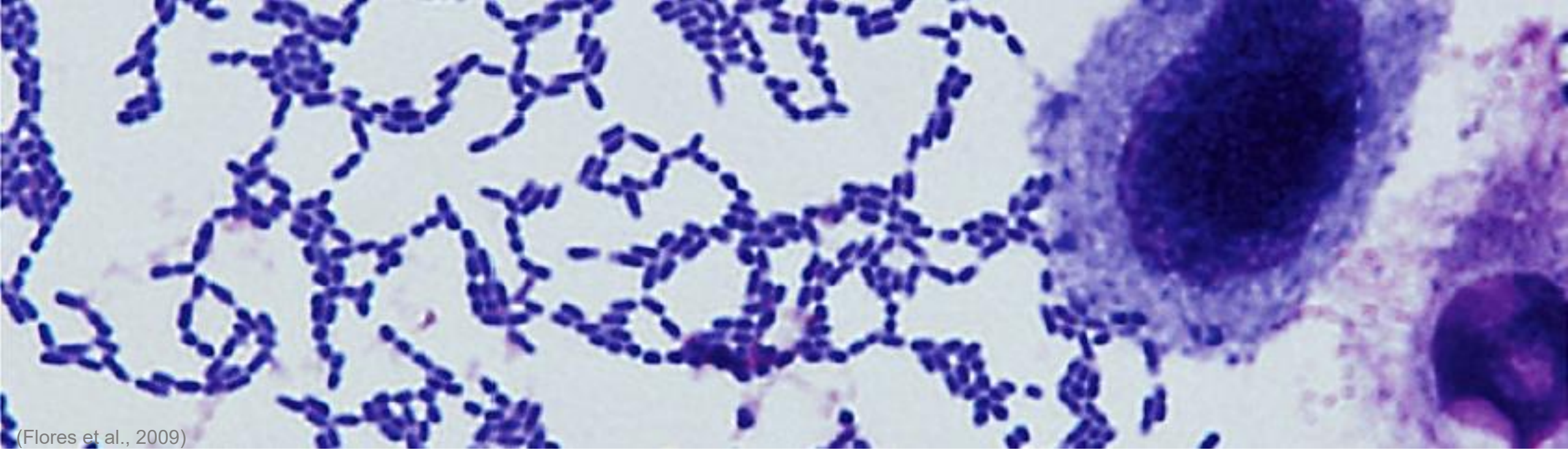




***Escherichia coli* patogeni:**
un focus su
***Escherichia coli* enteroaggregativo (EAEC)**
ed ***Escherichia coli* aderente-invasivo (AIEC)**

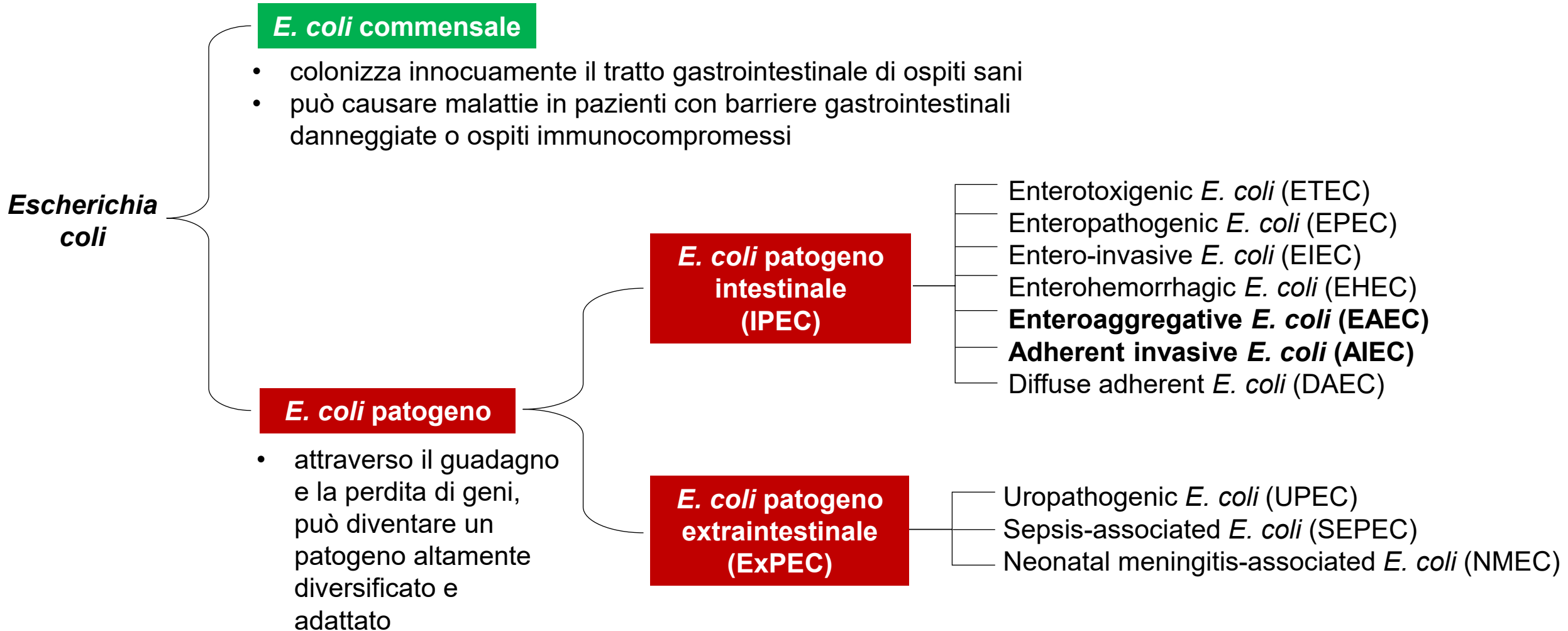


SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA



ESCHERICHIA COLI

L'*Escherichia coli* è un batterio **Gram-negativo**, a forma di bastoncello appartenente alla famiglia delle **Enterobacteriaceae**. È in grado di crescere sia aerobicamente che anaerobicamente, preferibilmente a 37°C, e può essere immobile o mobile, con flagelli peritrichi. Fu **isolato** per la prima volta dalle **feci di neonati** e caratterizzato da **Theodor Escherich** nel **1885**.



Escherichia coli

E. coli commensale

E. coli patogeno

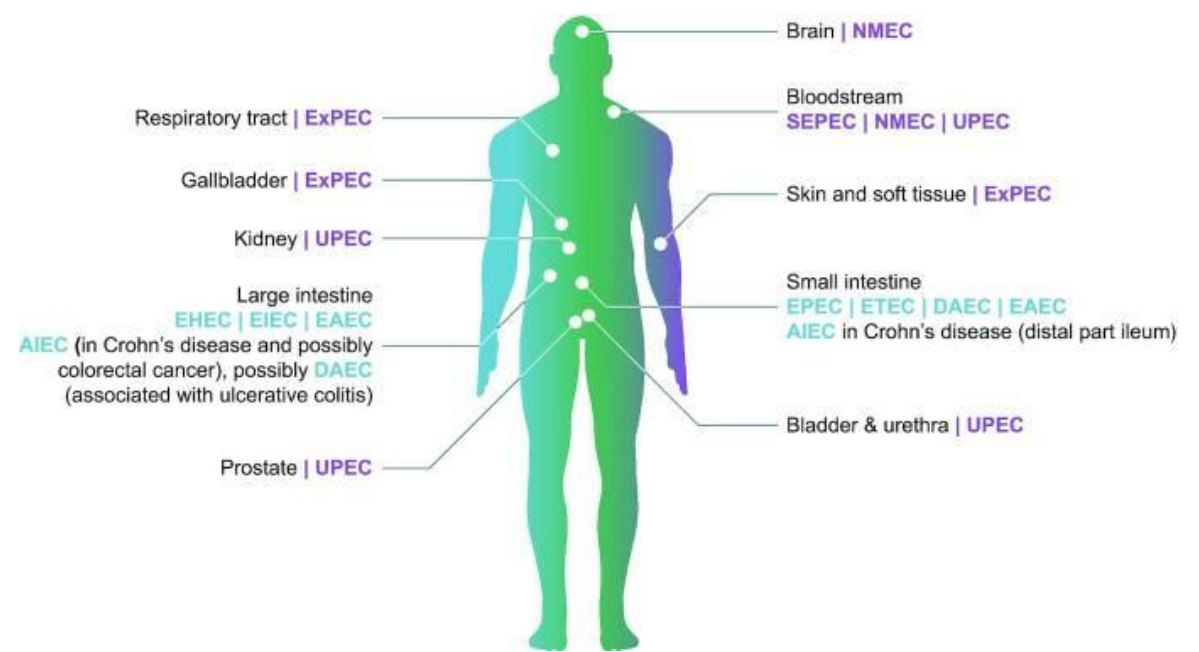
- attraverso il guadagno e la perdita di geni, può diventare un patogeno altamente diversificato e adattato

E. coli patogeno intestinale (IPEC)

E. coli patogeno extraintestinale (ExPEC)

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)
Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)
Entero-invasive *E. coli* (EIEC)
Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)
Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)
Adherent invasive *E. coli* (AIEC)
Diffuse adherent *E. coli* (DAEC)

Uropathogenic *E. coli* (UPEC)
Sepsis-associated *E. coli* (SEPEC)
Neonatal meningitis-associated *E. coli* (NMEC)

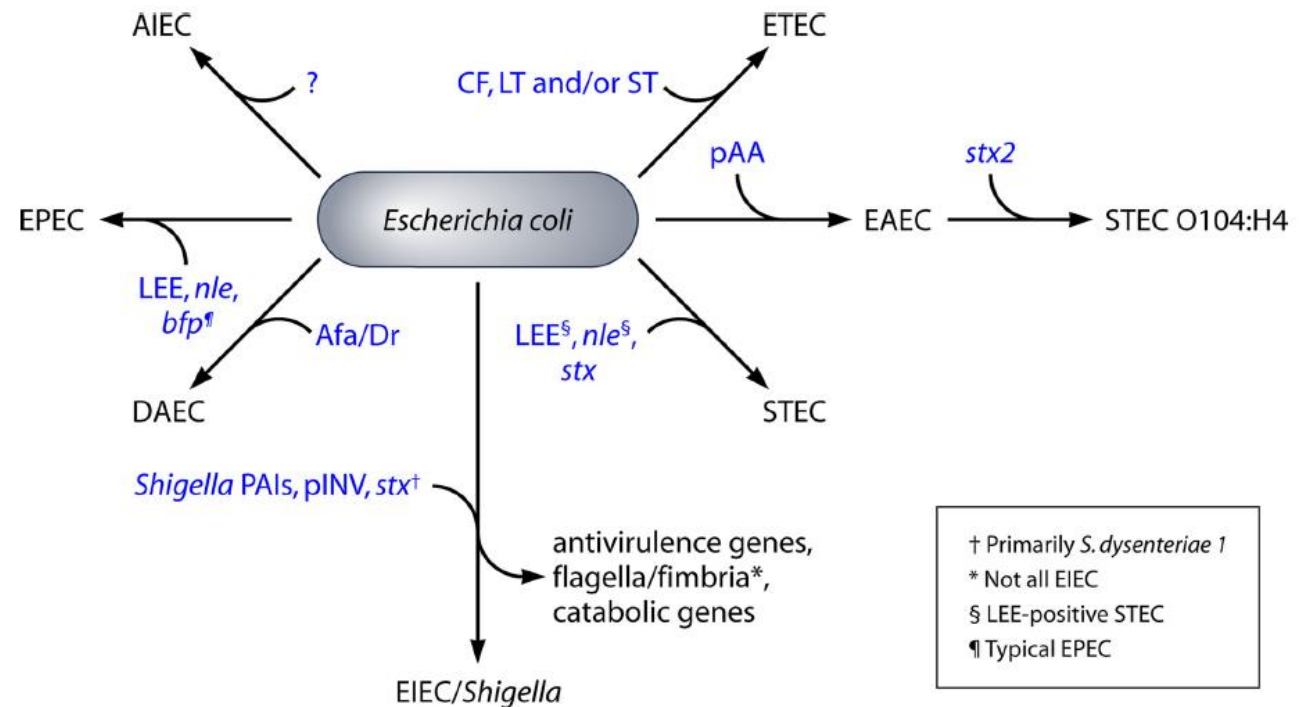


EVOLUZIONE DELL'*ESCHERICHIA COLI* PATOGENO

I genomi di *E. coli* sono divisi tra un **GENOMA CENTRALE** e un **POOL GENETICO FLESSIBILE**
→ quest'ultimo garantisce la capacità patogena di *E. coli*, attraverso l'acquisizione e la perdita di materiale genetico in una serie di *hot points* in tutto il genoma.

Il DNA può essere spostato tra ospiti procarioti attraverso meccanismi quali **coniugazione**, **trasformazione** e **trasduzione**, codificati da elementi genetici mobili (trasposoni, sequenze di inserzione, batteriofagi e plasmidi), con conseguente trasferimento genico orizzontale (**HGT**).

Gli elementi genetici mobili possono esistere integrati nel cromosoma o attraverso l'autoreplicazione all'interno del nuovo ospite, per fornire nuovi tratti e vantaggi in termini di fitness. Tuttavia, anche la **perdita genetica** può favorire l'idoneità o l'adattamento di un agente patogeno ad una nicchia particolare.



Molti dei patotipi intestinali costituiscono un **grave problema per la salute pubblica** e hanno causato diverse **epidemie mortali**, in particolare nei paesi in via di sviluppo...

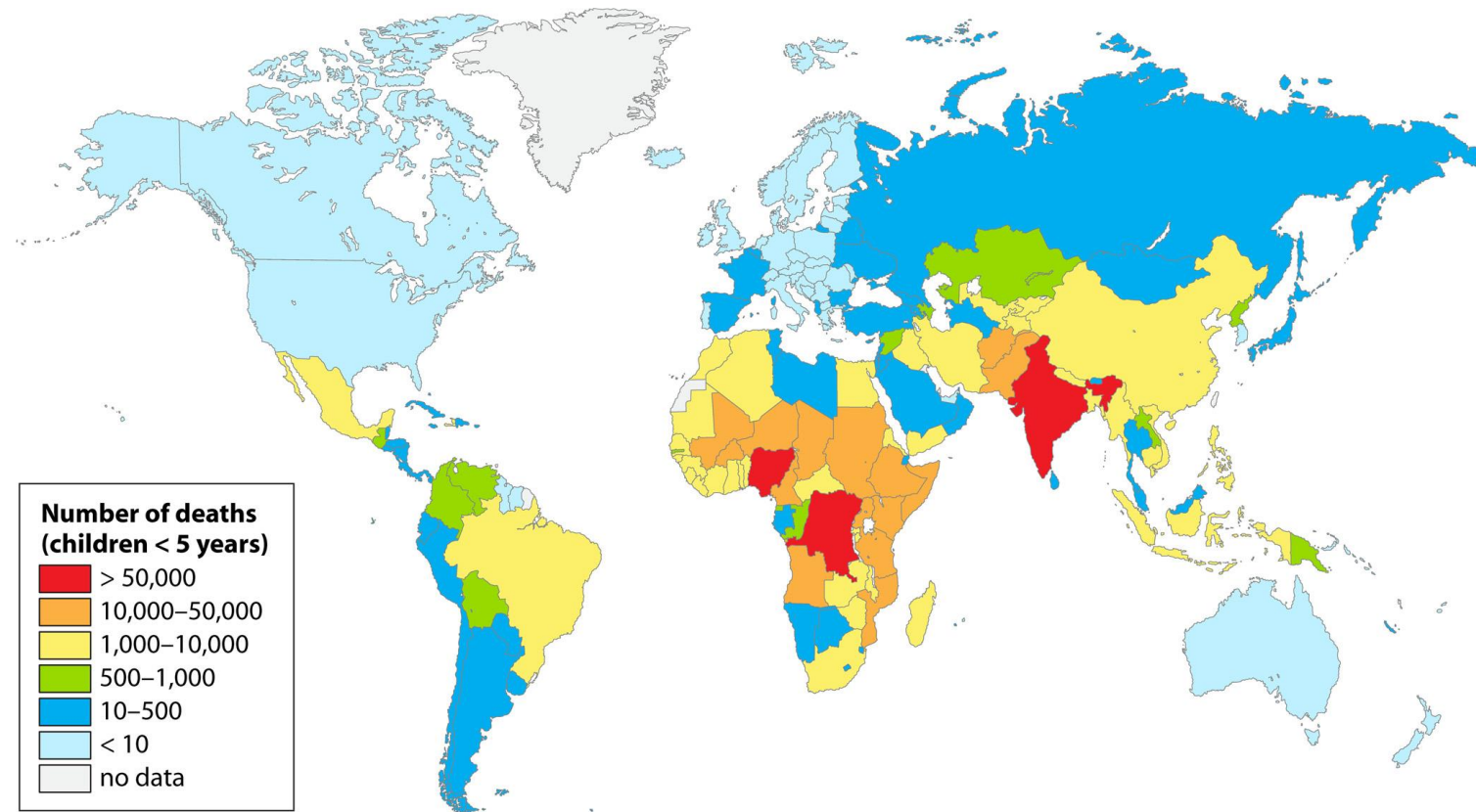
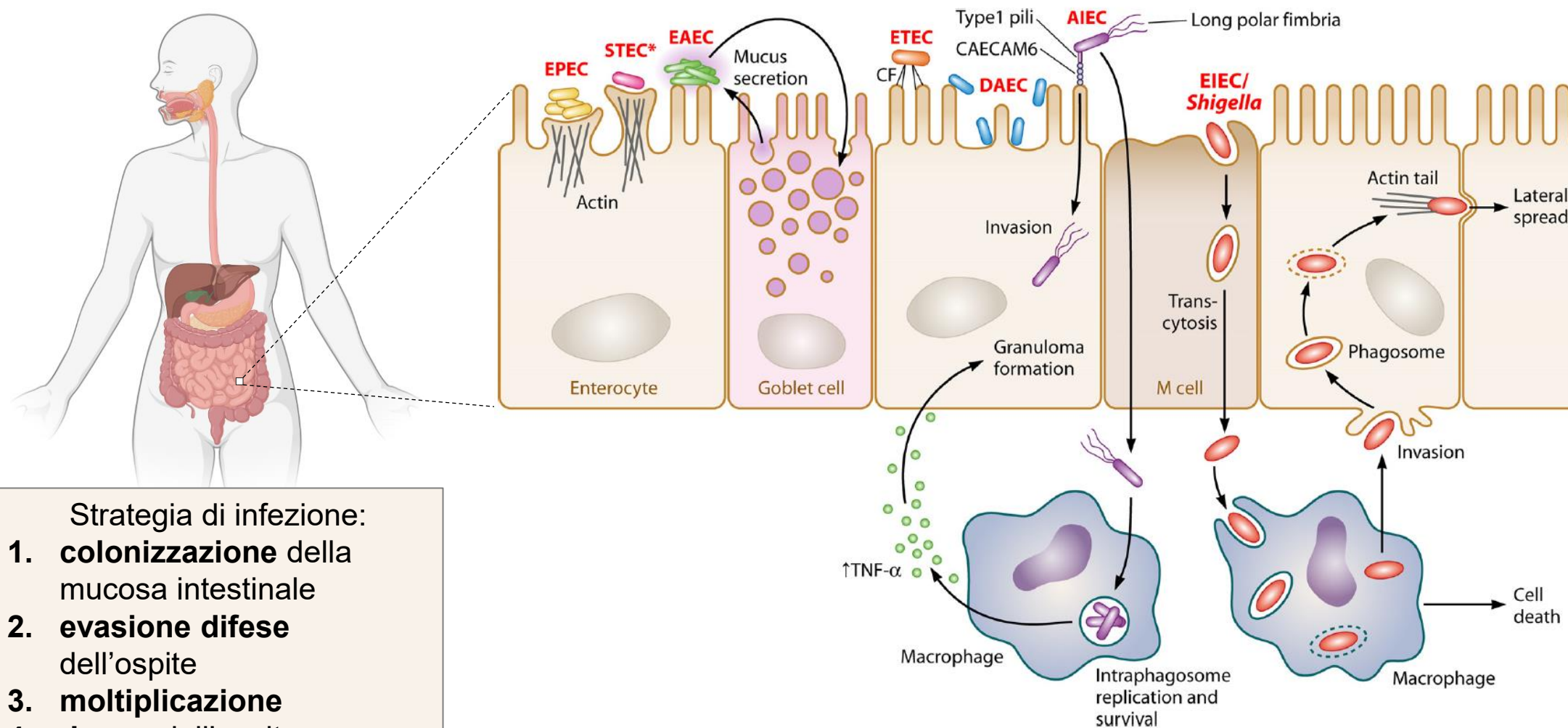


Fig. Global mortality from diarrhea in children under the age of 5 in 2010.
Source data for the map: World Health Organization

ESCHERICHIA COLI PATOGENI INTESTINALI

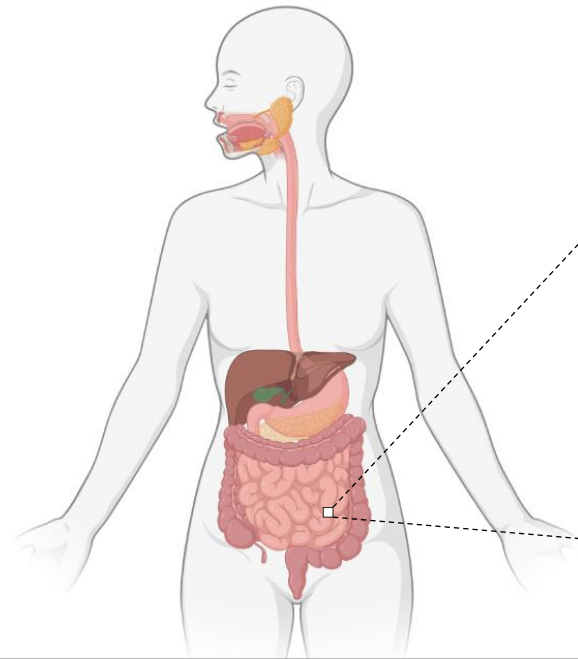
L'*E. coli* provoca una **varietà di malattie diarroiche nell'uomo**, a causa di specifici fattori di colonizzazione e virulenza associati a ciascun patotipo. Per ciascuno, il sito e il meccanismo di colonizzazione dell'ospite, la malattia, i sintomi e gli esiti clinici possono differire, esemplificando la diversità di *E. coli*.



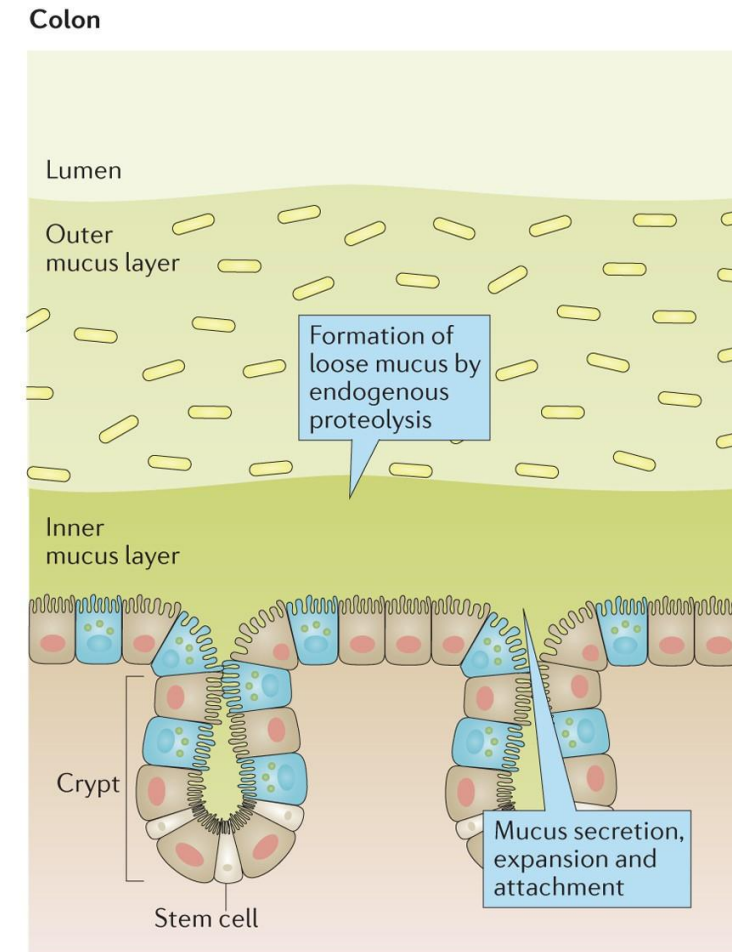
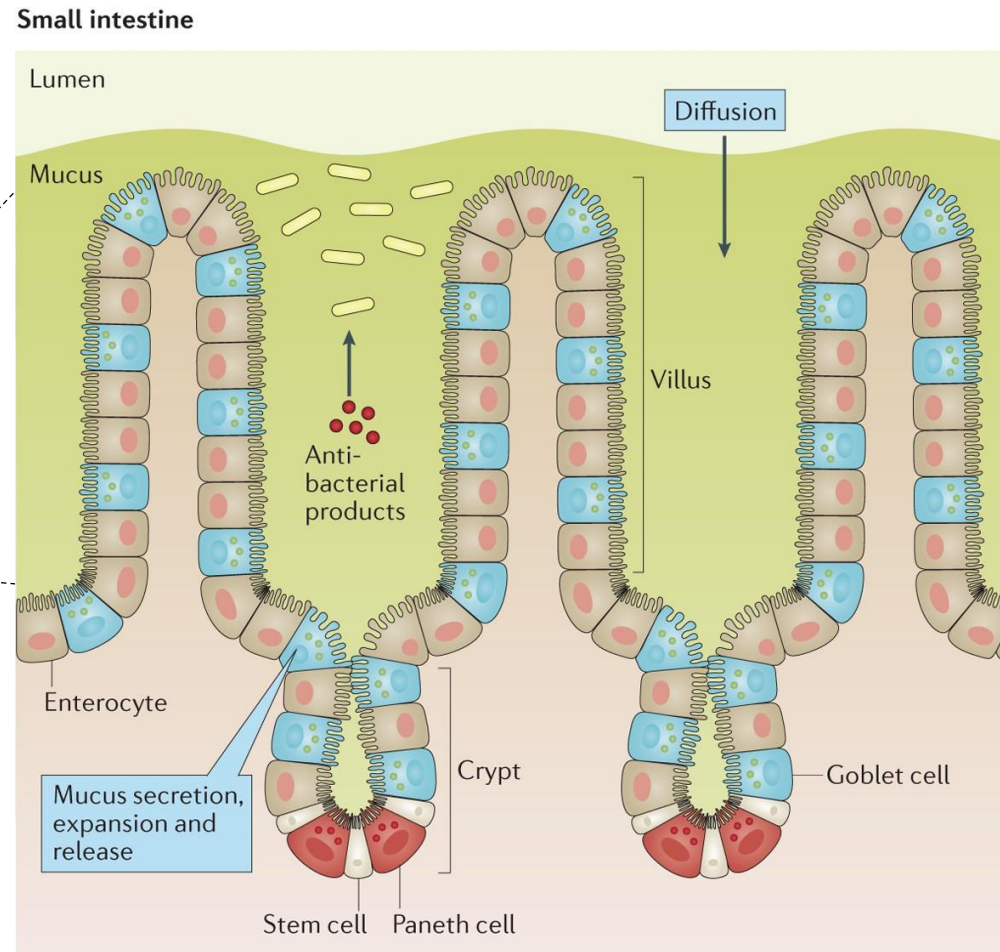
- Strategia di infezione:
1. **colonizzazione** della mucosa intestinale
 2. **evasione difese** dell'ospite
 3. **moltiplicazione**
 4. **danno** dell'ospite

ESCHERICHIA COLI PATOGENI INTESTINALI

L'*E. coli* provoca una **varietà di malattie diarroiche nell'uomo**, a causa di specifici fattori di colonizzazione e virulenza associati a ciascun patotipo. Per ciascuno, il sito e il meccanismo di colonizzazione dell'ospite, la malattia, i sintomi e gli esiti clinici possono differire, esemplificando la diversità di *E. coli*.

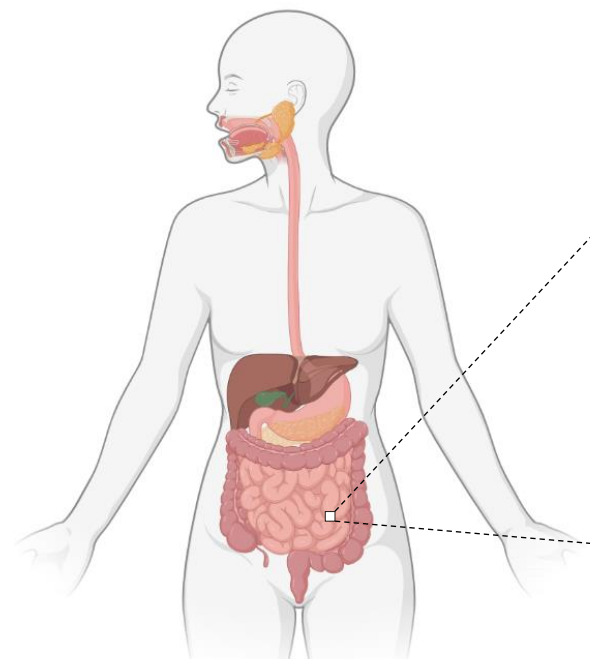


- Strategia di infezione:
1. **colonizzazione** della mucosa intestinale
 2. **evasione** difese dell'ospite
 3. **moltiplicazione**
 4. **danno** dell'ospite



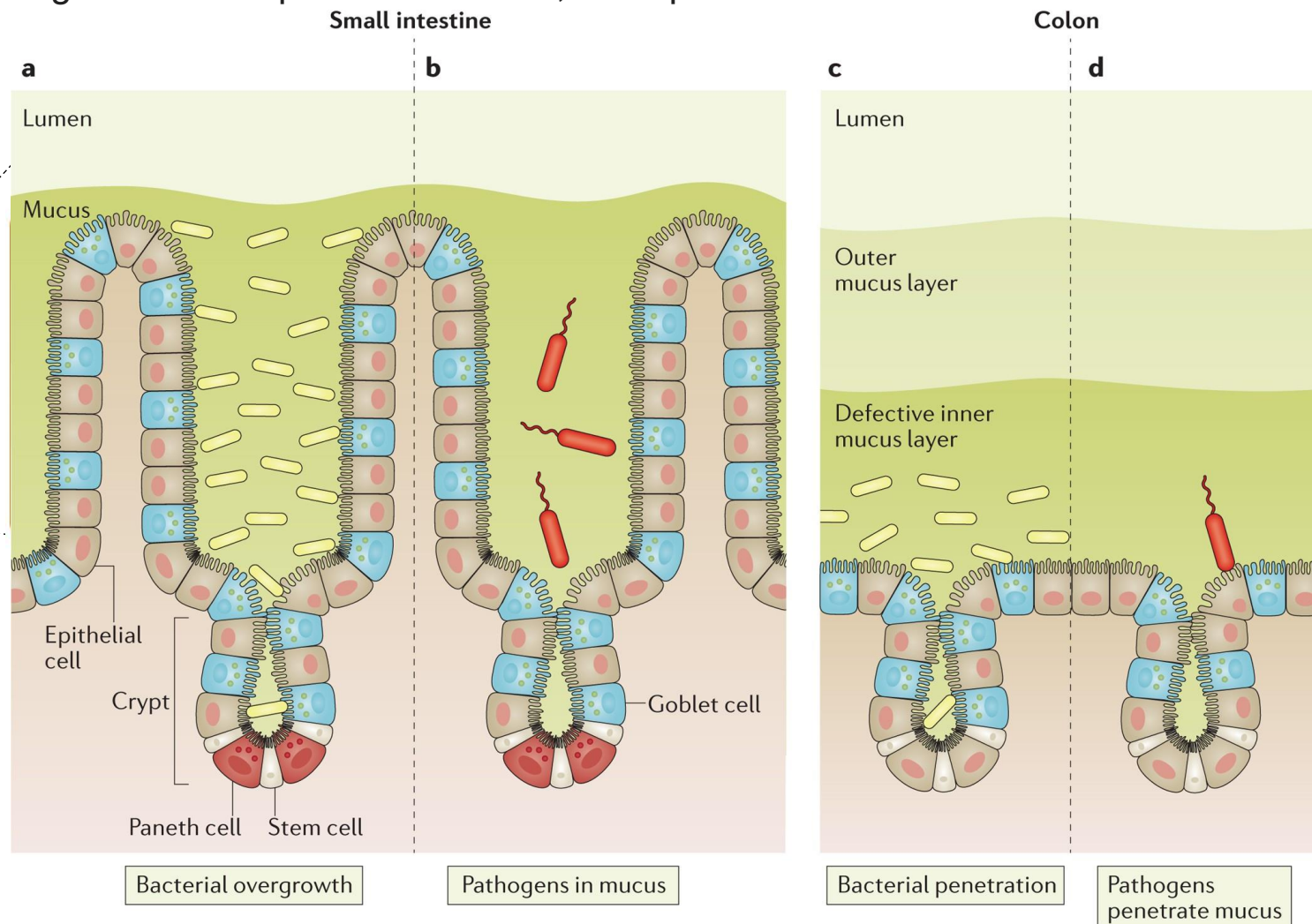
ESCHERICHIA COLI PATOGENI INTESTINALI

L'*E. coli* provoca una **varietà di malattie diarroiche nell'uomo**, a causa di specifici fattori di colonizzazione e virulenza associati a ciascun patotipo. Per ciascuno, il sito e il meccanismo di colonizzazione dell'ospite, la malattia, i sintomi e gli esiti clinici possono differire, esemplificando la diversità di *E. coli*.

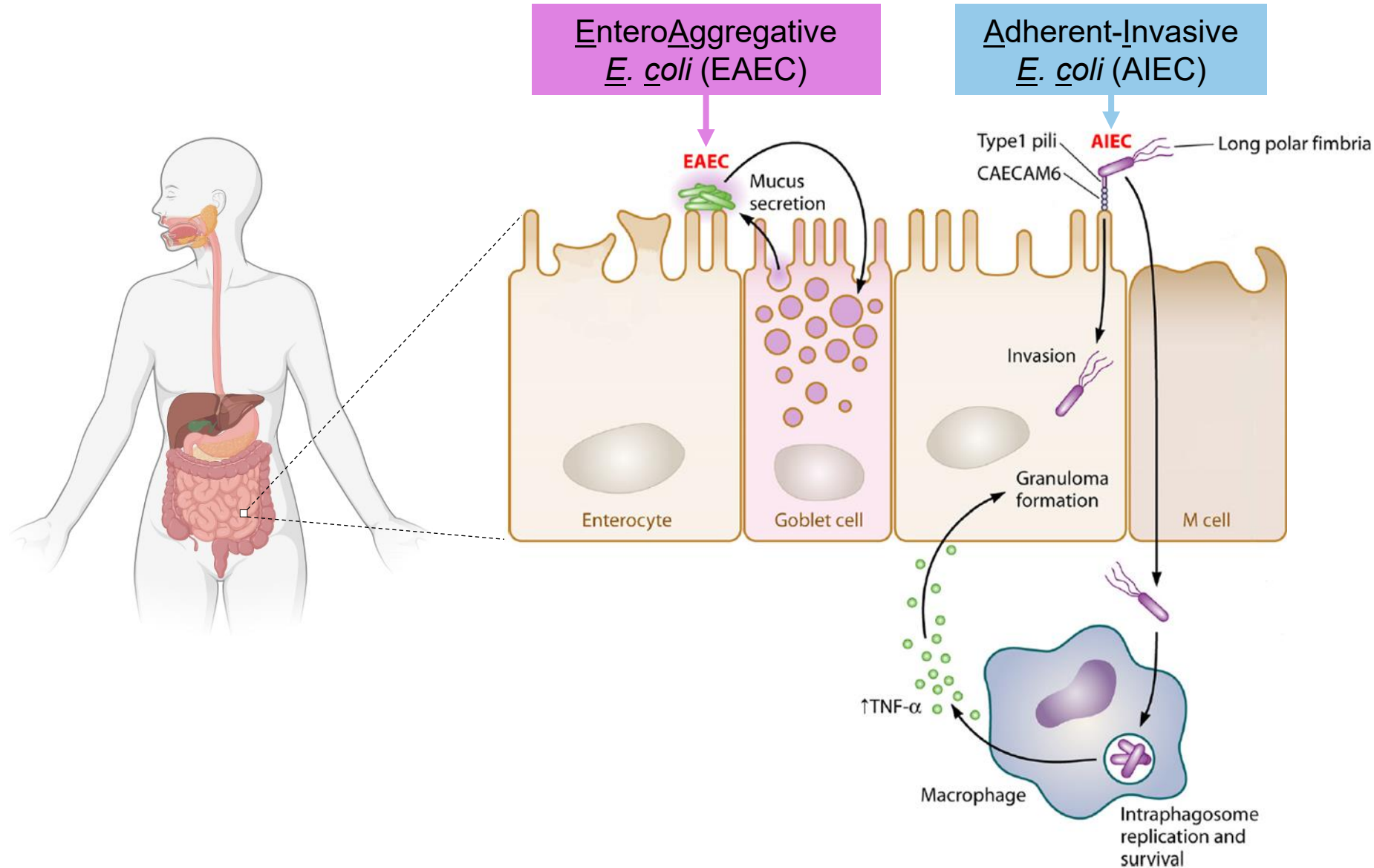


Strategia di infezione:

1. **colonizzazione** della mucosa intestinale
2. **evasione** difese dell'ospite
3. **moltiplicazione**
4. **danno** dell'ospite



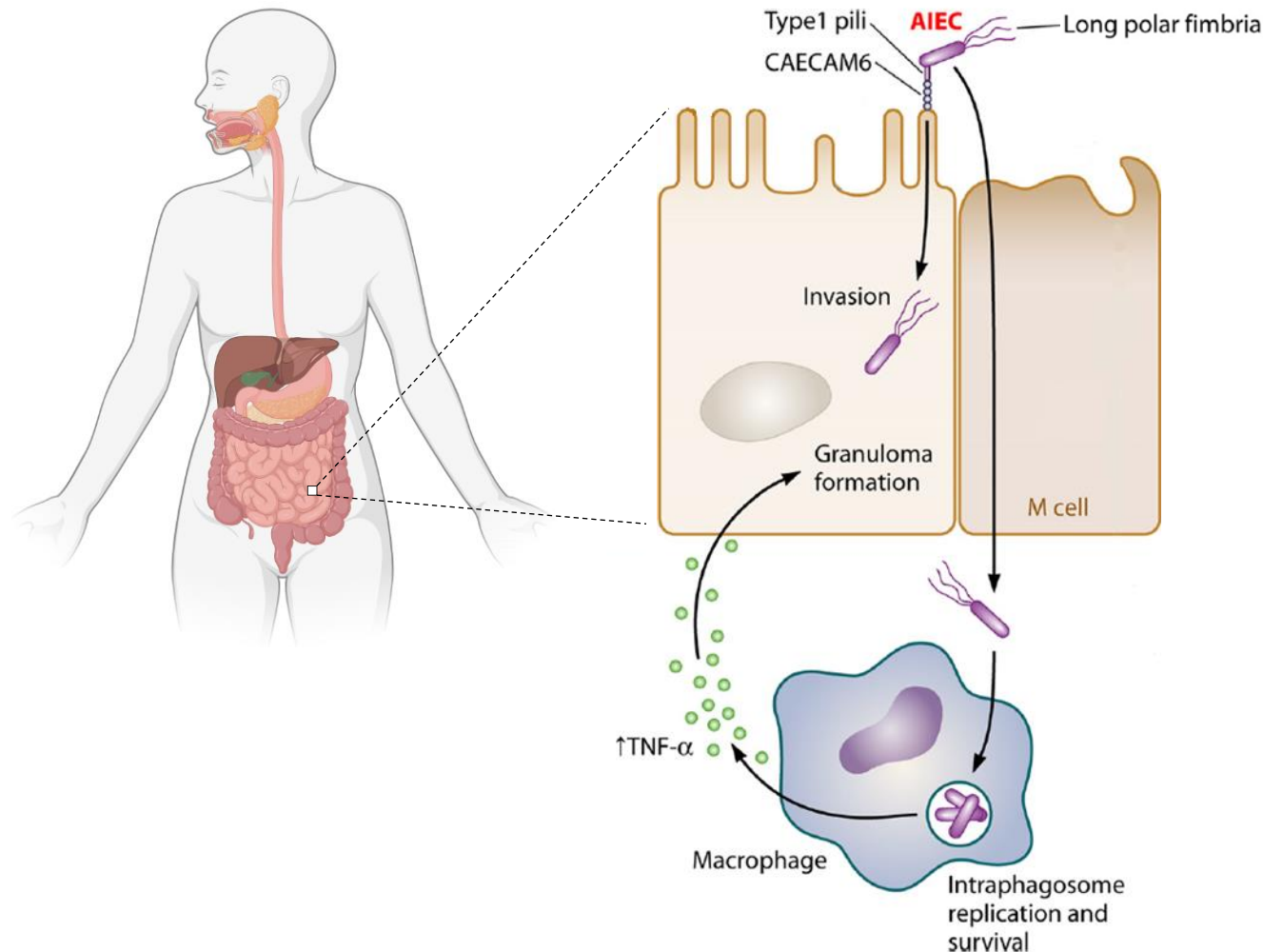
EAEC e AIEC



Discuteremo di **EAEC** e **AIEC** nel contesto:

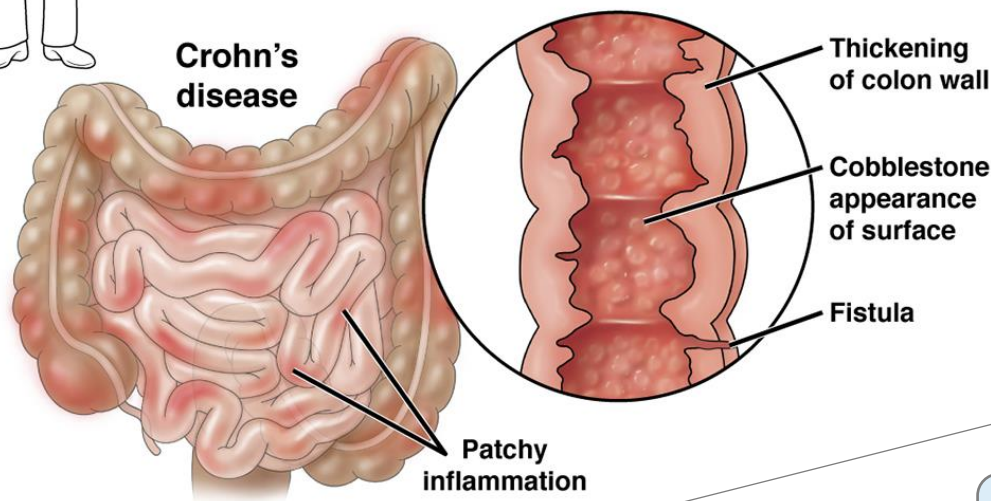
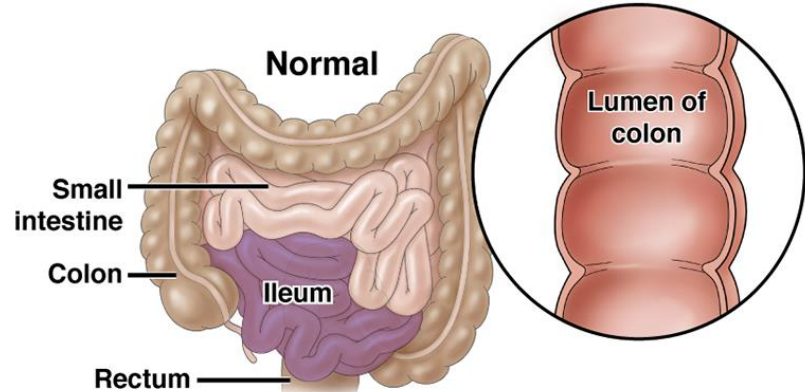
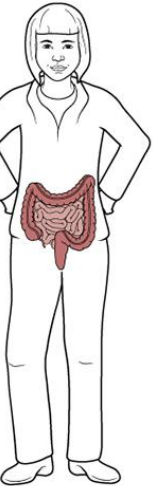
- dell'identificazione
- dell'epidemiologia
- della patogenesi e dei fattori di virulenza

Escherichia coli aderente invasivo (AIEC)



L'*E. coli* invasivo aderente (AIEC) è stato implicato come uno degli agenti causali del morbo di Crohn (CD), una malattia infiammatoria intestinale (IBD) che colpisce principalmente l'intestino tenue.

I dati disponibili suggeriscono una **correlazione** tra l'insorgenza della CD e la presenza di AIEC, rendendo questo patotipo una **minaccia sanitaria rilevante** e un bersaglio terapeutico.



Il morbo di Crohn (CD)

La malattia di Crohn (CD) è stata descritta per la prima volta nel 1932 dal medico Burill B. Crohn ed è una **malattia infiammatoria della mucosa intestinale (IBD)** che si sviluppa preferenzialmente nel giovane adulto ed evolve in modo recidivante e remittente. Può interessare tutti i segmenti del tratto gastrointestinale con **localizzazione preferenziale nell'ileo terminale e nel colon**. Ad oggi **non esiste** alcun **trattamento curativo** per i pazienti con malattia di Crohn, vengono proposti solo trattamenti sintomatici.

L'eziologia della malattia di Crohn è multifattoriale

Fattori ambientali

- **Fumo**
- Consumo di una **dieta** a basso contenuto di fibre arricchita di grassi e zuccheri totali

Composizione anormale del microbiota intestinale

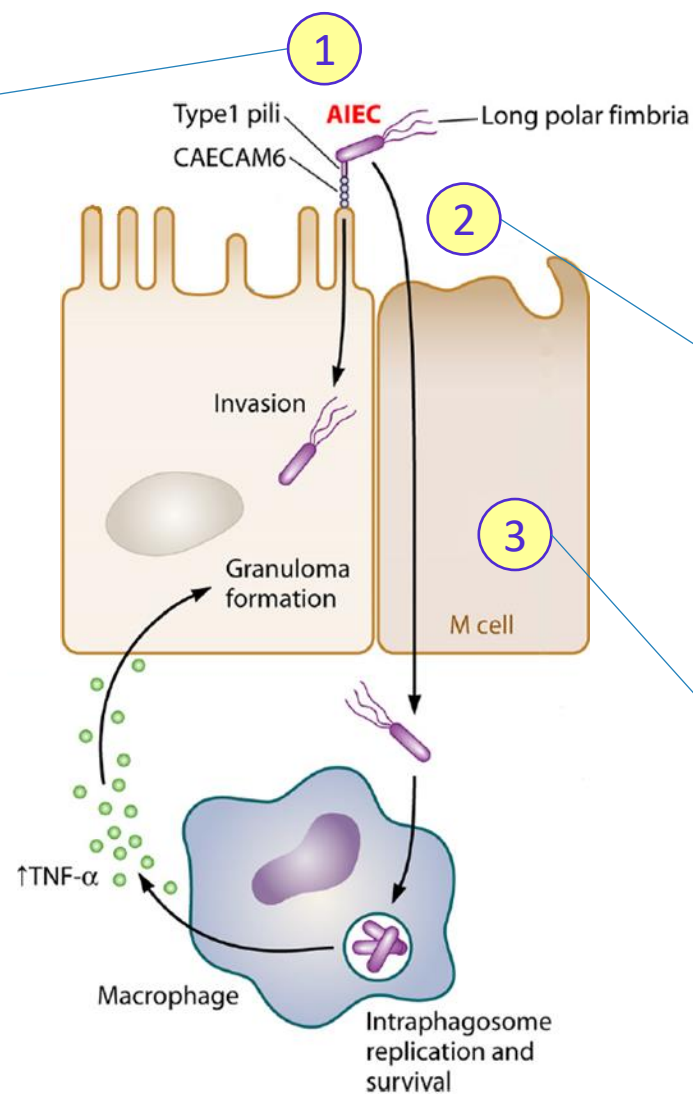
- **Disbiosi** con diminuzione di batteri benefici come quelli del phylum *Firmicutes* e da un aumento dei phyla *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. Tra gli enterobatteri, membri del phylum dei *Proteobacteria*, particolari ceppi **AIEC** sono stati identificati nella mucosa ileale e del colon infiammato dei pazienti con malattia di Crohn.

Suscettibilità genetica

- Polimorfismi nel **gene NOD2**, coinvolto nel **riconoscimento** intracellulare del muramil dipeptide (**MDP**) batterico.
- Mutazioni nei **geni coinvolti nel percorso dell'autofagia**, importanti per l'eliminazione dei batteri intracellulari, come ATG16L1 e IRGM.

Le principali caratteristiche della patogenesi dell'AIEC

**Attraversamento del
muco intestinale**



**Interazione con l'epitelio intestinale:
adesione alle cellule epiteliali
intestinali e invasione**

**Induzione
dell'infiammazione della
mucosa**

1

Attraversamento del muco intestinale

Uno **STRATO PROTETTIVO DI MUCO** ricopre la superficie dell'epitelio intestinale ed è composto da glicoproteine che formano gel chiamate **MUCINE**, secrete da cellule caliciformi specializzate → fondamentale nella protezione contro molti agenti patogeni intestinali.

Nei pazienti con **malattia di Crohn**, lo strato di muco è essenzialmente continuo e paragonabile alla mucosa sana, anche se sono state notate un'**espressione** e una **glicosilazione anomale delle mucine**, che rendono lo strato di muco più penetrabile da batteri commensali e patogeni. Le strutture dei carboidrati sulle mucine vengono prese di mira dai batteri patogeni per il loro attaccamento alla mucosa intestinale.

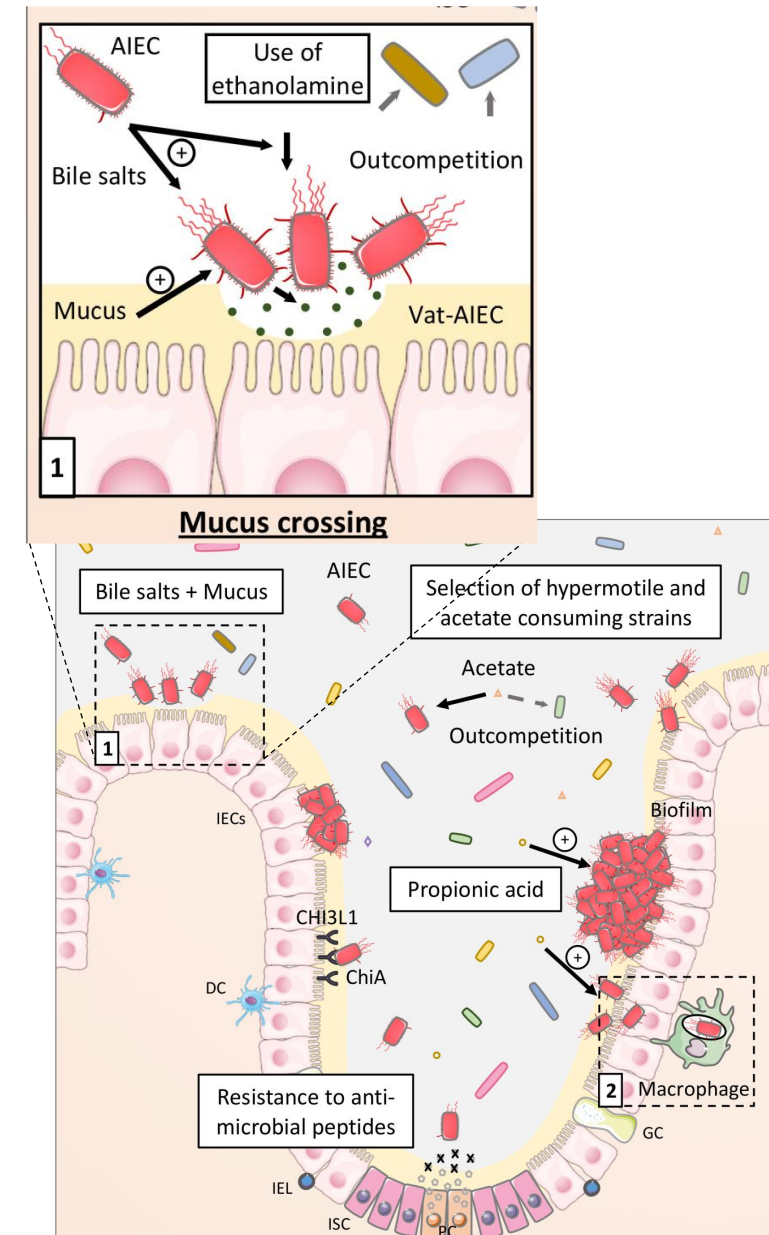
- La **mucinas Vat-AIEC** contribuisce alla virulenza degli AIEC nella prima fase dell'infezione poiché favorisce la penetrazione degli AIEC attraverso lo strato di muco, diminuendo la viscosità del muco, e la loro adesione agli IEC → l'**upregolazione** dell'espressione genica vat-AIEC è dovuta ai **sali biliari** e alla **mucina**.
- Le **cellule di Paneth**, presenti nella cripta dell'intestino tenue, **secretono peptidi antimicrobici** come α - e β -defensine, catelicidine, e lisozima che diffondono, seguendo un gradiente di concentrazione, all'interno dello strato di muco. I batteri AIEC devono trarre **vantaggio dalle carenze nella secrezione di defensine** nei pazienti con malattia di Crohn o **sviluppare resistenza ai peptidi antimicrobici**.

2

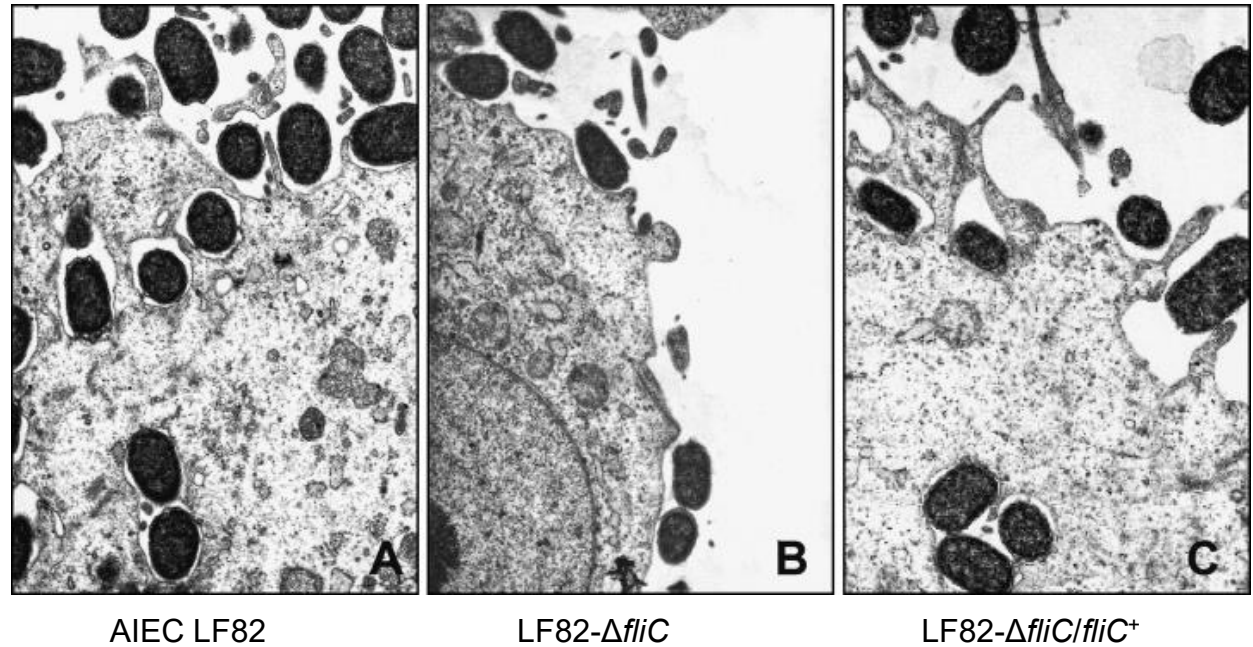
Adesione e invasione

3

Induzione dell'infiammazione



- I **flagelli** dei batteri AIEC, che sono organelli filamentosi che consentono la mobilità batterica, codificati dal gene *fliC*, svolgono un ruolo centrale nel processo di adesione dei batteri agli IEC direttamente *attraverso* la motilità, e indirettamente, mantenendo l'espressione del pilo di tipo 1.



- È stato identificato il **fenotipo ipermotile** selezionato durante l'evoluzione dell'AIEC in condizioni gastrointestinali. Il sequenziamento del genoma ha rivelato che l'ipermotilità dei ceppi selezionati era dovuta all'integrazione di una sequenza di inserzione mobile a monte del regolatore flagellare principale, *flhDC*, che ha potenziato l'invasione dell'AIEC e promosso la creazione di una nicchia mucosale.
- La **flagellina** viene espressa anche dai batteri commensali senza indurre un'infiammazione incontrollata, suggerendo una **regolazione specifica** dell'espressione della flagellina nei batteri AIEC durante il processo di colonizzazione → il gene *fliC* è sovraregolato nei batteri AIEC ma non nei ceppi commensali in risposta ai **sali biliari** e alla **mucina**.

1

Attraversamento del muco intestinale

2

Adesione e invasione

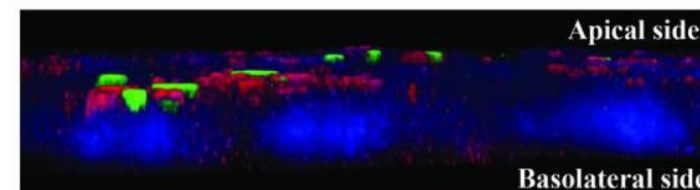
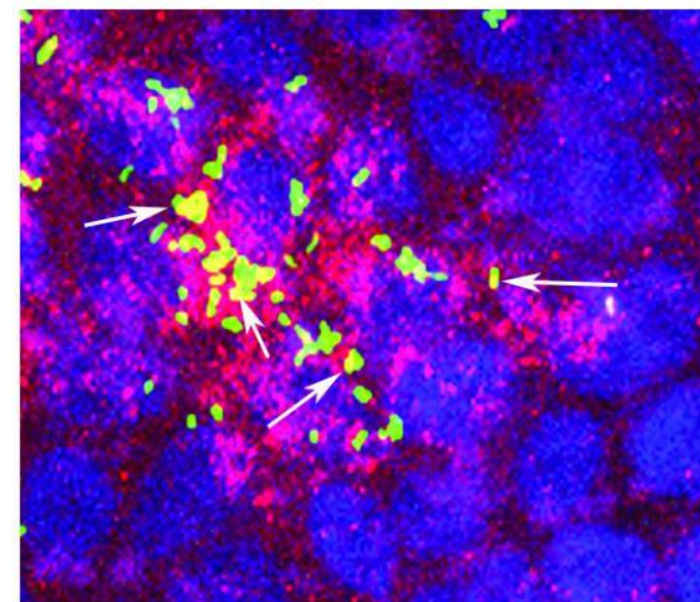
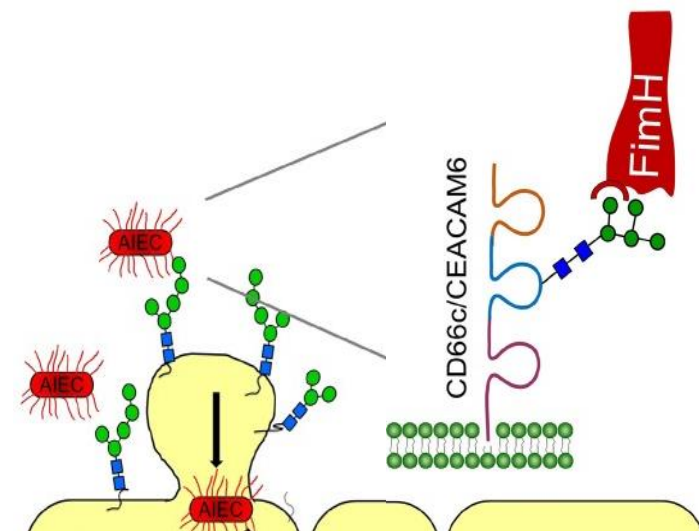
3

Induzione dell'infiammazione

Interazione CEACAM6-FimH

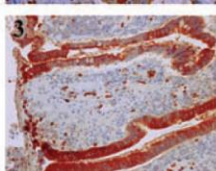
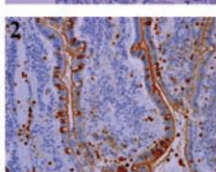
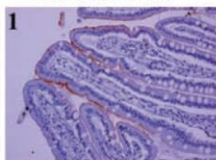
FimH è un'adesina situata sulla punta dei pili di tipo 1 altamente espressa dai batteri AIEC e coregolata con l'espressione dei flagelli.

CEACAM6 (molecola di adesione cellulare correlata all'antigene carcinoembrionale 6) è una proteina complessa, altamente glicosilata, che appartiene alla grande superfamiglia delle immunoglobuline (Ig) e consiste di un dominio simile a IgV e due domini simili a IgC2.

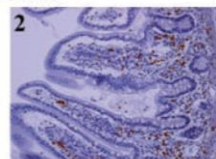
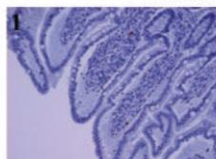


Caco-2 cells infected with GFP-expressing LF82 bacteria

A CD patients Anti-CEACAM6



B Control patients Anti-CEACAM6



È interessante notare che, in **condizioni fisiologiche**, CEACAM6 **non è espressa** dalle cellule epiteliali ileali, ma è stata trovata **espressa a un livello importante** nella mucosa ileale dei pazienti con **malattia di Crohn**.

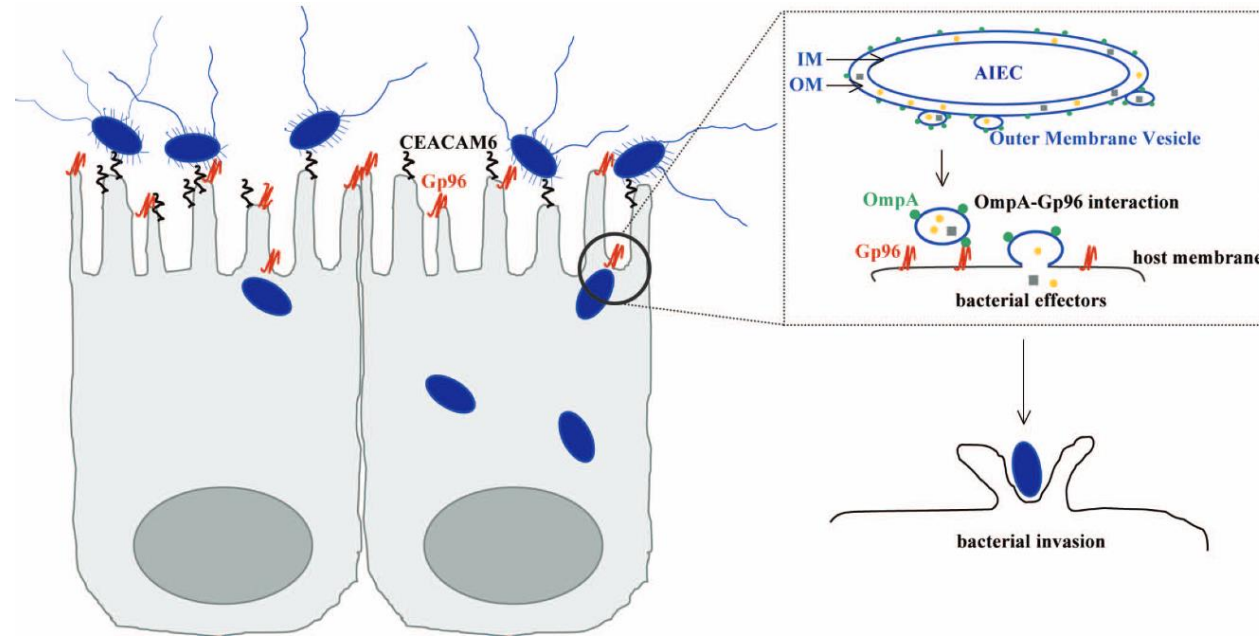
1

Attraversamento
del muco intestinale

2

Adesione e invasione

3

Induzione
dell'infiammazioneFattori di virulenza che
mediano l'invasione

- **Interazione OmpA-Gp96** → Le **vescicole della membrana esterna (OMV)**, ricche di proteina **OmpA** sulla superficie, vengono rilasciate dagli AIEC e mediano la capacità dei batteri di invadere le IEC attraverso l'interazione con le **Gp96**, anormalmente espresse nei pazienti con CD. Le OMV sono in grado di fondersi con la membrana cellulare dell'ospite, promuovendo l'invasione batterica attraverso il rilascio all'interno delle cellule dell'ospite di **effettori batterici**, ancora non identificati.

- **Invasina IbeA** → un'**invasina** della membrana esterna che **interagisce con** i recettori dell'ospite come la **vimentina**. Si è scoperto che IbeA è fondamentale per la capacità dell'AIEC di invadere le cellule ospiti e colonizzare l'intestino murino. È interessante notare che questi risultati sono stati confermati da una recente analisi del trascrittoma *in vivo* di AIEC, che ha rivelato che *ibeA* è sovraregolato durante la fase iniziale dell'infezione dell'ospite.

1

Attraversamento del muco intestinale

2

Adesione e invasione

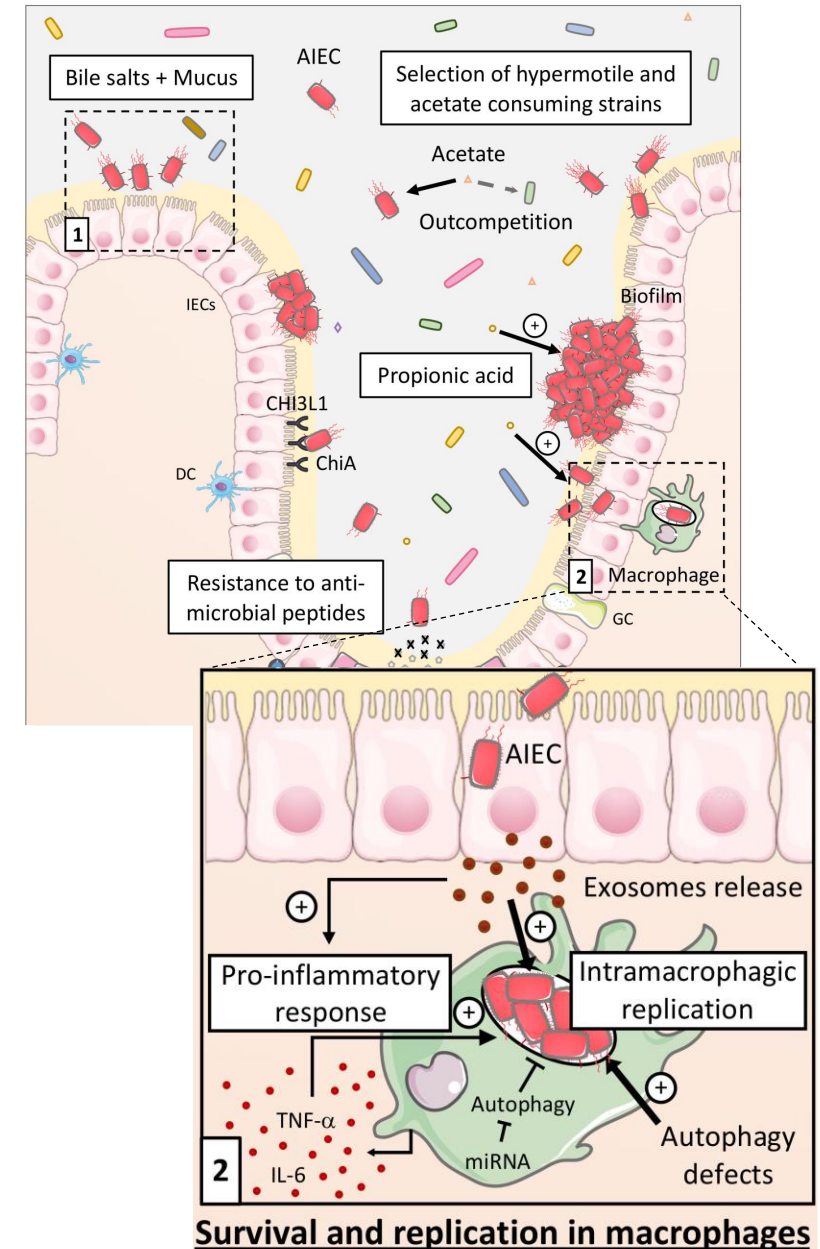
3

Induzione dell'infiammazione

Oltre all'invasione delle cellule epiteliali intestinali, l'AIEC è anche in grado di **traslocare attraverso l'epitelio** per accedere al tessuto linfoide sottostante, la lamina propria. L'AIEC esprime **lunghe fimbrie polari** che interagiscono con le **cellule M**, un monostato di cellule epiteliali specializzate sulla superficie delle placche di Peyer, consentendo all'AIEC di accedere alla **LAMINA PROPRIA**.

Ottenuto l'accesso alla lamina propria, avviene l'incontro con i **MACROFAGI** che sono cellule chiave del sistema immunitario innato:

- Possono riconoscere MAMP (LPS, flagelli e peptidoglicano) attraverso recettori di riconoscimento di pattern (PRR) come i TLR. L'interazione tra TLR e MAMP attiva le vie NF- κ B, MAPK e IRF che portano all'espressione di geni che codificano per **citochine pro-infiammatorie** come **TNF- α** o **IL-6**.
- Limitano anche la diffusione batterica attraverso la **fagocitosi** e la presentazione di antigeni per attivare le cellule immunitarie adattative → I batteri **AIEC** sono in grado di **sopravvivere e replicarsi** all'interno dei macrofagi, **nei fagolisosomi**, senza indurne la morte cellulare. La replicazione continua dell'AIEC nei macrofagi infetti determina la secrezione di **alti livelli di TNF- α** , causando infiammazione intestinale e formazione di granulomi nei pazienti con malattia di Crohn.



1

Attraversamento
del muco intestinale

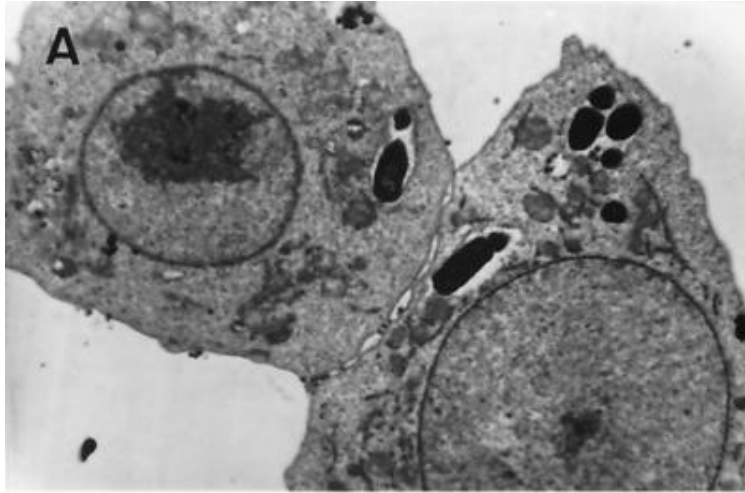
2

Adesione e invasione

3

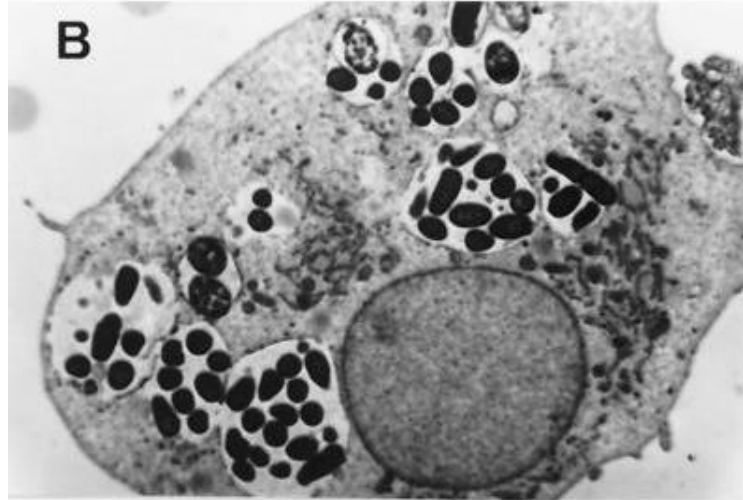
Induzione
dell'infiammazione

TEM di macrofagi J774-A1 infettati con un MOI di 10 batteri AIEC LF82 per cellula



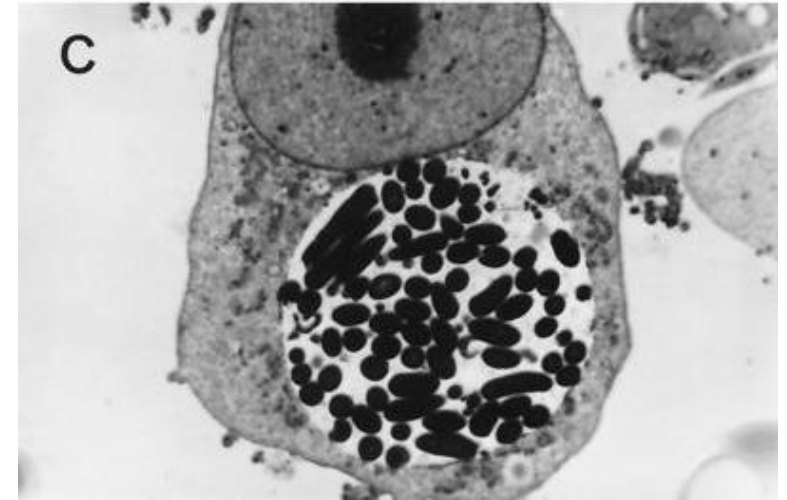
1 ora dall'infezione

I batteri AIEC LF82
si osservano in
piccoli vacuoli



8 ore dall'infezione

La dimensione dei
vacuoli aumenta



24 ore dall'infezione

Fusione dei fagosomi
che porta alla
**formazione di un
grande vacuolo**

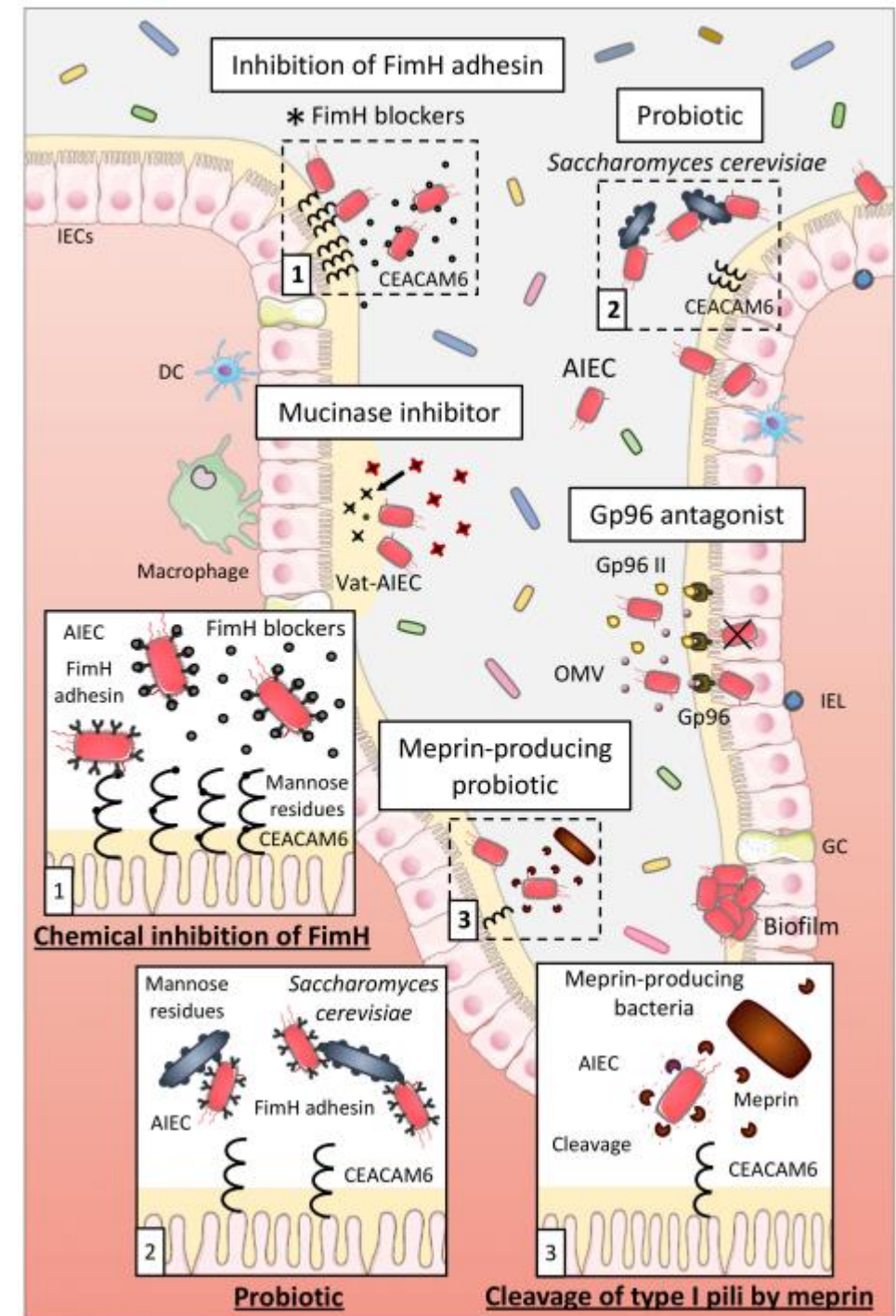


La **formazione di fagosomi spaziosi** può promuovere la sopravvivenza di LF82 mediante **diluizione di composti lisosomiali tossici** o **attenuazione di fattori antimicrobici**, inclusa la **diminuzione dell'acidificazione** dei fagosomi.

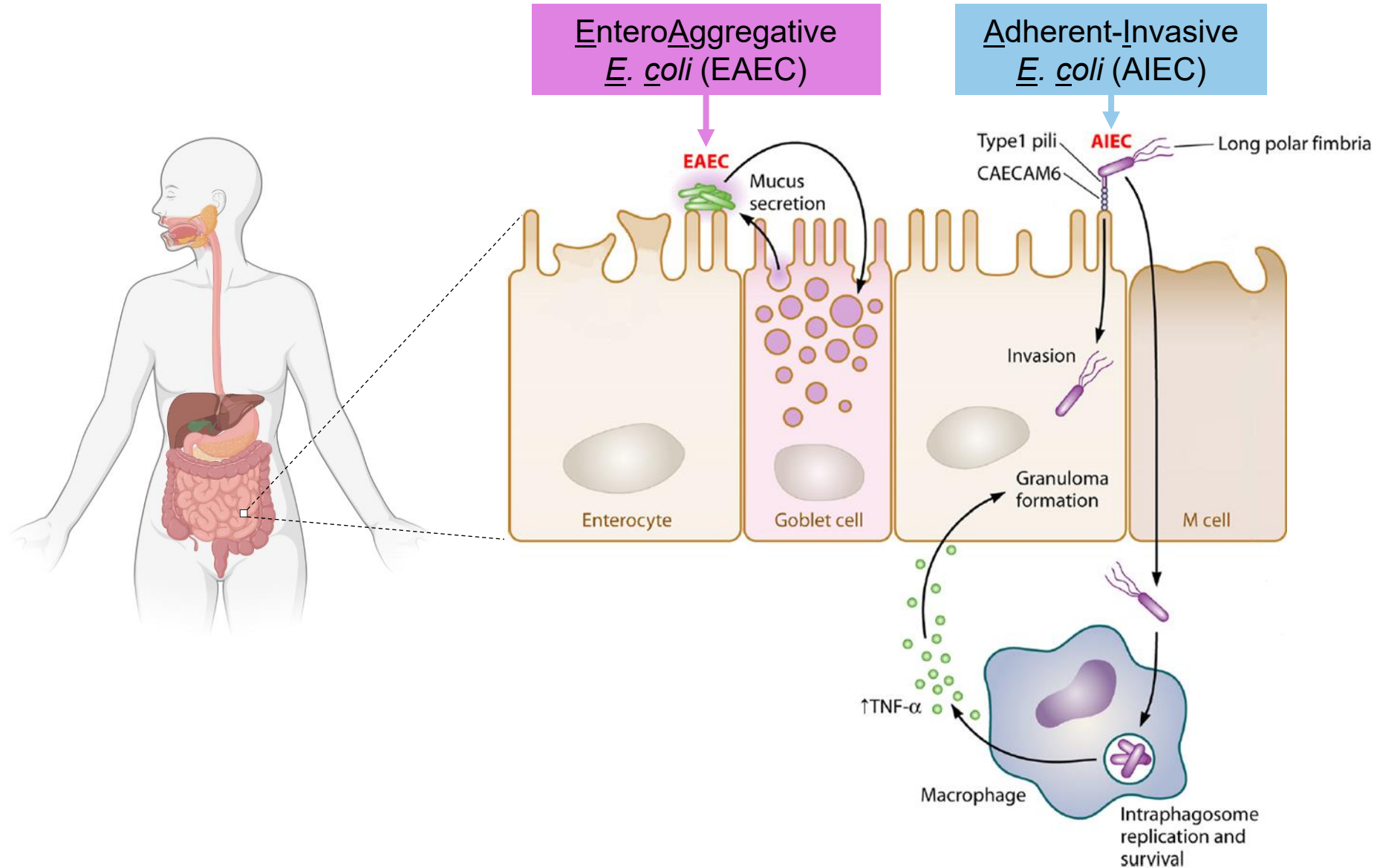
Strategie terapeutiche per AIEC

La CD mediata dall'AIEC potrebbe essere trattata utilizzando strategie coinvolte nella prevenzione della replicazione, dell'adesione e dell'invasione dell'AIEC.

- Lavaggi intestinali o farmaci antibatterici, come gli **antibiotici** (effetti drastici sulla composizione microbica e sullo stato immunitario dell'intestino).
- Blocco dell'interazione tra pili di tipo 1 e CAECAM6 → **antagonisti del mannosio** naturali o artificiali
- Inibizione della funzione dei pili di tipo 1 → prevenendo l'assemblaggio del pilo utilizzando i **pilicidi** attualmente disponibili (Meprin).
- **Inibizione competitiva** → somministrazione di **probiotici** a base di lievito, poiché esprimono pareti cellulari ricche di residui di mannosio liberi, che fungerebbero da ligandi esca per i pili di tipo 1.
- **Strategie terapeutiche** mirate a **Gp96** o alle **OmpA**, al fine di bloccare l'invasione dell'AIEC delle cellule epiteliali intestinali.



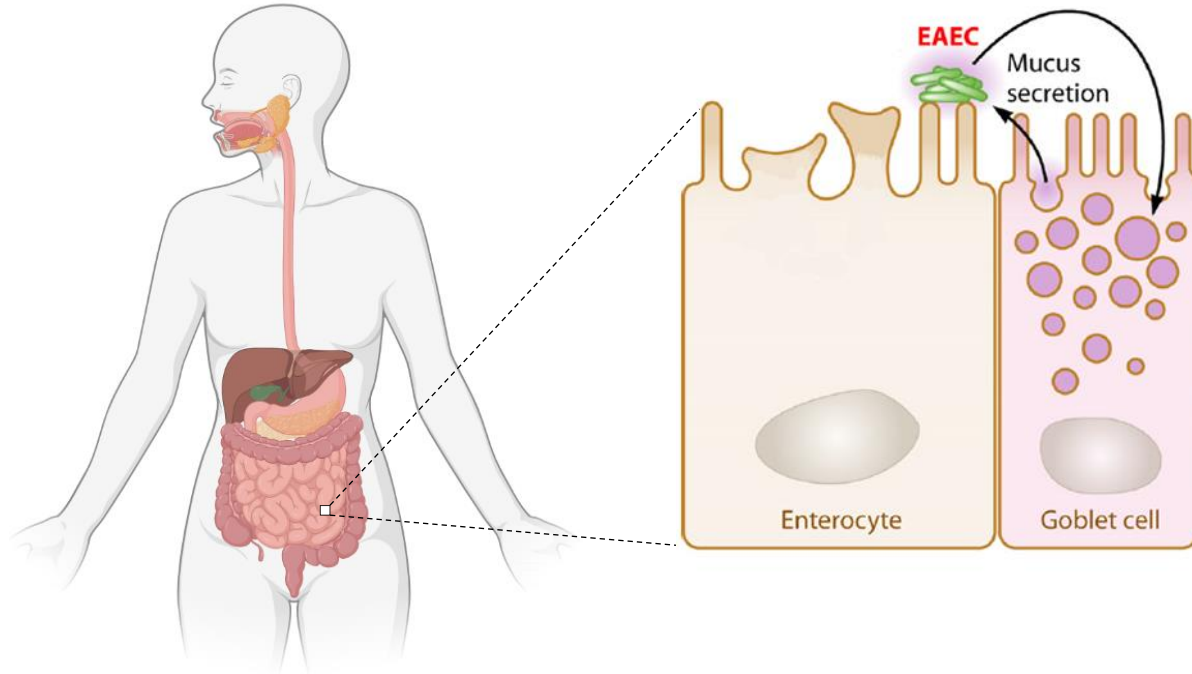
EAEC e AIEC



Discuteremo di **EAEC** e **AIEC** nel contesto:

- dell'identificazione
- dell'epidemiologia
- della patogenesi e dei fattori di virulenza

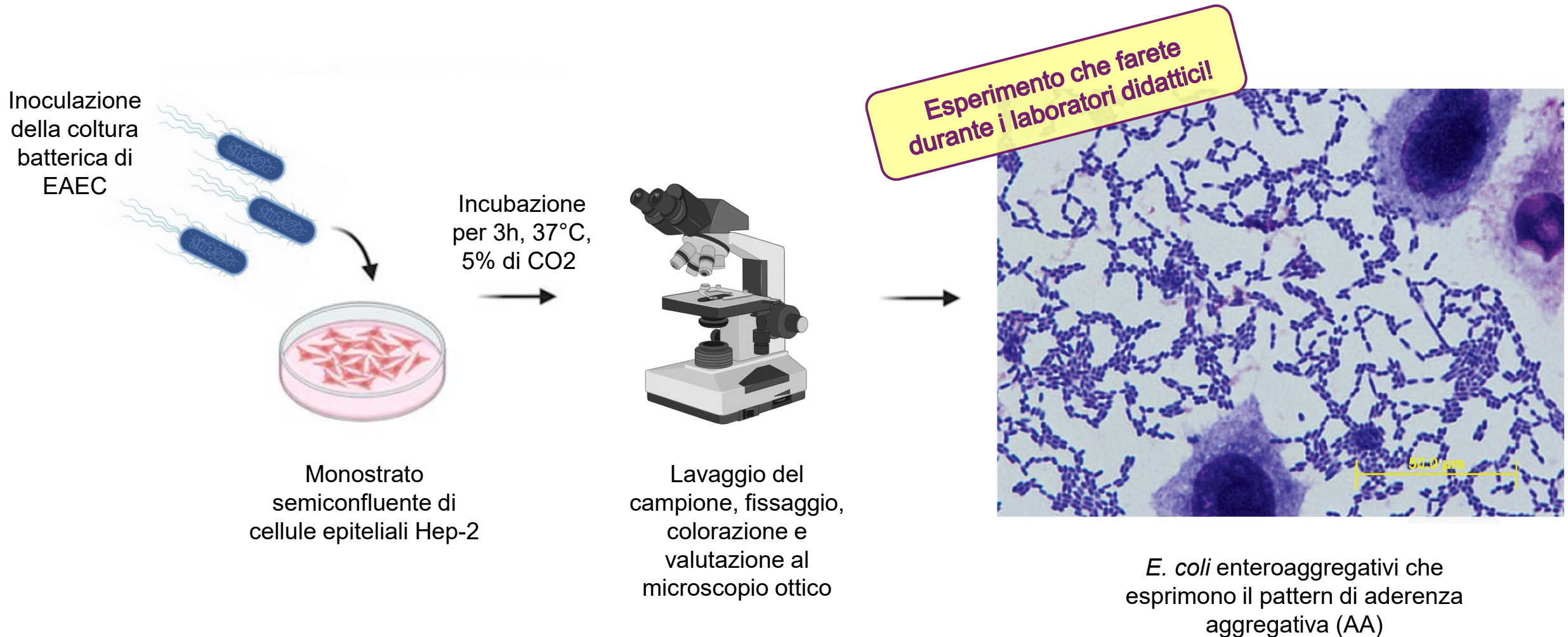
Escherichia coli enteroaggregativo (EAEC)



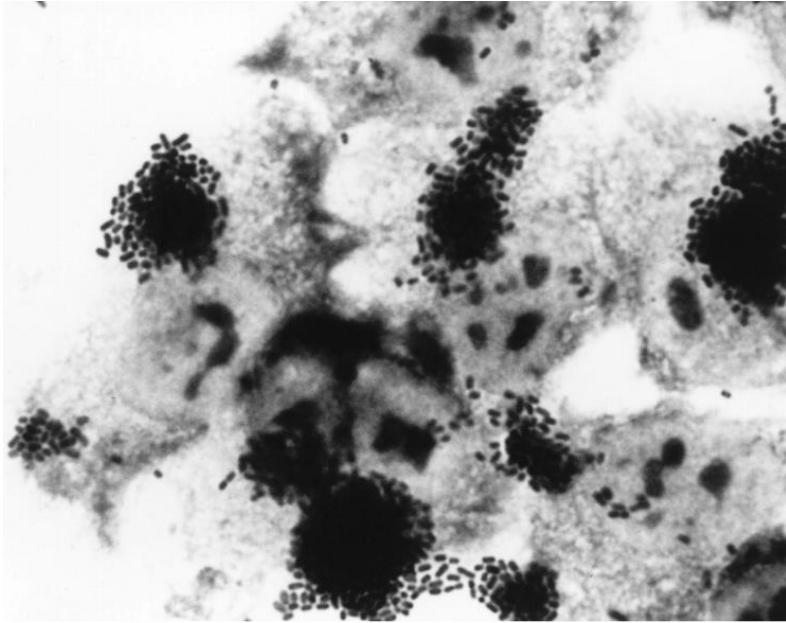
L'*E. coli* enteroaggregativo (EAEC) è stato **identificato** per la prima volta in Cile nel **1987** da Nataro e colleghi, in uno **studio epidemiologico sulla diarrea infantile** che confrontava i modelli di aderenza di oltre 500 isolati clinici

↓
Uno dei test fenotipici più utili per la diagnosi dell'*E. coli* diarroico è il **TEST DI ADERENZA** alle cellule **HEp-2**

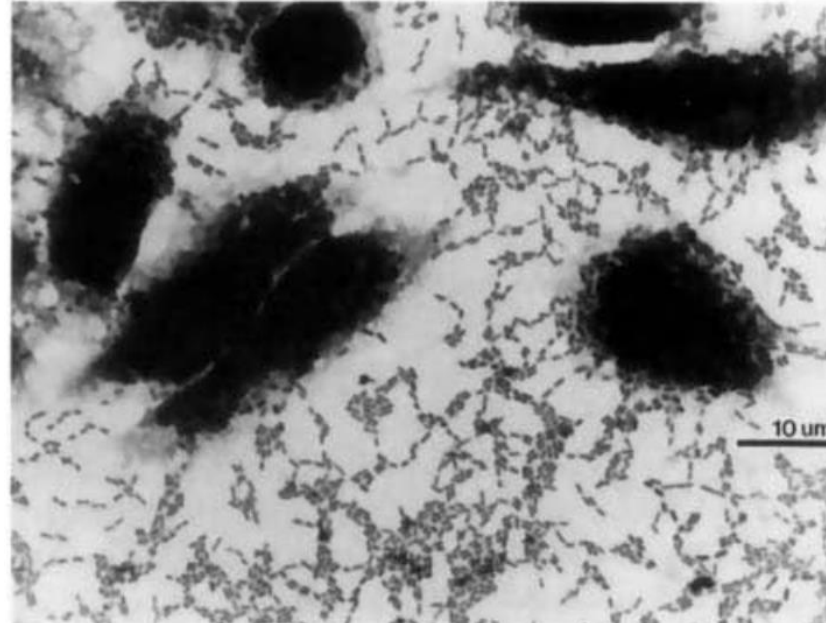
Saggio di aderenza alle cellule HEp-2



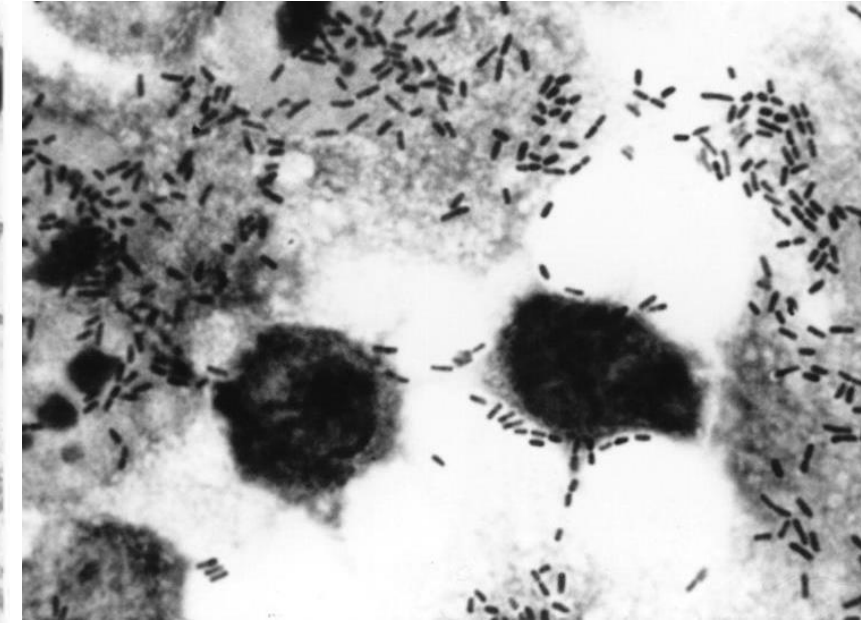
Identificazione e classificazione *Echerichia coli* enteroaggregativo (EAEC)



EPEC → Aderenza localizzata (LA)
con cluster o microcolonie sulla
superficie delle cellule HEp-2.



EAEC → Aderenza aggregativa (AA)
con prominente autoagglutinazione
delle cellule batteriche tra loro, sulle
cellule e sul vetrino coprioggetto libero.
Imprescindibile **configurazione a
mattoni impilati (stacked brick)**.



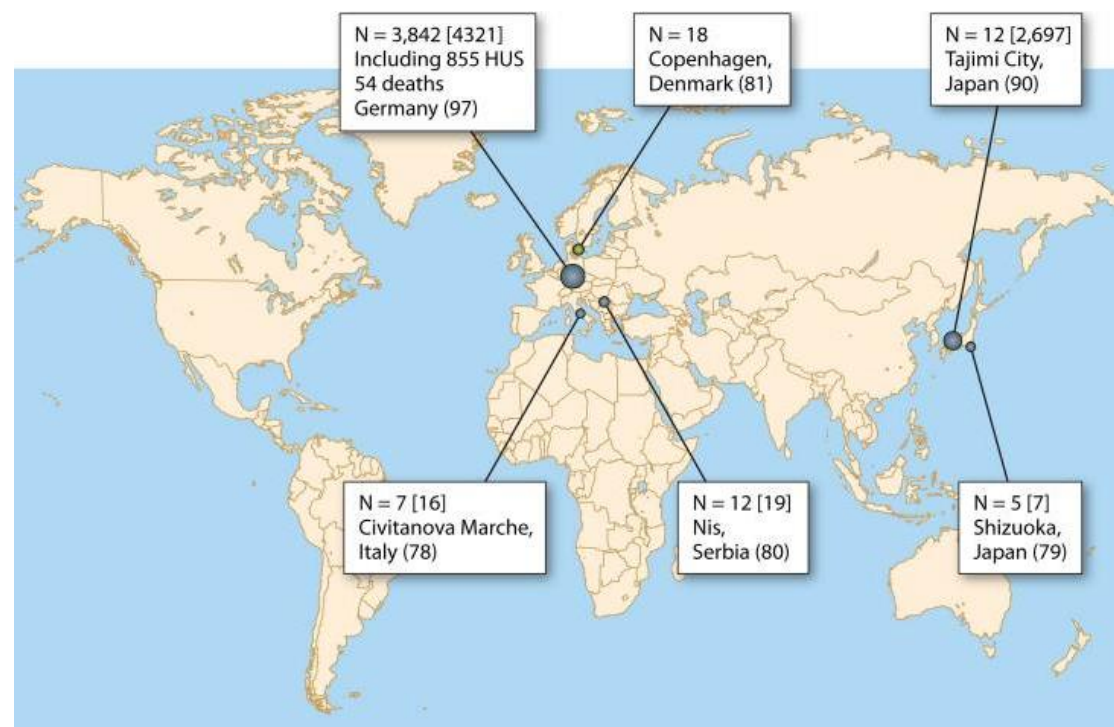
DAEC → Aderenza diffusa (DA)
con dispersione sulla superficie
delle cellule HEp-2, scarsa
aggregazione e scarsa aderenza
al vetrino libero.

EAEC: epidemiologia generale e caratteristiche cliniche

- ❖ Da quando è stato descritto nel 1987, l'EAEC è considerato un agente **patogeno emergente di origine alimentare**, associato principalmente a:
 - **diarrea infantile** acuta e persistente (**≥ 14 gg**) e a ritardo della crescita nei paesi sviluppati e in via di sviluppo.
 - **diarrea** acuta e persistente **del viaggiatore** dopo l'ETEC nei paesi sviluppati e in via di sviluppo
 - **infezioni enteriche** nei pazienti con **HIV/AIDS**.

EAEC: epidemiologia generale e caratteristiche cliniche

- ❖ Da quando è stato descritto nel 1987, l'EAEC è considerato un agente **patogeno emergente di origine alimentare**, associato principalmente a:
 - **diarrea infantile** acuta e persistente (**≥ 14 gg**) e a ritardo della crescita nei paesi sviluppati e in via di sviluppo.
 - **diarrea** acuta e persistente **del viaggiatore** dopo l'ETEC nei paesi sviluppati e in via di sviluppo
 - **infezioni enteriche** nei pazienti con **HIV/AIDS**.
- ❖ Diversi **focolai di gastroenterite** causati da **EAEC** sono stati segnalati in **Paesi a basso e alto reddito**, associate al consumo di alimenti contaminati:
 - nel **1997** in **Giappone** un'epidemia ha fatto ammalare 2.697 bambini.
 - nel **1997** in un villaggio dell'**India** si verificò un'epidemia diarroica dell'EAEC che colpì circa il 15% della popolazione.
 - nel **2008**, in **Italia** i focolai di EAEC sono stati trasmessi da formaggio non pastorizzato.
 - Rilevati ceppi diarrogeni dell'EAEC nel **continente africano**, in Mali, Libia, Africa sub-sahariana e Nigeria.
 - nel **2011** in **Germania** un'epidemia ha colpito 4.321 persone con più di 50 decessi. È stato riconosciuto un ceppo ibrido EAEC/STEC, che codifica per Stx.

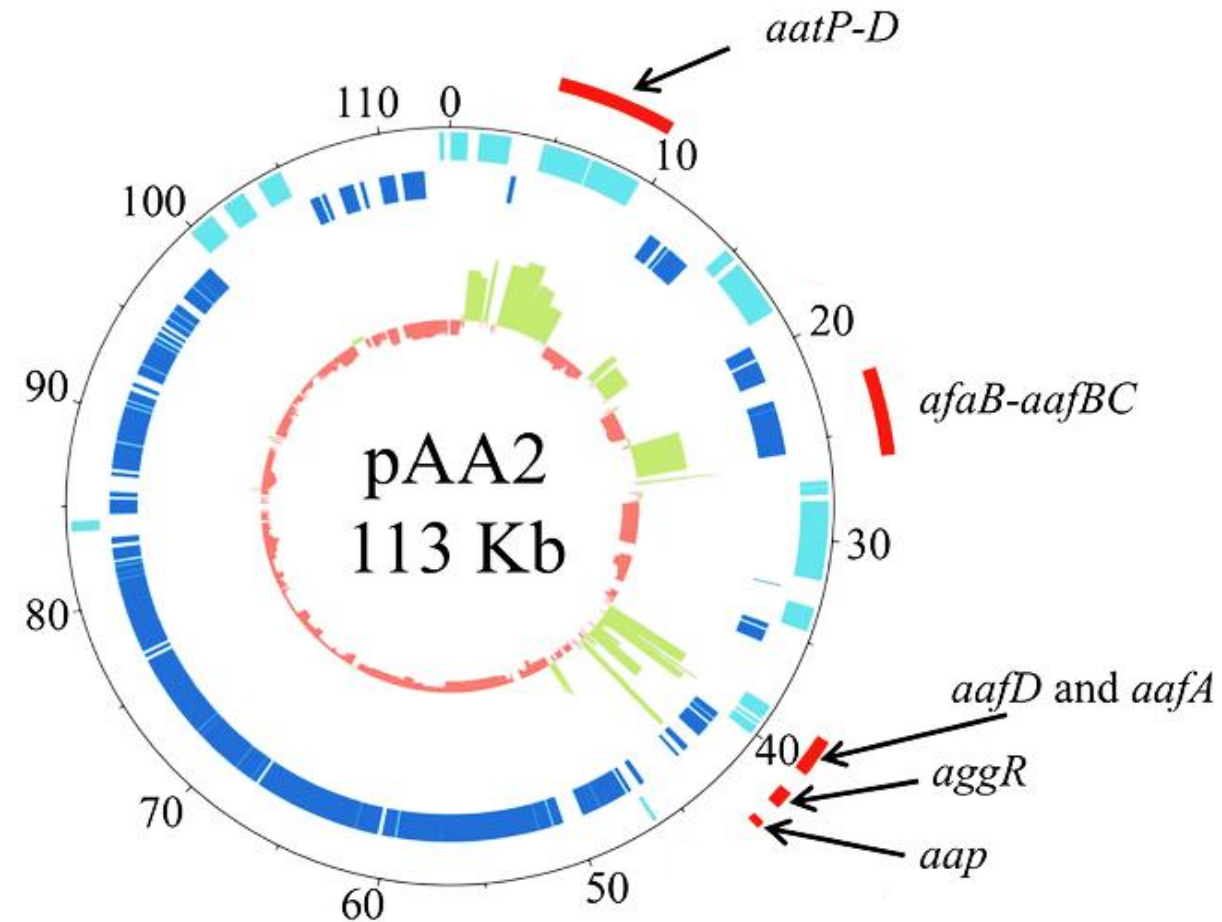


Plasmide di aderenza aggregativa (pAA)

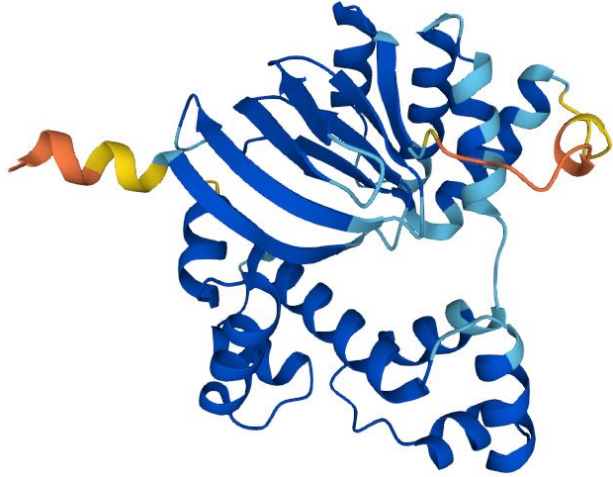
Il modello a "mattoni impilati" che caratterizza l'adesione dell'EAEC sulla cellula epiteliale dipende da fattori codificati dai geni che si trovano sul **plasmide di aderenza aggregativa (pAA)**.

pAA è un plasmide di 72–120 Kb, che **codifica** diversi **fattori di virulenza** come:

- fimbrie di aderenza aggregativa (**AAF**, *agg/aaf*)
- proteina antiaggregazione (**Dispersina**, *aap*)
- trasportatore della proteina antiaggregazione (*aatPABCD*)
- attivatore trascrizionale AggR (*aggR*)
- plasmid-encoded toxin (**Pet**, *pet*)
- enteroaggregative heat-stable toxin (**EAST-1**, *astA*)

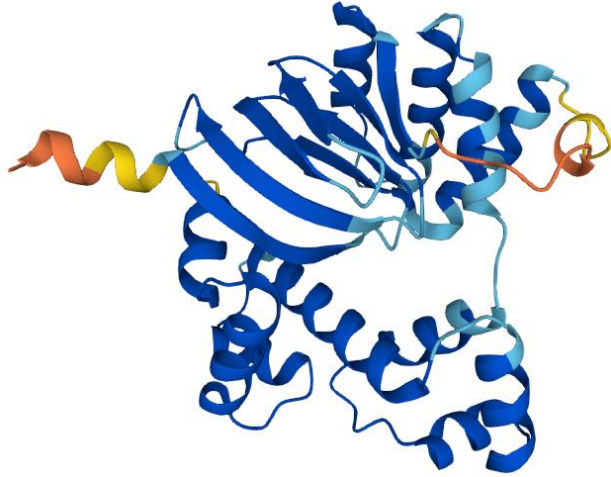


AggR come regolatore della virulenza negli EAEC



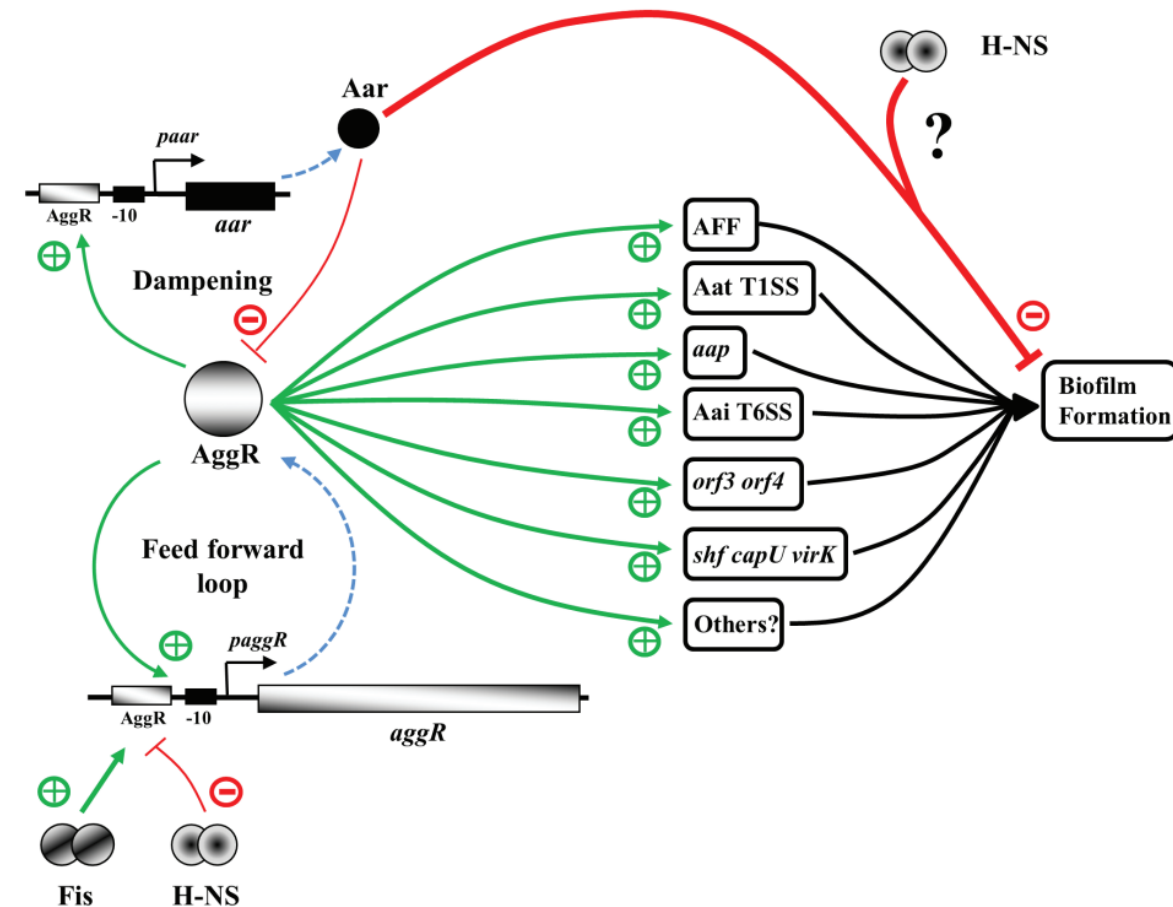
AggR è un attivatore trascrizionale e regola l'espressione di vari fattori di virulenza presenti nel cromosoma e nel plasmide pAA dell'EAEC

AggR come regolatore della virulenza negli EAEC

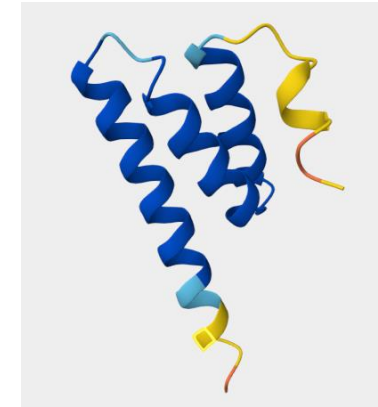
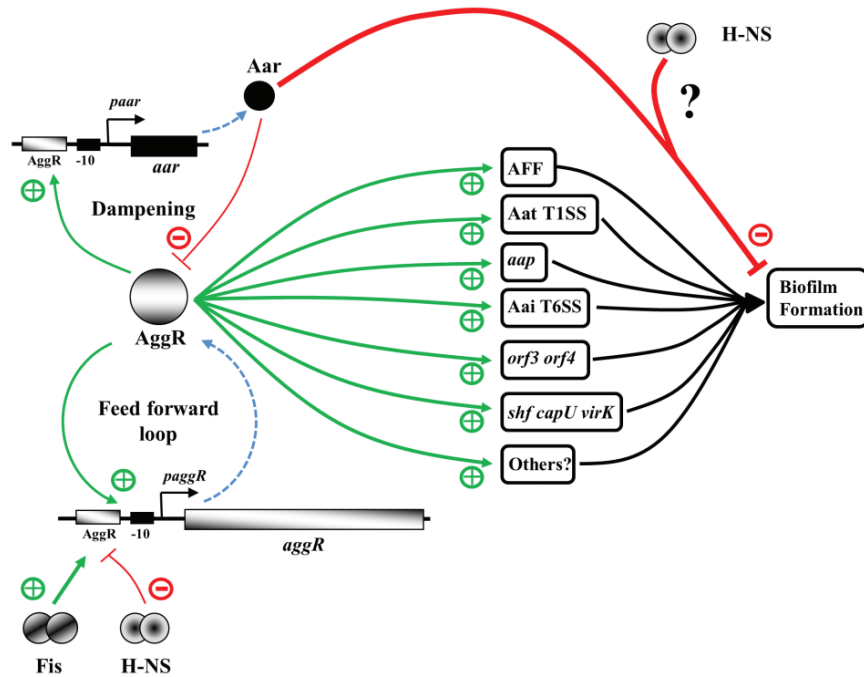


AggR è un attivatore trascrizionale e regola l'espressione di vari fattori di virulenza presenti nel cromosoma e nel plasmide pAA dell'EAEC

- Proteina della **famiglia di fattori di trascrizione AraC-XylS** che presentano diverse caratteristiche conservate e includono anche AraC, CfaR, Rns, ToxT, e VirF (il master regulator in *Shigella*).
- I **regolatori negativi** dell'espressione di *aggR* includono la proteina associata al nucleoide **H-NS** (che in genere agisce come inibitore trascrizionale legandosi a sezioni curve del DNA) e la proteina **Aar**, membro della famiglia di regolatori negativi AraC.
- I **regolatori positivi** dell'espressione di *aggR* includono sia la proteina **Fis** (che si lega al DNA sotto forma di dimeri e generalmente attiva la trascrizione) che il secondo messaggero nucleotidico **(p)ppGpp** (ormone). Inoltre, l'espressione di AggR è sovraregolata dall'**AggR** stesso.



Aar → AggR activated regulator



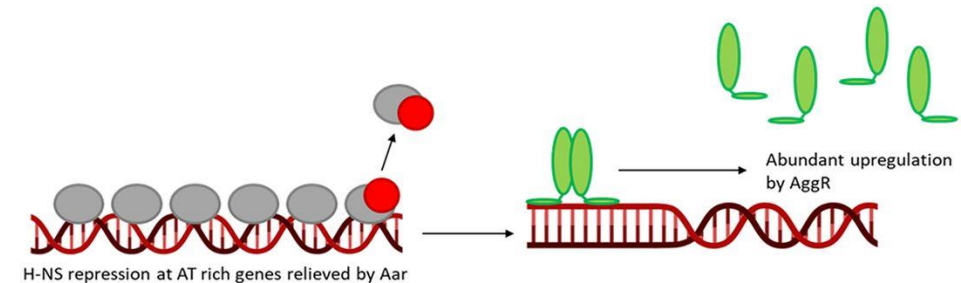
<10kDa

AggR a ctivated regulator

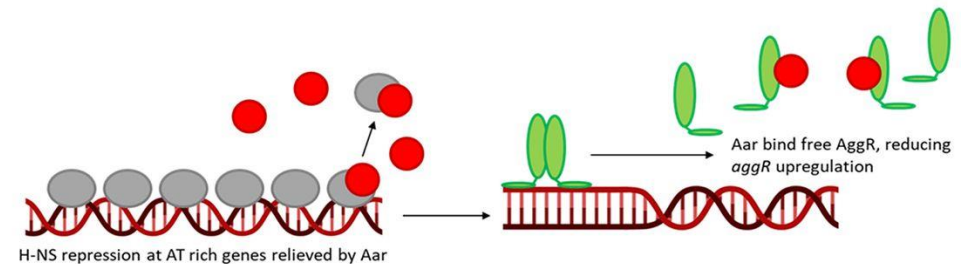
Meccanismo proposto dell'interazione AggR-Aar-Hns *in vivo*:

- quando la **concentrazione di Aar** (cerchi rossi) è **bassa**, Aar elimina la repressione di H-NS (ovalini grigi) sui geni ricchi di AT. Ciò consente ad AggR (ovalini verdi) di regolare abbondantemente l'espressione genica.
- quando la **concentrazione di Aar è elevata**, Aar rimuove la repressione H-NS ma si lega anche ad AggR. AggR è ancora in grado di upregolare l'espressione genica, ma non in modo così abbondante.

Low Aar
Concentration

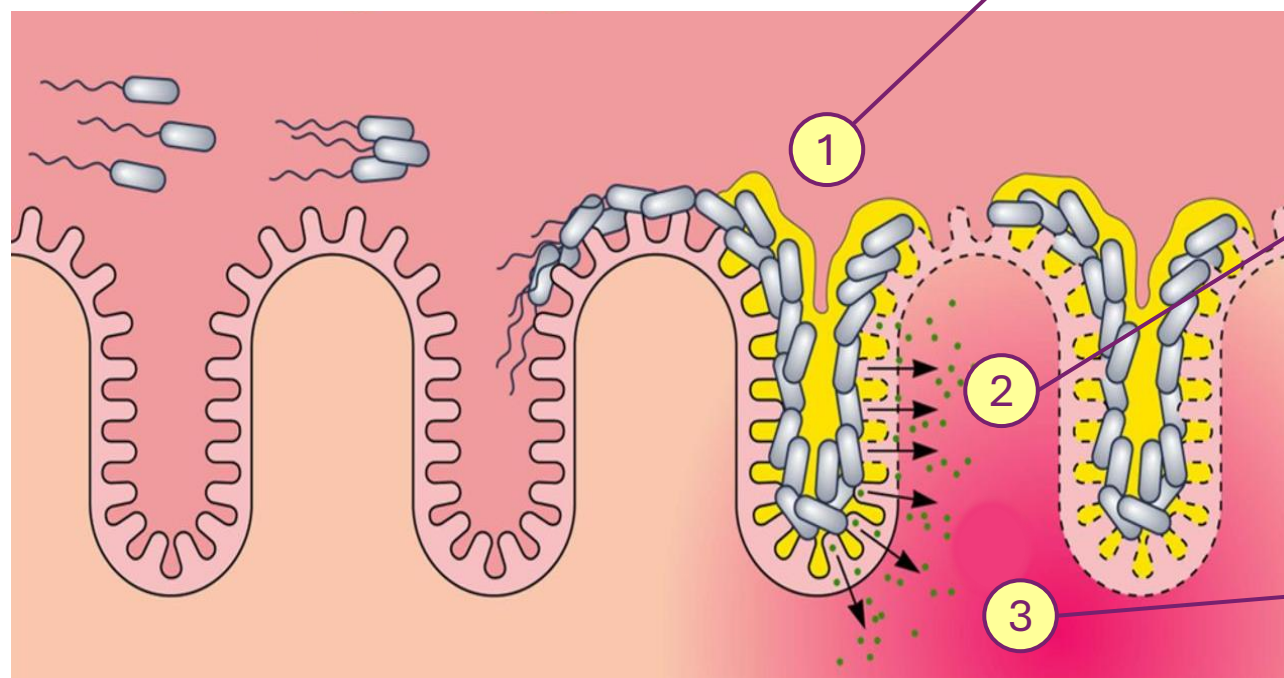


High Aar
Concentration



La patogenesi in tre fasi

- La **patogenesi di EAEC è complessa**, poiché i ceppi di EAEC sono molto eterogenei.
- Anche il **sito di infezione** nel tratto gastrointestinale **non è uniforme**: EAEC può legarsi all'epitelio del digiuno, dell'ileo e del colon.

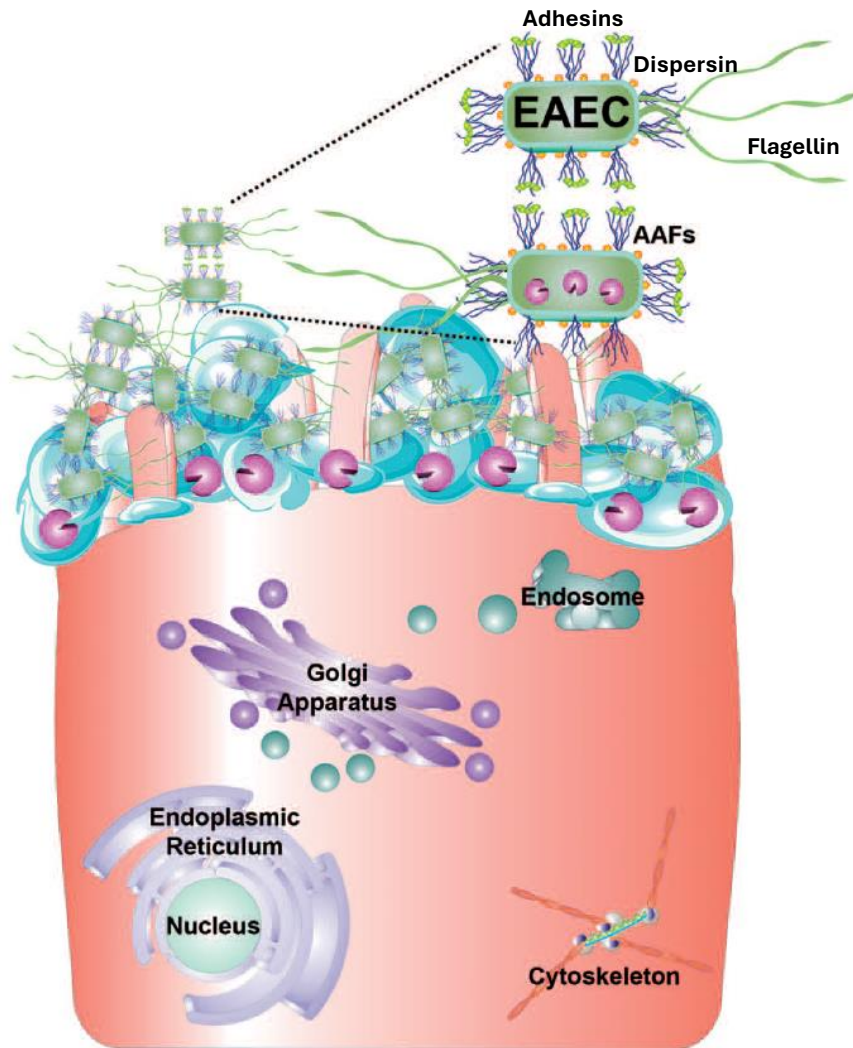


**Abbondante adesione
alla mucosa intestinale
con formazione di biofilm**

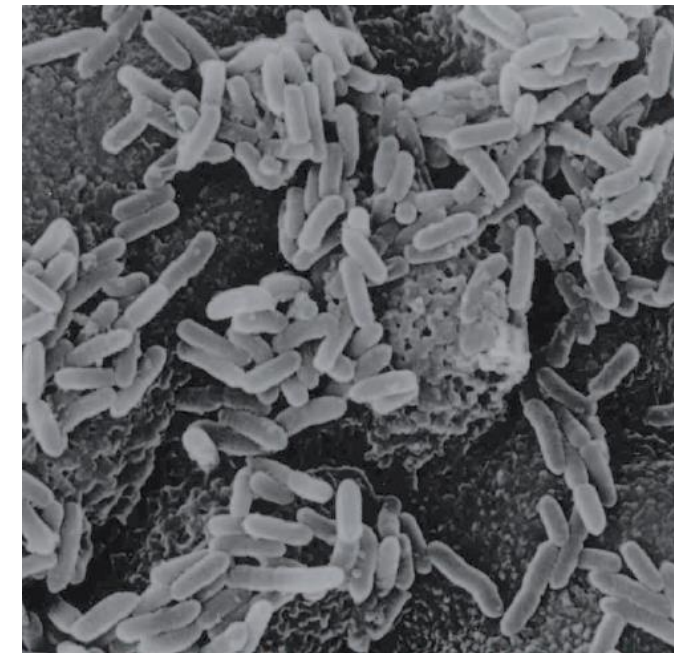
**Produzione di
enterotossine
e citotossine**

**Induzione
dell'infiammazione
della mucosa**

1

A
D
E
R
E
N
Z
A

Il **caratteristico fenotipo AA** espresso quando l'EAEC è in contatto con le cellule epiteliali in coltura, è osservabile anche sulla mucosa intestinale infettata da EAEC, dove l'adesione è caratterizzata da un **biofilm composto da aggregati di batteri** in associazione con uno **spesso strato di muco** → il biofilm favorisce l'elusione del sistema immunitario locale.



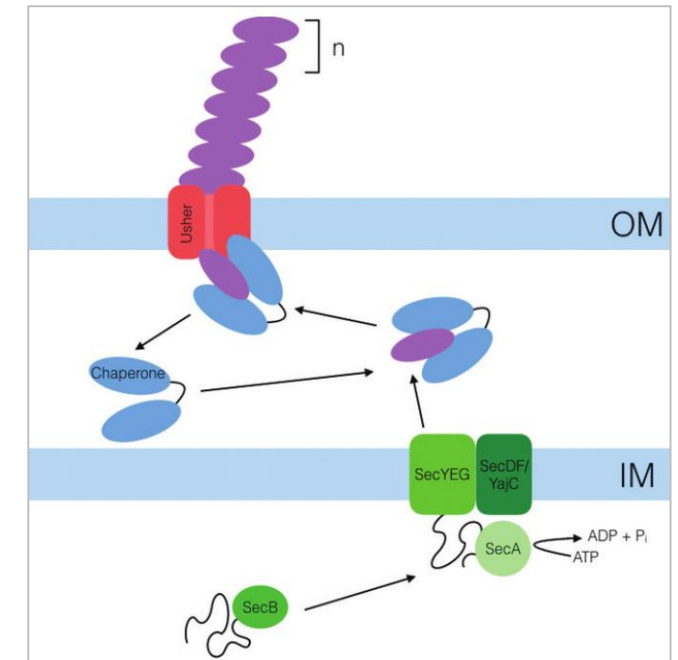
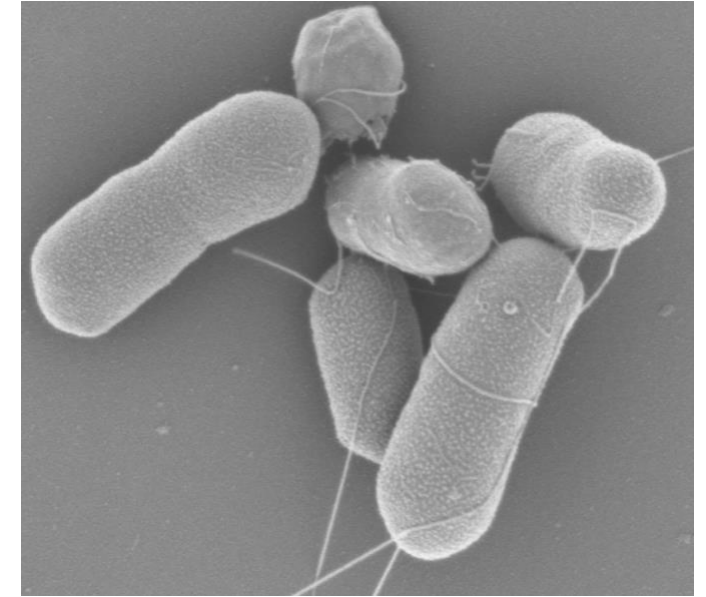
SEM of colonic specimens incubated with EAEC 042

Il fenotipo di AA è associato alla presenza di:

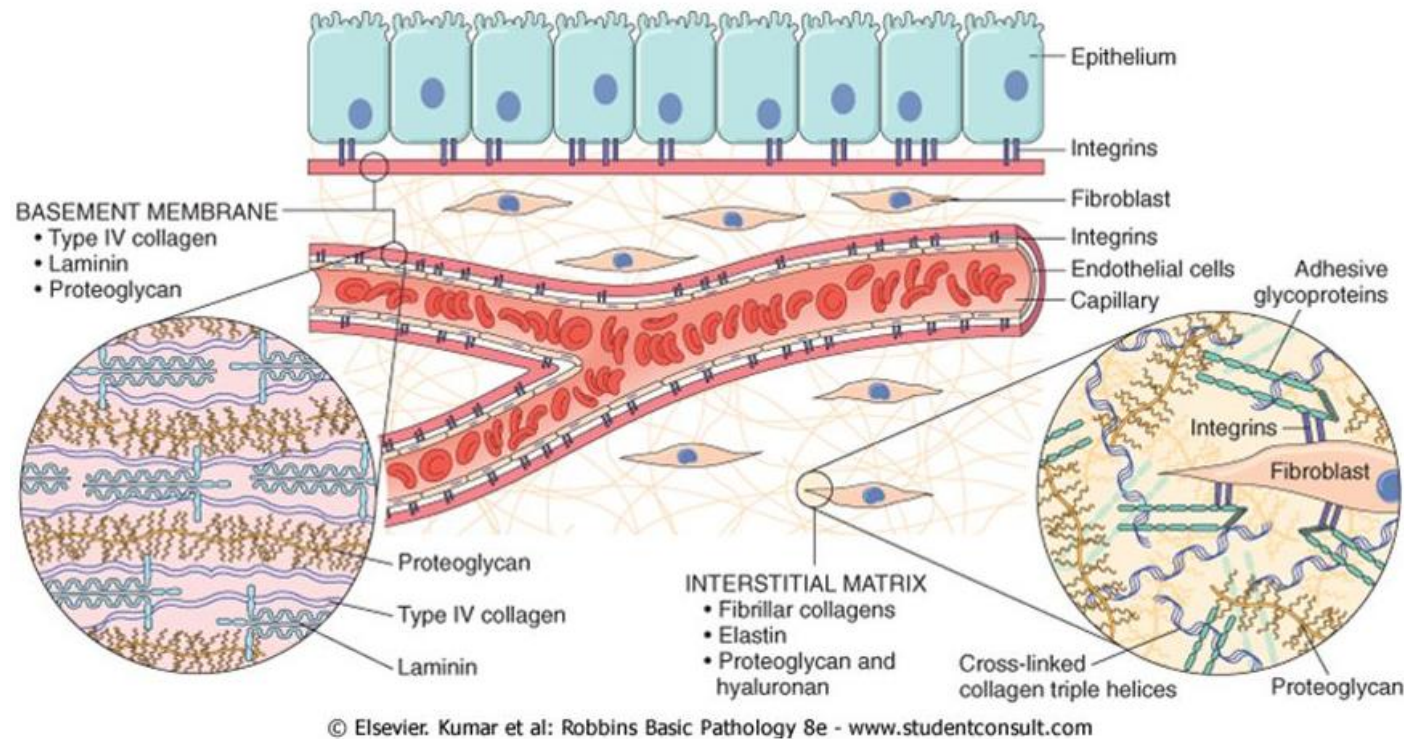
- **Pic**, una **mucinas** condivisa tra molti diversi ceppi patogeni di *E. coli* e *Shigella* spp. Consente la degradazione delle mucine per facilitare il passaggio di EAEC attraverso lo strato protettivo di muco.
- **Adesine Hra1 e Hra2** (OMP): agglutinine resistenti al calore coinvolte nell'autoaggregazione, nella formazione di biofilm e nell'adesione aggregativa.
- **Fimbrie di aderenza aggregativa** (AAF/I-AAF/IV)
- **Dispersina**: proteina anti-aggregazione.

Fimbrie di aderenza aggregativa (AAF/I-AAF/IV)

- Le AAF sono specifici fattori di adesione responsabili del riconoscimento dei recettori sulle cellule ospiti. Sono note **quattro varianti**: **AAF/I** (codificata dai geni *agg*), **AAF/II** (codificata dai geni *aaf*), **AAF/III** (*agg3*) e **AAF/IV** (codificata dai geni *agg4*).
- Le AAF espresse da *E. coli* si presentano come **fibre sottili o raggruppate** che possono estendersi fino a diversi micron dalla superficie batterica. Le stime per il **diametro** delle singole fimbrie sono:
 - nell'intervallo 2-3 nm per AAF/I,
 - fino a 5 nm di larghezza per AAF/II
 - diametro di 3-5 nm per gli AAF/III. Sono fimbrie lunghe e flessibili, ma di solito sono osservati come filamenti individuali e occasionalmente in fasci.
- La **biogenesi** delle AAF utilizza la **via chaperone-usher** e sono costituite da due subunità proteiche secrete, una subunità maggiore e una presunta subunità minore. Mentre le subunità minori sono relativamente conservate all'interno della sottofamiglia, le subunità maggiori di AAF mostrano solo una somiglianza di sequenza marginale tra loro.



- È stato recentemente dimostrato che la subunità principale di **AAF/II media l'attaccamento** del ceppo EAEC 042 ai **componenti della matrice extracellulare** (fibronectina, laminina e collagene di tipo IV) → questo dimostra il ruolo delle fimbrie di EAEC nell'adesione alla mucosa intestinale, ma il meccanismo di riconoscimento resta ancora sconosciuto.

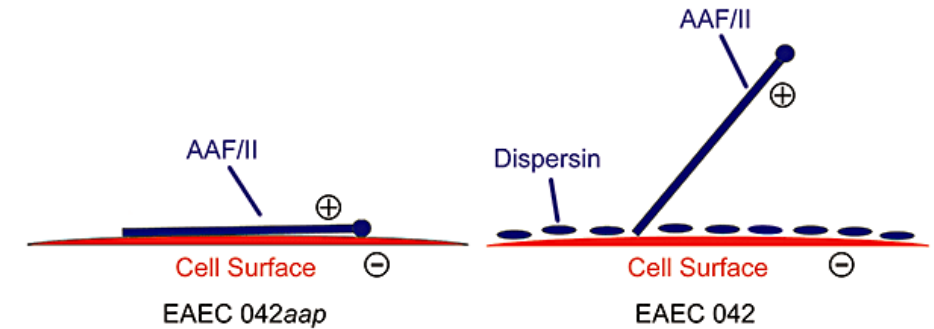


Le proteine della matrice extracellulare sono generalmente localizzate sulla membrana basale epiteliale, dove non sono disponibili per l'interazione con i batteri luminali → il processo infiammatorio può innescare cascate di trasduzione del segnale che inducono la secrezione apicale o la ricollocazione della fibronectina.

- Mentre la maggior parte delle subunità principali delle fimbrie assemblate con chaperone/usher sono caricate negativamente a pH fisiologico, le subunità principali di **AAF** sono **caricate positivamente** fino a pH 9,2–9,5; si ritiene che questa caratteristica abbia un **ruolo nell'adesione alla EAEC**.

Dispersina

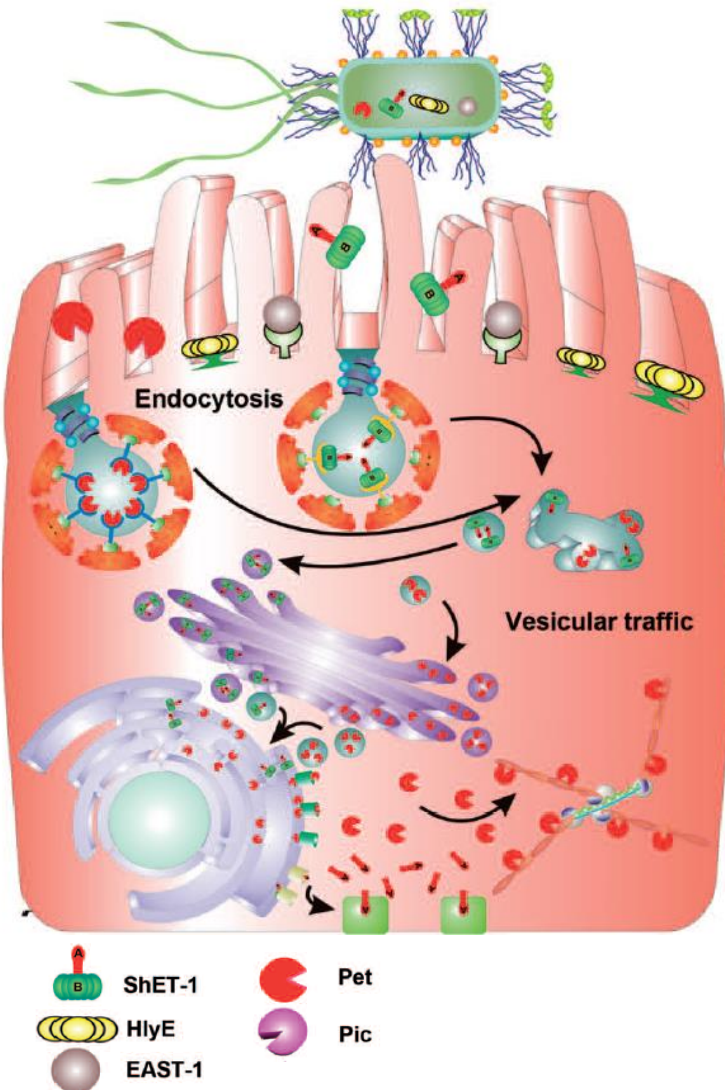
- Richiede un **sistema di trasporto di tipo ABC**, codificato dall'operone *aatPABCD*, presente nel plasmide *pAA*.
- La dispersina è espressa *in vivo* ed è altamente immunogena, il che la rende un **potenziale candidato al vaccino**.
- La **dispersina** sembra agire **neutralizzando l'LPS con carica negativa** della superficie batterica, permettendo così alle fimbrie AAF, cariche positivamente, di distendersi dal batterio e mediare interazioni a distanza. Diminuisce quindi l'autoaggregazione e consente la dispersione dei batteri lungo la mucosa intestinale.



Sono plausibili diversi ruoli della dispersione nell'adesione e nella colonizzazione

Tutti i patogeni enterici devono aderire alla superficie epiteliale. Allo stesso tempo, potrebbe essere utile modulare negativamente l'aderenza per consentire la **dispersione della progenie individuale** attraverso la superficie epiteliale, che è libera di **stabilire nuovi focolai di infezione**.

Possibile **ruolo nella penetrazione della mucosa intestinale** (1mm), ipotizzando che i grandi aggregati siano ritardati nella **traslocazione attraverso un gel viscoso** rispetto ai singoli batteri, che possono essere più abili a nuotare attraverso questo strato.



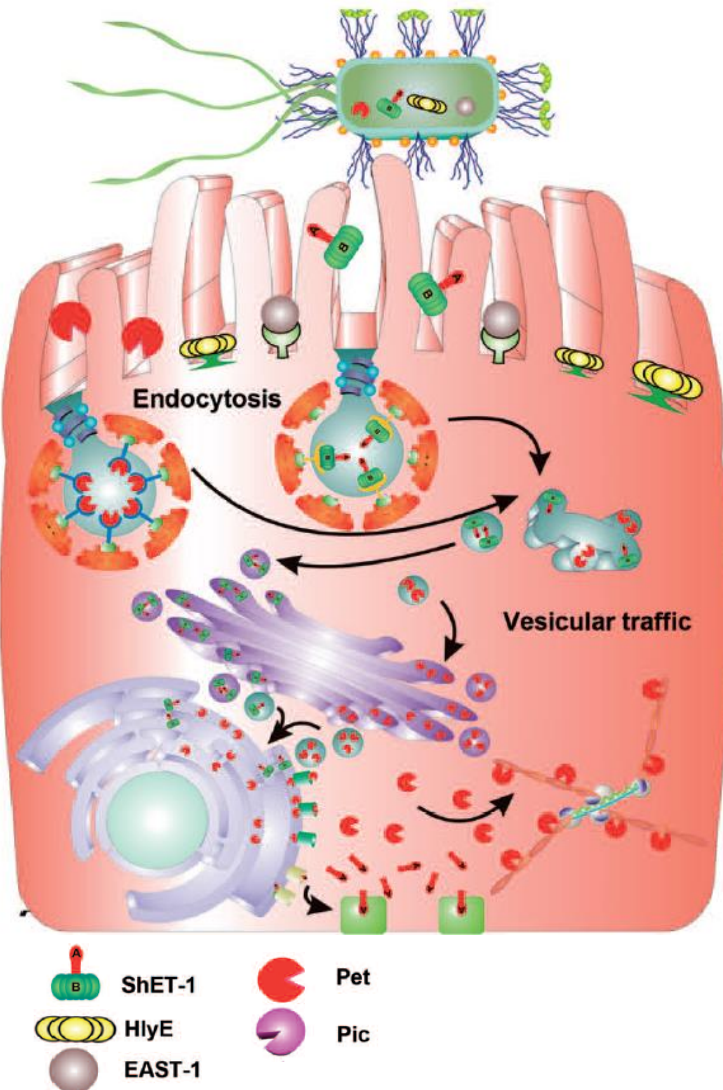
Una volta instaurato il biofilm, **EAEC produce effetti citotossici** quali vescicolazione dei microvilli, l'allargamento delle aperture delle cripte e l'aumento dell'estrusione delle cellule epiteliali. Si ritiene che la **secrezione di tossine** giochi un ruolo importante nella diarrea secretoria, che è una manifestazione clinica tipica dell'infezione da EAEC.

IL **PLASMIDE pAA** OSPITA I GENI CODIFICANTI:

- **EAST-1**, un'enterotossina termostabile nota per **causare diarrea secretiva**. L'interazione della tossina con il suo **recettore enterico**, induce un aumento della concentrazione di cGMP intracellulare nelle cellule intestinali, portando alla secrezione di anioni e alla diarrea.
- **Pet**, una tossina che **altera il citoscheletro**, poiché induce la contrazione del citoscheletro, la perdita di fibre di stress di actina e il rilascio di contatti focali, seguiti da un arrotondamento e completo distacco delle cellule.

Pet viene internalizzato da vescicole rivestite di clatrina: segue il trasporto verso l'ER, che contiene proteine traslocatrici che ne facilitano l'entrata nel citosol.

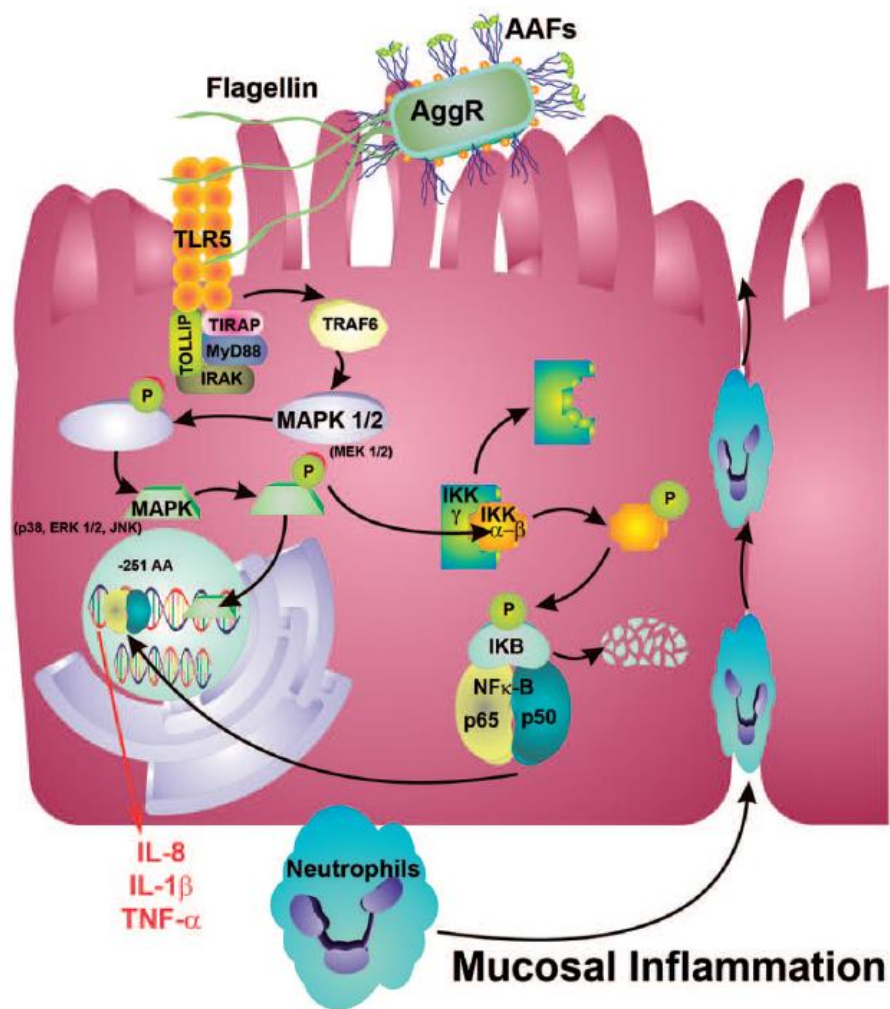
Il bersaglio intracellulare della tossina Pet è l' **α -fodrina**: la sua degradazione porta all'interruzione del citoscheletro, poiché la fodrina mantiene la connessione tra la membrana plasmatica e il citoscheletro.



Una volta instaurato il biofilm, **EAEC produce effetti citotossici** quali vescicolazione dei microvilli, l'allargamento delle aperture delle cripte e l'aumento dell'estrusione delle cellule epiteliali. Si ritiene che la **secrezione di tossine** giochi un ruolo importante nella diarrea secretoria, che è una manifestazione clinica tipica dell'infezione da EAEC.

IL **CROMOSOMA** CODIFICA PER:

- **ShET1**, una tossina che sembra **indurre la secrezione intestinale** attraverso l'adenosina monofosfato ciclico (cAMP) e il guanosina monofosfato ciclico (cGMP), ma il preciso meccanismo d'azione e la biochimica dettagliata rimangono elusi.



EAEC è un patogeno infiammatorio, come dimostrato sia in studi clinici, che in studi di laboratorio.

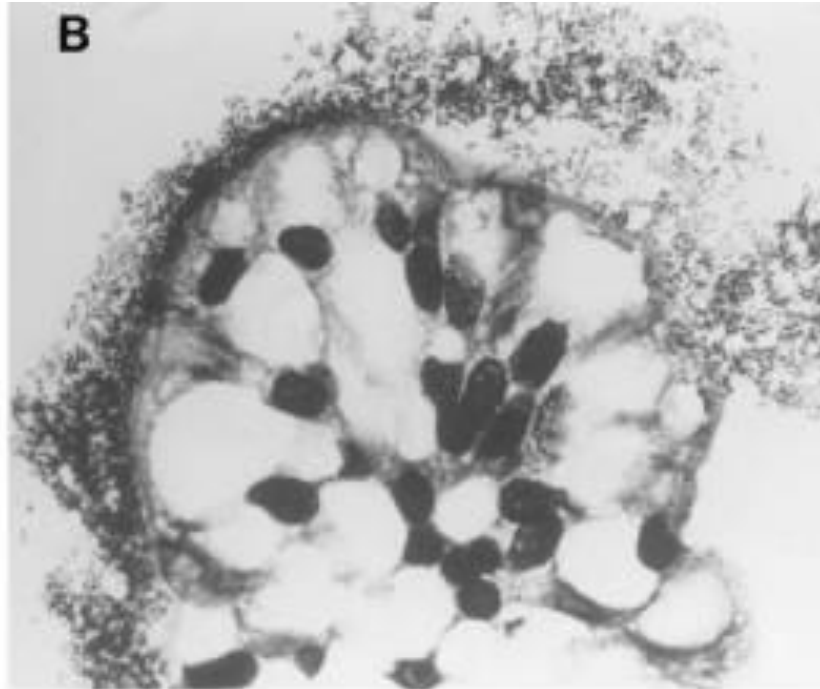
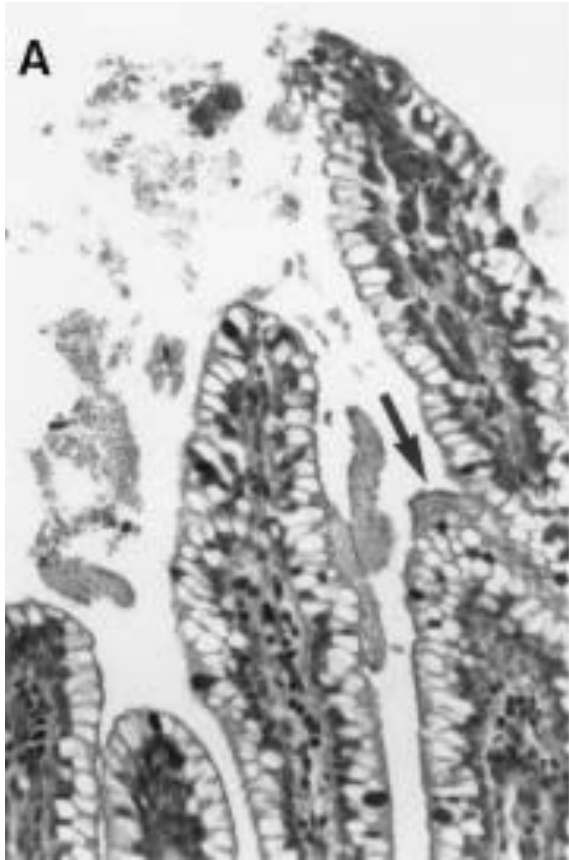
La **risposta infiammatoria** dell'ospite all'infezione da EAEC dipende dal sistema immunitario innato dell'ospite e dal ceppo di EAEC.

La **flagellina (FliC)**, una delle principali proteine di superficie batteriche di EAEC, risulta essere il principale stimolo pro-infiammatorio in grado di legarsi al recettore Toll-like5 (**TLR5**). Il TLR5, attraverso la p38 mitogeno-attivante chinasi (**MAPK**) e il fattore nucleare **NFκB**, dà il segnale per indurre la trascrizione di citochine pro-infiammatorie da parte di cellule epiteliali e monocitiche.

I livelli di citochine e marcatori infiammatori, quali interleuchina **IL-1**, **IL-1β**, **IL-8**, **interferone (INF)γ**, lattoferrina, leucociti fecali e sangue occulto, nelle feci di adulti e bambini con diarrea sono elevati.

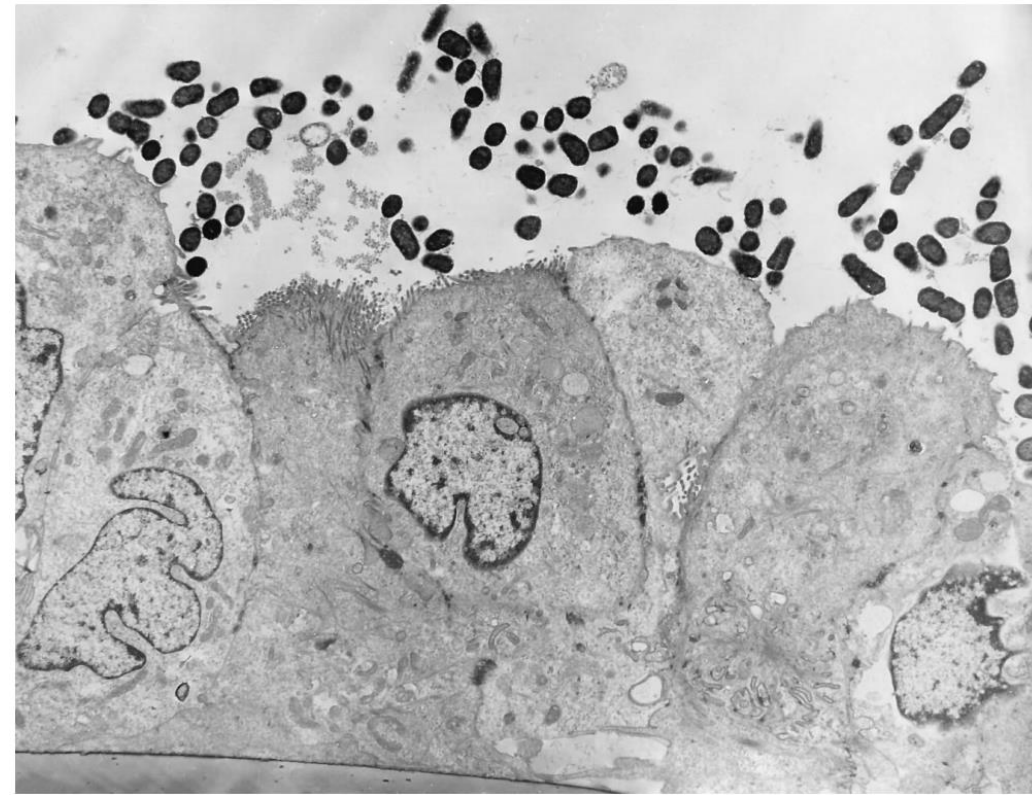
L'**IL-8** è la più importante chemochina pro-infiammatoria coinvolta nella patogenesi dell'EAEC: è responsabile del **reclutamento di neutrofili** alla mucosa epiteliale e facilita la secrezione di fluidi intestinali.

EAEC: Istopatologia



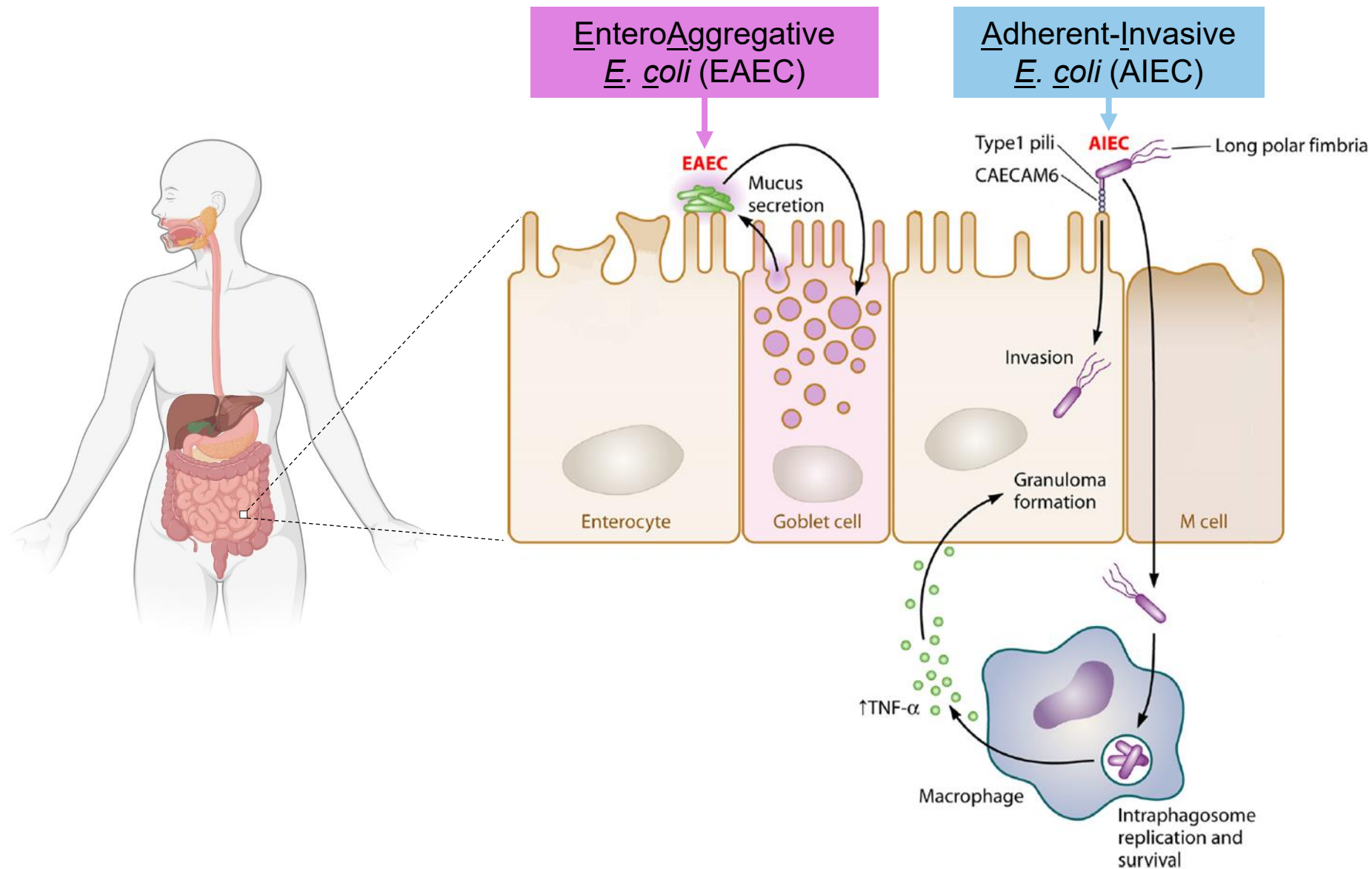
Interazione di EAEC con l'epitelio intestinale.

Ileo di un suino alimentato con il ceppo 042 di EAEC (A)
e EAEC ceppo 17-2 (B).



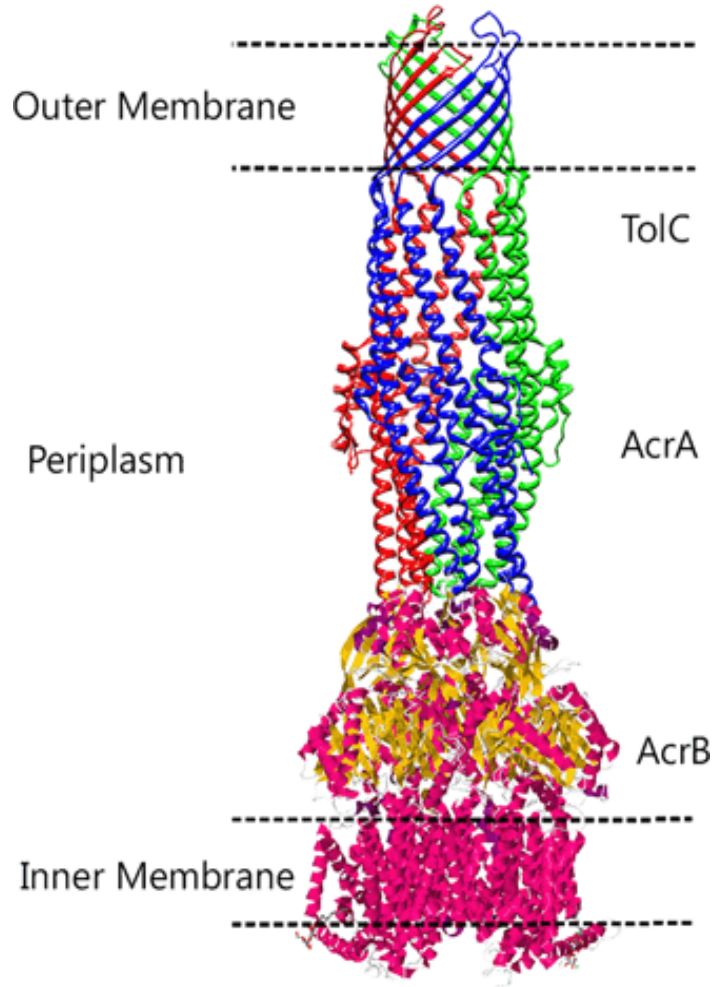
Citotossicità di EAEC su cellule T84 infettate con il ceppo EAEC 042.

Evidente l'adesione aggregativa dei batteri alla
membrana apicale, associata alla perdita dei
microvilli e all'arrotondamento della membrana
apicale.



Attualmente
utilizzati come
modelli nel nostro
laboratorio...

AcrAB efflux pump

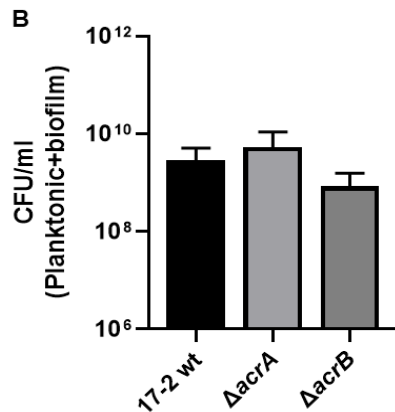
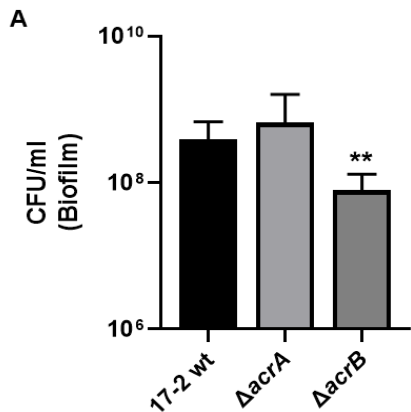


Investigate the functional
role of **MDR EPs**
in the **pathogenicity process** of
intestinal pathogenic *Escherichia coli*

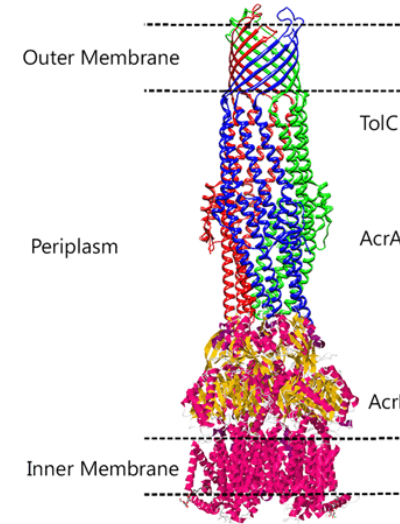
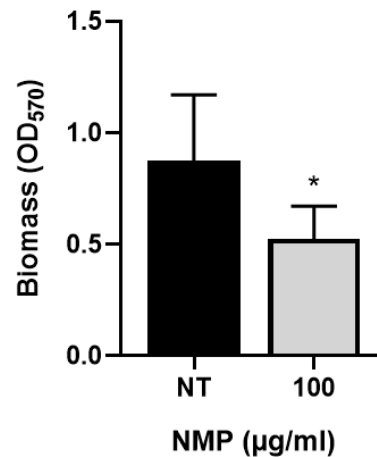
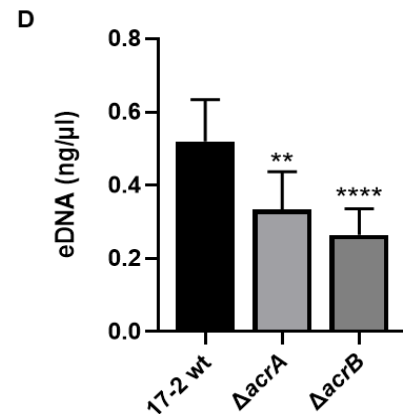
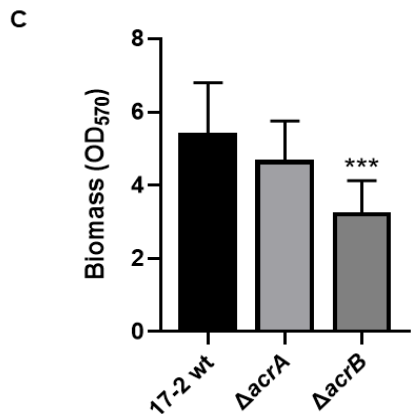
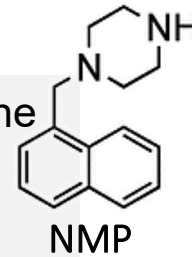
EnteroAggregative
E. coli (EAEC)

AcrB transporter contributes to biofilm production

- The **loss of AcrB** transporter significantly **reduced the biofilm biomass**
- EAEC 17-2 **Δ acrB** biofilms **contain less** extracellular DNA (eDNA)

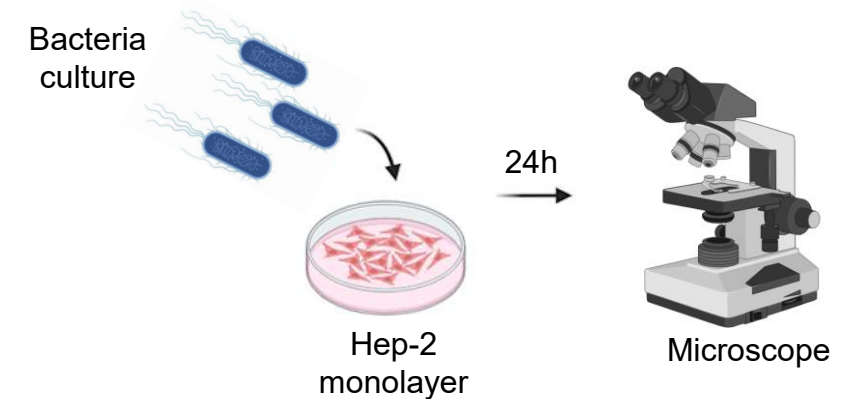


Treatment with the
AcrB inhibitor
1-(1-naphthyl-
methyl)-piperazine
(**NMP**) on EAEC 17-2



Does **silencing** of the
different components of the
AcrAB efflux pump
influence EAEC
aggregative phenotype?

Hep-2 cell adherence assay

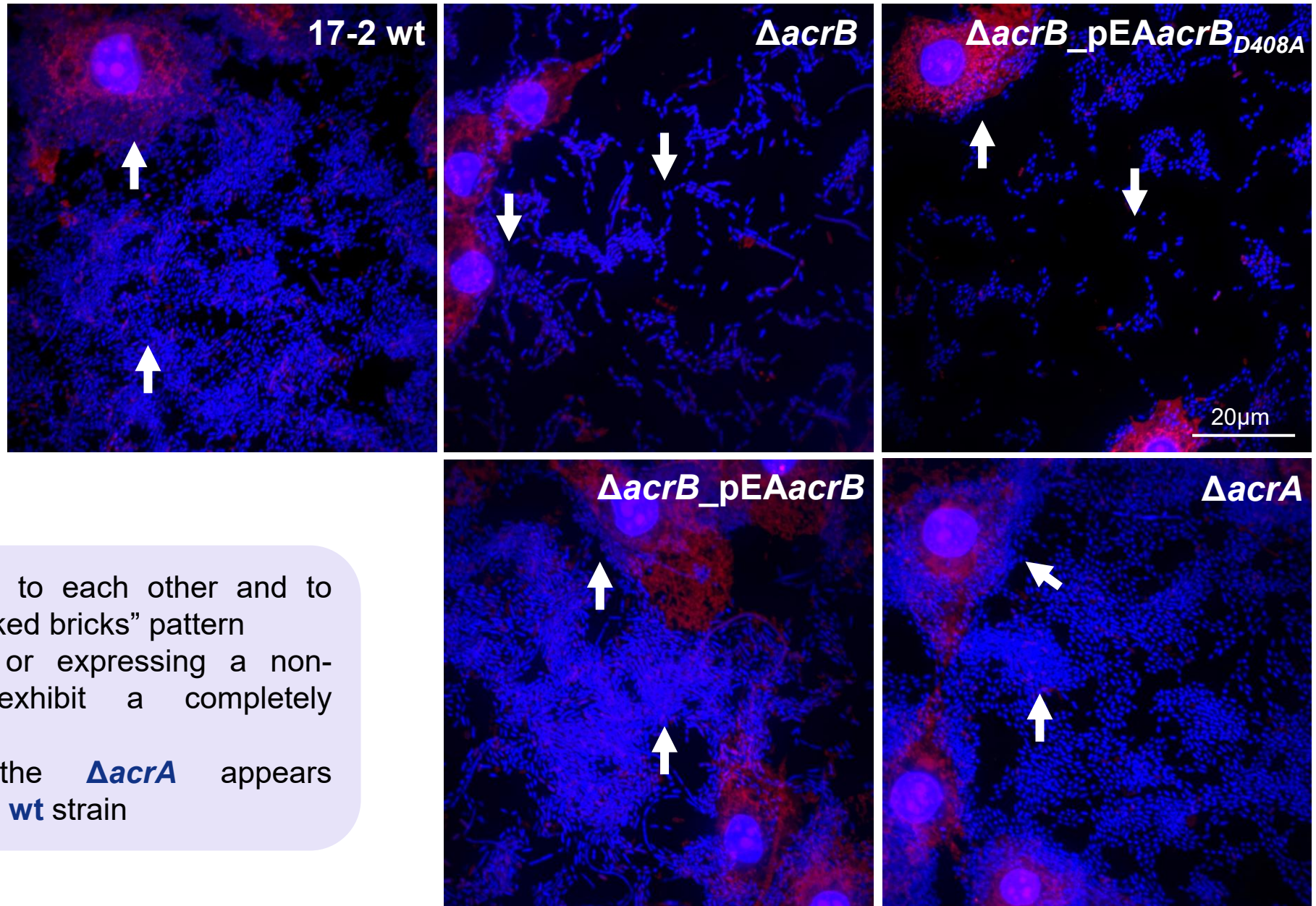


Silencing of the *acrB* gene results in a disorganised aggregative adherence pattern

Does a **compromised efflux via AcrAB** have a negative influence on **aggregative phenotype** of EAEC?

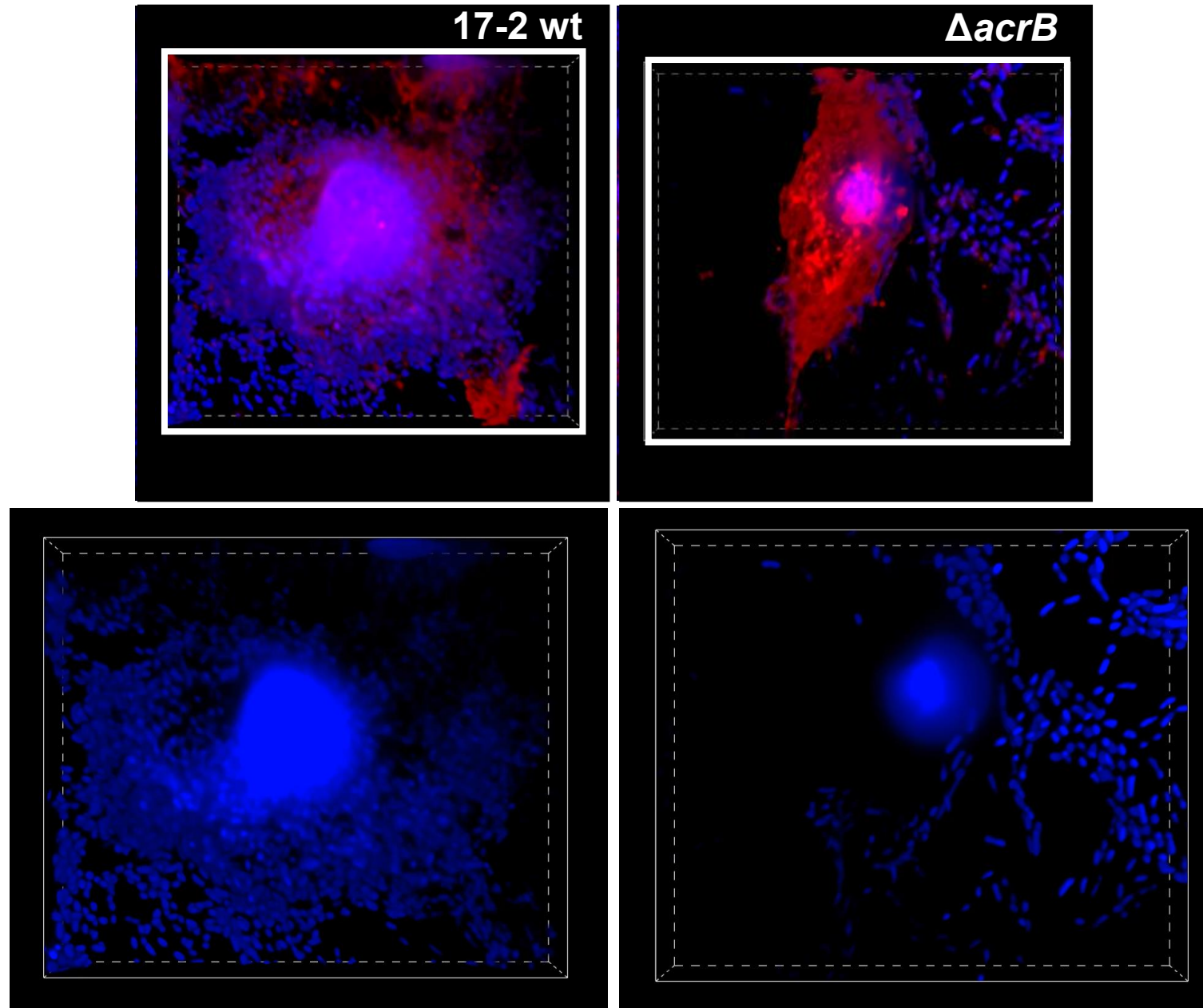
HEp-2 cell adherence assay

- 17-2 wt bacteria adhere to each other and to eukaryotic cells in a “stacked bricks” pattern
- Mutants **lacking AcrB** or expressing a non-functional **AcrB_{D408A}** exhibit a completely **disorganised pattern**
- The phenotype of the ***ΔacrA*** appears **comparable** to that of the **wt** strain

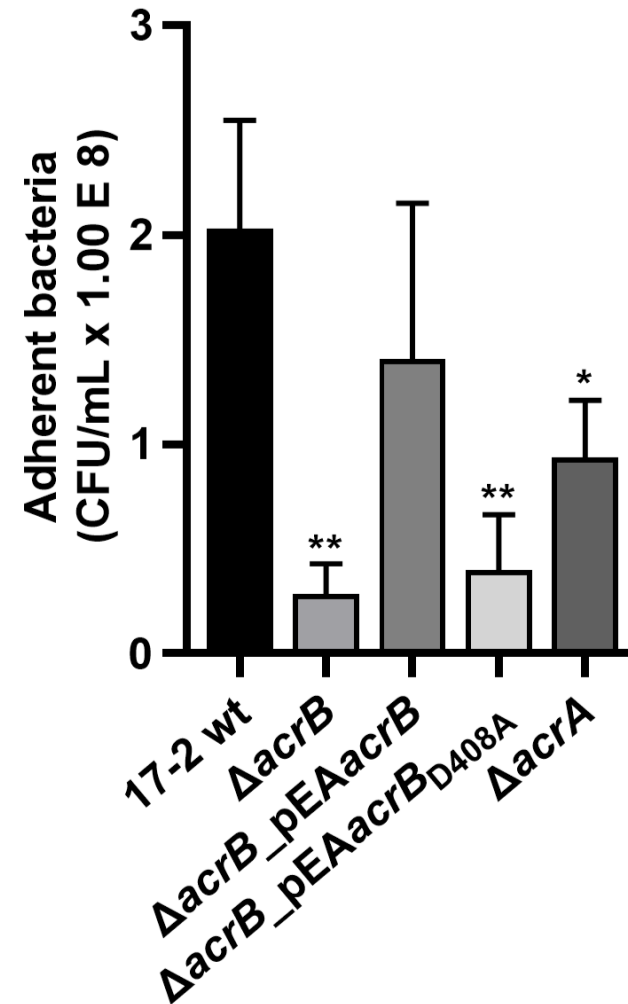
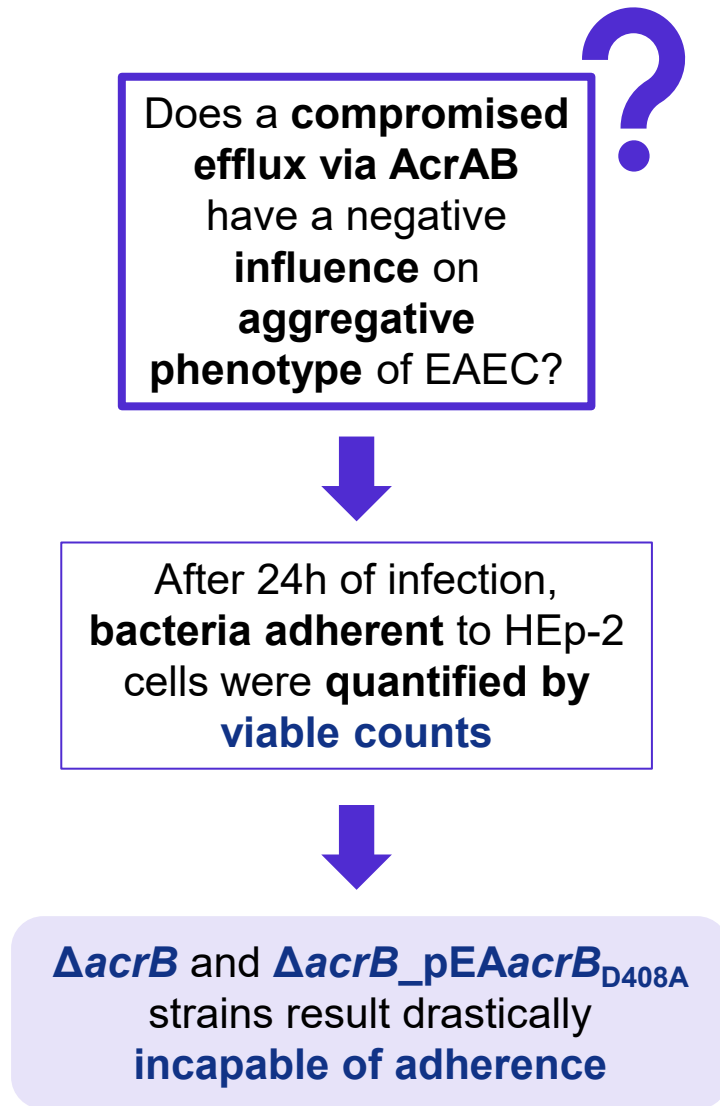


DAPI / EVANS BLUE 24h post-infection

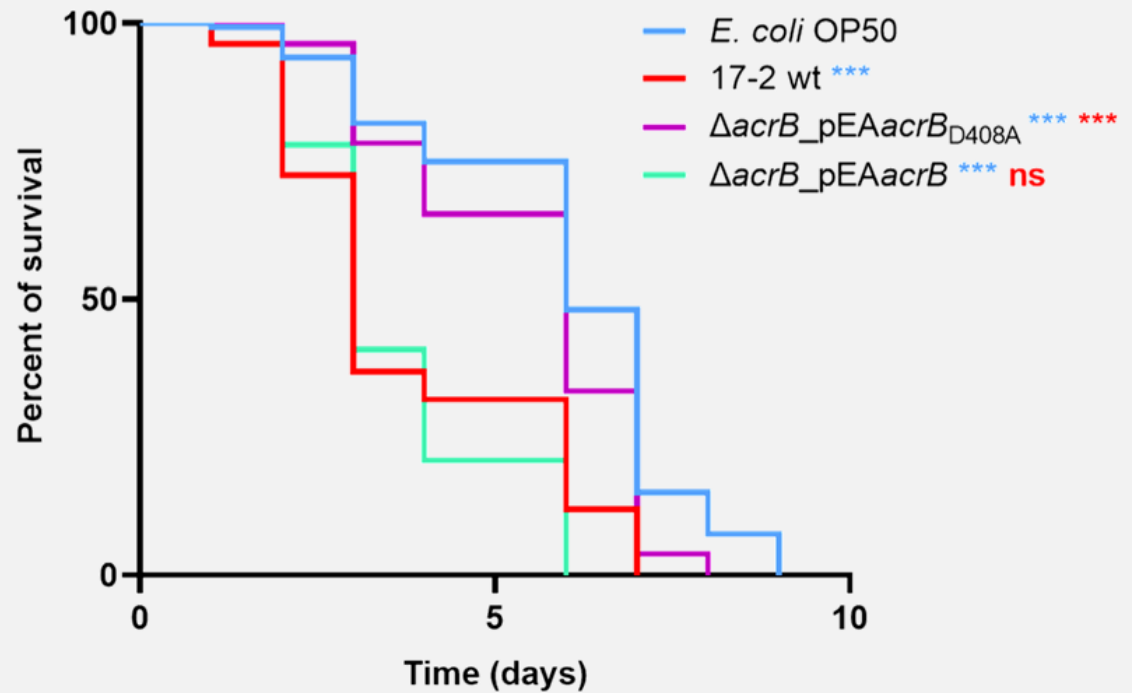
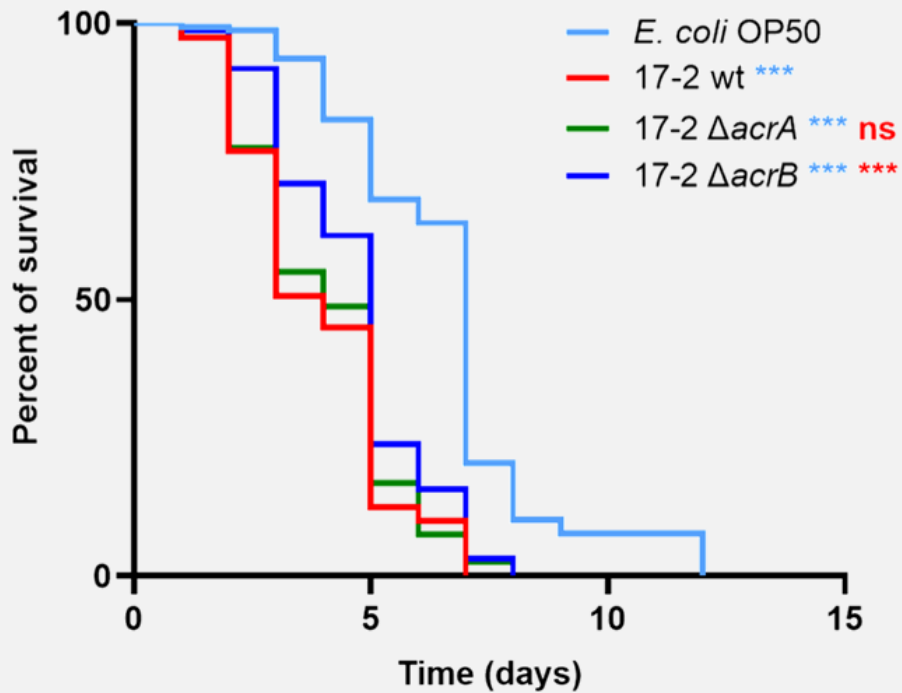
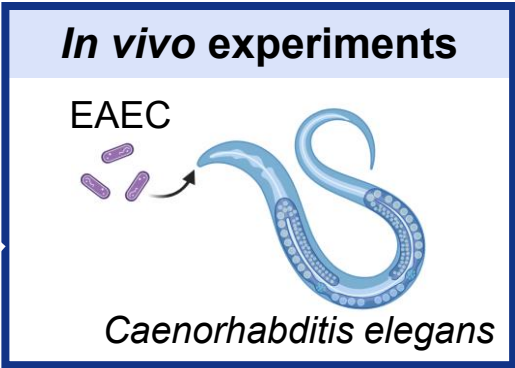
Silencing of the *acrB* gene results in a disorganised aggregative adherence pattern



Silencing of the *acrB* gene results in a disorganised aggregative adherence pattern

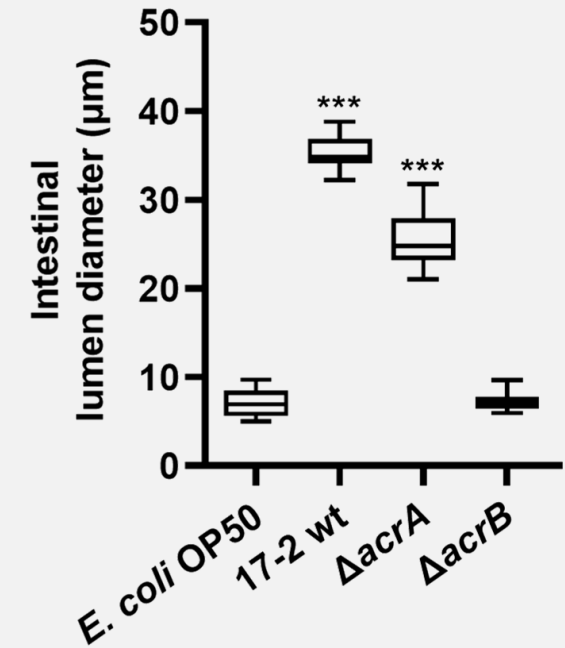
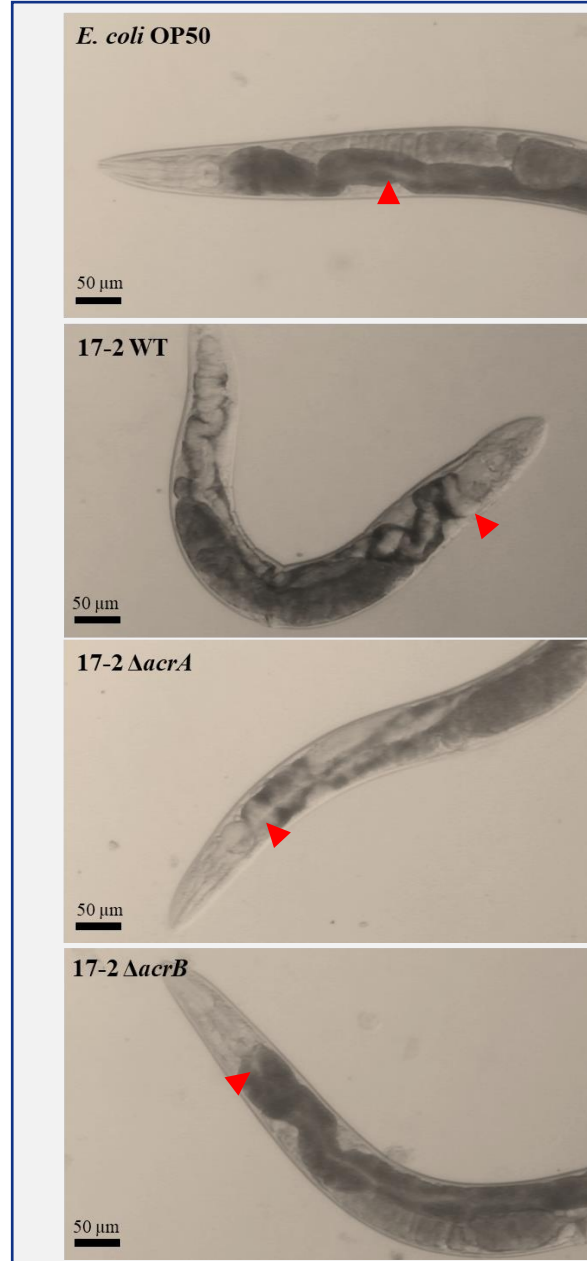
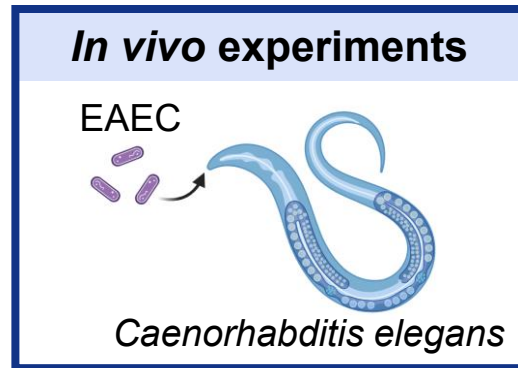


Efflux via the AcrAB pump appears to be crucial for the *in vivo* virulence of EAEC 17-2



acrB mutant is significantly ($p = 0.001$) less lethal than wt strain

Efflux via the AcrAB pump appears to be crucial for the *in vivo* virulence of EAEC 17-2



The **enlargement** of the **intestinal lumen** is a classic marker of nematode stress due to infection by pathogenic bacteria.

- Clearly visible when the worm is fed with the **wt**
- No longer evident when it is fed with **Δ *acrB***

Conclusions on the study of the AcrAB efflux pump

- ❖ The function of transport of AcrB is implicated in EAEC biofilm formation and maturation
- ❖ Results obtained with the inhibitor and in *in vivo* infections highlight the **importance of AcrAB** efflux pump in the **virulence of enteroaggregative *E. coli***
- ❖ The MDR EP AcrAB is a **valuable target** to be considered to **attenuate EAEC virulence**

