

YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS

Ricerca negli ovi-caprini come potenziali diffusori nell'ambiente

VALUTAZIONE DEI DETERMINANTI DI PATOGENICITÀ DEI CEPPI PRESENTI NEL TERRITORIO DELLA SARDEGNA E LORO EVENTUALE RUOLO PATOGENETICO NELL'UOMO

di G. Orrù¹, V. Braina², G. Illomei³, C. Murru², G. Orrù³, M. Liciardi².

¹ Laboratorio di Biotecnologie orali, Dipartimento di Chirurgia e Scienze odontostomatologiche, Università - Cagliari

² Istituto zooprofilattico sperimentale della Sardegna, Dipartimento di Cagliari

³ Gruppo Mediterraneo Ricerca chirurgica

Al genere *Yersinia* appartengono diverse specie batteriche ampiamente diffuse in natura, alcune delle quali come la stessa *Yersinia pseudotuberculosis* sono ritenute responsabili di patologie animali (specialmente nei roditori) e umane [1]. Nell'uomo, infatti, tale microrganismo è coinvolto in casi di appendicite e linfadenite mesenterica, diarrea e setticemia [2, 3]; in diverse specie animali può essere responsabile di affezioni enteriche ed essere isolato in casi di placentite con aborto e mastite nelle pecore [4-6]. Anche gli animali selvatici e in particolare gli uccelli sono considerati riserve importanti del germe. La contaminazione del suolo e delle acque contribuisce alla trasmissione all'uomo e ciò suggerisce interazioni tra ospiti e ambiente.

L'isolamento di *Yersinia pseudotuberculosis* nel corso di indagini batteriologiche, condotte a scopo diagnostico nei laboratori dell'Istituto zooprofilattico sperimentale della Sardegna, su latte e feti ovis e caprini, ha suggerito di verificare il ruolo di queste specie animali quali diffusori di *Y. pseudotuberculosis* nell'ambiente e quindi all'uomo. A questo proposito si è inteso valutare la presenza del microrganismo anche in soggetti umani interessati da alcune patologie enteriche.

Materiali e metodi

I campioni clinici sono stati esaminati mediante esame colturale tradizionale, utilizzando terreni colturali specifici per il genere *Yersinia* e mediante tecniche di biologia molecolare (tabella 1). L'esame molecolare in PCR *real time*, effettuato su parte di questi campioni, ha previsto dapprima l'analisi delle sequenze del DNA

di *Y. pseudotuberculosis* depositate in banca dati per scegliere le porzioni geniche specifiche del genoma da utilizzare come target. Si è successivamente proceduto al disegno delle sonde molecolari (*primer*) necessarie per l'amplificazione della regione bersaglio e quindi alla ricerca del target nei campioni clinici direttamente da brodo di arricchimento. I *primer* di PCR sono stati disegnati nel gene *yopT* codificante per un *chaperone* [7] lungo un frammento di 131 bp (*GenBank accession n. BX936399*). La PCR *real time* è stata condotta mediante *LightCycler* (Roche Mannheim Germany) utilizzando il kit *LightCycler DNA Master Hybridization Probes* con l'aggiunta del SYBR *Green* nella mix di reazione. Questa

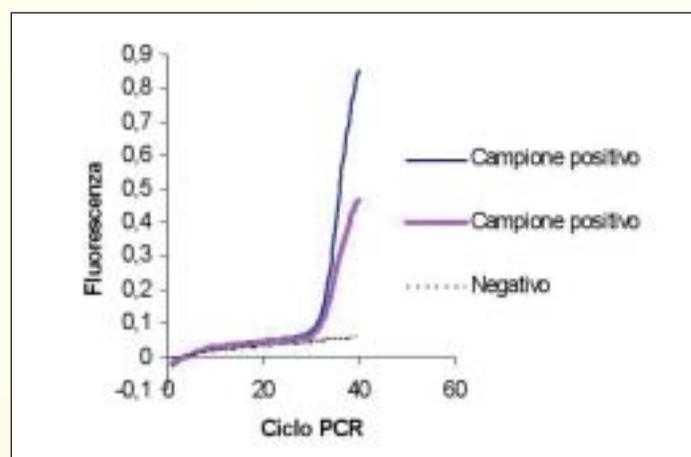


Grafico 1. Esempio di curve di fluorescenza ottenute con PCR *real time* e SYBR *Green* I in 3 campioni previamente testati con esame colturale per *Yersinia* spp.

Tabella 1. Campioni clinici esaminati per *Yersinia spp.*

| ESAME COLTURALE | ESAME MOLECOLARE |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Campioni clinici animali | |
| 25 campioni latte ovino | 23 campioni latte ovino |
| 61 linfonodi mesenterici ovini | 61 linfonodi mesenterici ovini |
| 10 linfonodi sopramammari ovini | 3 linfonodi sopramammari ovini |
| 6 campioni milza ovina | 6 campioni milza ovina |
| 6 uteri ovini | 6 uteri ovini |
| 158 feti ovini | 8 feti ovini |
| 6 feci ovine | 6 feci ovine |
| 56 feti caprini | - |
| Campioni clinici umani | |
| 32 appendici cecali | 32 appendici cecali |

Tabella 2. Comparazione dei risultati ottenuti con l'esame colturale e l'esame molecolare.

| Tipo Campione | N° campioni | Esame colturale Positivi/totale (%) | Esame molecolare Positivi/totale (%) |
|------------------------------|-------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Linfonodi mesenterici ovini | 61 | 0/61 | 16/61 (26) |
| Linfonodi sopramammari ovini | 10 | 0/10 | 0/3 |
| Milza ovina | 6 | 0/6 | 0/6 |
| Utero ovino | 6 | 0/6 | 1/6 (17) |
| Latte ovino | 25 | 3/25 (12) | 3/23 (13) |
| Feci ovine | 6 | 0/6 | 0/6 |
| Feti ovini | 158 | 4/158 (2,5) | 4/8 (50) |
| Feti caprini | 56 | 0/56 | - |
| Appendici umane | 32 | 0/32 | 0/32 |

conteneva una concentrazione finale di Mg pari a 3 mM, 0,5 µM di primer, 2 µl di SYBR Green I 10X (Sigma) e 2 µl di pellet batterico in un volume finale di 20 µl. I cicli termici di PCR prevedevano un riscaldamento a 95 °C per 3 minuti e 40 cicli di PCR a 95 °C per 0 sec, 47° C per 10 sec, 72 °C per 6 sec e infine un ciclo di Melting, da 45 a 95 °C alla velocità di 0,1 °C/sec. Le letture sono state eseguite nel canale F1.

Risultati e Discussione

Il metodo ha mostrato una sensibilità pari a 100 CFU/PCR, e una specificità, in esperimenti di ricostruzione con *Enterobacteriaceae* e con cocchi Gram positivi, pari al 100%. Il grafico 1 evidenzia una curva di fluorescenza ottenuta con il sistema *LightCycler* (Roche).

L'esame molecolare ha confermato le positività dell'esame colturale e ha evidenziato la positività di ulteriori campioni, dimostrando una maggiore sensibilità d'indagine (tabella 2).

Conclusioni

Poiché il profilo patogenico della *Yersinia pseudotuberculosis* varia a seconda della presenza di alcuni determinanti di patogenicità veicolati da plasmidi, la fase conclusiva del lavoro prevede la tipizzazione dei ceppi isolati e lo studio della loro distribuzione in Sardegna secondo "isole di patogenicità". Infatti pur non avendo riscontrato tra i campioni di appendici umane da noi esaminati, alcun positivo, sarà interessante poter stabilire se i ceppi isolati negli

animali in Sardegna possano essere potenzialmente patogeni per l'uomo.

Bibliografia

1. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
2. Leino R, Makela AR, Tiilikainen A, Toivanen A. *Yersinia arthritis* in children. *Scand J Rheumatol* 1980. 9:245-249. Krober, 1983.
3. <http://www.emedicine.com/med/topic1947.htm>
4. Otter A. Ovine abortion caused by *Yersinia pseudotuberculosis*. *Vet Rec.* 1996. Feb 10; 138(6): 143-144.
5. Slee KJ, Button C. Enteritis in sheeps, goats and pigs due to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Aust Vet J* 1990 Sep; 77(9): 320-322.
6. Farina, Scamozza: Trattato delle Malattie Infettive degli animali. UTET. Torino, 1995.
7. Arnold T, Hensel A, Hagen R, Aleksic S, Neubauer H, Scholz HC. A highly specific one-step PCR - assay for the rapid discrimination of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* from pathogenic *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Syst Appl Microbiol.* 2001 Jul;24(2):285-9.