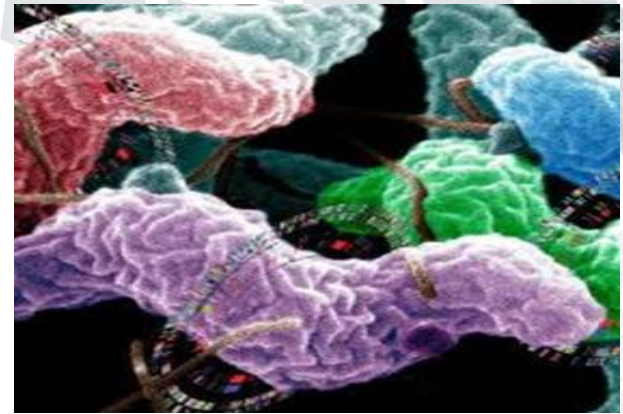




ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

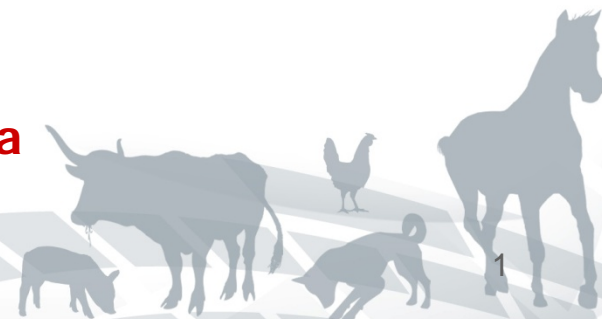


Valutazione della diversità genetica fra ceppi di Campylobacter jejuni e Campylobacter coli isolati da alimenti e animali.

Laboratorio Nazionale Riferimento Campylobacter
Di Giannatale Elisabetta

Teramo 09/07/2012

Auditorium Parco della Scienza



Risk based microbiological criteria: a tool for consumers protection and intervention strategies optimization

MSRFPD0107



b2201277 [RM] © www.visualphotos.com



Campylobacter

- Il *Campylobacter* rappresenta la causa più comune di gastroenterite batterica acuta di origine alimentare in tutto il mondo
- importante problema di salute pubblica, di considerevole impatto socio-economico
- Oltre 200.000 casi notificati in EU nel 2010;

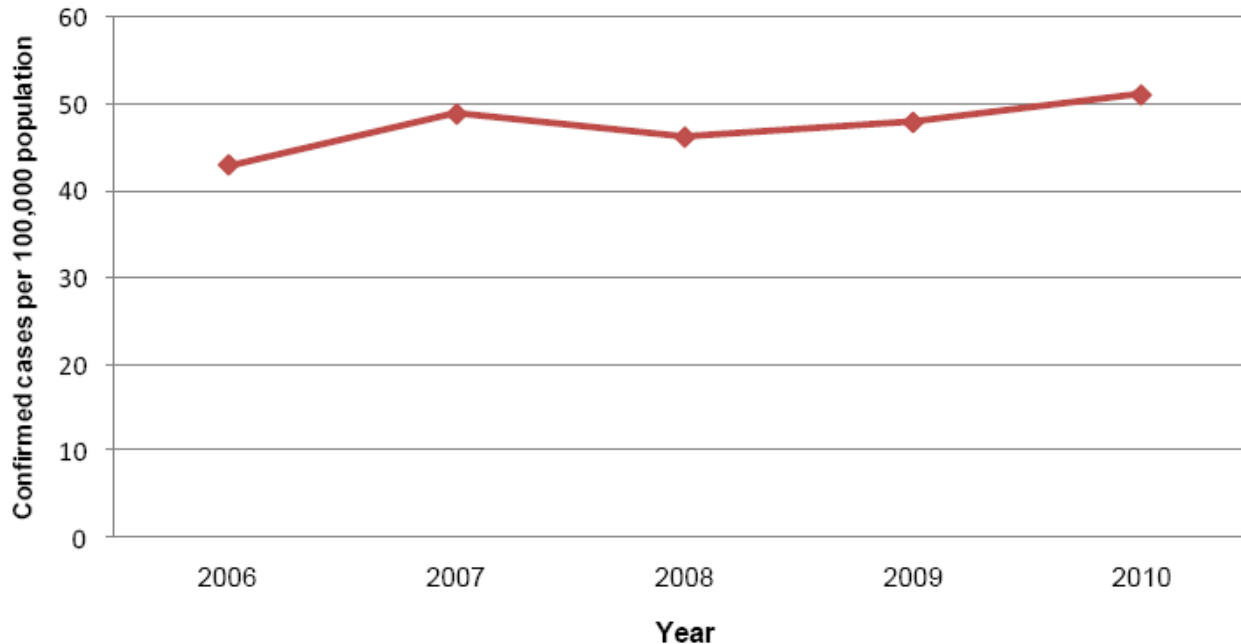




ISTITUTO NAZIONALE
TERAMO

Casi umani di Campylobacteriosi 2006-2010 in EU

EFSA Journal 2012;10(3):2597 (dati EFSA/ECDC)

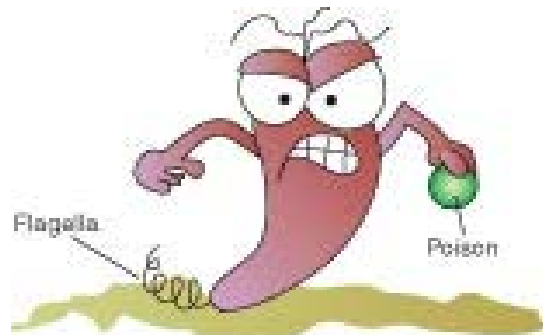


Source (for EU trend): Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Hungary, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, Netherlands, Poland, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, and United Kingdom.





Specie maggiormente coinvolta nell'uomo




**Campylobacter
jejuni**

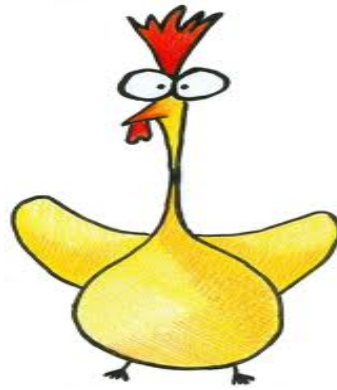


Campylobacter coli



- 
- La natura sporadica della malattia nell'uomo, l'ampia distribuzione del microrganismo negli animali d'allevamento e la sua eterogeneità antigenica e genetica rendono complesso lo studio e la conoscenza dell'epidemiologia di *Campylobacter*





- *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* sono le specie maggiormente coinvolte. *Campylobacter jejuni*, con il 36.4% degli isolati, è la specie maggiormente associata alle infezioni umane, e nei polli rappresenta il 67.8% degli isolati; questi ultimi hanno mostrato un livello di resistenza alla Ciprofloxacina (Cip) pari al 30.6% [EFSA, 2011;].



- prevalenza di forme sporadiche
- le carni di pollame sono responsabili della forma sporadica dell'infezione (parere EFSA, 2005b)
- la manipolazione, preparazione e consumo di carne di broiler sia responsabile del 20% to 30% dei casi di Campylobacteriosi umana, mentre il 50% to 80% potrebbe essere dovuto al pollo come riserva nel suo complesso (EFSA Journal 2010)

..





La tipizzazione molecolare ha assunto un ruolo crescente nelle indagini epidemiologiche e nelle reti di sorveglianza, migliorando la capacità di rilevare e monitorare epidemie, rappresentando uno strumento fondamentale per il rintraccio delle fonti di infezione e ampliando le conoscenze sulla genetica di popolazione, epidemiologia ed ecologia dei patogeni a trasmissione alimentare.



scopo

Lo scopo di questo progetto di ricerca è stato quello di indagare l'estensione della diversità genetica tra ceppi di *C. jejuni* and *C. coli* al fine di proporre un modello di network di sorveglianza, in cui le tecniche di epidemiologia molecolare possano contribuire all'identificazione di cloni epidemici circolanti su scala nazionale, o dotati di peculiari proprietà di virulenza o antibiotico-resistenza.



Al fine di acquisire maggiori conoscenze sul background fenotipico e molecolare, abbiamo analizzato i ceppi per determinarne il loro tipo R e i meccanismi molecolari che li determinano, il profilo di macrorestrizione, la presenza di geni di virulenza associati alla motilità e al trasporto, adesione, capsula e sintesi, processo di invasione dell'antigene, produzione di tossine, nella colonizzazione del pollo e nella biosintesi dei LOS.



Metodi di indagine

- Identificazione Campylobacter/Arcobacter ed Helicobacter mediante PCR-RFLP (Marshall S. et al 1999)
- Identificazione di Campylobacter sp. mediante PCR multiplex (Wang et al, 2002, modificata)
- Determinazione della sensibilità agli antimicrobici (Sensititre)
- Sequenziamento dei geni di resistenza al CIP/AN
- Pulsed Field Gel Elettrophoresis
- Microarray a DNA contenente sequenze oligonucleotidiche 70-mer



Matrici di isolamento

Latte crudo bovino

Feci di pollo

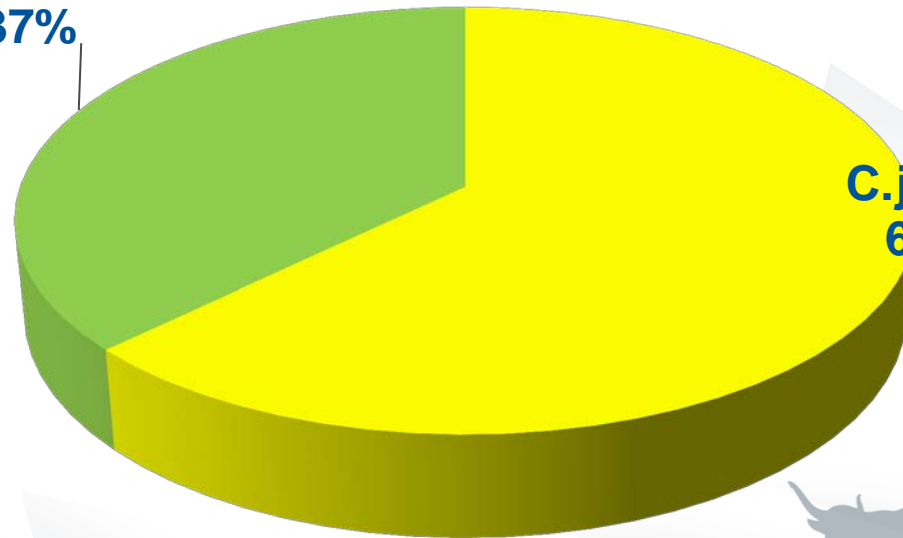
Carne di pollo

feci bovine

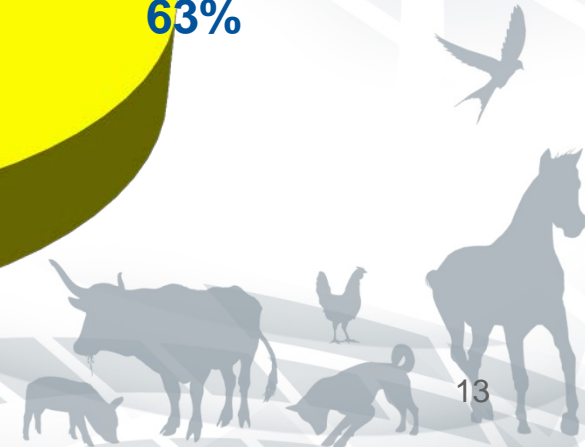
feci umane

Specie identificate

C.coli
37%



C.jejuni
63%





Identificazione di specie

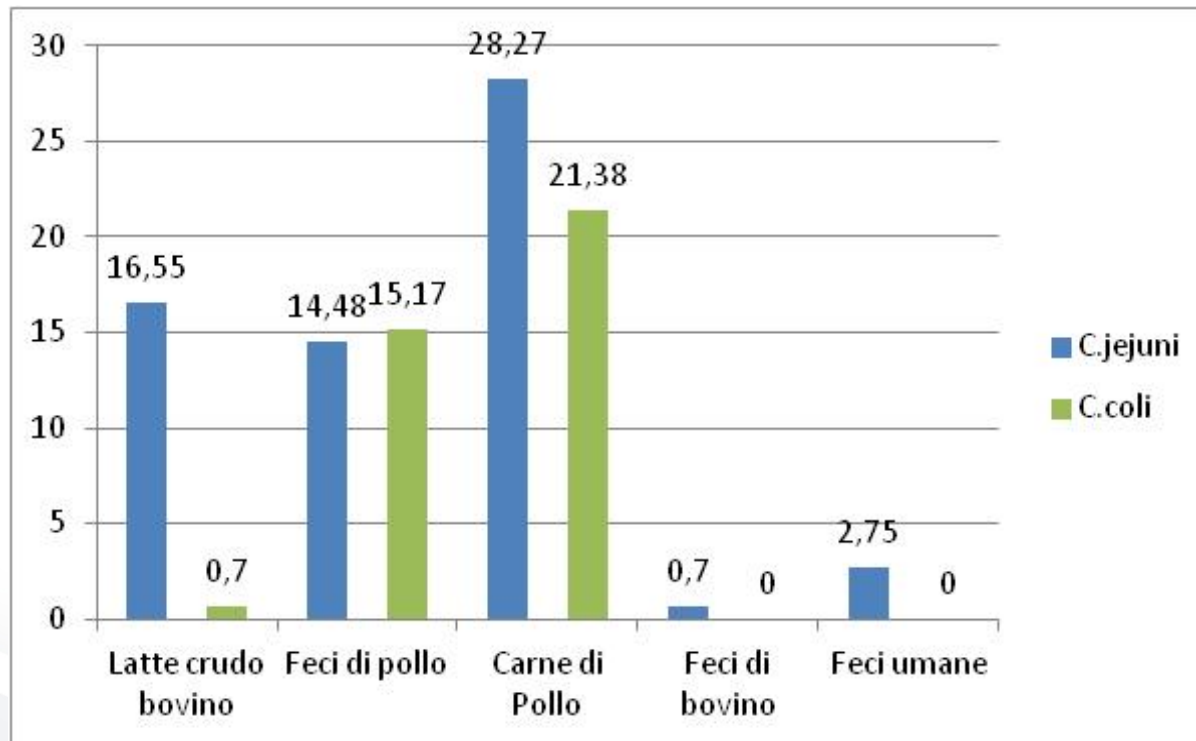
Alcuni ceppi isolati da latte bovino che all'esame morfologico, microscopico e alla PCR 23S risultavano essere *Campylobacter* spp, non erano tipizzabili con il metodo di Wang e Clark [Wang et al., 2002]

Sequenziati hanno presentato una mutazione ..

Sono risultati *C.jejuni*.



% di sierotipi nelle differenti matrici



Fenotipi di resistenza (chinoloni/fluorchinoloni)

- resistenza di origine cromosomica o plasmidica ed è legata a mutazioni negli enzimi target di queste molecole che sono la DNA girasi e la topoisomerasi IV.
- la resistenza dovuta a mutazioni puntiformi nasce spontaneamente e si traduce in sostituzioni aminoacidiche all'interno dei geni della DNA girasi e della topoisomerasi (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) spesso in combinazione con una diminuzione dell'espressione delle porine di membrana e di un'over espressione del sistema delle pompe di efflusso [Hopkins et al., 2005].

Pattern di sensibilità agli antimicrobici

- Metodo della microdiluzione in piastra (Sensititre, TREK Diagnostic Systems).
- Piastre da microtitolo contenenti, a concentrazione scalare nota, i seguenti antibiotici:
 - TE (0.25 - 16 $\mu\text{g/ml}$),
 - GM (0.12 - 16 $\mu\text{g/ml}$),
 - S (1 - 16 $\mu\text{g/ml}$)
 - E (0.5 - 32 $\mu\text{g/ml}$)
 - CIP (0.06 - 4 $\mu\text{g/ml}$)
 - AN (2 - 64 $\mu\text{g/ml}$)
 - C (2 - 32 $\mu\text{g/ml}$).

Controllo: C. jejuni ATCC 33291.

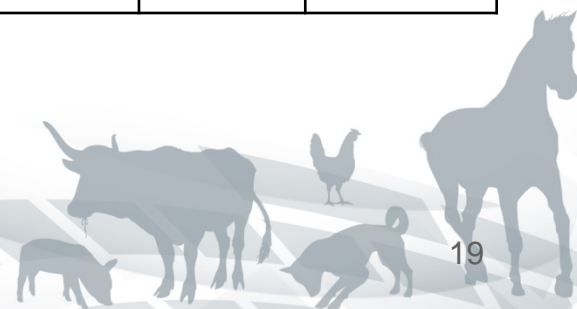


In *gyrA* sono state riportate diverse mutazioni puntiformi ma solo alcune risultano associate all'elevata resistenza ai fluorochinoloni come quella da Treonina (Thr) a Isoleucina (Ile) in posizione 86 [Yan et al., 2005].

Ceppi resistenti ad AN e/o a CIP sono stati sottoposti a sequenziamento (Avant Genetic Analyzer 3100) per valutare la presenza di eventuali mutazioni sul frammento QRDR (Quinolone Resistance—Determining Region) del gene *gyrA*



%	C	CIP	E	AN	GM	S	TE
R	0.69	62,76	13.10	55.17	0	4.83	55.86
I	0	4.14	2.76	0	0	0	2.76
S	99.31	33.10	84.14	44.83	100	95.17	41.38



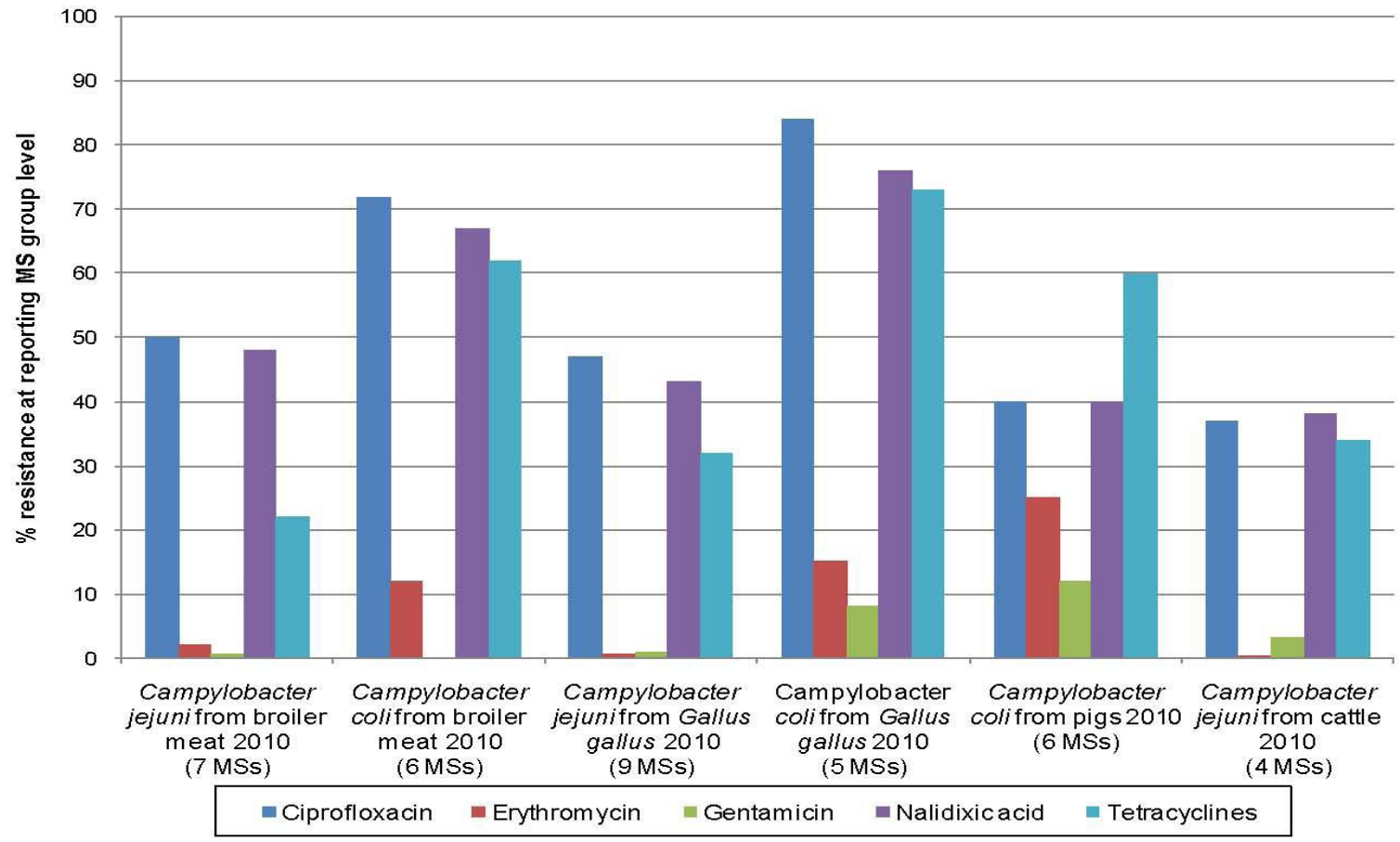
✓ Almeno un resistenza: 65,51%

✓ Ceppi multiresistenti %:

5	CipAnESTe	3.16
	CCipEAnTe	1.05
4	CipEAnTe	14.7
	CipAnSTe	2.10
3	CipAnTe	50.52
	CipETe	3.16
	EAnS ; CipEAn CipAnS	3,25
2	CipAn; CipTe	22,06



Resistenza a CIP,E,GM,AN e TE in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in EU nel 2010 (EFSA Journal,2011)



Su 84 sequenze eseguite, 83 hanno presentato una mutazione T86-I sostituita da ILE; 1 ceppo non ha presentato nessuna mutazione.

**su 137 ceppi resistenti, 130 avevano mutazione T86-I, 3 con T86-A, 1 con T86-V, 1 con la doppia mutazione T86-I e F99-L; 2 campioni, resistenti alla CIP e NA in vitro, non sono state evidenziate mutazioni puntiformi



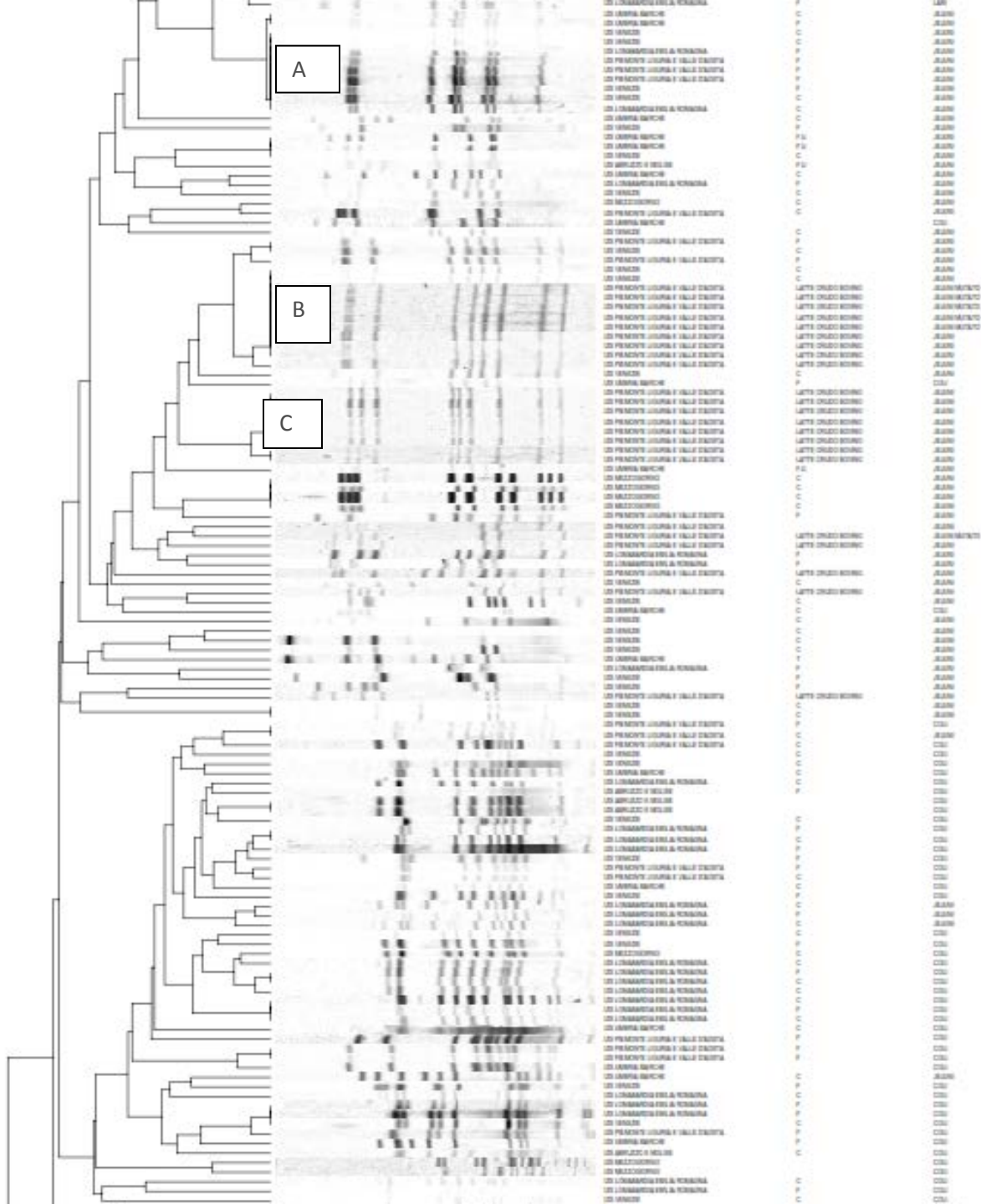
PFGE

Per l'analisi del genoma una delle più apprezzate rimane la PFGE (fingerprinting), che sfrutta il polimorfismo che si ottiene digerendo l'intero genoma del batterio in esame con enzimi di macrorestrizione. Il profilo genetico che si ottiene è estremamente caratteristico e quindi profili identici, anche in batteri non apparentemente correlati geograficamente, rivelano la presenza di una popolazione clonale fornendo la possibilità di seguire gli spostamenti della stessa lungo il territorio considerato.



PFGE:C.jejuni

- ❑ 3 cluster principali e una serie di microgruppi costituiti da due o quattro campioni.
- ❑ Il cluster A comprende 9 ceppi di *C. jejuni* isolati da carne e feci di pollo provenienti da diverse regioni del nord Italia.
- ❑ Il cluster B comprende un gruppo di 8 *C. jejuni*
- ❑ il cluster C comprende 6 isolati di *C. jejuni* tutti da latte crudo bovino; il 62.5% degli isolati appartenenti al cluster B, hanno presentato una mutazione che non li ha resi identificabili con il metodo di Wang e Clark [Wang et al., 2002].



La comprensione dei meccanismi di virulenza direttamente coinvolti nella patogenesi della malattia è di fondamentale importanza per ottenere una riduzione significativa delle infezioni da *Campylobacter* nell'uomo.



Nonostante l'incidenza e la diversità dei danni provocati da questo batterio, i meccanismi alla base della sua patogenicità non sono ancora del tutto compresi, anche se l'aderenza alla mucosa intestinale da parte del batterio, l'invasione delle cellule dell'ospite e la produzione di tossine sembrerebbero giocare ruoli fondamentali [Hu et al., 2008].

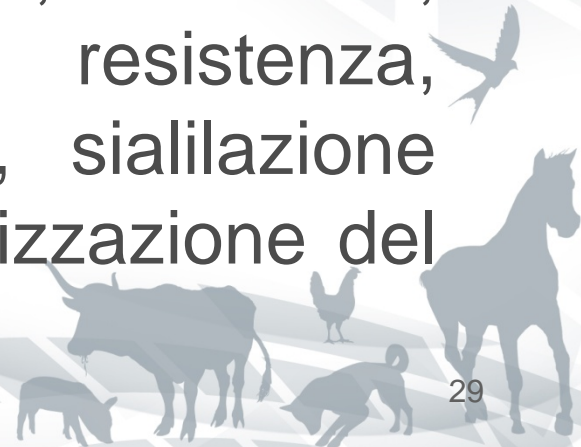


□ La tecnologia del microarray a DNA permettendo di rilevare contemporaneamente migliaia di distinte sequenze di DNA, è considerata uno strumento di considerevole potenzialità in grado di fornire informazioni dettagliate sulle comunità microbiche

□ Abbiamo utilizzato un microarray a DNA del tipo noto in letteratura con il nome microbial diagnostic microarrays (MDM) contenente sequenze oligonucleotidiche settantimere (70-mer) in grado di rilevare geni housekeeping, strutturali e di virulenza del *Campylobacter*.

Lo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nella virulenza del *C. jejuni* hanno dimostrato **la sua unicità come agente patogeno** essendo in grado di eseguire N-glicosilazioni di più di 30 proteine deputate alla colonizzazione, adesione ed invasione [Dasti et al., 2010].

La diversità tra i vari *Campylobacter* è stata osservata a livello fenotipico, in particolare per le caratteristiche tipiche dell'aderenza, invasione, produzione di tossine, siero resistenza, produzione degli esopolisaccaridi, sialilazione dei LOS e per la capacità di colonizzazione del tratto gastro-intestinale dei polli.



Fattori di virulenza

- La motilità è un importantissimo fattore di virulenza. La mancanza di motilità determina l'incapacità dei *Campylobacter* ad invadere i monostrati cellulari. Mutanti non virulenti sono il risultato di difetti causati in un certo numero di geni coinvolti nella struttura flagellare [Bereswill et al., 2003].
- L'importanza dei flagelli nella virulenza ha stimolato l'interesse ad indagare sui meccanismi che sono alla base della regolazione della biogenesi flagellare.



Risultati microarray

Sono stati osservati **5 cluster**, indicati da geni coinvolti nella motilità e trasporto, adesione, sintesi della capsula e trasporto, processo d'invasione antigenico, produzione delle tossine, colonizzazione del tratto gastrointestinale del pollo, biosintesi dei LOS, plasmide di virulenza.



Abbiamo ottenuto un dendrogramma con 2 cluster principali , in base ai geni presenti:

- Il primo cluster è suddiviso in 2 sottoclusters a e b
- Il secondo cluster è invece costituito da tre sottoclusters 2c, 2d, 2e



Geni presenti nei cluster

	Cluster 1a <i>C. jejuni</i>	Cluster 1b <i>C. jejuni</i>	Cluster 2c <i>C. coli</i> , <i>C. jejuni</i>	Cluster 2d <i>C. jejuni</i>	Cluster 2e <i>C. coli</i>
Geni di virulenza associati alla motilità, trasporto, chemiotassi	flgG2, flgK, flhA, flhB, flhF, fliA , fliI, fliM, fliG, fliN, motA, motB,	flgG2, flgK, flab, , flhA, flhB, flhF, fliA, fliI, fliM, fliG, fliN, motA, motB,	flgK, flag, flab, flaD, flhA, flhB, fliA, fliI, fliM, fliG, fliN, motA motB	flgG2, flgK, flag, flab flaA, flaD flhA, flhB, fliA, fliI, fliM, fliG fliN , motA , motB	flgG2, flgK, flag, flab flaA flaD flhA, flhB, fliA, fliI, fliM, fliG, motB
Fattori di adesione e legame	peb1A, cadF	peb1A, cadF	porA,	porA,	peb1A

Geni presenti nei clusters

	Cluster 1a (C. jejuni)	Cluster 1b (C. jejuni)	Cluster 2c (C. coli, C. jejuni)	Cluster 2d (C. jejuni)	Cluster 2e (C. coli)
Invasione	LOS biosynthesis: WaaE , rfaE/hldE	LOS biosynthesis: WaaE , htrB/waaM , cstA , gmhB , rfaE/hldE , cj1132 ,	ciaB , LOS biosynthesis: WaaE , WaaD , WaaC , htrB/waaM , neuA , wlaN , cstA , gmhB , rfaE/hldE , cj1136 , ciaB	LOS biosynthesis: galE/gne , WaaE , Cj1144c (only in C.coli), gmhB , rfaE/hldE	LOS biosynthesis: galE/gne , WaaE , WaaF , Cj1144c , neuA , rfaE/hldE
Tossine citoletali distensive	cdtA , cdtB	cdtA , cdtB , cdtC	cdtA ,	-	cdtA

Geni presenti nei clusters

	Cluster 1a (<i>C. jejuni</i>)	Cluster 1b (<i>C. jejuni</i>)	Cluster 2c (<i>C. coli</i> , <i>C. jejuni</i>)	Cluster 2d (<i>C. jejuni</i>)	Cluster 2e (<i>C. coli</i>)
Capsule synthesis and transport	Cj1419c, gmaH2, Cj1420c, Cj1418c,	Cj1419c, kpsS, gmaH2 (partially), Cj1417, Cj1418c, Cj1420c,	kpsS, kpsF, kpsM, kpsT, kpsS,	-	kpsS, kpsF, kpsM,
Chicken colonization	rpoN (partially), cheY, pgIF, livj, Cj0248, Cj0454	rpoN, cheY, pgIF, pgIH, wlaJ/pgIE, pta, aas, livj, Cj0618, Cj0248, Cj0454	Pta, docB-C, aas	wlaJ/pgIE,, pgIH, pgIF, livj	wlaJ/pgIE, (partially), pgIH, docB-C,
plasmide Virulence	-	-	pvir	-	-

2 dendogrammi; (1a e 1b); (2c ,2d,2e)

Cluster	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	%R	S	N° ceppi/Matrice
1a	23	-	7 (30.43)	16 (69.57%)	18 LB 5 CP
1 b	47	-	24(51.06)	23 (48.94)	21 CP ,18 FP 6LB;1 FB 1 FU
2 c	21	5	5 (100,00) <i>C. coli</i> 18(79.23) <i>C. jejuni</i>	3 (12.5) <i>C. jejuni</i>	3 FU 18 CP/FP 5 FP
2 d	-	42	34 (80.95)	8 (19.04)	48 CP/FP 1 LB
2 e	-	7	7(100,00)	-	7 CP/FP

Il secondo dendrogramma è invece costituito da tre sottocluster (2c, 2d, 2e):

2c costituito da 5 ceppi di *C. coli* da FP tutti resistenti ai fluorochinoloni e derivanti da feci di pollo; l'altro cluster è costituito da tutti ceppi di campo di *C. jejuni* provenienti nell'85.71% dei casi da carne e feci di pollo e nel 14.28% da feci umane. L'80% di questi ceppi sono risultati resistenti ai fluorochinoloni

2d: presenta due piccoli cluster distinti con i ceppi di *C. coli* provenienti nel 98% dei casi dalle matrici carne e feci di pollo, quasi tutti resistenti (83%) ai fluorochinoloni .

2e: è costituito da 7 ceppi di *C. coli* tutti resistenti ai fluorochinoloni e provenienti da matrici di carne e feci di pollo.

Confronto microarray-PFGE

- ❑ i ceppi del **cluster 1a** ottenuto con i microarray corrispondono ai ceppi dei **cluster B e C** ottenuti con la PFGE.
- ❑ Analogamente i ceppi del **cluster 1b** ottenuto con i microarray corrispondono ai ceppi del **cluster A** della PFGE. Nel cluster B visualizzato alla PFGE, sono presenti il 62,5% dei ceppi mutati alla PCR multiplex, mostrando ancora una volta l'ampia variabilità genetica di questo germe.



Confronto sequenziamento-microarray

Il sequenziamento dei geni di resistenza ha mostrato in *gyrA* una mutazione T86-Ile

Nei microarray, sono stati visualizzati i geni *gyrA* e *parE* solo nei cluster 1a e 1b del dendrogramma, gli stessi che hanno presentato una corrispondenza con i risultati della PFGE.



Microarray-resistenze

Cluster	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	%R	S	N° ceppi/Matrice
1a	23	-	7 (30.43)	16 (69.57%)	18 LB 5 CP
1b	47	-	24 (51.06)	23 (48.94)	21 CP ,18 FP 6LB;1 FB 1 FU
2c	21	5	5 (100,00) <i>C. coli</i> 18(79.23) <i>C. jejuni</i>	3 (12.5) <i>C. jejuni</i>	3 FU 18 CP/FP 5 FP
2d	-	42	34 (80.95)	8 (19.04)	48 CP/FP 1 LB
2e	-	7	7 (100,00)	-	7 CP/FP



Raccomandazioni (gruppo Biohazard,2011)

- sorveglianza attiva della campilobatteriosi in tutti gli Stati membri, (quantificare la sottostima e sottosegnalazione della malattia) al fine di calcolare con maggiore precisione la portata della malattia e consentire una valutazione degli effetti sulla salute umana di qualsiasi intervento.



Raccomandazioni (gruppo Biohazard, 2011)

- Al fine di fornire una migliore comprensione dell'epidemiologia molecolare della campylobatteriosi e una migliore base per l'attribuzione della fonte, la raccolta e la genotipizzazione (in tutti gli Stati membri) e la conservazione di una serie rappresentativa di isolati prelevati dall'uomo e dai presunti serbatoi.



Raccomandazioni (gruppo Biohazard,2011)

- Si raccomandano inoltre ulteriori ricerche per identificare i marcatori di virulenza del *Campylobacter*, le caratteristiche di sopravvivenza ed ecologiche e per quantificare l'impatto di un'immunizzazione protettiva acquisita sull'epidemiologia della campylobatteriosi nell'UE.



Gruppo di lavoro

- Marotta Francesca
- Zilli Katuscia
- Alessiani Alessandra
- Sacchini Lorena
- Di Serafino Gabriella
- Platone Ilenia
- Di Emidio Fernando.



Grazie per l'attenzione

