

# “PRESENZA DI COLIFAGI-STX2 IN CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA CAMPIONI DI PELLE BOVINA E FILTRI DI LATTE”

## “*DETECTION OF STX2 COLIPHAGES IN STRAIN OF ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM BOVINE FLEECE AND MILK FILTERS*”

Delle Donne G.<sup>1</sup>, Mancusi R., Trevisani M.  
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale  
Alma Mater Studiorum Università di Bologna  
<sup>1</sup>e-mail: giuseppe.delledonne2@unibo.it

### SUMMARY

Lambda( )-phage vectors of gene codifying for synthesis of Shiga-toxins are suspected to be involved in the virulence evolution of Vero-Toxin producing *Escherichia coli*(VTEC). Herds of domestic or wild ruminants are reservoirs of these bacteria, but excretion with faeces is more frequent in groups of heifers and feeder calves. Studies have shown that slurries produced by infected herds are often positive for VTEC and that *Stx2* carrying lambda coliphages can be isolated. These viruses can induce lysogenic cycles only in some strain of *Escherichia coli* and the *Stx* gene is then integrated in the bacterial chromosome. When these bacteria also possess other virulence traits, like those responsible for the intimate attachment to the enteric mucosal cells (*eae* or *saa*) the recombinant strains might become pathogen for humans. Our research was aimed at detecting the coliphages from ten *Stx2* positive strains isolated in our previous studies. We have included strains, possessing or not the '*eae*' genes. In addition we have used other isolates originating from slaughterhouses, with the aim of evaluating their susceptibility to the isolated -phages. Following induction of a lytic cycle with mitomycin C, the strains were screened by hybridization of plaque blots with *Stx2* probes. The purified extracts of eight of the ten strains produced plaque/halos of lysis in cultures of susceptible strains, thus showing these strains were infected by inducible phages, but only one proved to be *Stx2* carrier. Attempt to obtain new lysogens using the purified *Stx2* phage with other strains '*eae*' positive and STx negative isolated from slaughterhouses were unsuccessful. *Stx2* lysogens were obtained only using the reference strains DM1187.

### KEYWORDS

*Escherichia coli* Shiga-toxins producing (STEC), lambda( )-phage, Shiga-toxin type 2 (*stx2*).

### INTRODUZIONE

La presenza di *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossine è un problema emergente di sicurezza alimentare. Dati nazionali mostrano che l'infezione è presente in modo diffuso negli allevamenti di bovini da carne e da latte [1,2,3,4,5,6,7] e che i liquami degli allevamenti sono frequentemente positivi [8,9,10,11, 12]. Tra i fattori che hanno influito sull'evoluzione della virulenza si ritiene abbiano un ruolo rile-

vante i virus batteriofagi di tipo lambda in grado di veicolare geni che codificano la produzione di shigatossina 2 (*Stx2*). Questi virus possono infettare alcuni ceppi di *Escherichia coli* inducendo un ciclo lisogeno ed integrando il gene *Stx2* nel genoma del batterio infettato. Se il ceppo ricombinante già possiede altri fattori di virulenza, tra cui alcuni geni responsabili dell'adesione batterica ai villi intestinali (geni *eae* o *saa*) questo accresce la sua virulenza ed il ceppo può divenire patogeno per l'uomo.

L'impiego di taluni antibiotici, come pure l'esposizione a radiazioni UV è in grado d'indurre un ciclo litico con il rilascio di virus batteriofagi infettanti da parte di ceppi lisogeni. In campo il fenomeno della ricombinazione genetica tra i diversi ceppi di *Escherichia coli* merita perciò attenzione in relazione alla necessità di trattare opportunamente i liquami, in modo da inattivare i batteriofagi, oltre che i ceppi virulenti di *Escherichia coli*. Scopo della ricerca è dimostrare la presenza di fagi veicolanti il *stx2-gene* in ceppi di *Escherichia coli* isolati da alimenti. Si vuole verificare inoltre se fago è in grado d'integrare questo fattore di virulenza in altri ceppi di *Escherichia coli* recettivi modificandone la patogenicità..

## MATERIALI E METODI

La presenza di colifagi è stata ricercata in 10 isolati *E. coli Stx2*-positivi provenienti da pelli di origine bovina e filtri di impianti di mungitura. A tal fine colture di arricchimento in Lauria Bertani broth in fase di crescita esponenziale sono state addizionate con Mitomicina C, incubate per 24 ore a 37°C in modo da indurre un ciclo litico. La purificazione del fago è stata fatta mediante passaggio su filtri con porosità di 0,22 µm, seguendo la procedura descritta da Muniesa [13,14]. La presenza di fagi è stata valutata mediante spot-test. Come substrato per valutare la lisi o la lisogenia sono stati impiegati due ceppi di riferimento (*Escherichia coli* DM1187 e WG5) e 5 ceppi *Stx2* negativi, ma *eae/saa* positivi isolati da campioni di pelle bovina.

Per confermare la presenza di *Stx2* nelle placche di lisi queste sono state trasferite mediante blotting su membrane di nylon e il DNA, sottoposto ad estrazione alcalina, è stato saggiato mediante ibridazione con sonde *Stx2* marcate con digossigenina. Per produrre le sonde è stata impiegata la procedura Dig Hig Prime Synthesis Kit II (Roche®) ed i primer *stx2*-LP43 (bp 57 to 78 of EDL933; 5'-ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG-3'), and *stx2*-LP44 (bp 622 to 643 of EDL933; 5'-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3'). Le placche marcate sono state prelevate e sospese in 0,2 ml di diluente SM. Nel prelievo sono state incluse anche le colonie batteriche cresciute alla periferia o all'interno delle placche. Questa sospensione è stata utilizzata in parte per estrarre il DNA fagico da analizzare mediante PCR [15] e in parte per prove di lisogenia con le colture *eae/saa* positive. Per purificare il DNA una parte della soluzione SM è stata trattata con cloroformio e sottoposta a centrifugazione per inattivare i batteri e recuperare il surnatante

contenente la sospensione di fagi. Per le prove di lisogenia sono state utilizzate due procedure. La prima era volta a verificare se le colonie cresciute all'interno di placche di lisi erano lisogene. A tal fine parte della soluzione SM è stata seminata su piastra ed incubata a 37°C per 24 ore, quindi le colonie sono state saggiate mediante ibridazione. La seconda procedura era volta a valutare la capacità dei fagi provenienti dalle colture indotte con Mitomicina C di formare lisogeni se messi a contatto con altre colture suscettibili. A tal fine è stato utilizzato l'estratto fagico proveniente dal filtrato delle colture batteriche indotte e utilizzate diverse colture batteriche VT2 negative. Cinque erano *eae/saa* positive e di queste tre provenivano da ceppi isolati in campo (FV4028, FV4033, FV4996) due da ceppi di riferimento *Stx2* negativi (ED73 ed EDL 933). Sono stati impiegati anche altri due stipiti (*E. coli* DM1187 e *E.coli* WG5) suscettibili ad infezioni fagiche indicati nella procedura ISO10705-2 [16]. Le colture sono state messe a contatto con l'estratto fagico additivato con CaCl<sub>2</sub> ed incubate per 30 minuti a 37°C, seminate in superficie su LB agar ed incubate a 37°C per 24 ore. La patina batterica ottenuta è stata raccolta in 1 ml di tampone SM, sono state fatte diluizioni in base 10 e seminate in superficie su LB agar per avere piastre contenenti circa 100-150 UFC. Il riconoscimento delle colonie presunte lisogeni è valutata mediante la tecnica dell'ibridazione con sonde *stx2*. Le colonie presunte lisogene, per positività all'ibridazione, sono testate singolarmente mediante PCR [15].

## RISULTATI

I risultati delle diverse prove sono riportati in tabella 1. Dei 10 ceppi *Stx2* positivi analizzati 8 hanno mostrato formazione di placche di lisi in almeno uno dei substrati culturali utilizzati. Solo un campione ha invece mostrato la formazione di placche positive al test d'ibridazione con le sonde *Stx2* (fago isolato dallo stipite P65). Le placche di lisi indotte da questo fago, peraltro, appaiono poco marcate ed evidenti. Solo a contatto con il ceppo DM1187 è stato possibile evidenziare la formazione di placche *Stx2* positive. Conferma della presenza del gene *Stx2* nell'estratto proveniente dalle placche di lisi è stata ottenuta mediante PCR (Figura 1). Le colonie batteriche presenti nelle aree di lisi, tuttavia, mostravano all'analisi PCR risultati differenti, producendo un amplificato con frammenti di diverso peso rispetto al target *Stx2* (Figura 2). Risultati negativi sono stati ottenuti impiegando i 5 ceppi batterici *eae/saa* positivi.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano la presenza di batteriofagi litici in 8 dei 10 isolati *Stx2*-positivi analizzati. Questa positività è documentata dalla formazione di placche di lisi utilizzando diverse colture batteriche. Le differenze osservate nei diversi substrati colturali sono riconducibili al fatto che alcune infezioni fagiche creano lisogeni e non danno luogo ad un'infezione litica e che i diversi fagi non sono capaci d'infettare tutti i diversi substrati. La presenza del fago, inoltre, può non essere rilevata mediante osservazione di placche di lisi, ma richiedere l'osservazione di placche di lisogenia con colture sensibili, mediante test d'ibridazione. Ceppi che più facilmente permettono di osservare lisi sono quelli che hanno subito una mutazione del gene *recA* (*E.coli* K12 e DM1187). La mutazione *RecA* comporta l'inattivazione del sistema batterico di repressione del fago, per cui in seguito ad infezione fagica si attiva il ciclo litico con produzione di placche visibili [20]. Un altro ceppo molto sensibile all'infezione da colifagi è *Escherichia coli* WG5 che, è attualmente consigliato anche dal metodo ISO 10705-2, per il controllo di qualità delle acque [16]. Nel corso del nostro studio abbiamo potuto osservare che alcuni estratti fagici hanno prodotto placche di lisi con spot test soltanto su colonie di *Escherichia coli* collezionati in laboratorio e che presentavano fattori di virulenza quali il gene *eaeA*, *hlyA* o *stx1*, ma erano privi del gene *Stx2*, ma non nei

ceppi di riferimento WG5 e DM1187. In particolare i fagi F 14-4, P55-b e P658 che hanno dato lisi, più o meno evidente con il ceppo FV4996 ed il fago P7C-c, F14-4, P55-b e P658 che ha dato lisi sul ceppo FV4028. Non tutti i fagi evidenziati mediante spot test sui nostri isolati hanno peraltro mostrato lisi sulle colture di riferimento DM1187 e WG5 o hanno mostrato una diversa intensità della lisi. L'unico fago che si è dimostrato veicolare la *Stx2* è quello proveniente dal ceppo *Escherichia coli* P65. E' da notare inoltre che il fago P65 ha prodotto una zona di lisi poco evidente in presenza del ceppo DM1187, ma chiaramente riconoscibile mediante blotting ed ibridazione. E' stato un risultato imprevedibile che tale fago abbia mostrato lisogenia proprio con un ceppo *recA*-mutante in quanto l'infezione fagica avrebbe dovuto attivare l'induzione di un ciclo litico.

Il meccanismo attraverso cui i ceppi *recA*-mutanti attivano il ciclo litico sembra però dipendere dall'infezione di fagi [17,18]. L'induzione di un ciclo lisogeno nel nostro caso può essere spiegata perciò con due diversi meccanismi: il fatto che il P65 non sia una fago di tipo o la copresenza di più fagi all'interno del ceppo P65.

Studi di alcuni autori hanno infatti dimostrato che l'integrazione di un nuovo fago in una coltura già infetta da altri fagi è possibile e questa potrebbe avvenire in punti del genoma in modo da non attivare i meccanismi di induzione del ciclo litico [19,20].

**Tabella 1.** Risultati ottenuti da induzione fagica. (\*) valore medio di tre letture a 600 nm. (\*\*) Indicazione della lisi secondo scala di visibilità ad occhio nudo (+)=poco visibile/distinguibile, (++)=parzialmente visibile (+++)= visibile e netta rispetto alla crescita circostante

CEPPO	Induzione		Spot test ceppi referenza (**)		Spot Test su VTEC <i>stx2</i> neg. (**)					Ibrid. Sonde <i>stx2</i>	Conferma PCR
	Mit C(*)	Controllo	<i>E.coli</i> DM 1187	<i>E. coli</i> WG5	FV 4033	FV 4996	FV 4028	EDL 933	ED 73		
P7C	0,52	2,043	-	-	-	-	++	-	-	-	
P65	0,497	1,56	+	++	-	-	-	-	-	+	+
P18C	0,519	0,84	++	++	-	+	+++	-	-	-	
P1846	0,581	0,88	+++	+++	-	++	+++	-	-	-	
F 14-1	0,466	1,439	-	-	-	-	-	-	-	-	
F 14-4	0,547	0,7	-	-	-	+++	+++	-	-	-	
F 7-3.18	0,455	0,653	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	
P1476	0,604	0,803	+++	+++	-	++	++	-	-	-	
P55	0,348	0,978	-	-	-	++	+	-	-	-	
P658	0,477	0,695	-	-	-	+	++	-	-	-	

I lisogeni su DM 1187 con fago P65 da noi isolato sono risultati positivi al blotting con sonde,

ma diversamente dal fago isolato le colonie presentavano amplificazione della sequenza gene-

tica *stx2* difforme dal target e con frammentazione (Figura 2), dovuto ad integrazione fagica in un sito difforme da quello deputato [19,20].

Il fago P65 che con le tecniche utilizzate non si è dimostrato infettivo per i ceppi di campo e non ha perciò indotto lisogeni dotati di accresciuta virulenza.

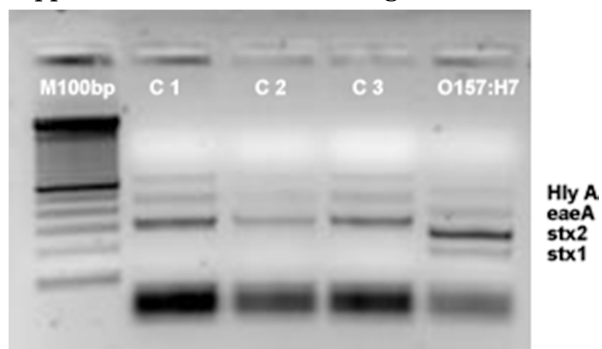
Questo fenomeno è in accordo con i risultati ottenuti in diversi lavori che dimostrano che batteriofagi isolati da ceppi di campo, in grado di provocare ciclo litico sui ceppi sensibili di laboratorio, non sempre sono in grado d'infettare ceppi selvaggi [13,14].

Che la ricombinazione genica non sia facilmente riproducibile è stato evidenziato in diversi lavori [20,21] i quali dimostrano che diversi stipiti di *Escherichia coli* hanno una differente sensibilità all'infezione ed all'induzione della lisogenia.

**Figura 1.** PCR DNA fagico ricavato da placca di lisi su coltura DM1187



**Figura 2.** PCR da 3 colonie lisogene *stx2* del ceppo DM1187 infettate con fago P65



La percentuale di fagi *Stx2* positivi sul totale dei ceppi infettati da fagi è risultata pari al 12,5% (1/8) è in accordo con valori riportati in letteratura in cui il valore era pari al 18% [22]. Il valore rilevato può sottostimare il dato reale perché l'induzione di un ciclo litico richiede che vi sia una concentrazione sufficiente di fagi infettanti e che i ceppi utilizzati siano sensibili nei confronti del fago.

E' stato osservato anche che, successivamente ad un ciclo litico, ci può essere un decadimento notevole dell'infettività del fago dovuta a ricombinazioni che provocano la perdita della capaci-

tà di clivaggio quando si attiva il sistema dell'SOS batterico, oppure ad un'integrazione molto forte con l'ospite che non consente al fago di sopravvivere all'esterno di questo anche per brevi periodi [23,24].

In conclusione, il nostro studio ci ha permesso di evidenziare la presenza di un fago lisogeno vettore del gene *Stx2*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Dambrosio A, Lorusso V, Quaglia NC, Parisi A, La Salandra G, Virgilio S, Mula G, Lucifora G, Celano GV, Normanno G (2007) *Escherichia coli* O26 in minced beef: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern. (). Int J Food Microbiol. Sep 15;118(2):218-22. Epub 2007 Aug 1
2. Alonso S, Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Ferreira MT, López C, Alberghini L, Albonetti S, Echeita A, Trevisani M, Blanco (2007) Fecal carriage of *Escherichia coli* O157:H7 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. J. Int Microbiol. Jun;10(2):109-16.
3. Bonardi S, Foni E, Chiapponi C, Salsi A, Brindani (2007) Detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serogroups O157 and O26 in the cecal content and lymphatic tissue of cattle at slaughter in Italy. F. J Food Prot. 2007 Jun;70(6):1493-7.
4. Bonardi S, Foni E, Brindani F, Bacci C, Chiapponi C, Cavallini P. (2004) Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (vtec) O157 and non-O157 in cattle at slaughter. New Microbiol.;27(3):255-61.
5. Picozzi C, Foschino R, Heuvelink A, Beumer (2005) Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol-negative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated from milk samples in Lombardy region. R Lett Appl Microbiol.;40(6):491-6.
6. Sisti M, Benedetti C, Lonzi A, Schiavano GF, Pianetti A, Romanini I, Bruscolini F. (2004) Isolation of *Escherichia coli* O157 from human and bovine faeces in the Urbino area, Italy. Int J Hyg Environ Health. ;207(6):577-83.
7. Conedera G, Dalvit P, Martini M, Galiero G, Gramaglia M, Goffredo E, Loffredo G, Morabito S, Ottaviani D, Paterlini F, Pezzotti G, Pisanu M, Semprini P, Caprioli A. (2004) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. Int J Food Microbiol. 2004 Oct 1;96(1):67-73.
8. Czajkowska D, Boszczyk-Maleszak H, Si-

- korska IR, Sochaj A. (2008) Studies on the survival of enterohemorrhagic and environmental *Escherichia coli* strains in wastewater and in activated sludges from dairy sewage treatment plants. *Pol J Microbiol.*;57(2):165-71.
9. Selma MV, Allende A, López-Gálvez F, Elizaquível P, Aznar R, Gil MI (2007) Potential microbial risk factors related to soil amendments and irrigation water of potato crops.. *J Appl Microbiol.*;103(6):2542-9
  10. Williams AP, Avery LM, Killham K, Jones DL. (2007) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the rhizosphere of maize grown in waste-amended soil. *J Appl Microbiol.*;102(2):319-26.
  11. Muniesa M, Jofre J, García-Aljaro C, Blanch AR. (2006) Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the environment. *Environ Sci Technol.*;40(23):7141-9. Review.
  12. Burckhardt F, Heissenhuber A, Morlock G, Busch U, Schindler P, Fruth A, Ammon A, Wildner M. (2005) Risk factors for abundance of shiga toxin producing *Escherichia coli* in sewage water *Gesundheitswesen.*;67(12):858-61. German.
  13. Muniesa M., Blanco J.E., de Simon M., Serra-Moreno R., Blanch A.R., Jofre J.; (2004) Diversity of *stx2* converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle; 2004; *Microbiology*, 150, 2959–2971
  14. Muniesa M., Lucena F., Jofre J.; (1999) Study of potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment; 1999; *Journal of applied Microbiology*; 87,p.402-409
  15. Paton A.W., Paton J.C. ; (1998) Detection and characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E.coli hlyA*, *rfb<sub>O111</sub>* and *rfb<sub>O157</sub>*; 1998; *Journal of Clinical Microbiology*, feb. 1998 , p. 598-602
  16. Anonymus (2000);ISO10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages –part2: Enumeration of somatic coliphages;International for Standardisation; Geneva
  17. Mount D W. (1977) A mutant of *Escherichia coli* showing constitutive expression of the lysogenic induction and error-prone DNA repair pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.*;74:300–304
  18. Chloe E. James, Karen N. Stanley, Heather E. Allison, Harry J. Flint, Colin S. Stewart, Richard J. Sharp, Jon R. Saunders, and Alan J. McCarthy (2001) Lytic and Lysogenic Infection of Diverse *Escherichia coli* and *Shigella* Strains with a Verocytotoxigenic Bacteriophage *Appl Environ Microbiol.* 2001 September; 67(9): 4335–4337
  19. García-Aljaro C., Muniesa M., Jofre J., and Blanch R. A.;(2009) Genotypic and Phenotypic Diversity among Induced, *stx2*-Carrying Bacteriophages from Environmental *Escherichia coli* Strains; *Applied and environmental microbiology*, p. 329–336
  20. Serra-Moreno R., Jofre J., Muniesa M.; (2007) Insertion Site Occupancy by *stx2* Bacteriophages Depends on the Locus Availability of the Host Strain Chromosome, *J Bacteriol.*; 189(18): 6645–6654.
  21. Muniesa M., Mocè-Llivina L., Katayama H., Jofre J.; (2003) Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages; 2003; *Antonie van Leeuwenhoek* 83: p.305-315
  22. Muniesa M., Jofre J.;(2004) Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment; *Antonie van Leeuwenhoek* 86:p.65–76, 2004.
  23. James C. E., Stanley K. N., Allison H. E., Flint H. J., Stewart C. S., Sharp R. J., Saunders J. R., McCarthy S. J.;( 2001) Lytic and Lysogenic Infection of Diverse *Escherichia coli* and *Shigella* Strains with a Verocytotoxigenic Bacteriophage; 2001; *Applied and environmental microbiology*, p. 4335–4337
  24. Muniesa M., Serra-Moreno R., Jofre J.;(2004) Free shiga-toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the *stx* gene appeared conserved; 2004; *Environmental microbiology* 6(7), p 716-725