




Metodi molecolari applicati alla caratterizzazione del *Campylobacter*: PFGE, *flaA*, MLST



Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Francesca Marotta, Giuliano Garofolo

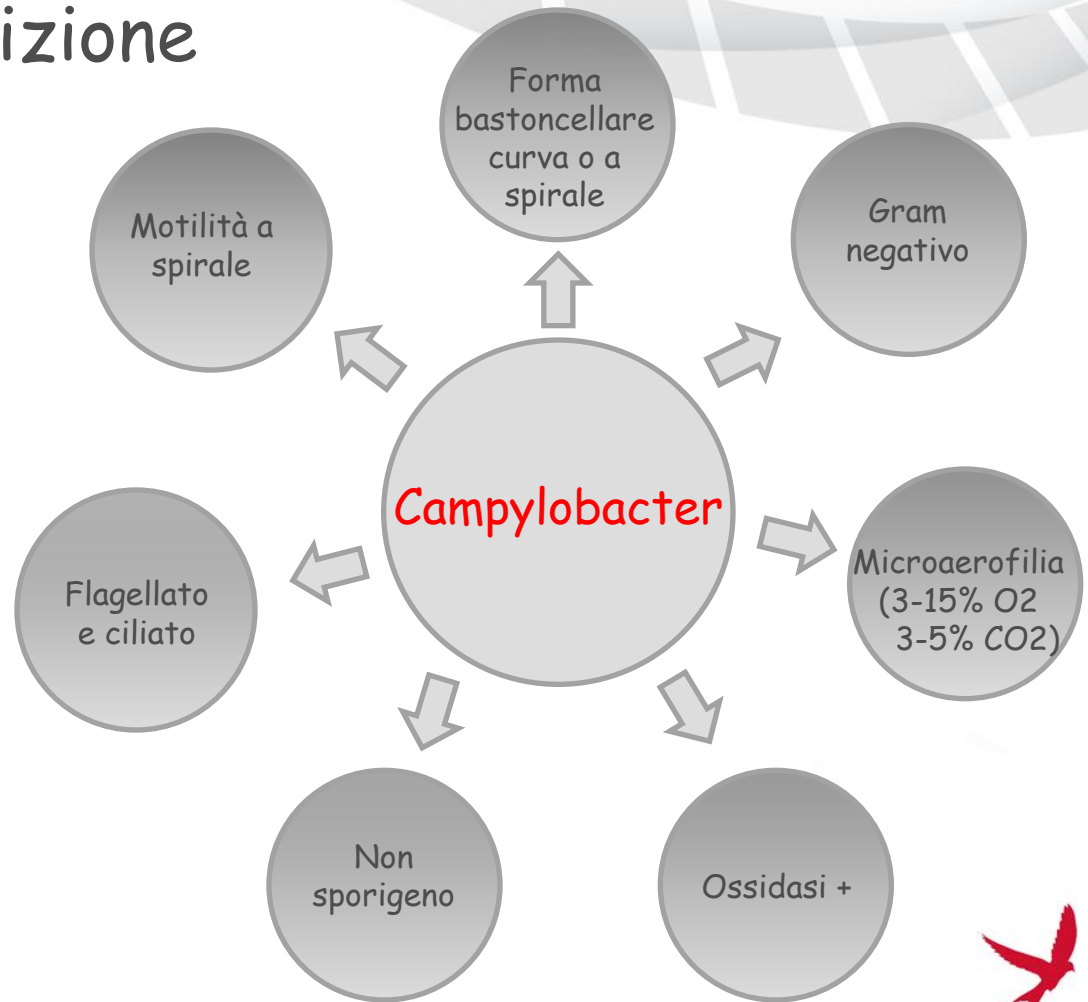
Teramo, 11-13 Dicembre 2013
Centro Internazionale per la Formazione e l'Informazione Veterinaria "Francesco Gramenzi"



Descrizione



E' un patogeno di origine zoonosica che ha come **serbatoio** numerose specie animali (spt. aviari) e come **veicolo di trasmissione** gli alimenti di origine animale



- E' la causa più comune di gastroenterite batterica acuta di origine alimentare in tutto il mondo
 - Oltre 200.000 casi in EU nel 2010 **EFSA Journal 2012;10(3):2597**

Problema di salute pubblica, di considerevole impatto socio-economico



Estremamente variabile da un punto di vista genetico

Non sono
cattivo!



Polli d'allevamento



Nonostante i numerosi allevamenti intensivi di polli e l'importanza economica di questo settore nel comparto delle produzioni animali italiane, le indagini svolte negli allevamenti

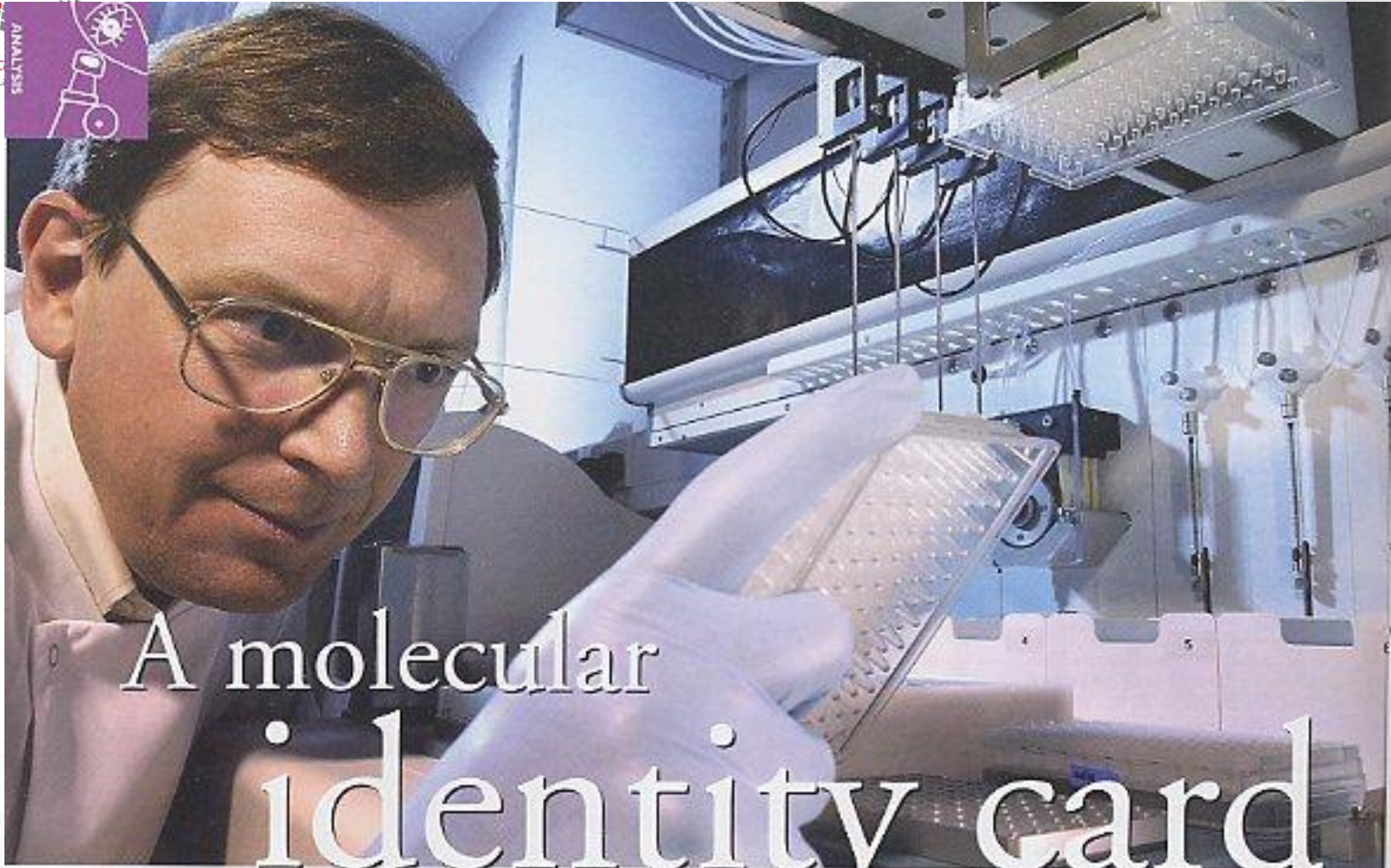
- per valutare la presenza di *Campylobacter* a livello di produzione primaria,
- e indagare la sua variabilità genetica

..... SONO ANCORA MOLTO LIMITATE!!!

SCOPO DEL PROGETTO

Caratterizzazione molecolare di questi microrganismi zoonotici associati alla filiera di produzione del pollo da ingrasso





A molecular identity card

PFGE

MLST

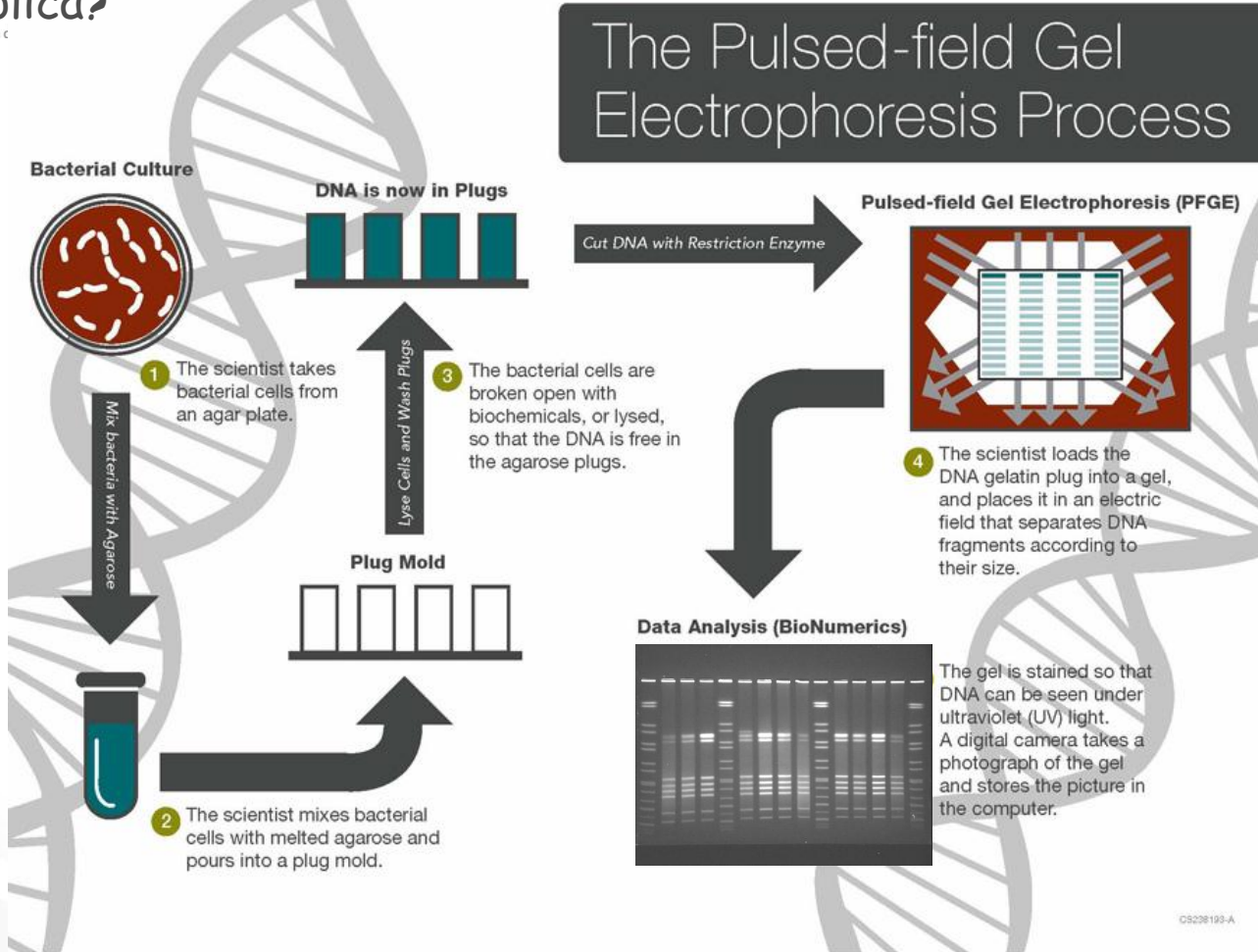
and bacterial typing

flaA-SVR



Che cos'è la PFGE?

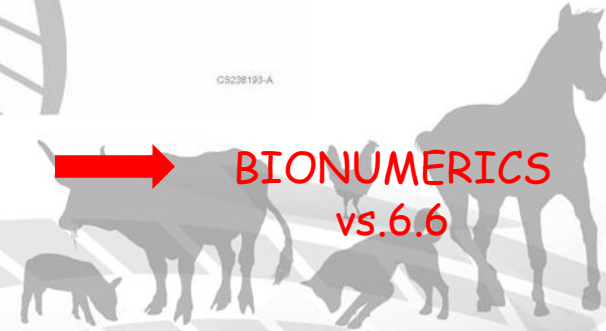
E' una tecnica utilizzata per generare un'impronta digitale del DNA di un batterio



DNA
fingerprint

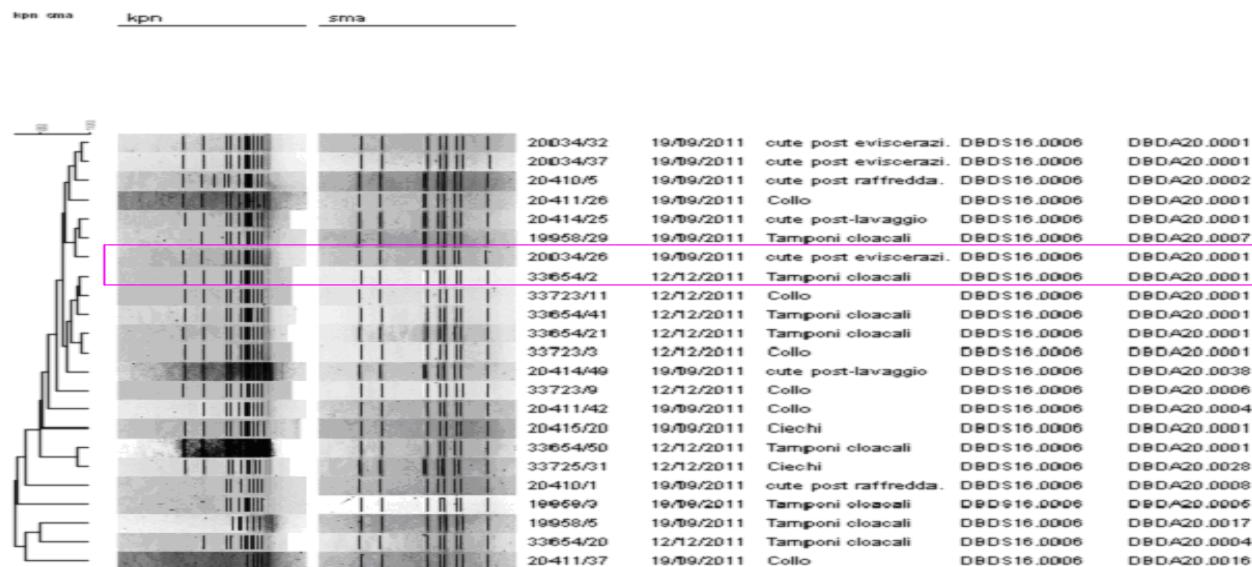
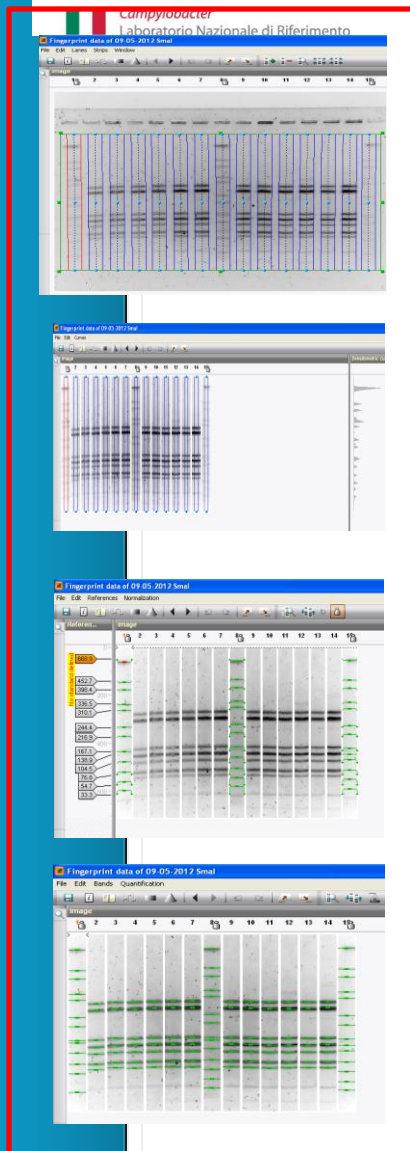


BIONUMERICs
vs.6.6





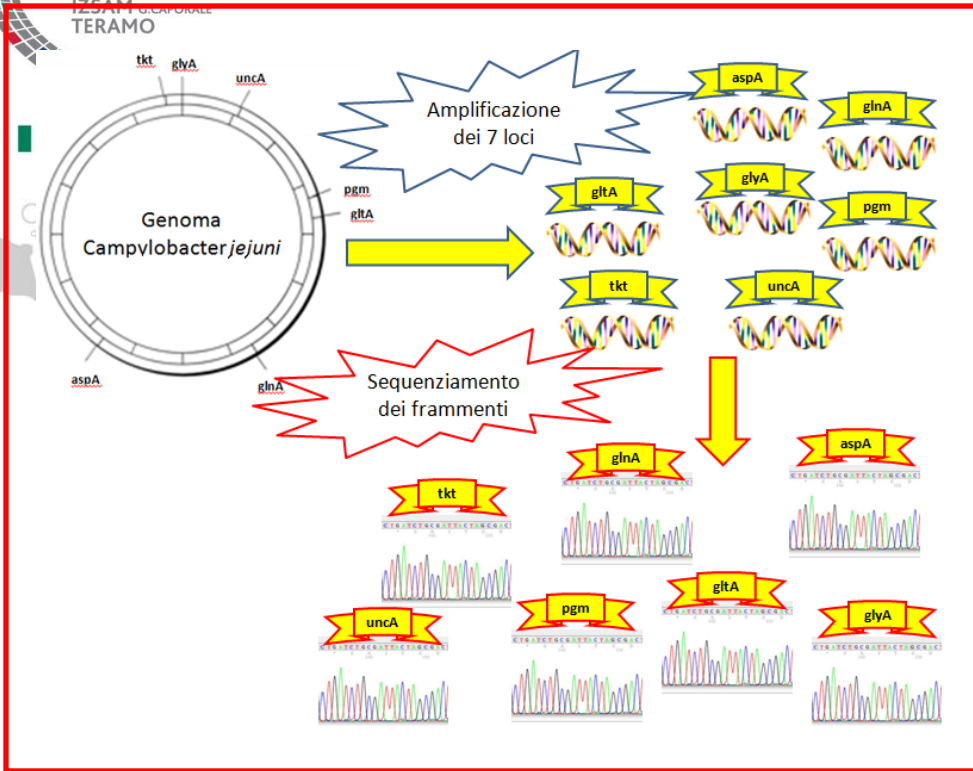
Analisi dell'immagine - BIONUMERICS -



Coefficiente di DICE (IS)
Metodo UPGMA
Tenover et al., 1995

MLST

(Dingle et al., 2001:)



- *gltA*: citrate synthase
- *uncA*: ATP synthase a subunit
- *aspA*: aspartase
- *glyA*: serine hydroxy methyl transferase
- *glnA*: glutamine synthetase
- *pgm*: phospho glucomutase
- *tkt*: transketolase

<http://pubmlst.org/campylobacter/>

Ogni sequenza è considerata un allele
a cui è associato un numero:
Ogni ceppo batterico → 7 alleli

The screenshot shows the 'Sequence query' form on the PubMLST website. It includes a search bar for entering a query sequence, a dropdown menu for selecting the locus (set to 'All loci'), and a dropdown for ordering results by 'locus'. There are 'Reset' and 'Submit' buttons at the bottom.

PROFILO ALLELICO (ST)

COMPLESSI CLONALI (CC)

The screenshot displays the search results for a clonal complex. It shows 'Exact matches found (7 loci)' and '1 record returned'. The results table is as follows:

ST	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkt	uncA	clonal complex
16	1	3	6	4	3	3	6	ST-22 complex

Below the table, there are 'Analysis tools' and an 'Export' section with buttons for 'Concatenate' and 'XMFA'.

S.T.A.R.T.2



flaA SVR



 **Campylobacter**
Laboratorio Nazionale di Riferimento



FLA4F: 5'- GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT GGT GC - 3'
FLA625RU: 5'- CAA GWC CTG TTC CWA CTG AAG - 3'

(Nachamkin et al, 1996)

Amplificazione SVR



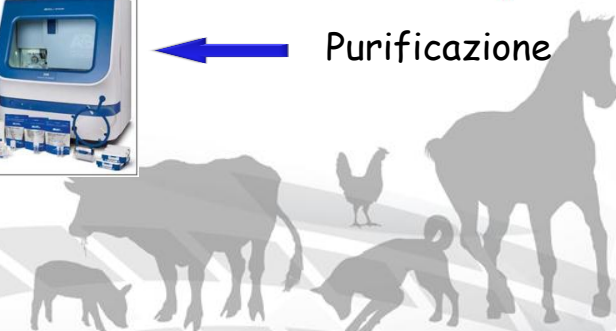
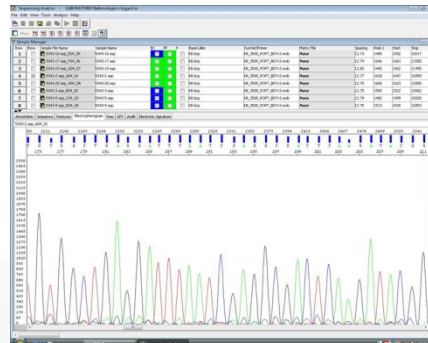
Purificazione

Reazione di sequenza

Purificazione

<http://pubmlst.org/campylobacter/flaA>

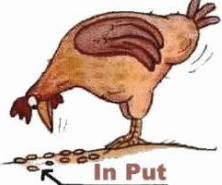
analisi di sequenza



Materiali e metodi

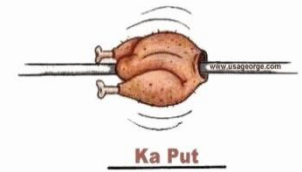


Campylobacter

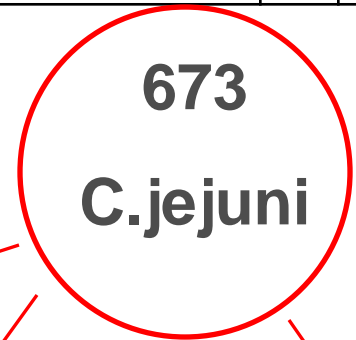


Tamponi cloacali polli in uscita dall'allevamento	A (n)	B (n)
Estate	23	30
Autunno	38	46
Inverno	38	38
Primavera	10	40

Campioni prelevati nelle varie fasi di macellazione	A (n)	B (n)
Estate	38	70
Autunno	34	54
Inverno	46	65
Primavera	19	47



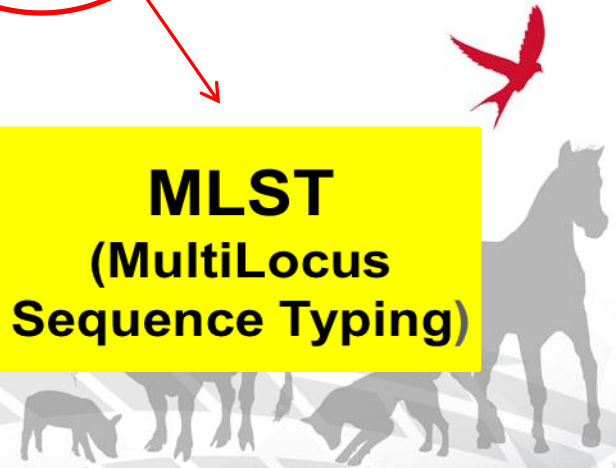
Cute post raffreddamento	A	B
Estate	1	15
Autunno	-	13
Inverno	6	19
Primavera	2	3



PFGE
(Pulsed Field Gel Electrophoresis)

flaA SVR
sequencing

MLST
(MultiLocus Sequence Typing)



Risultati



sma

sma



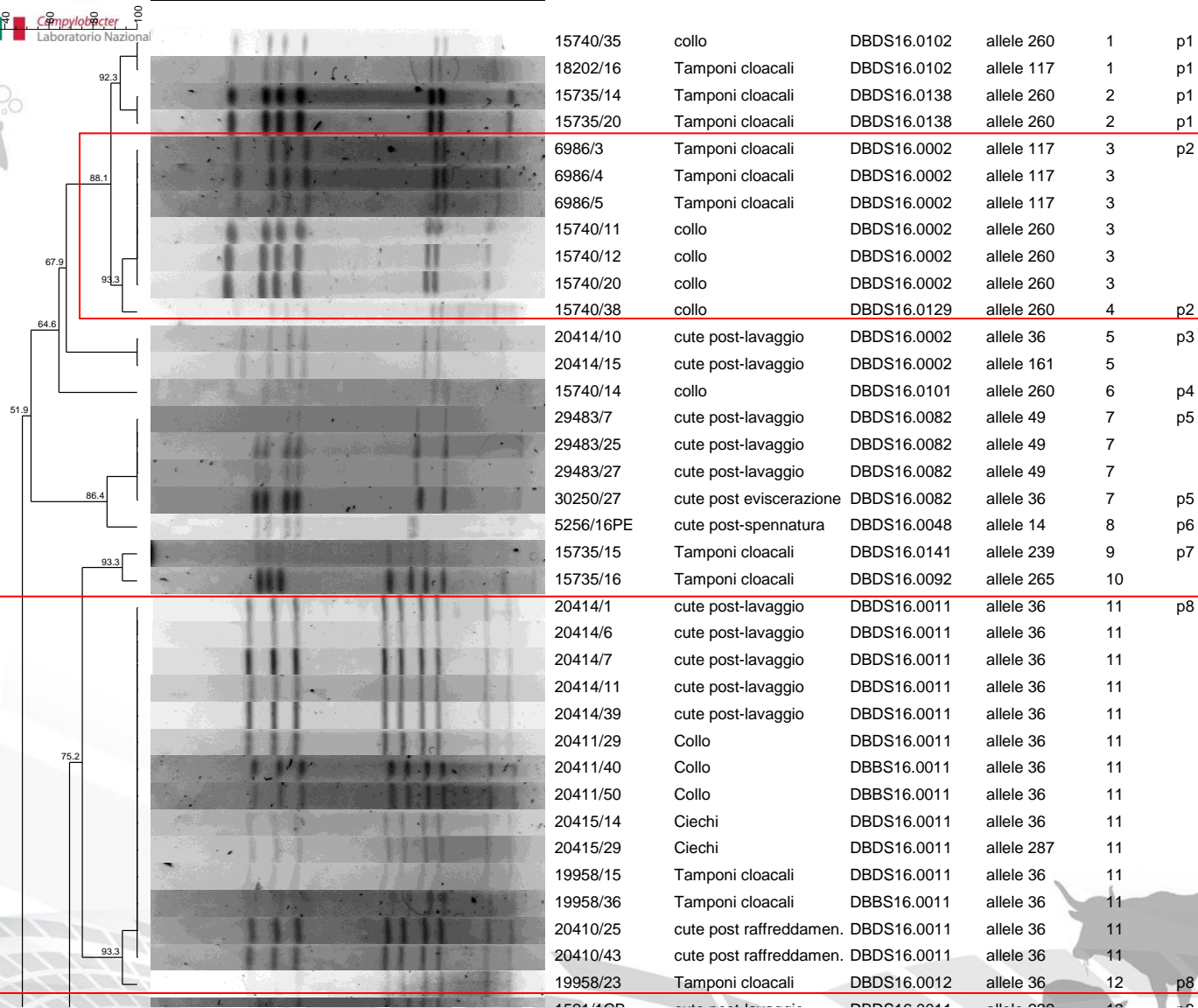
identificativo

matrice

Pulsotipo
PFGE - SmaI

flaA

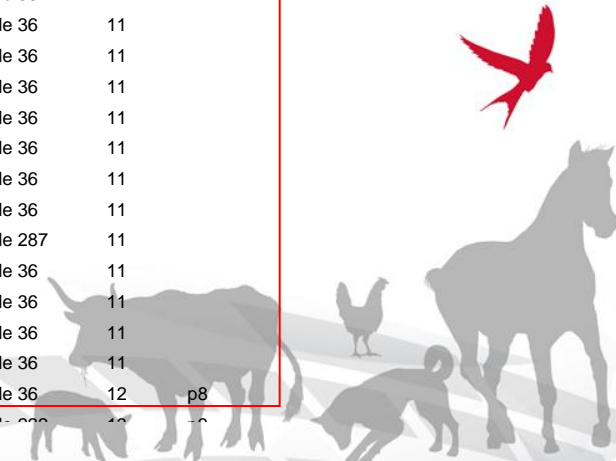
Pop. clonali
IS=95%



160 pulsotipi SmaI (IS=100%)

141 popolazioni clonali (IS≥95%)

25 alleli flaA



Risultati PFGE



 **Campylobacter**
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Tab.1

	ALLEVAMENTO	
	A	B
ESTATE	P8-P10-P22	P1-P14-P15- P16
AUTUNNO	P9- P16 -P24	(P2)-P3-P4-P6-P12-P25-P26
INVERNO	P10-P11	(P2)-P13-P18-P19-P20-P21-P23
PRIMAVERA	P16 -P17	(P2)-P4-P5-P6-P7-P13

P26 = Popolazioni clonali più rappresentative di *Cj* presenti nei vari cicli analizzati nei due allevamenti

Tab.2

A							
Cicli	Tamponi Cloacali	Cute post deiugulaz.	Cute post spennat.	Cute post evisceraz.	Intestini ciechi	Cute post lavaggio	Cute post raffreddamento
ESTATE	P8- P10	P8-P22	0	P22	P8-P10	P22	P10
AUTUNNO	P9-P16-P24	P9-P16	0	P9-P16	P9-P16-P24	P9-P16-P24	0
INVERNO	P10 -P11	P10	0	P10	P10	0	P10
PRIMAVERA	P17	-	P16-P17	-	P17	-	P17

Tab.3

B							
Cicli	Tamponi cloacali	Cute post deiugulaz.	Cute post spennat.	Cute post evisceraz.	Intestini ciechi	Cute post lavaggio	Cute post Raffreddamento
ESTATE	P1- P14- P15- P16	P1-P14- P15- P16	0	P14- P15- P16	P1- P15- P16	P1-P15-P16	P1- P15- P16
AUTUNNO	P4- P25- P26	P26	P3- P4- P26	P2- P3- P4- P12	P26	P3- P4- P12	P4- P6
INVERNO	P13- P18-P19-P23	P19-P20	P19-P21	P18-P19	P19-P23	P2-P19	P20-P23
PRIMAVERA	P2-P5-P6	P2-P7-P13	0	P2-P7	P2-	P2-P4	-

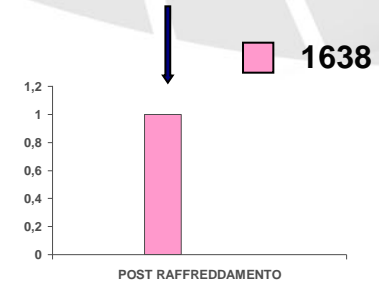
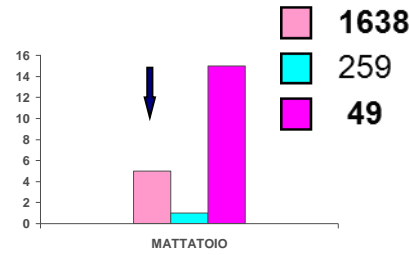
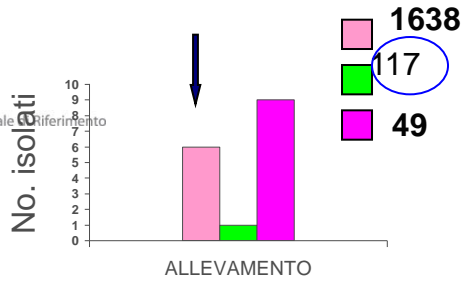
Risultati flaA SVR

-A-

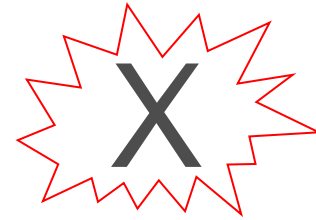
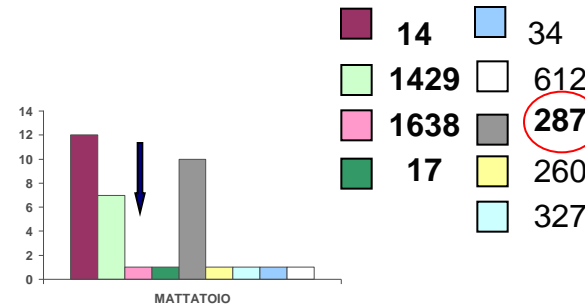
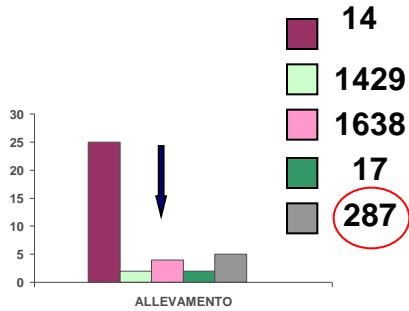


Campylobacter
Laboratorio Nazionale Referente

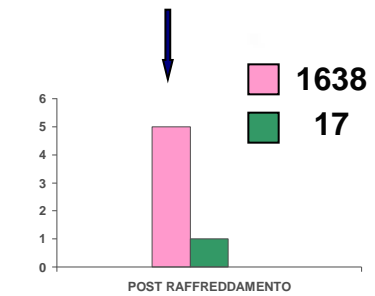
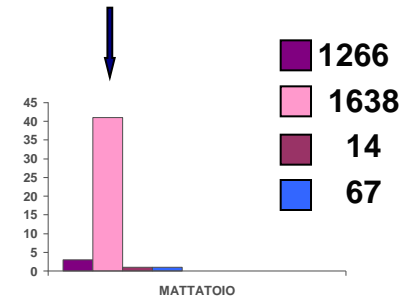
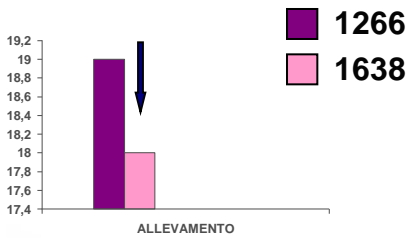
ESTATE



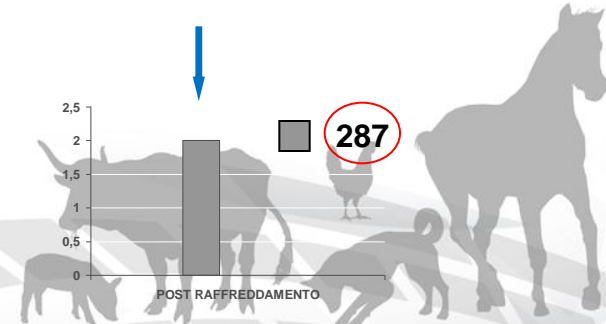
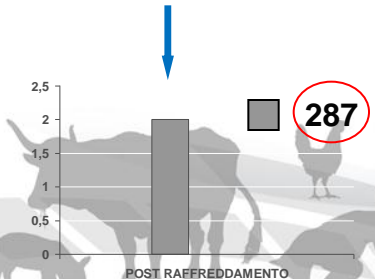
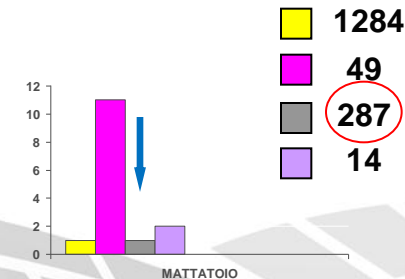
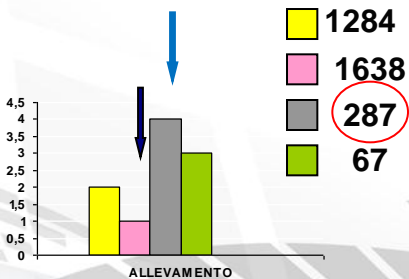
AUTUNNO



INVERNO



PRIMAVERA



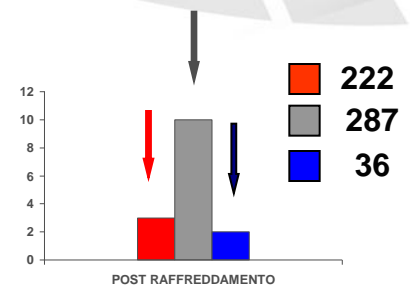
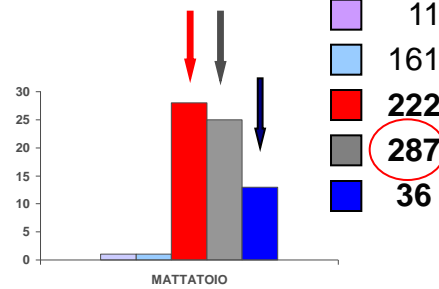
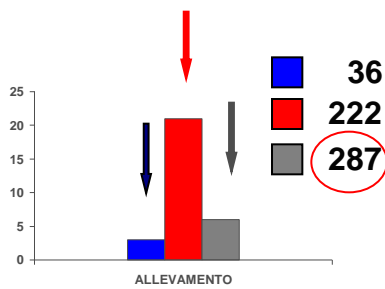
Risultati flaA SVR

-B-

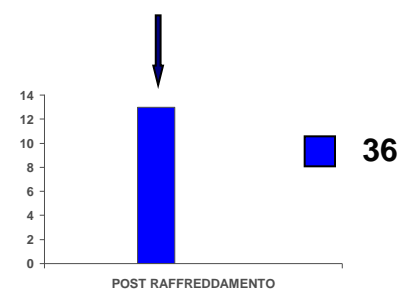
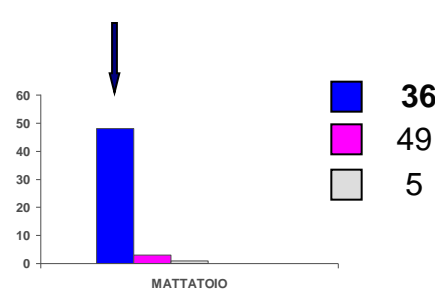
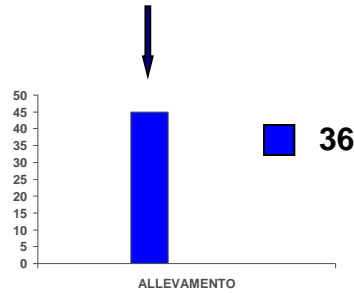


Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

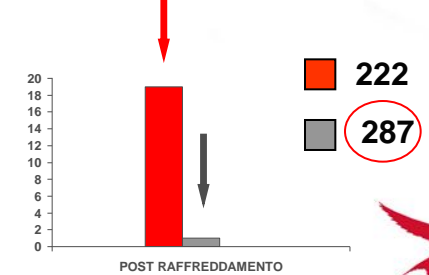
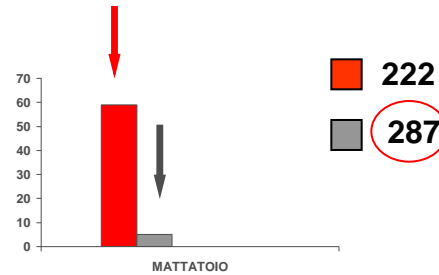
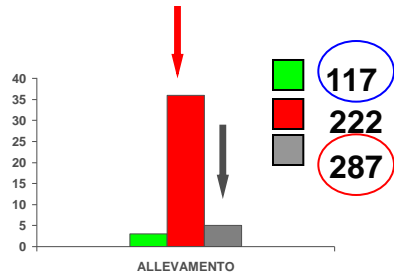
ESTATE



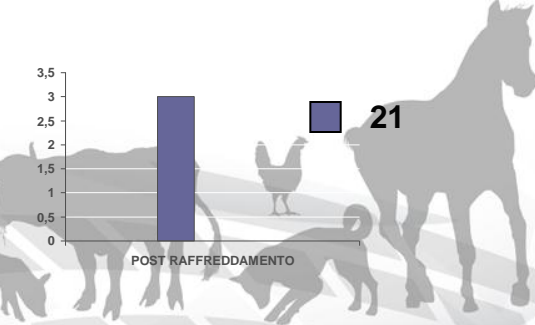
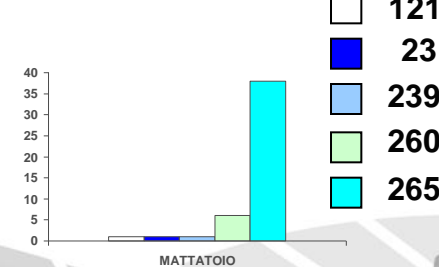
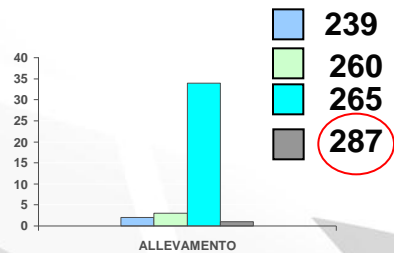
AUTUNNO



INVERNO



PRIMAVERA



Metodiche a confronto: PFGE e flaA SVR



	Popolaz. clonale	Num .campioni	Allevamento	Ciclo	Fase
Allele 1638	P8	1	A	Estate	Mattatoio
	P9	1	A	Autunno	Mattatoio
	P10	59	A	Inverno	Tamp.cloac., mattatoio, post raffredd.
	P11	1	A	Inverno	Tamp.cloac.
	P16	4	A	Autunno	Tamp.cloac.

Allele information - *fla* nucleotide: 1638

Provenance/meta data

locus: *fla*nucleotide
 allele: 1638

sequences: AAGGCAACTC AAGCGGCTCA AGATGGACAA AGTTTAAAAA CAAGAACCAT GCTTCAAGCA GATATCAACC GITTAATGGA AGAACTTGAC AATATCGCAA ATACTACTTC ATTTAACGGT AAGCACTTT TAAGTGGAAA TTTTATCAAT CAAGAATTC AAATCGGTGC GAGTTCAAAT CAAACTGTAA AAGTACCAT AGGAGCAACC CAGTCTTCTA AGATAGGTTT AACACGCTTT GAAACAGGAG GGAGAATTC ATCTAGTGGT GAAGTGGAAAT TTAICTTAA AAACACTAAT GGTATAGATG ATTITTCAGTT T

length: 321
 status: trace checked
 date entered: 2013-05-29
 timestamp: 2013-05-29
 sender: Francesca Marotta, IZSAM "G. Caporale", Teramo, Italy
 curator: Alison Cody, Department of Zoology, Oxford University, UK. (E-mail: Alison.Cody@zoo.ox.ac.uk)
 peptide id: 388

	Popolaz. clonale	Num .campioni	Allevamento	Ciclo	Fase
Allele 287	P9	1	A	Autunno	Mattatoio
	P15	1	B	Estate	Tamp.cloac.
	P16	32	A, B	Autunno	Tamp. Cloac., mattatoio
				Estate	Tamp.cloac., mattatoio, post raffredd-
	P17	6	A	Primavera	Tamp.cloac., mattatoio, post raffreddam.
	P19	1	B	Inverno	Mattatoio
	P23	8	B	Inverno	Tamp.cloac., mattatoio, post raffreddam.
P24	2	A	Autunno	Mattatoio	



Metodiche a confronto: PFGE e flaA SVR



 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

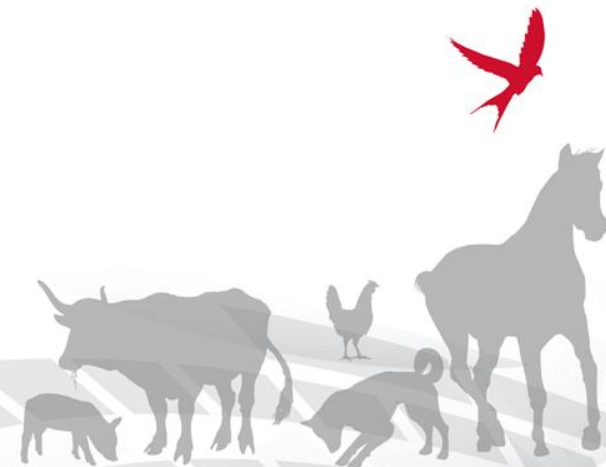
... ma la **P10** contiene non solo l'allele **1638** (59),

ma anche gli alleli **1266** (17)

14 (1)

17 (1)

67 (1)



Indici di diversità e correlazione



IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

Simpson's Index of Diversity



Campylobacter
Laboratori

Simpson's Index of Diversity and 95% CI

Name	# partitions	Simpson's ID	CI (95%)	CINA (95%)	Jackknife pseudo-values CI (95%)
PFGE	25	0.924	(0.913-0.934)	(0.913-0.935)	(0.913-0.934)
flaA-SVR	17	0.832	(0.815-0.849)	(0.815-0.850)	(0.815-0.849)

p-values between Simpson's Indexes of Diversity

	PFGE	flaA-SVR
PFGE		
flaA-SVR	<0.001	



p-value \geq 0.05



p-value < 0.05

Hubert and Arabie's Adjusted Rand

Adjusted Rand and jackknife pseudo-values 95% CI

	flaA-SVR	PFGE
flaA-SVR		
PFGE	0.363 (0.313-0.413)	



Risultati MLST (allevamento B-estate)



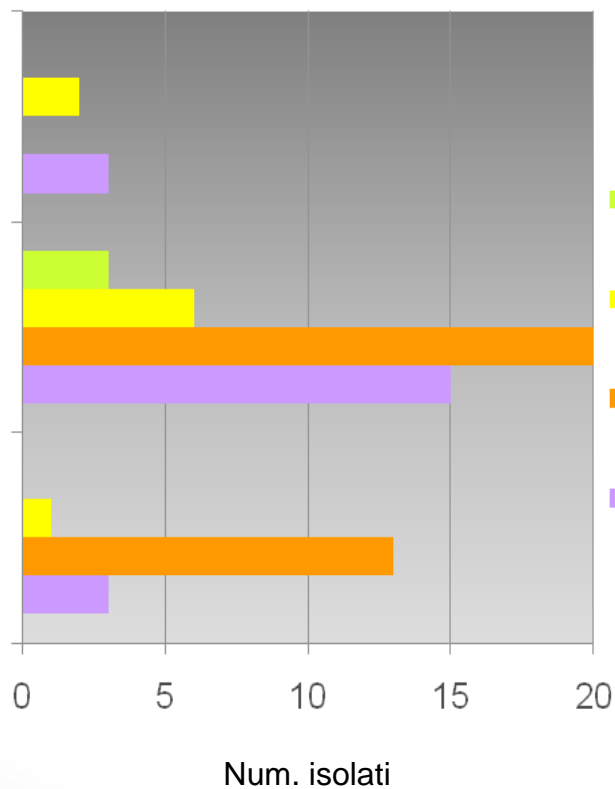
 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



post raffreddamento

mattatoio

tamponi cloacali



254 Isolati da uomo, latte crudo, carne di pollo in Europa, USA, Giappone, Sud Africa

726 isolati da uomo e carne di pollo in Europa, USA, Asia, Canada

34 isolati da pollo in Italia, 1 isolato da carne di pollo in Danimarca

24 isolati da pollo in Italia, 3 isolati da feci umane in nord Europa



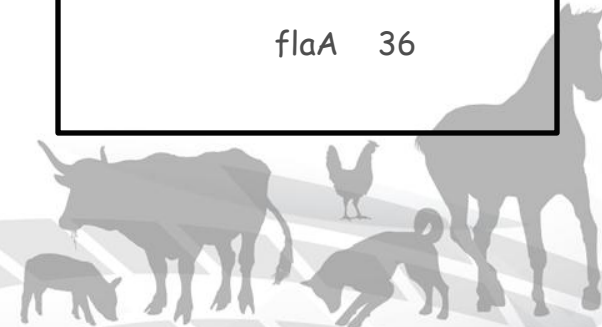
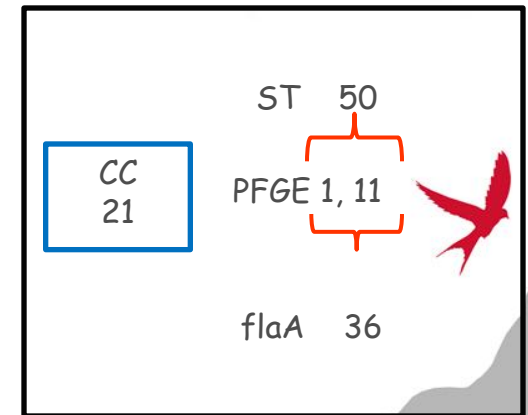
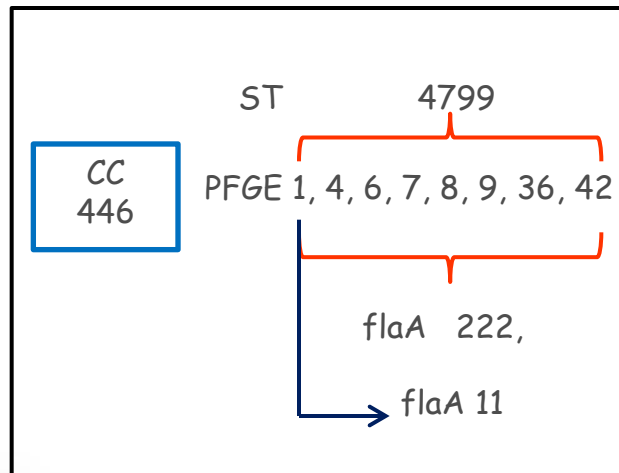
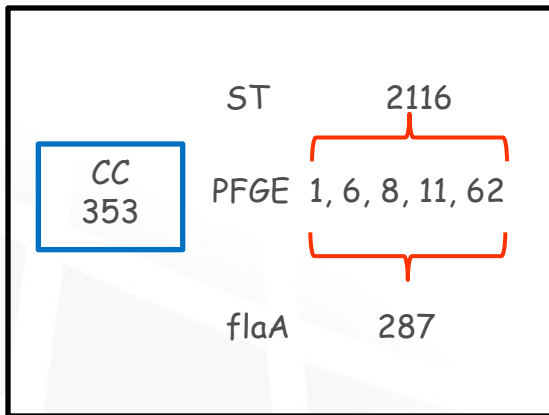
Metodiche a confronto: MLST, PFGE, flaA SVR



Campylobacter
Laboratorio Nazionale

Allevamento B-Estete

MLST profili	Pulsotipi PFGE			flaA type
	Tamponi cloacali	Mattatoio	Post raffredd.	
ST 2116_st-353 complex	6	1, 6, 62, 11	6, 8	287
ST 4799_st-446 complex	1, 6, 7, 8	1, 4, 6, 7, 9, 36, 42	-	222, 11
ST 50_st-21 complex	11	11, 1	11	36
ST 22_st-22 complex	-	2	-	36, 161



Conclusioni (1)

Non esiste una semplice relazione lineare tra i genotipi definiti dai 3 sistemi di tipizzazione utilizzati

Possiamo applicare un indice di diversità che ci dà una misura del potere discriminante delle 3 metodiche

Simpson's Index of Diversity

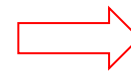
Simpson's Index of Diversity and 95% CI

Name	# partitions	Simpson's ID	CI (95%)	CINA (95%)	Jackknife pseudo-values CI (95%)
PFGE	4	0.679	(0.612-0.745)	(0.609-0.749)	(0.609-0.748)
flaA-SVR	4	0.625	(0.546-0.703)	(0.543-0.706)	(0.542-0.707)
MLST	3	0.614	(0.541-0.686)	(0.538-0.690)	(0.538-0.689)

p-values between Simpson's Indexes of Diversity

	PFGE	flaA-SVR	MLST
PFGE			
flaA-SVR	0.174		
MLST	0.065	0.582	

■ p-value ≥ 0.05 ■ p-value < 0.05



Tutte e 3 le metodiche hanno un DI simile!

Adjusted Rand

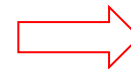
Adjusted Rand and jackknife pseudo-values 95% CI

	MLST	flaA-SVR	PFGE
MLST			
flaA-SVR	0.899 (0.757-1.000)		
PFGE	0.613 (0.393-0.834)	0.634 (0.424-0.846)	

p-values between Adjusted Rands

		p-value	
flaA-SVR ↔ MLST	vs	PFGE ↔ MLST	0.009

MLST ▼ ↔ MLST ▼ vs MLST ▼ ↔ MLST ▼ p-value



MLST e flaA SVR risultano significativamente congruenti!



Conclusioni (2)

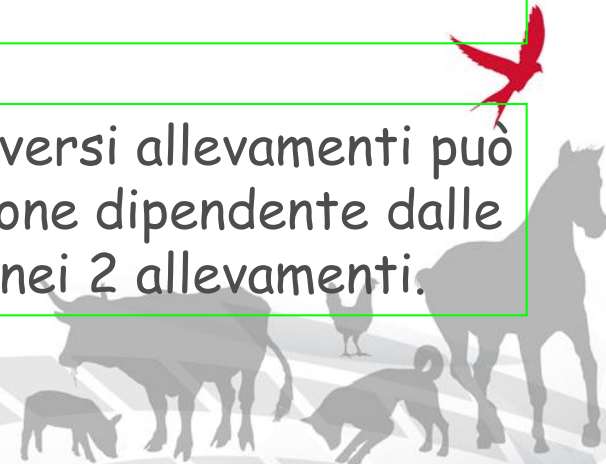
 **Campylobacter**
Laboratorio Nazionale di Riferimento

L'osservazione più evidente è la grande diversità genetica tra i ceppi di *C. jejuni*.


Presenza di popolazioni clonali caratteristiche della filiera avicola in esame, che con l'animale dall'allevamento entrano nel processo di macellazione e non subiscono sostanziali mutazioni fino alla fine dello stesso.

La presenza di una stessa popolazione all'interno dello stesso allevamento in più cicli presuppone la persistenza e la resistenza di alcuni ceppi all'ambiente.


La presenza di una stessa popolazione nei 2 diversi allevamenti può essere un indice di una probabile contaminazione dipendente dalle maestranze che operano contestualmente nei 2 allevamenti.



Conclusioni (3)



Data la distribuzione ubiquitaria di *Campylobacter*, la possibilità di prevenzione e controllo nella catena alimentare dipende in larga misura dalla gestione della produzione primaria, cioè dalla possibilità di prevenire l'introduzione del *Campylobacter* negli allevamenti e di prevenire la contaminazione fecale di alimenti affinando le tecniche di macellazione.



Le misure igieniche preventive lungo tutta la filiera di produzione dalla macellazione al prodotto finito sono i mezzi più efficaci per controllare i patogeni a trasmissione alimentare.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

