

Valutazione dell'efficacia di un protocollo sperimentale per l'isolamento di batteriofagi contro *Campylobacter jejuni*



Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

D'Angelantonio Daniela, Aprea Giuseppe*, Boni Arianna, D'Agostino Krizia, Battistelli Noemi, Pomilio Francesco, Migliorati Giacomo

Reparto di Igiene delle Tecnologie Alimentari e dell'Alimentazione Animale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo

* Presenting author

Keywords Batteriofago, *Campylobacter*, Pool batterico

Introduzione

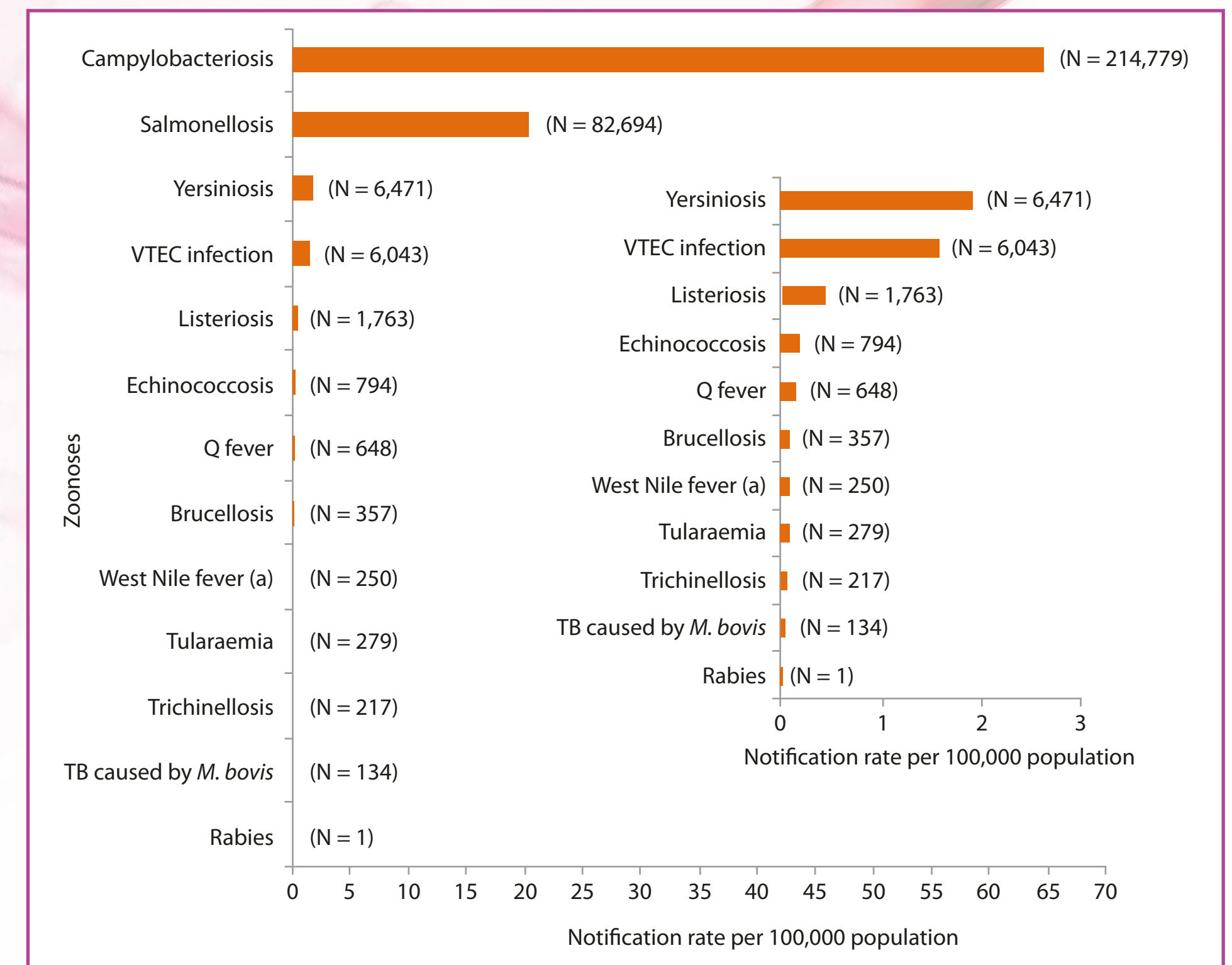
Campylobacter rappresenta la prima causa di malattia batterica di origine alimentare dell'ultimo secolo (1), con oltre 214.779 casi segnalati nell'uomo (2) (Figura 1). Oltre l'80% delle infezioni sono causate da *Campylobacter jejuni*, specie ubiquitaria in natura e negli animali domestici, con conseguente contaminazione di molti alimenti crudi, sia di origine vegetale che animale. Il pollo è comunque considerato il principale reservoir (3), probabilmente a causa delle condizioni di microaerofilia ciecali e dell'elevata temperatura corporea.

La campilobatteriosi umana, oltre a patologie gastrointestinali, può esitare in sequele croniche gravi come l'artrite reattiva e la sindrome di Guillan-Barré. Ulteriori dati allarmanti sono quelli relativi allo sviluppo di antibiotico resistenza (4), stimolando pertanto la comunità scientifica nell'individuazione di metodi alternativi per il controllo di questo patogeno.

I batteriofagi (fagi) sono i naturali competitori dei batteri, replicano all'interno di specifici "ospiti" ed esprimono la loro attività antimicrobica attraverso l'infezione e la distruzione della cellula procariotica. La loro estrema specificità nei confronti del patogeno bersaglio ed il carattere di innocuità nei confronti delle cellule animali li rende candidati ideali per le applicazioni volte ad aumentare la sicurezza alimentare e nel prevenire o ridurre la colonizzazione degli allevamenti (6).

È noto che per l'isolamento dei fagi da campioni ambientali è indispensabile eseguire una fase di "prearricchimento", che consenta l'individuazione di fagi a titoli bassi ed indeboliti, allo scopo di incrementarne il titolo e riattivarli per renderli coltivabili. Inoltre è altrettanto noto che le differenze antigeniche somatiche e flagellari dei diversi ceppi di *Campylobacter* incidono sulla variabilità dei fagi isolabili dall'ambiente (7). Lo scopo del lavoro è stato quello di verificare l'efficacia di un protocollo sperimentale di prearricchimento per l'isolamento dall'ambiente di nuovi fagi contro *C. jejuni*, basato sulla combinazione di diversi ceppi ospiti. In particolare sono stati utilizzati come materiali di riferimento il fago CP220, *C. jejuni* (NCTC 12662) ed altri otto ceppi di *C. jejuni* isolati da allevamenti avicoli. I *Campylobacter* sono stati scelti sulla base di profonde differenze antigeniche e flagellari.

Figura 1. Notifiche di zoonosi riportate in casi umani confermati nel 2013 in Europa (2).



Materiali e metodi

Batteriofago, ceppo batterico, terreni e condizioni di coltura. Per l'esecuzione delle prove sono stati utilizzati 9 ceppi di *C. jejuni*. La lista completa dei ceppi e delle loro caratteristiche è stata riportata in Tabella 1. In particolare il ceppo NCTC12662 è noto per essere particolarmente sensibile all'attacco dei fagi ed è stato scelto come ospite rivelatore della replicazione e titolazione (Spot Assay) del fago CP220 (Figura 2).

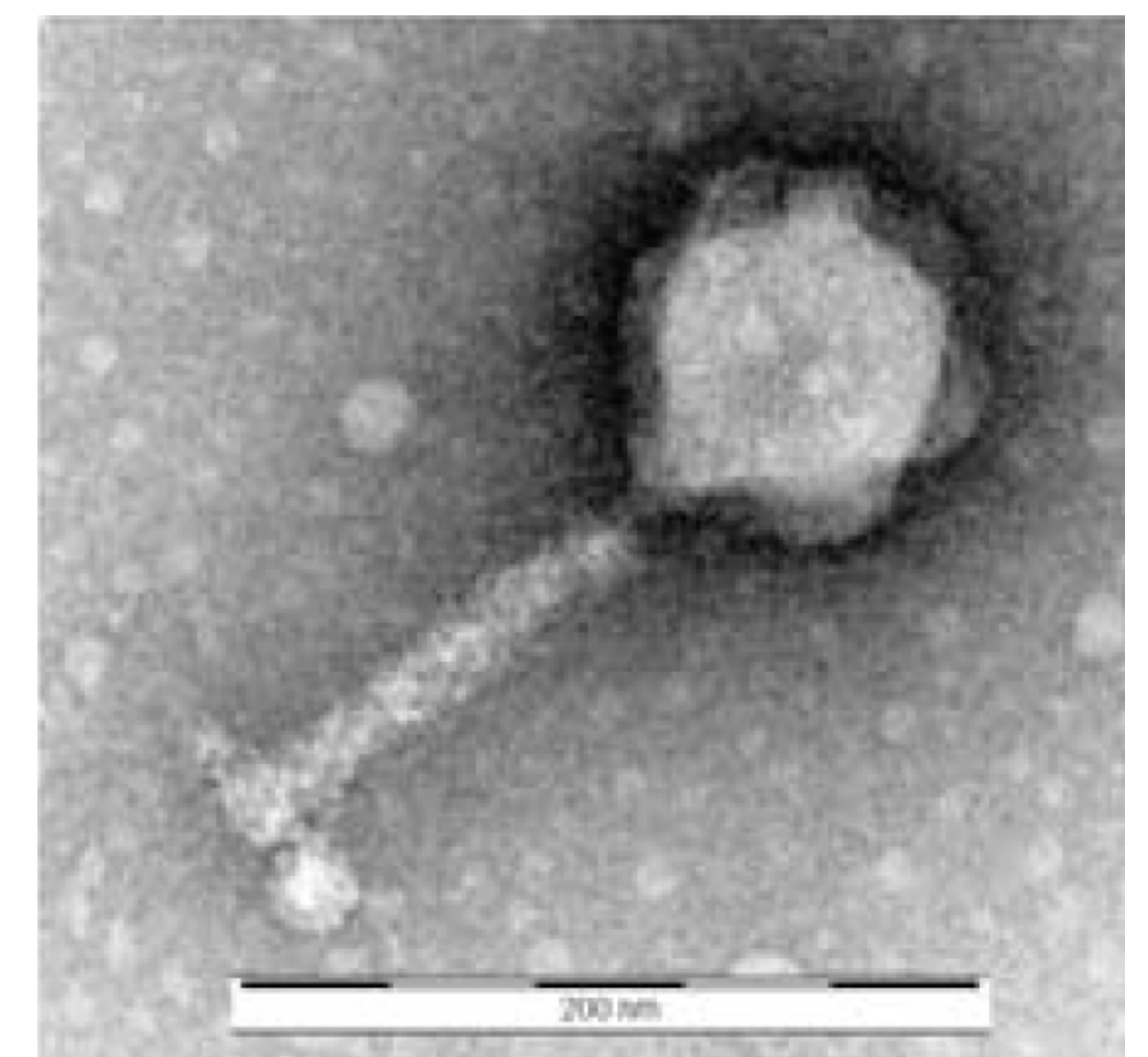
Dopo semina su Columbia blood agar (Oxoid), i 9 ceppi batterici sono stati incubati separatamente a 42 ± 1 °C, in condizioni di microaerofilia, per 18-20 h. In seguito, alcune colonie sono state trasferite in New Zealand Casamino Yeast Broth 1X (NZCYMB, Sigma) supplementato con CaCl₂ (1 mM concentrazione finale) e, dopo aver raggiunto una densità ottica (600nm) di 0,35, (Eppendorf, Hamburg, Germany) corrispondente a circa 10^8 ufc/ml, la brodocultura batterica è stata incubata per 4 h a 37 ± 1 °C in condizioni di microaerofilia. Successivamente 200 µl di ogni brodocultura sono stati prelevati e miscelati in modo da costituire due diverse soluzioni batteriche (pool) composte ciascuna da ceppi di campo più il ceppo NCTC12662. Le miscele di ospiti sono state denominate come pool 1, comprendente i ceppi NCTC12662, 252aM/11A, 252bM/11A, IZSAM/25, 252cM/12A, e pool 2, comprendente i ceppi NCTC12662, 252dM/12A, 252eM/12A, 252fM/12A, 252gM/12A.

Prearricchimento. Il fago CP220 è stato diluito in brodo SM (Tris-HCl con NaCl, MgSO₄ e gelatina 0,01 %) mediante diluizioni scalari in base 10, fino al raggiungimento del titolo di 10^3 unità formanti placca per ml (ufp/ml). Il fago è stato quindi sottoposto a prearricchimento, usando separatamente ambedue i pool, mediante la seguente procedura: 4 ml di fago 10^3 ufp/ml sono stati aggiunti ad 1 ml di NZCYM 5X con 5 µl di CaCl₂ 1M e 50 µl di brodocultura del pool 1 e del pool 2 separatamente. Parallelamente è stato allestito un prearricchimento utilizzando soltanto il ceppo di riferimento NCTC12662. Dopo incubazione per 18-24 h a 37 ± 1 °C in microaerofilia ed agitazione (VWR, USA) a 125 rivoluzioni per minuto (rpm), alle colture è stato aggiunto cloroformio (Sigma-Aldrich) 1 % ed il tutto è stato sottoposto a centrifugazione (Eppendorf, Hamburg, Germany) a 4.500 g per 15 min. I surnatanti sono stati filtrati con filtri da 0,45 nm e titolati mediante tecnica di Spot Assay (7).

Tabella 1. Ospiti batterici utilizzati nel test di prearricchimento, con differenti caratteristiche relative a sierotipo di Penner, pulsotipo (PFGE) ed antigene flagellare.

Ceppi di <i>C. jejuni</i>	Sierotipizzazione di Penner	PFGE type (Smal)	PFGE type (Kpnl)	Fla
NCTC12662	HS:5j	-	-	-
252aM/11A	HS:1,44	1	I	allele 36
252bM/11A	HS:3	2	II	allele 14
IZSAM/25	HS:15	3	III	allele 1638
252cM/12A	HS:52	4	IV	allele 222
252dM/12A	HS:57	5	V	allele 287
252eM/12A	HS:4,13,16,43,50	6	VI	allele 1284
252fM/12A	HS:5	7	VII	allele 287
252gM/12A	HS:55	8	VIII	allele 265

Figura 2. Morfologia del fago CP220 al microscopio elettronico a trasmissione (5).



Risultati e discussione

Utilizzando per il prearricchimento il pool 1 di ceppi ospiti, il fago CP220 ha incrementato il titolo di 3 log, raggiungendo il valore di 3×10^6 ufp/ml. Mediante pool 2, il fago CP220 ha incrementato il titolo di 5 log, raggiungendo il valore di 3×10^8 ufp/ml (Figura 3). Utilizzando il solo ceppo sensibile NCTC12662, il fago CP220 ha incrementato il suo titolo di 4 log, raggiungendo il titolo di 3×10^7 ufp/ml (Tabella 2).

I risultati mostrano come i ceppi di *Campylobacter* in pool non abbiano manifestato alcuna forma di competizione durante la fase di prearricchimento del fago ed inoltre i titoli raggiunti soddisfano pienamente quanto ci si attendeva, non discostandosi significativamente dal titolo raggiunto utilizzando unicamente il ceppo NCTC12662 come ospite.

In letteratura sono stati pubblicati molti lavori che utilizzano un solo ceppo particolarmente sensibile per l'isolamento di fagi, limitando a nostro avviso la probabilità di isolare dall'ambiente un gruppo di fagi eterogeneo ed utile al potenziale controllo di una più ampia popolazione di ceppi di *Campylobacter* spp. Mediante le attività condotte è stato pertanto individuato un protocollo sperimentale che per le sue caratteristiche di utilizzazione risulta più rapido, meno costoso ed utile per l'isolamento di un gruppo più diversificato di fagi dall'ambiente rispetto a quanto proposto da molti altri autori (8).

Figura 3. Morfologia delle placche del fago CP220 mediante tecnica di Spot Assay per la lettura del titolo. In evidenza le 7 placche di lisi.

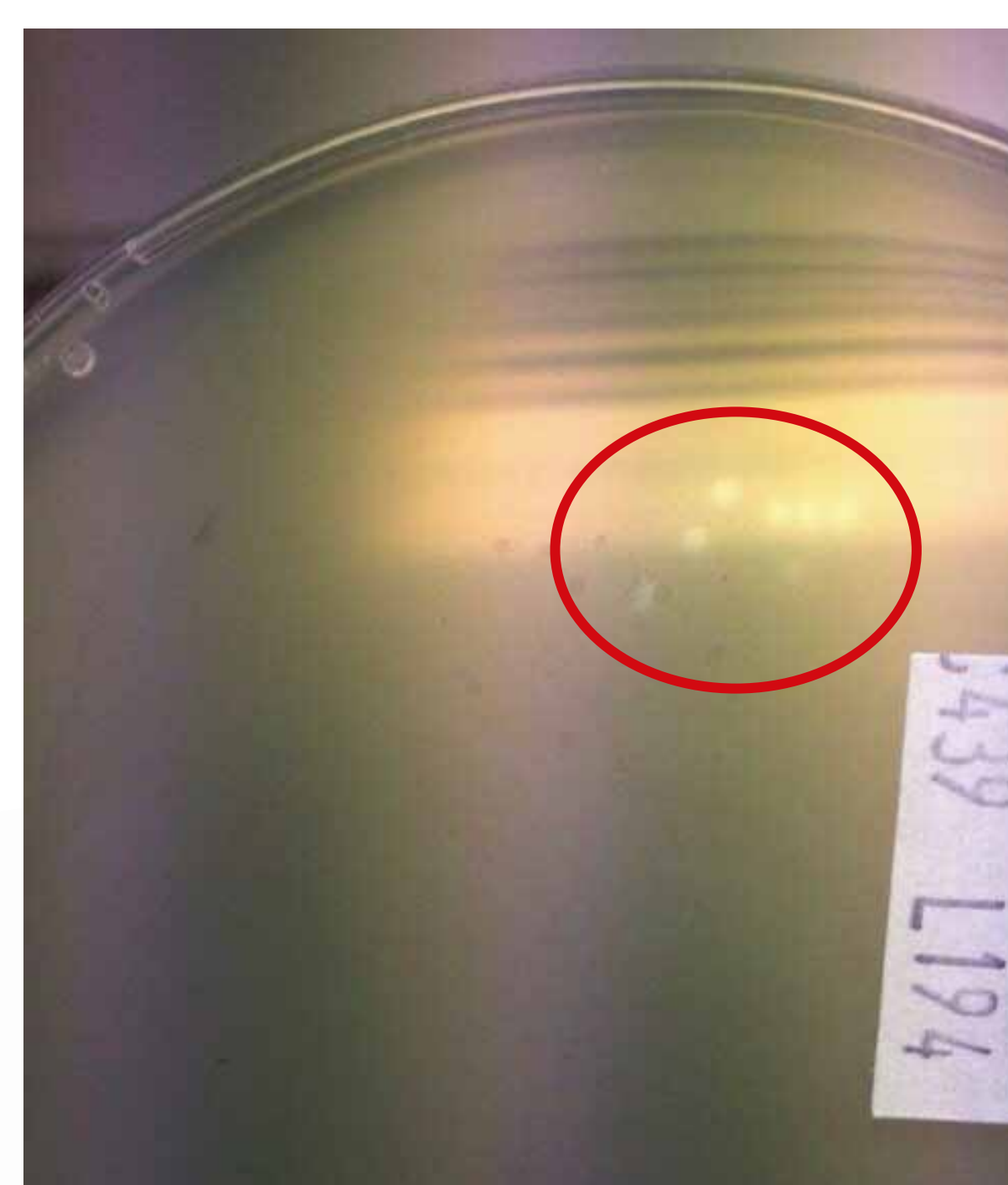


Tabella 2. Risultati relativi al prearricchimento del fago CP220 mediante l'utilizzo del ceppo ospite NCTC12662 e dei pool batterici 1 e 2.

Prearricchimento	Numero placche (diluizione)	Aumento titolo	Titolo post prearricchimento (ufp/ml)
Fago CP220 (10^3 ufp/ml) + NCTC12662	1 (10^{-6})	4 log	3×10^7
Fago CP220 (10^3 ufp/ml) + Pool 1	1 (10^{-5})	3 log	3×10^6
Fago CP220 (10^3 ufp/ml) + Pool 2	10 (10^{-6})	5 log	3×10^8

Bibliografia

- Kaakoush N.O., Castaño-Rodríguez N., Mitchell H.M. & Man S.M. 2015. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clinical microbiology reviews*, **28** (3), 687-720.
- EFSA. 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, **13** (1).
- EFSA. 2011. Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal*, **9**, 141.
- EFSA. 2015. ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*, **13** (1).
- El-Shibiny A., Scott A., Timms A., Metawea Y., Connerton P. & Connerton I. 2009. Application of a Group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *Journal of Food Protection*, **72** (4), 733-740.
- Janež N. & Loc-Carrillo C. 2013. Use of phages to control *Campylobacter* spp. *Journal of microbiological methods*, **95** (1), 68-75.
- Sørensen M.C.H., Gency Y.E., Birk T. & Brøndsted L. 2015. Primary isolation strain determines both phage type and receptors recognised by *Campylobacter jejuni* bacteriophages. *PLoS One*, **10** (1).
- Owens J., Barton M.D. & Heuzenroeder M.W. 2013. The isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* bacteriophages from free range and indoor poultry. *Veterinary microbiology*, **162** (1), 144-150.