spagnolo, albanese...
Abbiamo distribuito le nostre riviste in tutto il mondo: dalle Americhe all'Australia, dall'Europa alla Cina, dall'Africa alla Confederazione degli Stati Indipendenti.

MEDICAL SYSTEMS S.P.A.

....IL FUTURO HA IL CUORE ANTICO

Editor in Chief: Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel. e Fax 079 270464; E-mail: rassu@mbox.vol.it
Amministrazione: Medical Systems S.p.A.
Via Rio Torbido, 40 - 16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 8 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 803498- 809070.



EDITORE

Abbiamo deciso di mettere a Vostra disposizione la nostra esperienza, la nostra passione, le nostre tecnologie
per la pubblicazione di Atti di Congressi,
per la ideazione e realizzazione di riviste scientifiche, per la pubblicazione di libri e monografie, per la raccolta e stampa di articoli scientifici.....

Consultateci!!!!!!

Caleidoscopio

Rivista mensile di Medicina

anno 10, numero 67

user data-star A service of Radio-Suisse

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel. Fax e Modem (079) 270464

Responsabile Commerciale
Alessandra Pater

European Association of Science Editors EASE

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Maria Speranza Giola

Servizio Abbonamenti
Fina Grandeppieno
Giuseppe Gambetta

Editore
Medical Systems S.p.A.
TECNOLOGIA con Amore

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 (7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 809737- 802257.
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio -Ed. Spagnola-
Caleidoscopio letterario, Pandora, Tribuna Biologica e Medica,
The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

Stampa
ATA-Azienda Tipografi Associati
Via G. Torti, 32 C Rosso
16143 Genova - Tel. 010 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Gennaio 1992
Sped. in Abb. Post. gr. III/70%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana

USPI

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR 627/78)