

DOSI NUTRIZIONALI DI ZINCO MODULANO L'ESPRESSIONE GENICA DEI FATTORI DI VIRULENZA DI *ESCHERICHIA COLI* K88

NUTRITIONAL ZINC DOSES MODULATE GENE EXPRESSION OF *ESCHERICHIA COLI* K88 VIRULENCE FACTORS

BONETTI A.¹, TUGNOLI B.², PIVA A.^{1,2}, GRILLI E.^{1,3}

¹DIMEVET, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna,
Via Tolara di Sopra, 50, 40064, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia

²Vetagro S.p.A., via Porro 2, 42124, Reggio Emilia, Italia

³Vetagro Inc., 116 W. Jackson Blvd., Suite #320, 60604, Chicago, IL, USA

Parole chiave: *Escherichia coli* K88, antibiotici, zinco

Key Words: *Escherichia coli* K88, antibiotics, zinc

RIASSUNTO

La minaccia rappresentata dall'antibiotico resistenza richiede l'utilizzo di metodi alternativi per gestire infezioni legate a patogeni come *Escherichia coli* K88, principale agente eziologico della diarrea post-svezzamento del suino. Lo zinco ossido è impiegato a livelli farmacologici per migliorare le performance e l'integrità intestinale allo svezzamento, tuttavia l'inquinamento ambientale derivante dal suo uso desta una crescente preoccupazione. Considerando i futuri requisiti legislativi, che impediranno l'uso dello zinco a scopo farmacologico, questo studio ha valutato l'attività inibente la crescita batterica di antibiotici convenzionali e varie forme di zinco, unitamente alla loro capacità di modulare la virulenza di *E. coli* K88. I risultati dimostrano come il ceppo testato di *E. coli* K88 sia resistente alla maggior parte degli antibiotici esaminati; tra le forme di zinco, solo ZnO, nano-ZnO, ZnSO₄ e Zn-Met mostrano attività antimicrobica a 2000 ppm. ZnO, nano-ZnO, ZnSO₄ e ZnCl₂ hanno aumentato – a una dose di zinco equivalente pari a 65 ppm – l'espressione dei fattori di virulenza di *E. coli* K88. In conclusione, questo studio ha dimostrato che concentrazioni farmacologiche di varie forme di Zn possono esercitare un effetto antimicrobico solo a 2000 ppm, mentre il loro impiego a dosaggi nutrizionali comporta, in ogni modo, una modulazione significativa dei geni di virulenza di *E. coli* K88.

ABSTRACT

The threat represented by antibiotic resistance is more and more requiring the identification of alternative methods to manage infections exerted by pathogens such as *Escherichia coli* K88, the main determining agent of piglets' post-weaning diarrhea. Pharmacological levels of zinc oxide are usually employed for their capacity to improve growth performance and intestinal integrity at weaning. However, the environmental pollution exerted by ZnO is raising concerns. Considering future legislative requirements, which will forbid the usage of zinc for pharmacological purposes, this study evaluated the antimicrobial activity of conventional antibiotics and several zinc forms, and their ability to modulate the *E. coli* K88 virulence gene expression. Results demonstrate how the *E. coli* K88 tested strain is resistant to most of the tested antibiotics; amongst zinc forms, only ZnO, nano-ZnO, ZnSO₄ and Zn-Met show an antimicrobial activity at 2000 ppm. ZnO, nano-ZnO, ZnSO₄ and ZnCl₂ – at doses providing 65 ppm of Zn – increased

the expression of *E. coli* K88 virulence factors. In conclusion, this study demonstrated the capacity of pharmacological doses of various Zn forms to exert an antimicrobial effect only at 2000 ppm, while their utilization at nutritional levels produces a significant modulation of virulence genes of *E. coli* K88.

INTRODUZIONE

La diarrea post-svezzamento rappresenta una delle principali sfide dell'industria suina mondiale. Tale condizione patologica è primariamente causata da *Escherichia coli* K88, un patogeno appartenente alla classe degli *E. coli* enterotossigenici (ETEC) (Croxen *et al.*, 2013), che comporta importanti perdite economiche per gli allevatori a causa di costi per le terapie, ridotta crescita degli animali e mortalità (Jayaraman and Nyachoti, 2017). L'azione patogena di *E. coli* K88 viene esercitata mediante i suoi fattori di virulenza. L'attacco del batterio avviene mediante adesine fimbriali che legano recettori posti sulla superficie degli enterociti; tale legame stimola la produzione delle enterotossine proteiche termolabili (LT) e termostabili (STa ed STb). Le tre tossine, interagendo con i loro rispettivi recettori, pur attivando vie di segnalazione differenti, comportano l'apertura di canali per l'escrezione del cloro e l'inibizione di proteine per il riassorbimento del sodio. Ciò produce uno squilibrio ionico che, richiamando acqua nel lume intestinale, genera il sintomo diarroico.

Gli antibiotici rappresentano l'approccio principalmente impiegato per combattere gli stati di colibacillosi. Tuttavia, l'insorgenza e la rapida diffusione della resistenza microbica agli antibiotici hanno spinto scienziati e istituzioni politiche a promuovere azioni volte alla riduzione del loro uso.

L'utilizzo di minerali a scopo antimicrobico è una pratica ampiamente consolidata in suinicoltura (Poulsen, 1995). L'impiego di dosi farmacologiche di zinco ossido (ZnO) allo svezzamento può ridurre l'insorgenza della diarrea, migliorare le performance di crescita e modulare l'architettura e lo stato infiammatorio intestinale (Grilli *et al.*, 2015). Ciò nonostante, l'utilizzo di elevati livelli di questo elemento ha sollevato preoccupazioni riguardanti l'inquinamento ambientale. Per questo motivo, le autorità europee hanno imposto una completa eliminazione di livelli farmacologici di ZnO dal 2022.

Scopo di questo studio è stato quello di valutare la suscettibilità di un ceppo di *E. coli* K88 verso alcuni degli antibiotici più utilizzati in allevamento animale e diverse forme di Zn. Inoltre, in ottemperanza ai futuri requisiti legislativi, è stata analizzata la capacità delle stesse forme di Zn, a livelli nutrizionali, di modulare l'espressione dei geni di virulenza di *E. coli* K88.

MATERIALI E METODI

Il batterio utilizzato in questo studio è un ceppo di campo di *Escherichia coli* K88, originariamente isolato dall'intestino di un suinetto sintomatico.

Antibiogramma. Mediante l'approccio MIC (concentrazione minima inibente), è stata valutata la suscettibilità del ceppo a 7 antibiotici (amoxicillina, ampicillina, doxiciclina, lincomicina, neomicina, penicillina G e colistina), le cui soluzioni stock sono state preparate in infuso cuore-cervello (BHI). Il saggio, allestito in piastre 96-well, ha previsto la diluizione degli antibiotici in BHI alle concentrazioni di interesse, l'inoculo del ceppo a una concentrazione di 10^5 CFU/mL, quindi l'incubazione in aerobiosi a +37°C per 24 ore. Ogni piastra, preparata in duplicato, conteneva sia controlli positivi (solo BHI con ceppo) che bianchi (solo BHI). Trascorso il periodo di incubazione, è stata misurata allo spettrofotometro l'assorbanza di ogni piastra a 630 nm. Per ogni sostanza, la MIC è stata definita come la concentrazione più bassa in grado di restituire una assorbanza nulla

dopo 24 ore di incubazione.

Attività antimicrobica di diverse forme di Zn. Con lo stesso metodo, è stata determinata l'attività antimicrobica verso *E. coli* K88 di 4 forme di Zn, le cui soluzioni stock sono state preparate in acqua ($ZnSO_4$, $ZnCl_2$ e Zn-Met) o 5% acido acetico (ZnO, nano-ZnO). Il saggio, allestito in tubi, ha previsto la diluizione delle soluzioni stock delle varie forme di Zn in terreno di coltura BHI alle concentrazioni di interesse, l'inoculo del ceppo alla concentrazione di 10^5 CFU/mL, quindi l'incubazione dei tubi in aerobiosi a $+37^\circ C$ per 24 ore. Tra i tubi, preparati in triplicato, sono stati aggiunti sia controlli positivi (BHI con ceppo, BHI + 5% acido acetico con ceppo) che bianchi (solo BHI). Trascorso il periodo di incubazione, 10 μ L del contenuto di ogni tubo sono stati seminati su piastre BHI Agar. Per ogni forma di Zn, la MIC è stata definita come la concentrazione più bassa di sostanza in grado di impedire la crescita di colonie in seguito a semina e incubazione per 24 ore su piastra BHI Agar.

Modulazione dei geni di virulenza di K88 da parte di diverse forme di Zn. Per valutare la capacità di diverse forme di Zn di modulare l'espressione dei geni di virulenza di *E. coli* K88, 10^6 CFU sono stati inoculati in 5 mL di BHI supplementato con differenti forme di Zn (ZnO, nano-ZnO, $ZnSO_4$, $ZnCl_2$ e Zn-Met) a una concentrazione tale da fornire 65 ppm di Zn (equivalenti a 80.90 ppm di ZnO e nano-ZnO, 181.97 ppm di $ZnSO_4$, 135.50 ppm di $ZnCl_2$ e 212.36 ppm di Zn-Met). Ogni concentrazione è stata valutata in triplicato, oltre all'aggiunta di controlli adeguati (solo BHI, BHI con ceppo, BHI + 5% acido acetico con ceppo). In seguito a 4 ore di incubazione in aerobiosi a $+37^\circ C$, è stato estratto l'RNA totale mediante il kit NucleoSpin[®] RNA Kit (Macherey-Nagel), seguendo le istruzioni del produttore. In seguito alla misurazione allo spettrofotometro della resa e della qualità dell'RNA estratto, è stata eseguita la retrotrascrizione dell'RNA in cDNA mediante iScript[™] cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad), come da istruzioni fornite dal produttore. La real-time PCR è stata realizzata utilizzando CFX96[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) e iTaq[™] Universal SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad). Le reazioni sono state preparate in un volume finale di 10 μ L, contenenti 5 μ L di 2x iTaq Universal SYBR mix, 200 o 600 nM di ogni primer (Tabella 1), 10 ng di cDNA e acqua nucleasi-free per portare a volume. Il protocollo di PCR ha previsto 3 minuti a $95^\circ C$, seguito da 40 cicli di 10 secondi a $95^\circ C$ e 30 secondi a $60^\circ C$. La specificità della PCR è stata determinata mediante una curva di melting (da 55 a $95^\circ C$ con un incremento di temperatura pari a $0.5^\circ C/s$). L'analisi di espressione genica, normalizzata rispetto ai due geni reference *rrsA* e *ihfB*, ha previsto l'utilizzo del metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Analisi statistica. Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando GraphPad Prism[®]. Per i risultati della gene expression, è stato applicato il test ANOVA a una via, seguito dal Turkey post-test, per comparare i trattamenti con il rispettivo controllo. Le differenze significative sono indicate dagli asterischi: * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$.

RISULTATI

Antibiogramma. I risultati dell'antibiogramma condotto su *E. coli* K88 sono mostrati in Figura 1. Il batterio in esame si è mostrato resistente a tutte le concentrazioni testate (0.5 ppm – 64 ppm) di amoxicillina, ampicillina, lincomicina, penicillina G e neomicina. Tuttavia, la crescita batterica è stata inibita dalla doxiciclina alle concentrazioni di 32 e 64 ppm, mentre la colistina si è dimostrata capace di prevenire la proliferazione batterica già alla concentrazione di 4 ppm.

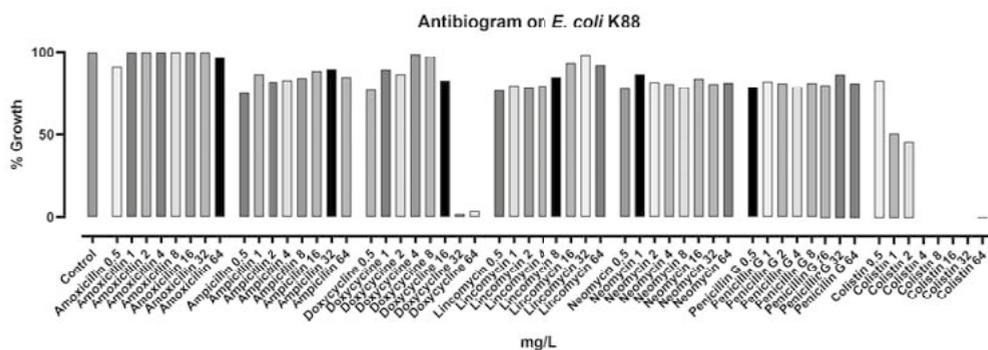


Figura 1 - Crescita di *E. coli* K88, espresso come % rispetto al controllo (solo ceppo), quando coltivato con differenti concentrazioni in ppm di amoxicillina, ampicillina, doxiciclina e lincomicina, neomicina, penicillina G e colistina.

Figure 1 - *E. coli* K88 growth, expressed as % compared to control (strain only), when cultured with different concentrations in ppm of amoxicillin, ampicillin, doxycycline, lincomycin, neomycin, penicillin G and colistin.

Attività antimicrobica di diverse forme di Zn. I risultati delle MIC su *Escherichia coli* K88 trattato con quattro differenti forme di Zn hanno dimostrato che ZnO, nano-ZnO, ZnSO₄ e Zn-Met sono capaci di inibire la crescita batterica alla dose più alta (2000 ppm), mentre le concentrazioni inferiori hanno consentito la crescita di *E. coli* K88. Nessuna attività inibitoria è stata registrata per ZnCl₂.

Modulazione dei geni di virulenza di K88 da parte di diverse forme di Zn. I risultati della modulazione dell'espressione genica dei fattori di virulenza di *E. coli* K88 esercitati da diverse forme di Zn sono presentati in Figura 2. In generale, si evidenzia la capacità di quasi tutte le forme di Zn di modulare l'espressione dei geni di virulenza del patogeno in esame, anche se impiegate a una concentrazione equivalente di 65 ppm, notevolmente inferiore alle dosi farmacologiche.

Per quanto riguarda le capacità adesive di *E. coli* K88, ZnSO₄, ZnCl₂, ZnO e nano-ZnO mostrano una significativa capacità di incrementare l'espressione del gene *faeG*, codificante per la subunità maggiore delle diverse varianti delle adesine fimbriali, aumento non registrato con l'utilizzo della Zn-Met (Figura 2A).

L'espressione della tossina termolabile LT viene notevolmente incrementata dall'incubazione di *E. coli* K88 con ZnSO₄, ZnCl₂, ZnO e nano-ZnO (P<0.001), mentre l'utilizzo di Zn-Met non comporta un aumento apprezzabile dell'espressione dei geni *eltA* ed *eltB*, codificanti le due subunità della tossina in esame (Figure 2B e 2C).

Mentre i livelli di mRNA della proteina STb non sono influenzati in maniera rilevante da nessuno dei trattamenti (Figura 2E), l'espressione della tossina STa viene significativamente ridotta dall'aggiunta, nel medium di coltura di *E. coli* K88, di ZnSO₄, ZnCl₂ e Zn-Met (Figura 2D).

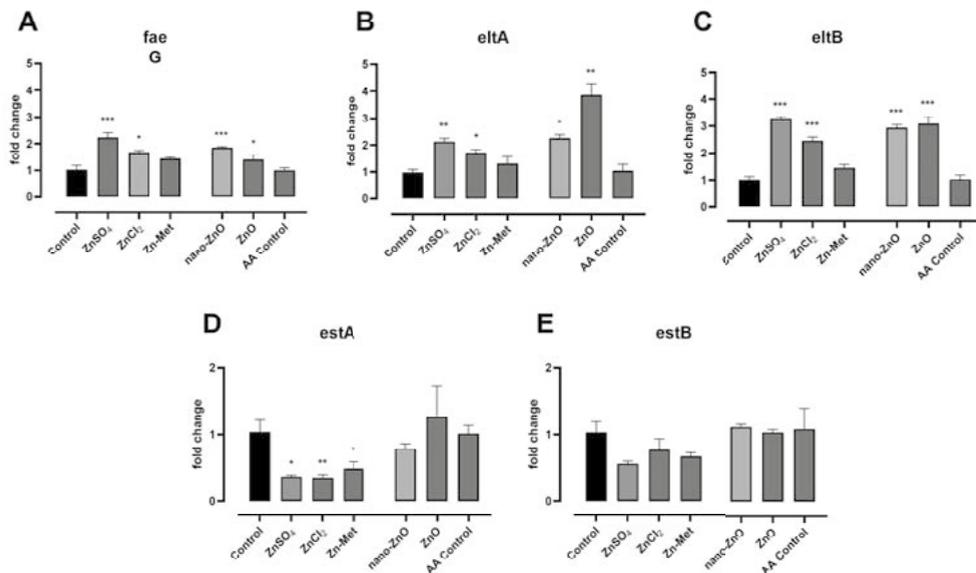


Figura 2 - Analisi gene expression dei geni di virulenza di *E. coli* K88 incubato con differenti forme di Zn in grado di fornire 65 ppm di Zn. I dati sono presentati come media (n = 3) e la SEM è rappresentata dalle barre verticali. Gli asterischi indicano una differenza significativa: * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$. Le differenze sono calcolate tra ogni trattamento e il rispettivo controllo: ZnSO₄, ZnCl₂ e Zn-Met verso controllo; nano-ZnO e ZnO verso controllo AA.

Figure 2 - Gene expression analysis of *E. coli* K88 incubated with different zinc sources providing 65 ppm of Zn. Data are presented as means (n = 3) and SEM represented by vertical bars. Asterisks indicate statistically significant differences: * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$. Differences are calculated between each treatment and the respective control: ZnSO₄, ZnCl₂ e Zn-Met versus control; nano-ZnO and ZnO versus AA control.

DISCUSSIONE

In questo studio, un ceppo di *E. coli* K88 è stato testato contro diversi antibiotici: il batterio è risultato resistente ad amoxicillina, ampicillina, neomicina, lincomicina e penicillina G. Pur essendo ancora sensibile alla doxiciclina, il dato della MIC (32 ppm) mostra in *E. coli* K88 una preoccupante propagazione dei geni di resistenza. Tali osservazioni sono confermate da ulteriori studi che hanno provato una problematica riduzione della sensibilità di numerosi ceppi di *E. coli* agli antibiotici (Choi *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2015; van Breda, Dhungyel and Ward, 2018).

La colistina è uno degli antimicrobici autorizzati all'utilizzo sia in campo animale che umano. Il suo uso in suinocoltura aiuta la gestione delle infezioni da *E. coli* in maniera efficace, come dimostrato dai nostri risultati: il ceppo testato ha mostrato sensibilità alla colistina (MIC a 4 ppm). Tuttavia, la comparsa del gene di resistenza *mcr-1* rappresenta una seria minaccia all'efficacia di un antibiotico utile anche in medicina umana; si rende quindi necessario valutare ulteriori strategie (Rhouma *et al.*, 2016).

Tra gli approcci alternativi per combattere la diarrea post-svezzamento del suino vi è l'impiego di livelli farmacologici di Zn. In questo studio, la MIC contro *E. coli* K88 è stata riscontrata a 2000 ppm per ZnO, nano-ZnO, ZnSO₄ e Zn-Met, mentre non è stato possibile osservare una inibizione della crescita microbica alle concentrazioni testate di ZnCl₂. In generale, i risultati delle MIC non dimostrano una attività antimicrobica ampia contro *E. coli* K88 per nessuna delle forme di Zn valutate.

Dal 2022, l'utilizzo dello Zn sarà consentito nell'Unione Europea solamente a livelli nutrizionali, in quanto le autorità competenti hanno imposto un totale divieto sulla commercializzazione di prodotti contenenti Zn a scopo terapeutico. Secondo il Regolamento (CE) N. 1334/2003, il limite d'uso è fissato a 150 ppm per il suino. Considerando tale limite, il presente studio ha voluto valutare la capacità di dosi nutrizionali di Zn – inferiori al requisito legislativo e non efficaci dal punto di vista antimicrobico – di modulare l'espressione di geni di virulenza e patogenicità di *E. coli* K88 e come questa attività potesse essere influenzata dalla diversa forma di Zn.

In generale, si osserva che le varie forme di Zn tendono a promuovere l'espressione dei geni di virulenza di *E. coli* K88. In effetti, lo Zn è uno degli ioni essenziali per la sopravvivenza e il metabolismo di *E. coli*, poiché parte di una molteplicità di proteine ed enzimi. L'aggiunta ulteriore di Zn nella dieta potrebbe, quindi, facilitarne l'assunzione ed utilizzo da parte dei batteri, favorendone il metabolismo e l'acquisizione di un fenotipo particolarmente virulento come conseguenza della maggiore attività degli enzimi, tra cui le polimerasi della trascrizione genica (Hantke, 2005).

CONCLUSIONI

Questo studio ha osservato la resistenza di un ceppo di campo di *E. coli* K88 – principale responsabile dell'insorgenza della diarrea post-svezzamento del suino – a diversi antibiotici, confermando come l'antibiotico-resistenza rappresenti una seria minaccia per la gestione delle infezioni batteriche. L'utilizzo di varie forme di Zn non esercita un effetto antimicrobico su *E. coli* K88, se non limitatamente alle dosi farmacologiche (2000 ppm). I futuri requisiti legislativi europei proibiranno l'impiego di tali concentrazioni di Zn: l'uso di livelli nutrizionali di questo minerale – pari a 65 ppm di Zn equivalente, al di sotto del tetto fissato di 150 ppm – dimostra come possa comunque esistere, da parte dei composti dello Zn, un'azione modulatoria sull'espressione dei geni di virulenza di *E. coli* K88.

BIBLIOGRAFIA

1. van Breda, L. K., Dhungyel, O. P. and Ward, M. P. (2018) “Antibiotic resistant *Escherichia coli* in southeastern Australian pig herds and implications for surveillance”, *Zoonoses and Public Health*, 65, pp. e1–e7.
2. Choi, C. *et al.* (2002) “Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Korea”, *Journal of Veterinary Medical Science*, 64, pp. 71–73.
3. Croxen, M. A. *et al.* (2013) “Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*”, *Clinical Microbiology Reviews*, 26, pp. 822–880.
4. Grilli, E. *et al.* (2015) “Low doses of microencapsulated zinc oxide improve performance and modulate the ileum architecture, inflammatory cytokines and tight junctions expression of weaned pigs”, *Animal*, 9, pp. 1760–1768.
5. Hantke, K. (2005) “Bacterial zinc uptake and regulators”, *Current Opinion in Microbiology*, 8, pp. 196–202.
6. Jayaraman, B. and Nyachoti, C. M. (2017) “Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review.”, *Animal nutrition*, 3, pp. 205–211.

7. Klein, U. *et al.* (2015) “Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory and enteric tract pathogens isolated from diseased pigs across Europe between 2009 and 2012”, *7th European Symposium of Porcine Health Management*.
8. Poulsen, H. D. (1995) “Zinc oxide for weanling piglets”, *Acta Agriculturae Scandinavica A: Animal Sciences*, 45, pp. 159–167.
9. Rhouma, M. *et al.* (2016) “Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives.”, *Frontiers in microbiology*, 7, p. 1789.