

Estrazione e caratterizzazione del lipopolisaccaride di *Bartonella quintana*

Extraction and characterization of the lipopolysaccharide of *Bartonella quintana*

°Giovanni Matera, °Maria Carla Liberto, °Antonio Pollio,
°Raffaele Diana, °°Maria Martucci, °°Giuseppe Parlato,
°°Elio Gulletta, °Alfredo Focà.

°Cattedre di Microbiologia, °°Chimica e Propedeutica Biochimica e
°°Patologia Clinica, Università "Magna Graecia", Catanzaro

■ INTRODUZIONE

Bartonella quintana, conosciuto come agente eziologico della febbre delle trincee, è stato recentemente isolato, con una incidenza crescente, da campioni clinici di pazienti affetti da AIDS, in casi di batteriemie persistenti, ed è associato alla eziologia di endocarditi [1]. Le manifestazioni cliniche causate da *Bartonella spp.* includono anche la angiomatosi bacillare cutanea ed ossea, la pielosi epatica, endocarditi, linfadenopatia cronica, e batteriemie persistenti che si manifestano anche in individui immunocompetenti [2]. Le fasi dell'infezione possono essere caratterizzate da una fase acuta e da una cronica ed i fattori patogenetici implicati non sono stati a tutt'oggi individuati. Uno dei principali antigeni e fattori patogenetici dei batteri gram-negativi, inclusa *B. quintana*, è rappresentato dal lipopolisaccaride (LPS); tuttavia sulle caratteristiche del LPS di *Bartonella* sono disponibili poche informazioni.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di estrarre, purificare e caratterizzare il LPS di *B. quintana*, e di valutare l'effetto del LPS in esame sul rilascio di TNF α nel modello sperimentale di sepsi costituito da campioni di sangue umano intero stimolati *in vitro*.

■ MATERIALI E METODI

Il ceppo Oklahoma di *B. quintana* è stato coltivato su piastre di agar sangue di montone a 37°C e incubati in atmosfera umidificata contenente 5% di CO₂. Le cellule sono state raccolte e lavate in soluzione fisiologica sterile e apirogena, sottoposte a procedimento di estrazione del LPS secondo la metodica di Westphal e Jann [3], modificata da Minnick (1994) [4]. Il LPS è stato quindi sotto-

posto ad elettroforesi (15mA di corrente elettrica continua, per circa 90 min) su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE). Il LPS in esame, Standards "broad range" per SDS-PAGE (Bio-Rad, Italia) e gli LPS di riferimento, *Serratia marcescens* (Sigma, St. Louis, USA), *Proteus mirabilis* (RIBI, Montana USA), *Salmonella minnesota* S1114 (Sigma, St. Louis, USA), *Salmonella minnesota* R595 (Calbiochem, California, USA), sono stati applicati ad un gel discontinuo (4% acrilamide "spacer gel", 12.5% acrilamide "resolving gel") ed a fine corsa le bande sono state evidenziate con la tecnica del nitrato d'argento secondo Hitchcock & Brown [5].

L'attività endotossinica del LPS di *B. quintana* è stata valutata mediante il test cromogenico al lisato di amebociti di limulus (LAL test). Come LPS di riferimento sono stati usati quello ottenuto da *Serratia marcescens*, il LPS di *Salmonella minnesota* S1114 ed il LPS di *E. coli* 0113:H10:K0 (Endotossina Standard di Riferimento della USP).

Per la valutazione del TNF α , campioni di sangue intero proveniente da volontari sani e anticoagulato con eparina, venivano incubati, a 37°C in 5% di CO₂ per 4 ore, in presenza o in assenza di dosi scalari di endotossina di *B. quintana*. Dopo tale incubazione venivano dosati i livelli di TNF α sul plasma mediante tecniche immunoenzimatiche (Immunogenetics, Zwijndrecht, Belgium).

■ RISULTATI E DISCUSSIONE

Il LPS di *B. quintana* dopo migrazione all'SDS-PAGE risultava essere un chemotipo "deep rough" (Figura 1). Infatti si può facilmente osservare il comportamento della unica banda evidenziata in una posizione che precede immediatamente la più ampia banda del LPS di *S. minne-*

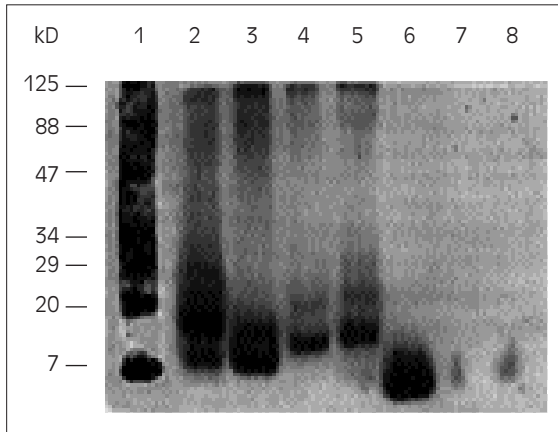


Figura 1 - SDS-PAGE del LPS di *Bartonella quintana* e dei LPS di riferimento. Per evidenziare le bande è stata usata la tecnica del nitrato d'argento secondo Hitchcock e Brown [5].

1) Standards "broad range" per SDS-PAGE: aprotinina (7 kD), lisozima (20 kD), inibitore della tripsina dei semi di soia (29 kD), anidraasi carbonica (34 kD), ovoalbumina (47 kD), albumina bovina (88 kD), β -galattosidasi (125 kD); 2) LPS di *Salmonella minnesota* S1114 (chemotipo wild, 10 μ g); 3) LPS di *Serratia marcescens* (chemotipo wild, 10 μ g); 4) LPS di *Proteus mirabilis* (chemotipo wild, 5 μ g); 5) LPS di *Proteus mirabilis* (chemotipo wild, 10 μ g); 6) LPS di *Salmonella minnesota* R595 (chemotipo rough, 10 μ g); 7) LPS di *Bartonella quintana* (10 μ g); 8) LPS di *Bartonella quintana* (20 μ g).

sota R595, il cui peso molecolare corrisponde a 3,1 kD. I rimanenti LPS di riferimento presentavano una immagine caratteristica della migrazione di endotossina di ceppi "smooth" all' SDS-PAGE, come già riportato in letteratura. Il test cromogenico al lisato di amebociti di limulus (LAL test) indicava una forte reattività anche a concentrazioni molto basse (6.2 pg/ml) (Tabella 1).

I campioni di sangue umano intero, stimolati con 1000 ng/ml di LPS di *B. quintana*, mostravano il rilascio di 1707 ± 378 pg/ml di $TNF\alpha$, mentre concentrazioni inferiori di LPS non stimolavano significative quantità di tale citochina.

È stata riportata discrepanza [6] tra la reattività al LAL test e altri effetti biologici del LPS di alcuni microrganismi; i nostri dati dimostrano che la elevata reattività al LAL test non è associata ad un altrettanto potente effetto pro-infiammatorio, come dimostrato dalla inefficacia delle concentrazioni di 10 e 100 ng/ml di LPS e dal valore non elevato di citochina stimolata da 1000 ng/ml di endotossina.

È stato dimostrato che il LPS è un importante componente della membrana esterna delle *Bartonelle* [4], e che tali microrganismi sono in grado di parassitare un elevato numero di cellule e tessuti di animali superiori, incluso l'uomo. Brouqui e Raoult [7] riportano che *B. quintana* invade e si moltiplica nelle cellule endoteliali ed in altri tipi cellulari rilasciando dalla superficie della membrana esterna batterica "blebs" nelle quali è contenuto LPS.

Nel caso di *Neisseria spp.* il LPS contenuto in tali "blebs" stimola una pronta e cospicua liberazione di citochine quali il $TNF\alpha$, e la sopravvivenza e la moltiplicazione del microrganismo è efficacemente controllata. Così non accade per *Bartonella* che insieme con altri parassiti endocellulari, quali *Ehrlichia* e *Chlamydia*, condivide la tendenza a determinare infezioni persistenti e malattie croniche [7, 8]. Questi organismi hanno, infatti, sviluppato delle varianti molecolari di prodotti batterici (per es. il LPS), meno attive in senso pro-infiammatorio, rispetto ad altri batteri gram-negativi, (per es. *Neisseria spp.*) che possono rilasciare molecole spesso associate a potenti reazioni infiammatorie a catena di tipo sistemico.

In conclusione i risultati del SDS-PAGE suggeriscono che il LPS di *B. quintana* ha un basso peso molecolare, con un chemotipo rugoso. Inoltre i risultati della reattività del LPS di *B. quintana* al LAL test e gli effetti sul rilascio di $TNF\alpha$ *in vitro* dimostrano che il prodotto batterico da noi esaminato potrebbe giocare un ruolo di primo pia-

Tabella 1 - Effetto del LPS di *Bartonella quintana*, di *E. coli*, di *S. marcescens* e di *S. minnesota* sulla reattività (O.D. 405 nm) al test cromogenico al lisato di amebociti di limulus (LAL test).

LPS (pg/ml)	O.D. 405 nm			
	<i>B. quintana</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. minnesota</i>
6.2	0.351 \pm 0.060	N.D.	N.D.	N.D.
12.5	0.587 \pm 0.029	0.175 \pm 0.022	0.143 \pm 0.018	0.147 \pm 0.019
25	0.694 \pm 0.042	0.424 \pm 0.002	0.218 \pm 0.010	0.185 \pm 0.044
50	1.195 \pm 0.048	0.638 \pm 0.006	0.447 \pm 0.008	0.330 \pm 0.037
100	1.297 \pm 0.050	1.141 \pm 0.010	0.910 \pm 0.013	0.508 \pm 0.029

N.D.: Non dosabile.

no nella patogenesi delle infezioni sostenute da *B. quintana* in quanto, contribuendo a mantenere quelle caratteristiche di cronicizzazione tipiche di tale infezione nel rapporto ospite-parassita, favorisce l'espressione di fattori angiogenici, unici

del genere *Bartonella*, responsabili in ultima analisi delle più classiche manifestazioni cliniche.

Key words: *Bartonella quintana*, lipopolysaccharide.

RIASSUNTO

Bartonella quintana, conosciuto come agente eziologico della febbre delle trincee, è stato recentemente isolato, con una incidenza crescente, da campioni clinici di pazienti affetti da AIDS, in casi di batteriemie persistenti, ed è associato alla eziologia di endocarditi. Uno tra i principali antigeni e fattori patogenetici dei batteri gram-negativi, inclusa *B. quintana*, è il lipopolisaccaride (LPS). Sulle caratteristiche del LPS di *Bartonella* sono disponibili poche informazioni. Scopo del nostro lavoro è stato quello di estrarre, purificare e caratterizzare il LPS di *B. quintana* e di valutarne l'effetto del LPS in esame sul rilascio di TNF- α nel modello sperimentale di sepsi costituito da campioni di sangue umano intero stimolati in vitro.

Il ceppo Oklahoma di *B. quintana* è stato fatto crescere su piastre di agar sangue di montone a 37°C ed incubato in atmosfera umidificata contenente 5% di CO₂. Le cellule sono state raccolte e lavate in soluzione fisiologica sterile e apirogena, sottoposte a procedimento di estrazione del LPS secondo la metodica di Westphal e Jann (1965), modificata da Minnick (1994). Dall'analisi su SDS-PAGE risultava che LPS di *B. quintana* è un chemotipo "deep rough". Il test cromogenico al lisato di amebociti di limulus (LAL test) indicava una forte reattività anche a concentrazioni molto basse (6.2 pg/ml). Campioni di sangue umano intero stimolati in vitro con 1000 ng/ml di LPS di *B. quintana* mostravano il rilascio di 1707±378 pg/ml di TNF α .

SUMMARY

Bartonella quintana has been reported as the cause of trench fever, persistent endocarditis, bacteraemia and has been isolated with an increasing incidence in clinical specimens from AIDS patients. One of the main pathogenic factors of gram-negative bacteria, including *B. quintana*, is the lipopolysaccharide (LPS). However, very little information is available on the features of *Bartonella* LPS. The aim of the present study was to extract, purify and characterise *B. quintana* LPS. The effect of the LPS under scrutiny was also evaluated on TNF α release by means of the "in vitro" human whole blood model of sepsis. The Oklahoma

strain of *B. quintana* was grown on sheep blood agar, at 37°C, in a moist atmosphere containing 5% carbon dioxide. Cells were harvested and washed in sterile and apyrogenic saline solution and LPS extracted following the procedure of Westphal e Jann (1965), modified by Minnick (1994). The LPS of *B. quintana* showed the migration pattern of a deep rough chemotype, and the chromogenic limulus amoebocyte lysate test (LAL test) revealed strong reactivity at low concentrations (6.2 pg/ml). Samples of human whole blood stimulated by 1000 ng/ml of *B. quintana* LPS released 1707±378 pg/ml of TNF α .

BIBLIOGRAFIA

- [1] Maurin M., Raoult D. *Bartonella* (Rochalimaea) quintana infections. Microbiol. Rev. 9, 273-292, 1996.
- [2] Anderson B.E., Neuman M.A. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. Clin. Microbiol. Rev. 10, 203-219, 1997.
- [3] Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Meth. Carb. Chem. 5, 83-91, 1965.
- [4] Minnick M.F. Identification of outer membrane proteins of *Bartonella bacilliformis*. Infect. Immun. 62, 2644-2648, 1994.

- [5] Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. J. Bacteriol. 154, 269-277, 1983.
- [6] Hurley J.C. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. Clin. Microbiol. Rev. 8, 268-292, 1995.
- [7] Brouqui P., Raoult D. *Bartonella quintana* invades and multiplies within endothelial cells in vitro and in vivo and forms intracellular blebs. Res. Microbiol. 147, 719-731, 1996.
- [8] Schaffner W., Standaert S.M. Ehrlichiosis-in pursuit of an emerging infection. N. Engl. J. Med. 334, 262-263, 1996.