

STABILITÀ DEL GENE *FLAA* IN *CAMPYLOBACTER COLI*

Caroli A.¹, Pugliese N.¹, Circella E.¹, Pazzani C.², Camarda A.¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”, Italia.

²Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”, Italia.

Summary

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli* usually colonize avian gut, and they can also grow in human intestine. Some Author hypothesized that the ability of *Campylobacter* spp. to colonize different environments may be improved by genetic variability. The genes *flaA* and *flaB*, involved in the synthesis of flagellin, are associated with a variable region of *Campylobacter* spp. genome. We investigated the genetic stability of the locus *flaA* in *C. coli* by repeatedly passaging two strains of *C. coli* *in vitro* and by PCR-RFLP typing them. Furthermore we sequenced PCR products from initial and final passages to better identify possible single nucleotide variations. We did not find any change in PCR-RFLP profiles and sequence analysis revealed only point mutations, but their frequencies were different in the two strains. On aggregate those preliminary results suggest that some strains are more prone than other to genetic variability.

INTRODUZIONE

Campylobacter (C.) jejuni e *C. coli* sono i principali responsabili di gastroenteriti batteriche nei paesi industrializzati (Bluzler, 2004). Alcuni Autori hanno ipotizzato che la capacità di colonizzazione dell'intestino di questi germi possa essere associata ad una loro propensione alla variabilità genetica, che conferirebbe maggiori probabilità di sopravvivenza (Ridley et al., 2008). Tra i fattori coinvolti nei meccanismi di virulenza è certamente inclusa la flagellina in quanto promotore della colonizzazione intestinale. Due geni, *flaA* e *flaB*, sono coinvolti nella biosintesi della flagellina, ed essi ricadono all'interno di regioni omopolimeriche con alto tasso di variabilità (Parkhill et al., 2000). I due geni condividono il 95% della sequenza nucleotidica, ma *flaA* sembra essere critico per la mobilità, la colonizzazione, e la patogenesi, mentre *flaB* potrebbe avere il ruolo di riserva di materiale genetico. Eventi ricombinativi tra *flaA* e *flaB* incrementano la variabilità della flagellina, e non è escluso che ciò possa influire sull'adattamento ai diversi ambienti intestinali.

In questo studio è stata valutata *in vitro* la variabilità del gene *flaA* di ceppi di *C. coli* coltivati mediante passaggi sequenziali in condizioni ambientali differenti.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 2 stipiti di *C. coli* (rispettivamente C19 e C29) isolati da 2 allevamenti di galline ovaiole della Puglia. I 2 stipiti, che presentavano differente profilo di restrizione (C2 e C1) (Nachamkim et al. 1993) sono stati ripassati circa 50 volte in microaerofilia su Nutrient Agar (Oxoid, Milano) addizionato di sangue di montone defibrinato (C_f 5%). Parallelamente, i due ceppi sono stati sottocoltivati, in due esperimenti separati, in presenza di 1x10⁶ UFC di *Salmonella enterica* subsp.

enterica ser. Gallinarum (*S. Gallinarum*), addizionate per inclusione in Agar sangue. Ad ogni sottopassaggio di ciascuna serie, il ceppo è stato caratterizzato mediante PCR-RFLP (Nachamkim et al. 1993). I prodotti di amplificazione relativi al locus *flaA* provenienti dalla prima tipizzazione e dall'ultima sottocoltura sono stati clonati in pGEM-T-Easy Vector (Promega, Milano) secondo le indicazioni del produttore. Tre cloni relativi alla prima tipizzazione e dodici dagli ultimi passaggi di ciascuna serie sono stati sequenziati (BMR Genomics, Padova). Le sequenze sono state confrontate sia tra loro per multiallineamento mediante software Mega 4.1 (Tamura et al., 2007), sia con quelle depositate in GenBank mediante l'applicazione BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

RISULTATI

I profili di PCR-RFLP caratterizzanti i ceppi di *C. coli* ad ogni singolo passaggio, in presenza e in assenza del competitore *S. Gallinarum*, sono rimasti invariati.

I risultati emersi dai sequenziamenti delle porzioni genetiche clonate ed amplificate in corripodenza del primo ed ultimo passaggio sono stati riepilogati in Tabella 1. La sequenza di tutti i cloni relativi all'ultimo passaggio del ceppo C19 era la medesima, mentre dopo i passaggi sequenziali in presenza di *S. Gallinarum* sono stati evidenziati due distinti gruppi di sequenze. Due gruppi distinti sono stati ottenuti anche dai cloni relativi all'ultimo passaggio del ceppo C29, sia in presenza sia in assenza del competitore.

Le sequenze dei passaggi finali con quelle iniziali differivano solo per mutazioni puntiformi. Inoltre, confrontando le sequenze di *flaA* clonate con sequenze depositate in GenBank relative allo stesso gene e al paralogo *flaB* è stato possibile escludere la possibilità che siano intercorsi eventi di ricombinazione.

Mentre le sequenze iniziali e finali del ceppo C19 differivano soltanto per un nucleotide, le sequenze del ceppo C29 variavano per un numero di mutazioni compreso tra due e cinque, con il numero più alto di alterazioni osservato in presenza del competitore.

Nel complesso, assumendo approssimativamente 10-15 generazioni per passaggio, è stato possibile stimare un tasso di mutazione puntiforme compreso tra 3×10^{-6} e 4×10^{-7} per il ceppo C29, e un tasso non superiore a 10^{-7} per il ceppo C19.

DISCUSSIONI

Il numero esiguo di sostituzioni non consente un'analisi statistica accurata, ma le frequenze di mutazione del locus *flaA* in entrambi i ceppi di *C. coli*, sono più elevate se comparate con il tasso di mutazione standard presunto per *Escherichia coli*, compreso tra 10^{-10} - 10^{-11} .

Inoltre, lo stress da competizione sembra favorire la variabilità genetica. Infatti, il ceppo C29 mostra una maggiore tendenza alla mutazione in un numero minore di passaggi in presenza del competitore *S. Gallinarum*.

Il ceppo C19, invece, in condizioni di stress da competizione mostra un tasso di mutazione inferiore rispetto al ceppo C29, mentre non sono state individuate sequenze mutanti nello stesso ceppo sottocoltivato in condizioni ottimali, e questo potrebbe implicare una maggiore propensione di alcuni ceppi alla variabilità rispetto ad altri della stessa specie, così come riportato per *C. jejuni* (Hanninen et al., 1999).

Resta da valutare se questo diverso comportamento sia una caratteristica del locus

fla oppure se non sia una peculiarità dell'intero genoma della specie, considerato che la variabilità genetica può favorire la sopravvivenza del *Campylobacter* spp. Poiché la variabilità genetica può favorire la colonizzazione dell'ambiente intestinale, si potrebbe ipotizzare che alcuni genotipi di *Campylobacter* spp. possano essere a loro volta favoriti durante il processo di colonizzazione da una maggiore tendenza alla variabilità. A seguito delle indagini preliminari qui presentate, saranno rivolti in futuro studi atti a verificare queste ipotesi.

BIBLIOGRAFIA

1. Butzler, J.P., 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*, 10:868-876.
2. Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., Colin, P., 1999. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:406-410.
3. Hanninen M.L., Hakkinen, M., Rautelin, H., 1999. Stability of related human and chicken *Campylobacter jejuni* genotypes after passage through chick intestine studied by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microb.*, 65:2272-2275.
4. Havelaar A.H., Mangen, M.J.J., de Koeijer, A.A., Bogaardt, M.J., Evers, E.G., Jacobs-Reitsma, W.F., van Pelt, W., Wagenaar, J.A., de Wit, G.A., van der Zee, H., Nauta, M.J. 2007. Effectiveness and Efficiency of Controlling *Campylobacter* on Broiler Chicken Meat. *Risk Anal.* 27:831-844.
5. Nachamkin, I., Bohachick K., Patton.C.M. 1993. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:1531-1536.
6. Parkhill, J., Wren, B.N., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., van Vliet, A.H.M., Whitehead, S., Barrell, B.G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403:665-668.
7. Ridley, A.M., Toszeghy, M.J., Cawthraw, S.A., Wassenaar, T.M., Newell, D.G.. 2008. Genetic instability is associated with changes in the colonization potential of *Campylobacter jejuni* in the avian intestine. *J. Appl. Microbiol.* 105:95-104.
8. Tamura, K., Dudley, J., Nei M., Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
9. Wilson D.J., Gabriel E., Leatherbarrow A.J.H., Cheesbrough J., Gee S., Bolton E., Fox A., Fearnhead P., Hart C.A., Diggle P.J. 2008. Tracing the source of *Campylobacteriosis*. *Plos Genetics*, 4:e1000203.

Tabella 1. Risultati del confronto tra le sequenze nucleotidiche. I dati sono relativi al confronto tra le sequenze dell'ultimo passaggio rispetto alla sequenza del ceppo originario.

Sequenza ¹	Sostituzioni	Gap	Transizioni	Trasversioni	Sostituzioni Sinonime
19(43)	0	0	0	0	0
19(50S)a ²	1	0	1 (T→C)	0	1
19(50S)b ²	1	1	1 (T→C)	0	1
29(44)a	2	0	2 (C→T)	0	0
29(44)b	1	0	1 (C→T)	0	0
29(30S)a ²	5	0	1 (G→A) 2 (A→G) 1 (T→C) 1 (C→T)	0	3
29(30S)b ²	2	0	1 (T→C) 1 (C→T)	0	1

¹ Nome della sequenza riferita al ceppo specifico (C19 o C29), riportato in parentesi il numero del passaggio da cui si è ottenuta la sequenza.

²S: *C. coli* cresciuto in presenza di *S. Gallinarum*.