



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Caratterizzazione dei ceppi di Campylobacter mediante microarray

Laboratorio Nazionale di Riferimento Campylobacter

Francesca Marotta & Katiuscia Zilli

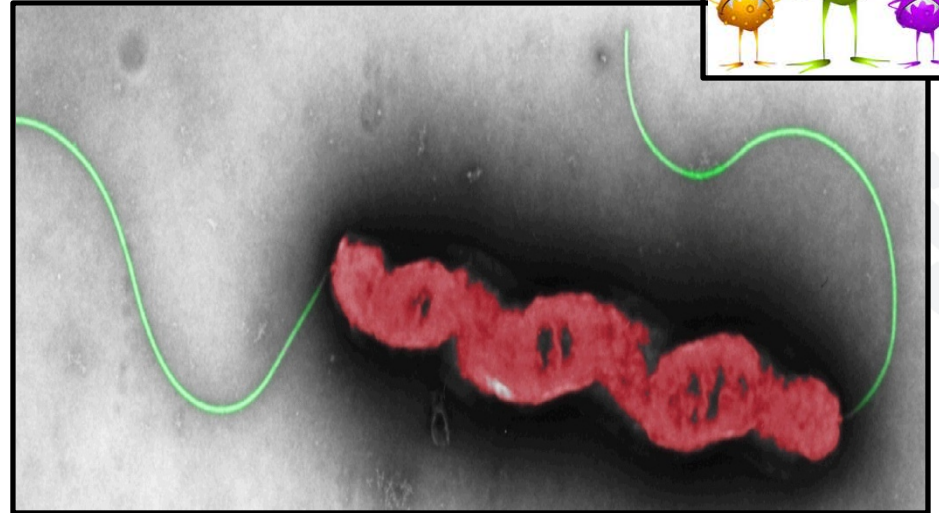
Teramo, 11-12 Dicembre 2012



Campylobacter



- Phylum *Proteobacteria*,
Famiglia *Campylobacteriaceae*
- Gram negativi
- Forma bastoncellare curva o a spirale
- Motilità a spirale
- Microaerofilia (3-15% O₂ ; 3-5% CO₂)
- 42°C
- Catalasi positivi/negativi
- Ossidasi positivi



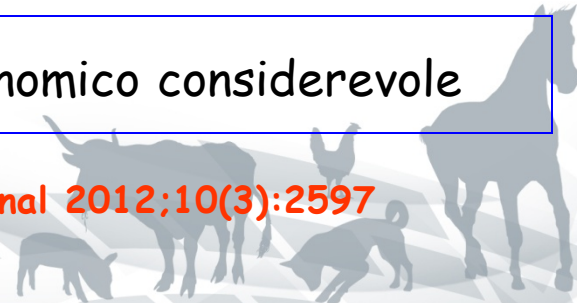
E' la causa più comune di gastroenterite batterica acuta di origine alimentare in tutto il mondo

Incremento della Campylobatteriosi negli ultimi anni

Problema di salute pubblica, di impatto socio-economico considerevole

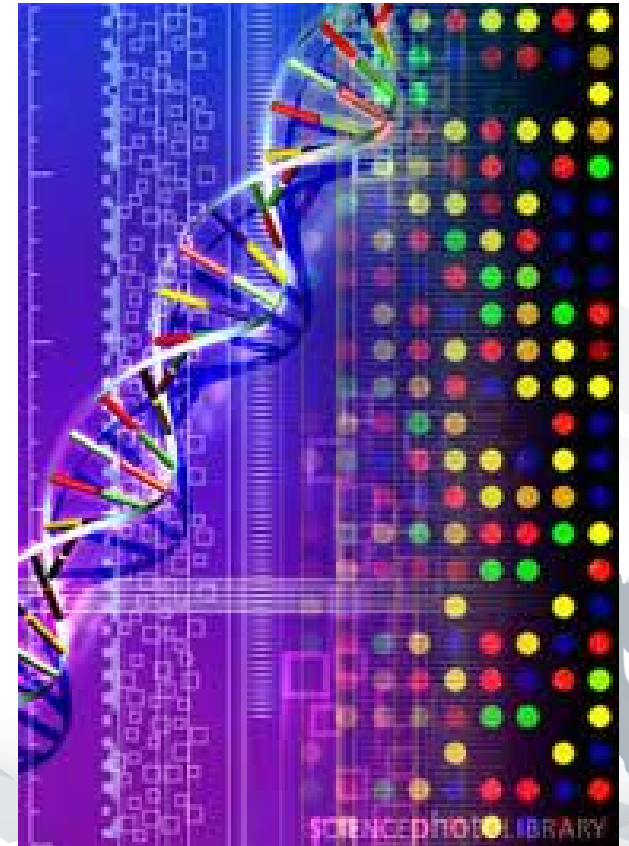
Oltre 200.000 casi in EU nel 2010

EFSA Journal 2012;10(3):2597



Tecnologia del microarray

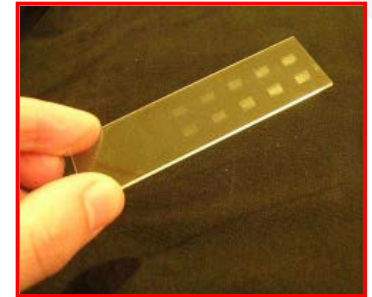
- ❑ Sistema miniaturizzato
- ❑ Permette di rilevare migliaia di sequenze di DNA simultaneamente
- ❑ Rapido
- ❑ Permette analisi parallele su larga scala
- ❑ Metodica ad alta processività
- ❑ Studio dettagliato di comunità microbiche



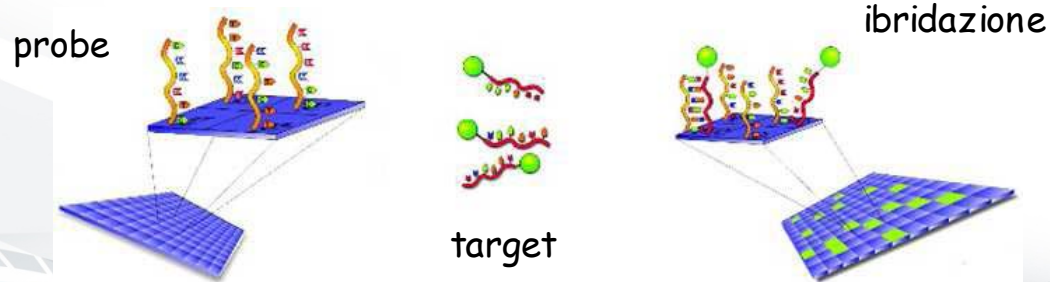
Che cos'è un DNA microarray?

A DNA microarray è definito come un supporto solido sul quale sono immobilizzate migliaia di sequenze di oligonucleotidi differenti:

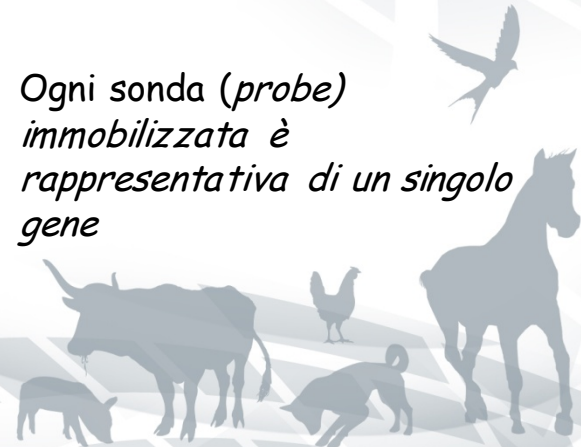
- ✓ Dimensioni Vetrino: 25 x 75 mm
- ✓ Diametro spot: 100 micron
- ✓ Ogni spot contiene specifiche sequenze di DNA a singolo filamento 70-meri
- ✓ Tutte le sequenze sono chimicamente legate alla superficie del vetrino



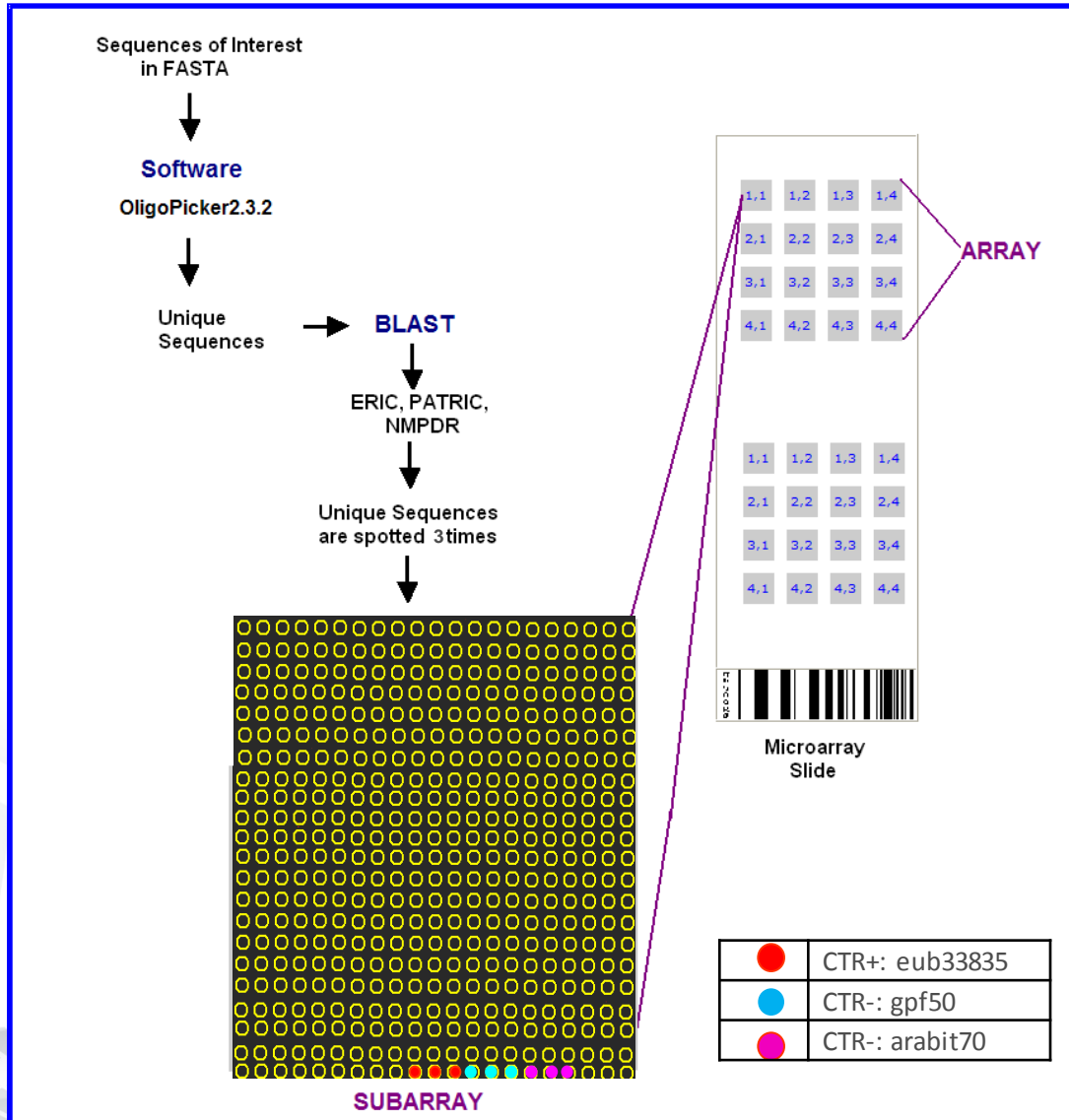
Le sequenze di DNA negli spots agiscono come sonde che si ibridano con sequenze complementari marcate



Ogni sonda (*probe*) immobilizzata è rappresentativa di un singolo gene



Layout del microarray



Le seq. dei geni d'interesse:

- raccolte in formato FASTA
- processate con OligoPicker
- oligonucleotidi scrinati per attestare la loro selettività
- CG 40-60%
- no seq. palindromiche
- omologia vs. i geni non target < a 14 pb contigue

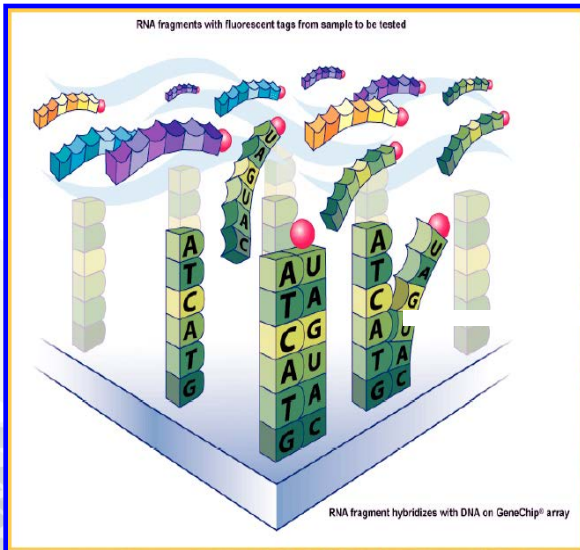
<http://candida2.bri.nrc.ca/izsam/index.cfm>

(From Tonelli et al. 2010)

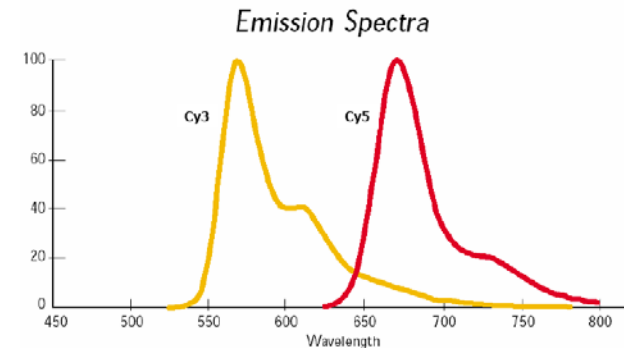
Virulence Factors of Pathogenic Bacteria Database (VFDB)

Materiali e metodi

- 150 ceppi di *Campylobacter* (matrici differenti)
- Estrazione del DNA (*Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega*) e analisi e quantificazione degli estratti tramite spettrofotometro
- Amplificazione e Marcatura del DNA (*Bioprime Array CGH Genomic Labelling System, Invitrogen*)
- Ibridazione (Bruant et al. 2006)



Cy3 emette una lunghezza d'onda nel campo del verde



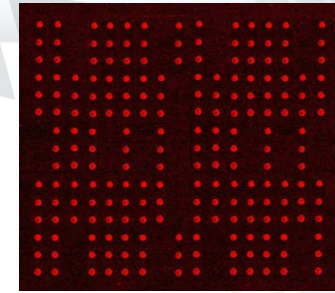
L'efficienza e la percentuale di incorporazione del Cy3 è stata determinata misurando al Nanodrop A260 e A550



http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/percent_inc.html



- Scansione del vetrino con **ScanArray**
Immagine 16-bit formato TIFF



- Analisi dei dati grezzi con **QuantArray** e normalizzazione

Gridding dell'immagine

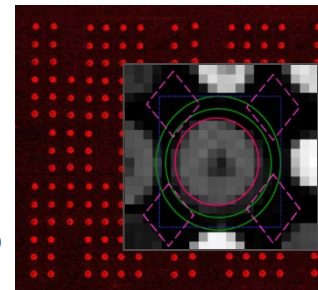
Correzione del background

per sottrazione dal segnale utile del suo valore calcolato su aree dedicate esterne allo spot → segnale netto

Cause:

- "spotting" scorretto;
- legami aspecifici del campione con il supporto;
- fluorescenza propria dei reagenti.

Applicazione di indicatori di qualità agli spot per la selezione dei geni giudicati idonei per la successiva analisi (CTR)



Pipeline in BrIZP-Db

Fluorescence from each spot

Intensity - Background
of replicates of gene

Median of each gene
divided
Median of Background
(Empty)

Log 2 transformation
of ratio

Cluster 3

- Clustering gerarchico (**Cluster software v.3.0**)

(Algoritmo usato: la distanza basata sul coefficiente di correlazione di Pearson e il metodo "Pairwise maximum Linkage")

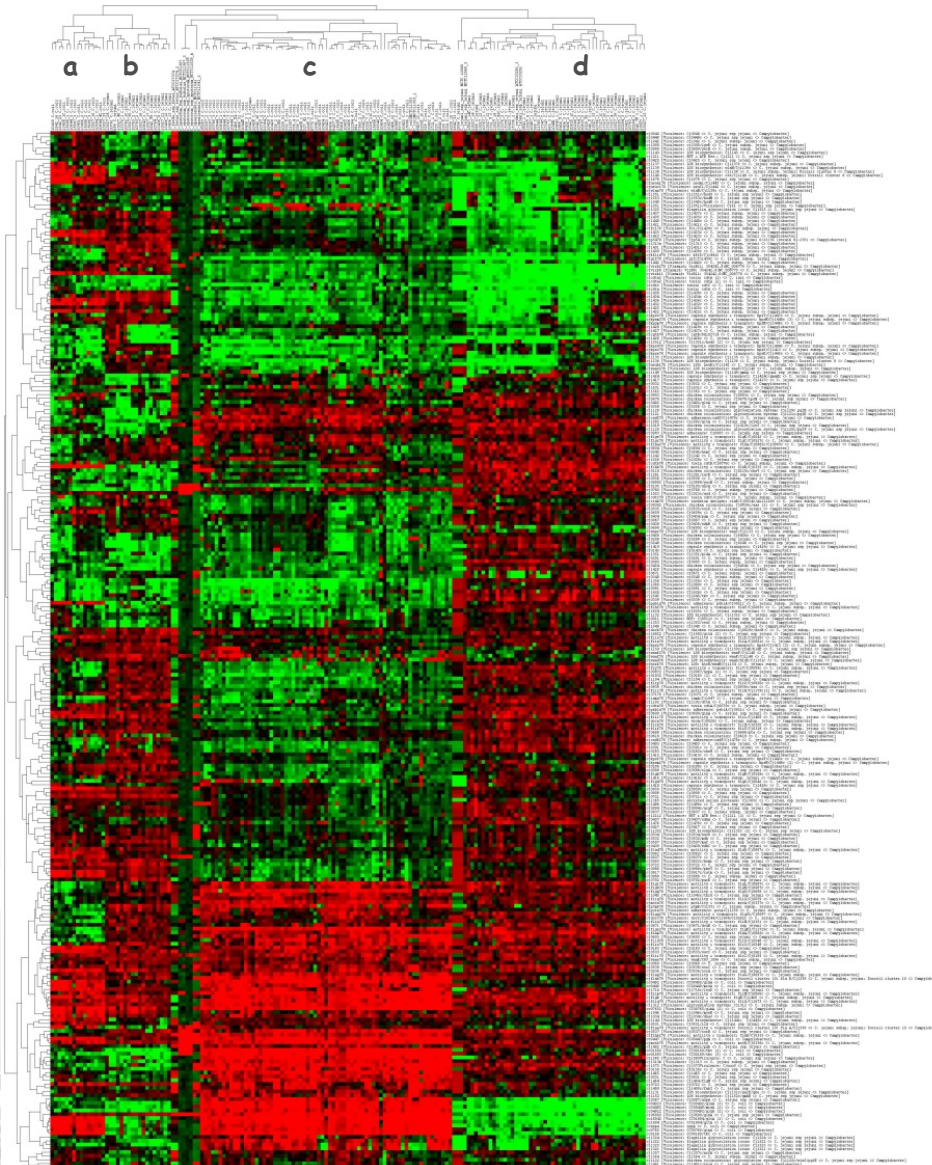
- Visualizzazione dei dati elaborati con **Java TreeView software**



C.coli
C.jejuni

C.coli

C.jejuni



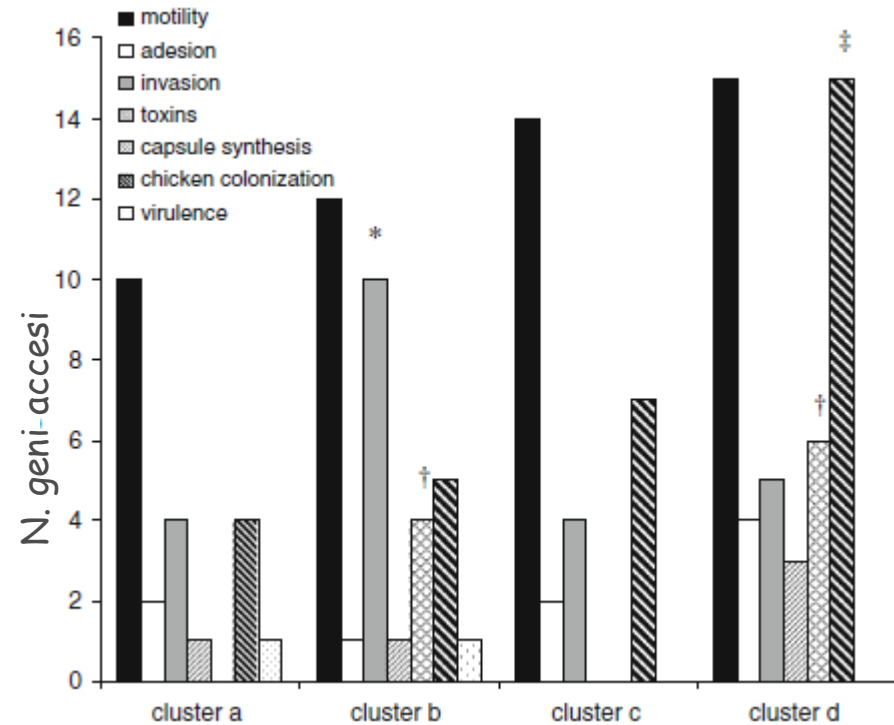
Identificazione di specie

Cluster a <i>C.coli</i>	Cluster b <i>C.jejuni</i>	Cluster c <i>C.coli</i>	Cluster d <i>C.jejuni</i>
67% CC 33% CF	56% CC 22% CF 5.5% RM 16.5% DH	54.4% CC 45.6% CF	56.3% CC 33.3% CF 10.4% RM



Caratterizzazione del profilo dei geni coinvolti nella patogenesi della campylobatteriosi

	Gene	Gene description
Motility, transport and chemotaxis	flgG2	Flagellar basal-body rod protein
	flgK	Flagellar hook-associated protein
	flaG-flaB-flaA flaD	Flagellin protein FlaG FlaB, FlaA, FlaD
	flhB-flhA	Flagellar biosynthesis protein FlhB-FlhA
	fliA	Flagellar biosynthesis sigma factor involved in transcription of flagellar genes
	fliI	Flagellum-specific ATP synthase
	fliM-fliG-fliN	Flagellar motor switch protein
	mot A,B	Flagellar motor protein MotA MotB
Binding and adhesion	cadF	Fibronectin-binding outer membrane protein
	peb1	Periplasmic binding protein
	porA	Major outer membrane protein
	jlpA	Surface-exposed lipoprotein
Invasion	LOS	Mimicry with GM1 and GD1a gangliosides leading to Guillain-Barre' syndrome
	cia	Campylobacter-invasive antigens, especially CiaB, secreted through the flagellar export apparatus
	CPS	Capsular polysaccharide
	cadF	Activation of Rac1 and Cdc42
Toxins	cdtA,B,C	Cytolethal distending toxin CdtB causes cell cycle arrest and apoptosis IL-8 secretion
Capsule synthesis and transport	kpsS	Capsule polysaccharide export protein KpsS
Chicken colonization	rpoN	Transcription of flagellar genes
	cheY	Response regulator necessary for flagellar rotation
	pglE, pglF	Transcription of an aminotransferase, transcription of dehydratase

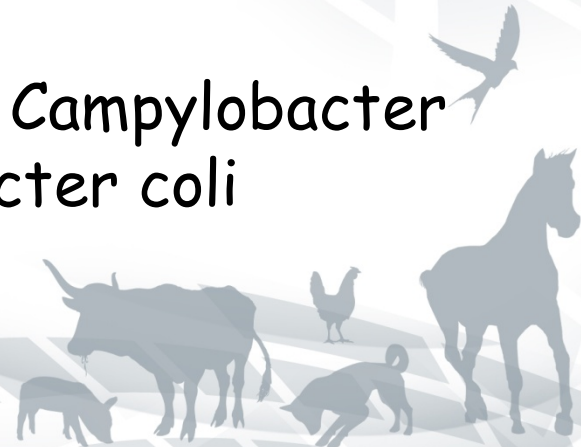


Differenza interspecie e intra-specie nei geni di virulenza

*Statistically significant ($p < 0.05$, χ^2 test and Marascuilo procedure for comparison of K proportions) versus cluster a, c, and d invasion genes;
 †Statistically significant ($p < 0.05$, χ^2 test and Marascuilo procedure for comparison of K proportions) versus cluster a and c capsule synthesis genes;
 ‡Statistically significant ($p < 0.05$, χ^2 test and Marascuilo procedure for comparison of K proportions) versus others chicken colonization genes

Conclusioni

- ◆ Ciascun cluster analizzato mostra una propria variabilità genetica
- ◆ Diversi meccanismi patogenetici tra i *Campylobacter*
- ◆ Patotipi più aggressivi nei ceppi dei *Campylobacter jejuni* rispetto ai *Campylobacter coli*

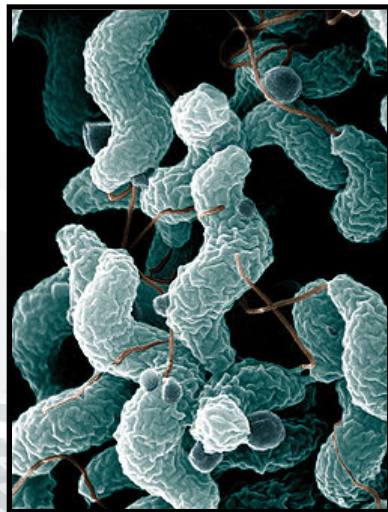


Conclusioni

Tutti questi fattori determinanti per la codifica di importanti strutture
in termini di

SOPRAVVIVENZA, TRASMISSIONE, PATOGENESI

indicherebbero l'esistenza di pressioni selettive che condurrebbero a
profondi cambiamenti evolutivi al fine di creare specie più adattabili di
Campylobacter



Tuttavia, i meccanismi che inducono una
diversità genetica nei Campylobacter
rimangono ancora oggi poco conosciuti



Prospettive future

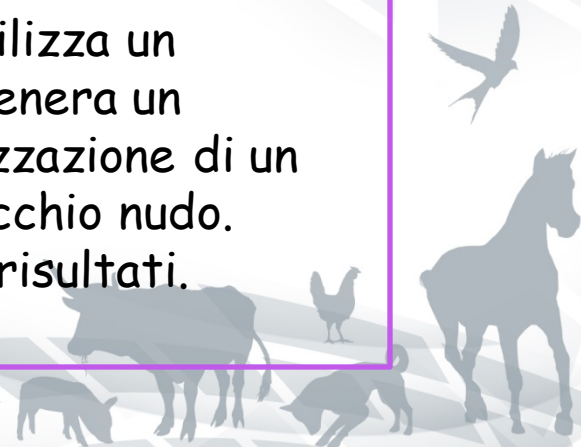
❑ OTTIMIZZAZIONE DEL VETRINO

microarray a bassa densità, con un ridotto numero di spots → miglioramento della specificità dell'analisi.

❑ CAMBIAMENTO DELLA CHIMICA

metodo di rilevamento colorimetrico.

Si tratta di una tecnologia - ampliPHOX - che utilizza un fotoiniziatore che, quando attivato dalla luce, genera un segnale di amplificazione attraverso la polimerizzazione di un monomero organico. Gli spot sono poi visibili a occhio nudo. Software appropriato per l'interpretazione dei risultati.



GRAZIE DELL'ATTENZIONE



Si ringrazia
Dr.ssa Elisabetta Di Giannatale
Team

Katiuscia Zilli
Tiziana Persiani
Lorena Sacchini
Alessandra Alessiani
Gabriella Di Serafino
Silvana Salvatore
Giuliano Garofolo
Federico di Fabio
Antonietta Pomanti

Alfreda Tonelli
Romolo Salini

