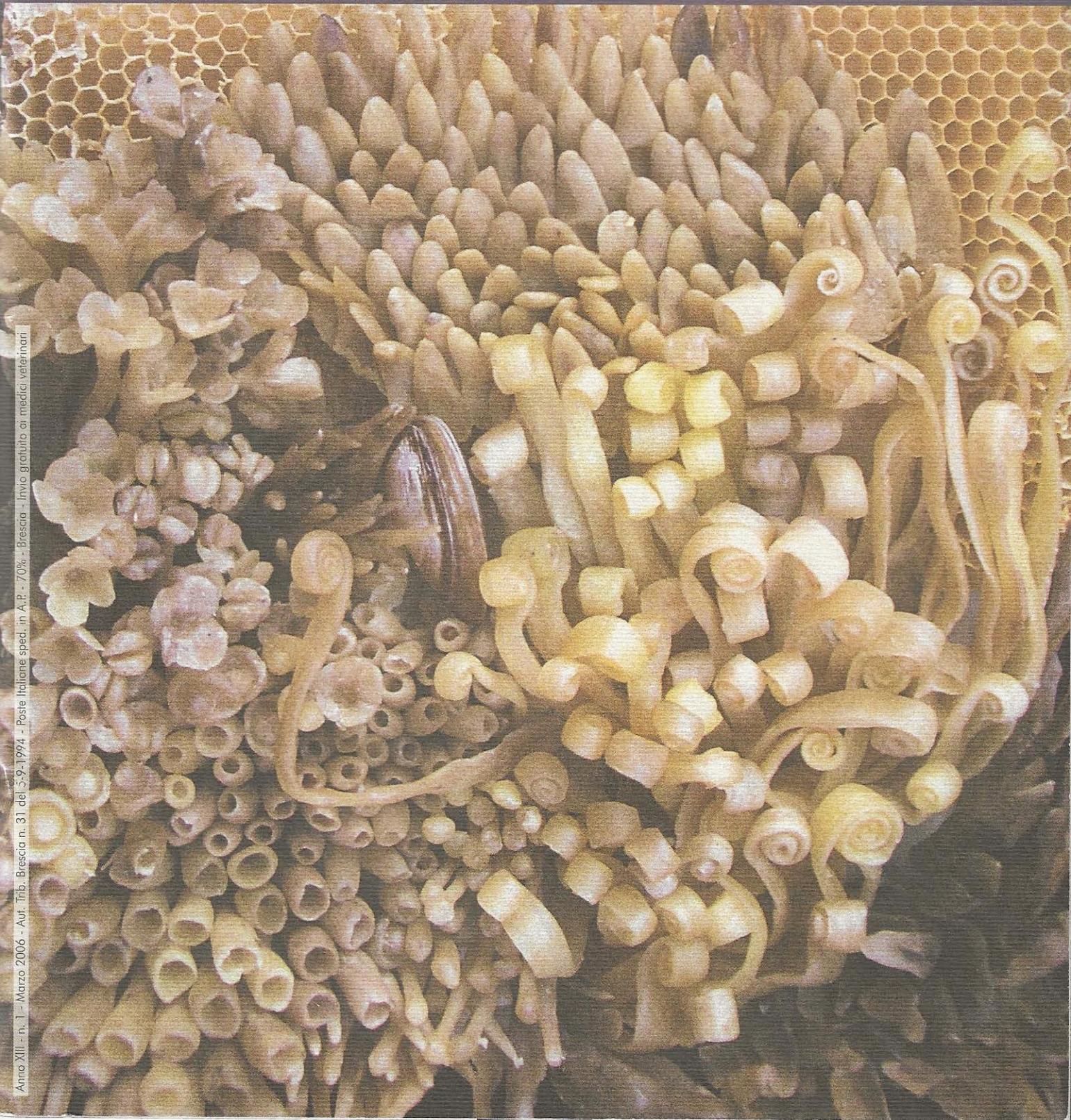


il Chirone

RIVISTA TRIMESTRALE DI INFORMAZIONE E ATTUALITÀ VETERINARIA



Anno XIII - n. 1 - Marzo 2006 - Aut. Trib. Brescia n. 31 del 5-9-1994 - Poste Italiane sped. in A.P. - Brescia - Invio gratuito ai medici veterinari

Studio molecolare di nuovi ceppi di attinomiceti produttori di antibiotici

Vincenzo Alessandro Gennarino

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia-Palermo

Il problema della resistenza agli antibiotici cresce con una frequenza molto alta. Infezioni batteriche un tempo facili da curare oggi rappresentano una nuova sfida da combattere. La capacità che hanno gli antibiotici di curare malattie infettive precedentemente incurabili ha fatto nascere l'idea che siano "farmaci miracolosi" dotati di "poteri" che vanno ben al di là di quelli che possono essere attribuiti alle loro reali caratteristiche farmaceutiche. Nella maggior parte dei Paesi europei, gli antibiotici sono tra i farmaci più utilizzati, secondi solo ai comuni analgesici. Sfortunatamente, stiamo cominciando a pagare un prezzo molto alto per l'errata impostazione dell'uso degli antibiotici, un uso indiscriminato ed eccessivo sia in campo medico che agricolo-veterinario, che ha portato a selezionare ceppi batterici multiresistenti. Tra queste infezioni batteriche, ricordiamo la Tuberculosis, che è la seconda malattia infettiva più comune al mondo ed è la maggiore causa di morte per i pazienti affetti da AIDS. La malattia, curata con antibiotici di prima e seconda scelta (Isoniazide, Rifampicina ed Etambutolo), sta nuovamente acquisendo un'importanza rilevante a causa della comparsa di ceppi multiresistenti (*Multi Drug Resistant*). L'aumento dei soggetti HIV positivi, le immigrazioni di individui dalle aree d'elevata endemia nonché una più facile trasmissione interumana, hanno contribuito alla maggiore diffusione della malattia e, probabilmente, all'incremento della "farmacoresistenza". Bisogna inoltre evidenziare che molti casi di tubercolosi (almeno il 50%, dati OMS) non vengono diagnosticati, ciò porta ad un'inadeguata cura e di conseguenza ad un'inefficace contenimento della patologia. L'incremento della tubercolosi come zoonosi è dovuto sicuramente alle carenze igieniche negli allevamenti zootecnici, ai sistemi di stabulazione permanente, all'alimentazione con *unifeed* (detto piatto unico, si caratterizza per la somministrazione contemporanea di tutti gli alimenti, miscelati fra di loro, necessari a coprire i fabbisogni), inadeguati controlli durante l'immissione e l'importazione di nuovi animali negli allevamenti e a una scarsa sensibilizzazione sanitaria degli allevatori. Oltre alle forti implicazioni economiche che una tale malattia riveste nella gestione degli allevamenti, il problema risulta ancor più grave se si pensa che molti micobatteri, patogeni naturali degli animali, possono

infettare seriamente anche l'uomo. Le patologie da micobatteri rappresentano quindi una valida ragione per lo studio di nuovi farmaci implicati nella terapia antimicrobica verso questi batteri, dato il loro ruolo in termini di sanità pubblica umana, veterinaria ed economici.

Nel corso di una recente ricerca sono stati analizzati da un punto di vista molecolare, alcuni ceppi di attinomiceti di nuovo isolamento ed attivi contro alcuni ceppi di micobatteri MDR (tra cui *Mycobacterium Bovis* ed *Avium*), ceppi resistenti ai classici antibiotici usati oggi per la cura di infezioni batteriche derivanti da questi batteri. Questi ceppi sono stati caratterizzati molecolarmente tramite esperimenti di AFLP e sequenziamento di elementi ripetuti omologhi a sequenze trasponibili di *Mycobacterium bovis* MDR. Gli attinomiceti producono più del 60% delle molecole farmacologicamente attive (di cui l'80% è prodotto dagli Streptomiceti) note, di grande importanza nell'industria, in agricoltura e in medicina umana e veterinaria come agenti antibatterici, antivirali, antimicotici, antitumorali.

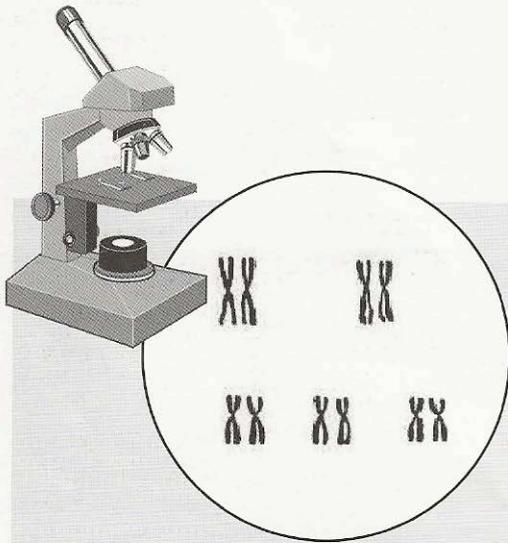
Sono stati esaminati in particolare, 6 ceppi di attinomiceti, denominati: 6VS, 5DN, 17PO, 2FG, 11, 31VS, selezionati in base alle proprietà inibenti i Micobatteri MDR. In particolare i ceppi sono stati sottoposti ad analisi di *fingerprinting* molecolare con una tecnica innovativa definita AFLP che usa coppie di *primer* specifiche scelte in base al rapporto AT/GC dei cromosomi batterici. L'analisi dei dati avviene tramite l'ausilio del *software genescan*, che si basa sulla registrazione dei tempi di uscita dei picchi relative alle varie bande di amplificazione. Queste riflettono la differente e caratteristica distribuzione dei siti di restrizione per alcuni enzimi di restrizione (*Msel* e *EcoRI*). L'analisi dei ferogrammi evidenzia particolari picchi, peculiari per il DNA di alcuni ceppi esaminati e non per altri. Un'altra variabile è data dalle altezze dei picchi relativi ai frammenti di restrizione. I dati ricavati sono stati elaborati tramite l'indice di Jaccard (S_{JK}). Tutti i dati (indici di Jaccard) sono stati riuniti in una tabella grezza che costituisce una matrice bidirezionale in cui sia le righe che le colonne rappresentano i ceppi con i relativi indici. Mediante il programma *Cluster* dalla matrice sono state ottenute varie rappresentazioni grafiche. Questo sistema ci ha permesso di visualizzare e calcolare in maniera in-

tuitiva le distanze genetiche tra i vari ceppi, che riflettono un'origine filogenetica diversa o un diverso luogo di isolamento tra i vari ceppi. Tutto ciò ci permetterà in futuro di costruire una banca dati di "omologia" nei ceppi via via isolati o analizzati.

Ulteriore scopo del nostro lavoro è stata la ricerca di sequenze d'inserzione ripetute (IS) omologhe alle sequenze intersperse nel genoma dei micobatteri con cui gli attinomiceti sono imparentati. A tal proposito si è in prima istanza valutata la possibilità di amplificazione del DNA degli attinomiceti con i *primer* derivati dalle omologhe sequenze (IS6110) di *Mycobacterium bovis*. Esperimenti di ibridazione ci hanno suggerito la presenza nei nostri ceppi di sequenze ripetute omologhe a quelle d'inserzione ormai ben descritte per i Micobatteri. Ciò ha rappresentato la base di partenza per un'analisi tramite *chromosome walking* con l'uso della PCR e sequenziamento per la caratterizzazione degli elementi d'inserzione. A tale scopo abbiamo disegnato una serie di coppie

di *primer* sulla base dell'IS6110 di *Mycobacterium* che sono state impiegate in reazioni di PCR allo scopo di ottenere frammenti (bande) significativi da sequenziare. In particolare, è stata osservata la conservazione di un nucleo di sequenze IS6110 tra le varie popolazioni di elementi che differiscono tra loro per la probabile presenza di tratti aggiuntivi (anche il numero di tali ripetizioni sembra essere un elemento caratterizzante i singoli ceppi).

I risultati ottenuti ci consentono di ipotizzare che i nostri ceppi presentano elementi ripetuti parzialmente omologhi all'IS6110 di *Mycobacterium* (ricordiamo che i ceppi di attinomiceti da noi studiati inibiscono la crescita dei micobatteri MDR). Ulteriori studi sono ancora in corso per continuare il *chromosome walking* per la definizione degli elementi di inserzione in modo completo e per la comprensione del tipo di distribuzione sul cromosoma degli attinomiceti. Attualmente, stiamo isolando tramite *Chromatofocusing* la/e sostanza/e ad attività antibiotica verso Micobatteri MDR.



I vantaggi del sesso

La maggior parte degli animali e delle piante sono sessuati e negli organismi che normalmente si moltiplicano in forma asessuata, come i microbi e alcuni funghi, i processi sessuali raramente sono completamente assenti. Pertanto il processo sessuale, così diffuso in natura, deve svolgere una funzione essenziale.

Numerose teorie propongono gli ipotetici vantaggi della sessualità e della ricombinazione genetica. Recentemente è stato presentato un elegante e rigoroso esperimento condotto su lieviti che mostra che una popolazione sessuata evolve più rapidamente che non una popolazione asessuata, quando vengano poste di fronte a variazioni ambientali. Il sesso, accrescendo la variazione genetica, rende la selezione naturale più efficiente, con conseguente maggiore adattamento evolutivo. (gfp)

Hoekstra R.F. (2005) Why sex is good. Nature 434, 571-573