



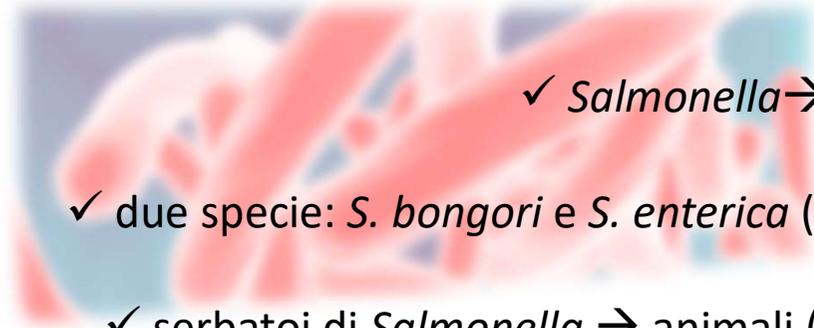
Il successo ecologico di S. 4,[5],12:i:- uno studio genomico comparativo

Sara Petrin

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, IZSve

**Applicazioni del Sequenziamento di Nuova Generazione (NGS) nel contesto One Health
Torino, 20 Aprile 2017**

INTRODUZIONE



✓ *Salmonella* → malattia alimentare

✓ due specie: *S. bongori* e *S. enterica* (6 sottospecie, subsp. *enterica* >2500 sierotipi)

✓ serbatoi di *Salmonella* → animali (avicoli e suini), prodotti di origine animale

✓ 93,8 mln casi/anno (80,3 mln trasmissione per via alimentare) (Majowicz, 2010)

✓ 4,07 mln DALYs attribuibili a NTS (21,2 mln DALYs considerando NTS e sierotipi tifoidei; 8,76 mln DALYs - alimenti contaminati) (WHO, 2015)

DALYs = Disability Adjusted Life Years, misura della gravità di una malattia espressa come numero di anni persi per disabilità o per morte prematura

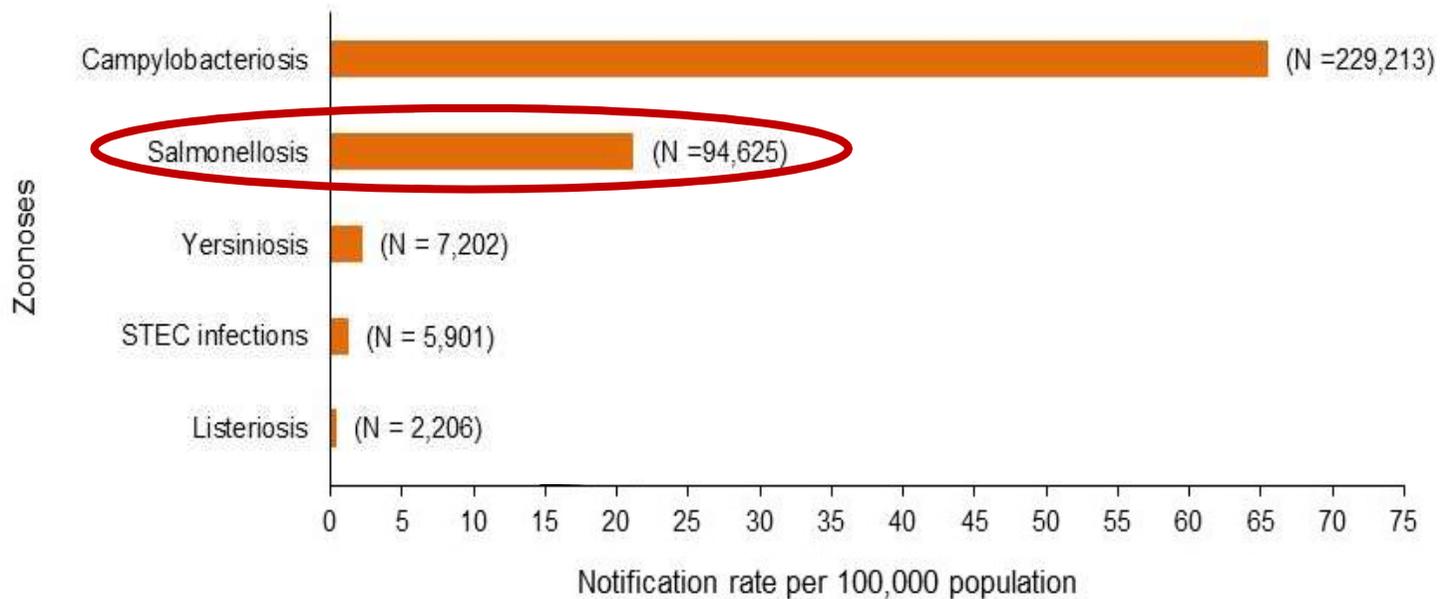
Significativa importanza nella salute pubblica

Urgenza di misure di controllo



INTRODUZIONE

Numero di casi di zoonosi umane confermate in Europa nel 2015



INTRODUZIONE

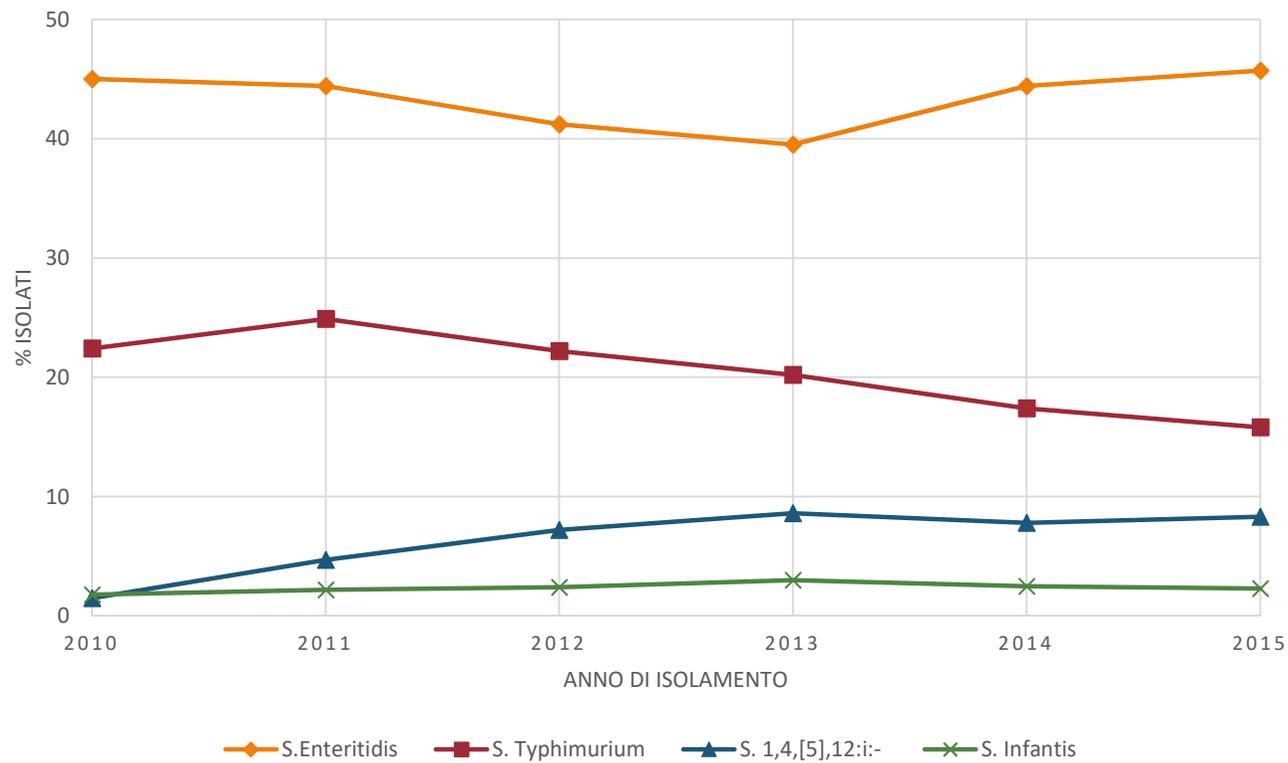
Sierotipi più frequenti nelle zoonosi umane causate da *Salmonella*

Serovar	2015		
	Cases	MS	%
Enteritidis	31,829	26	45.7
Typhimurium	10,997	26	15.8
Monophasic Typhimurium <u>1.4.[5].12:i:-</u>	5,770	15	8.3
Infantis	1,585	24	2.3
Stanley	763	22	1.1



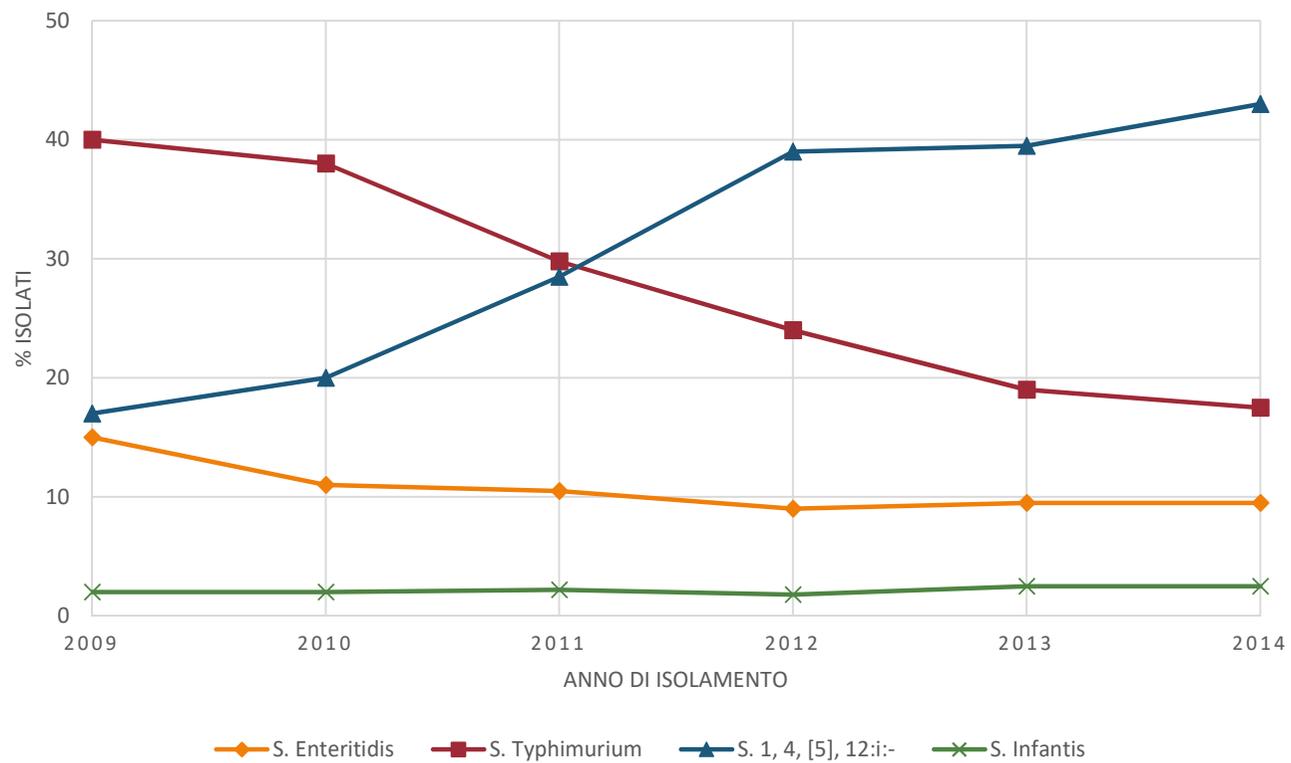
INTRODUZIONE

Sierotipi più frequenti nelle zoonosi umane causate da *Salmonella*



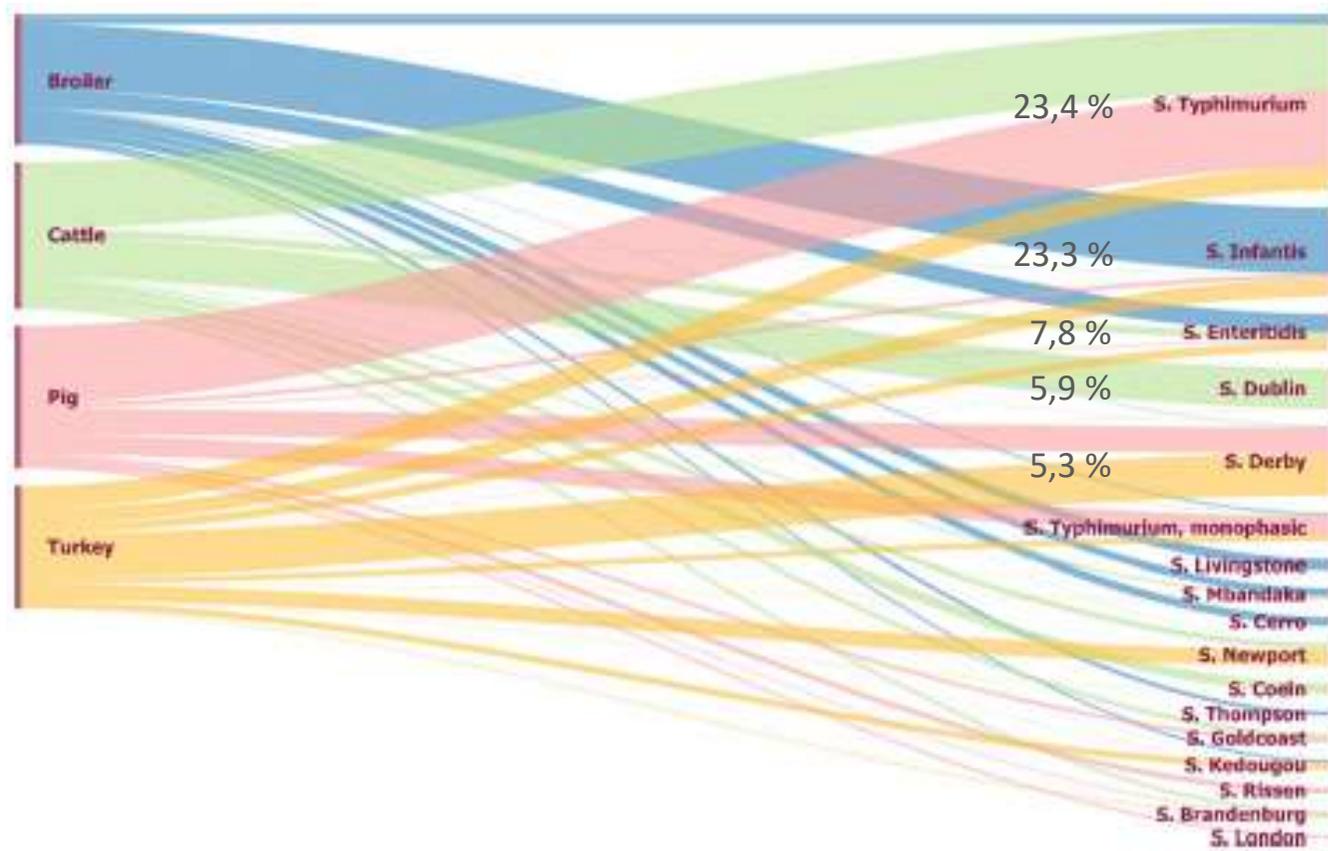
INTRODUZIONE

Sierotipi più frequenti negli isolati umani



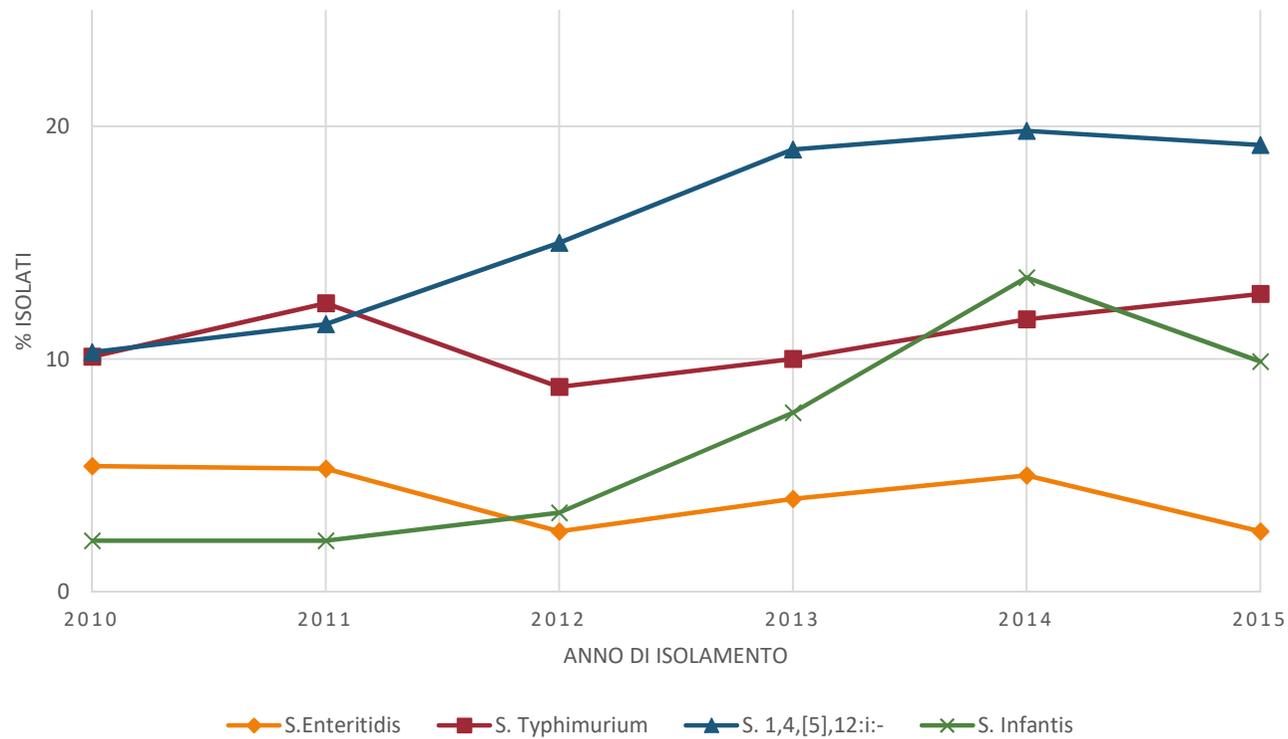
INTRODUZIONE

Sierotipi più frequenti negli isolati veterinari e alimenti di origine animale



INTRODUZIONE

Sierotipi più frequenti negli isolati veterinari



INTRODUZIONE

S. 4,[5],12:i:- è definita come la **variante monofasica** di S. Typhimurium

Salmonella Typhimurium

4,[5],12 : i : 1,2

formula
antigenica

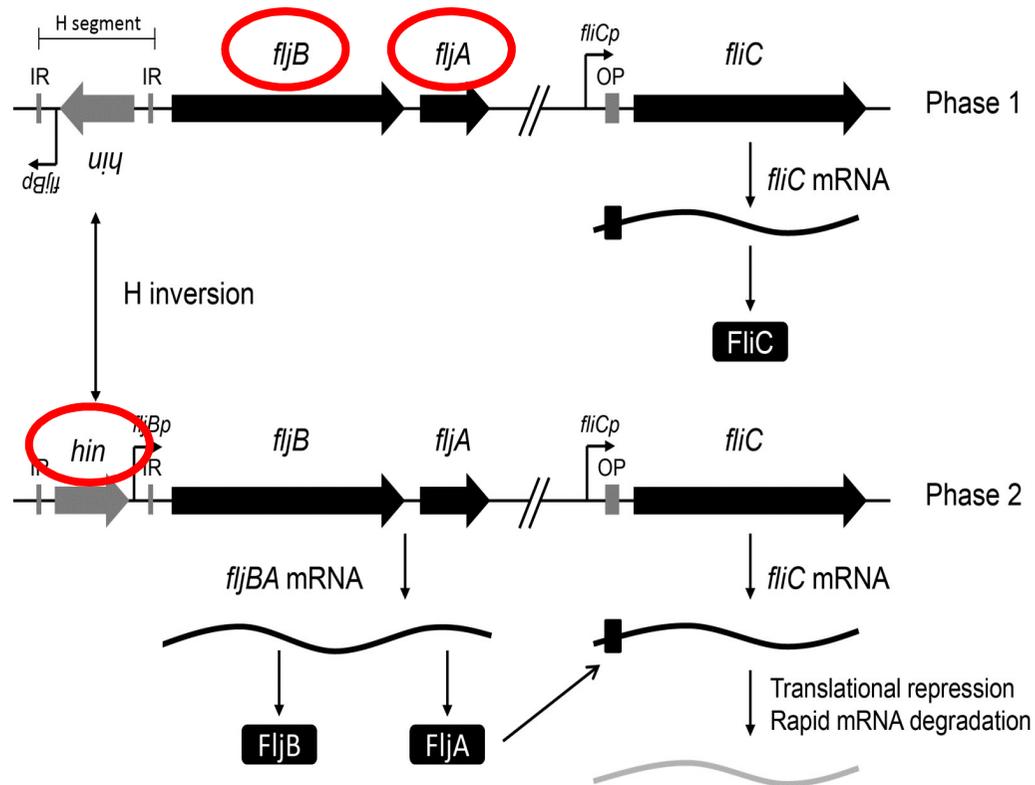
S. 4,[5],12:i:-

4,[5],12 : i : -



S. 4,[5],12:i:- ha perso la capacità di esprimere il secondo antigene flagellare

INTRODUZIONE



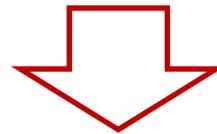
- ✓ Molti sierotipi di *Salmonella* sono bifasici
- ✓ Gli antigeni flagellari vengono espressi alternativamente
- ✓ L'inversione di fase coinvolge tre geni principali

INTRODUZIONE

Sierotipo S. 4,[5],12:i:- isolato per la prima volta alla fine degli anni '80

Generalmente associato ai suini (animali e prodotti derivati)

Geneticamente strettamente correlato a *S. Typhimurium*



Differisce da *S. Typhimurium* LT2 per 5 delezioni nel cromosoma (clusters I - V)

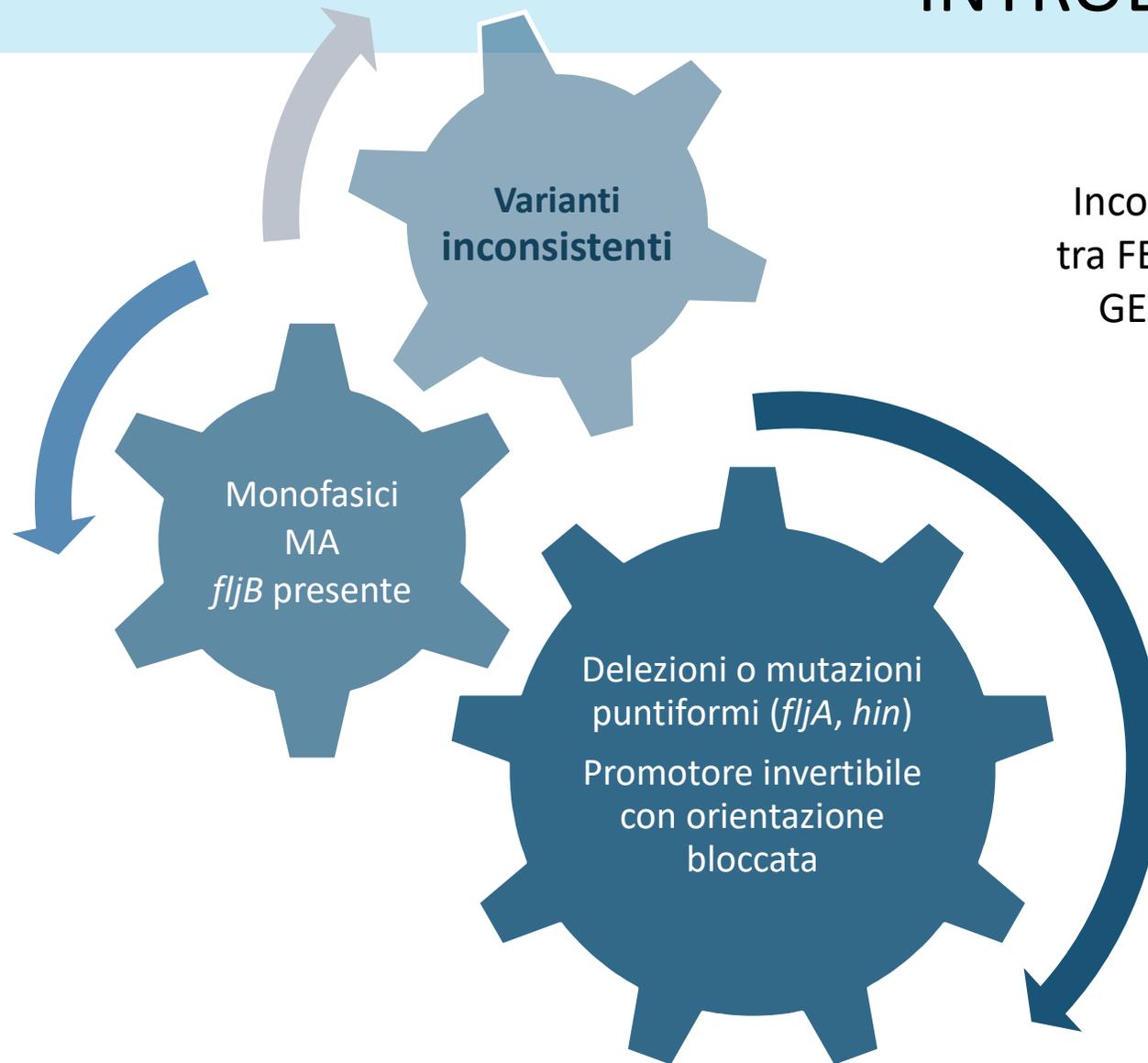
cluster V: geni con diverse funzioni,
incluso l'**operone *fljAB*** (Garaizar, 2002)

Esistenza di **diverse linee clonali** che si sono evolute contemporaneamente:

- ✓ Clone SPAGNOLO (U302, resistenze plasmidiche – ACGSSuTTm)
 - ✓ Clone AMERICANO
- ✓ Clone EUROPEO (DT193 e DT120, R-type ASSuT – resistenze cromosomiche)
 - ✓ Clone SUD-EUROPEO (resistenze plasmidiche – CSSuTTm)

(Soyer, 2009; Hopkins, 2010; Lucarelli, 2010 ; Mourão, 2014)

INTRODUZIONE



Incongruenza
tra FENOTIPO e
GENOTIPO

OBIETTIVI DELLO STUDIO

✓ Identificare marker molecolari che potrebbero giustificare il successo ecologico di *S. 4,[5],12:i:-*

✓ Confrontare i genomi di *S. 4,[5],12:i:-* “classiche” e inconsistenti con il genoma di *S. Typhimurium* LT2 per individuare eventuali connessioni tra le varianti monofasiche e i ceppi progenitori bifasici



MATERIALI E METODI

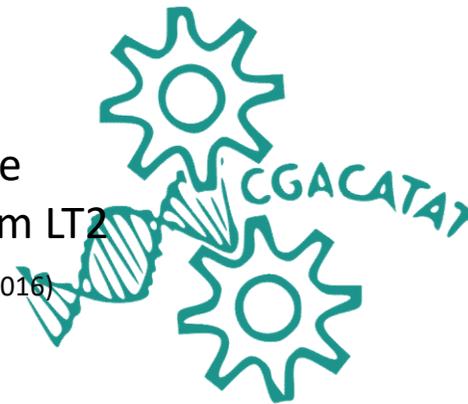


- ✓ 50 ceppi di *S. 4,[5],12:i:-* (10 inconsistenti)
- ✓ 2010-2015
- ✓ animali/alimenti



Sequenziamento whole-genome
Piattaforma Illumina MiSeq

Analisi bioinformatiche
2 referenze: *S. Typhimurium* LT2
e *S. 4,[5],12:i:-* (Petrovska, 2016)



MATERIALI E METODI

✓ Identificare marker molecolari che potrebbero giustificare il successo ecologico di S. 4,[5],12:i:-

✓ antimicrobial resistance genes (AMRGs)

✓ heavy metal resistance genes (HMRGs) – 8 geni

✓ plasmidi

Caratterizzazione mediante ~~MLST/MLVA e ARGS~~ ✓ toxin-antitoxin (TA) system → evidenza che altri fattori determinano resistenza e persistenza

-TOLLERANZA ai metalli pesanti (espressione di pompe di efflusso già presenti)

-RESISTENZE a diversi stressors (biocidi)

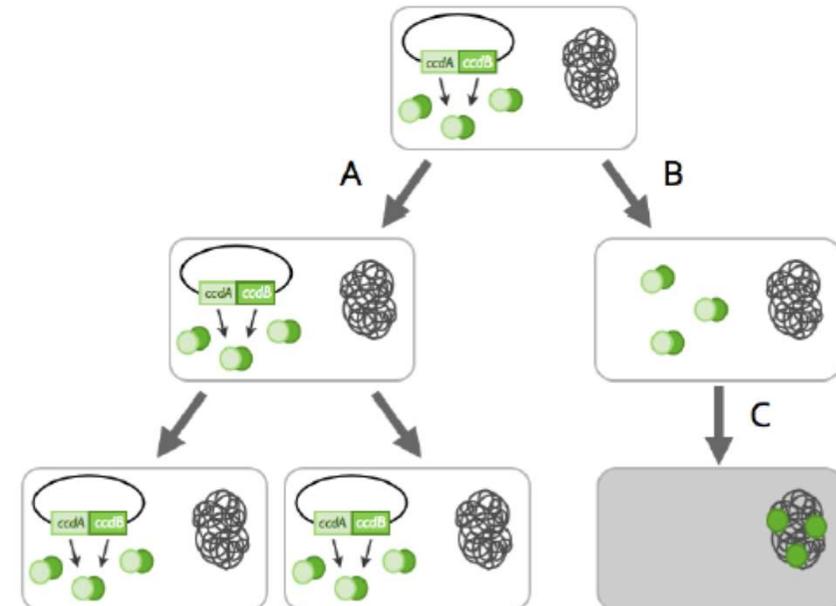
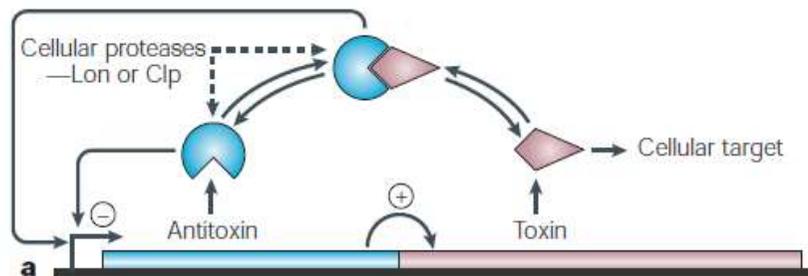


metalli pesanti = growth promotion (molecole a scopo auxinico)

biocidi = disinfezione

Toxin-Antitoxin Systems

- ✓ Piccoli moduli genetici (50-150 nt), composti di due elementi:
 - TOSSINA, proteina stabile che ha come target processi cellulari essenziali
 - ANTITOSSINA, proteina/RNA instabile che inibisce l'azione della tossina
- ✓ Diffusi in batteri e archea
- ✓ Diverse funzioni tra cui persistenza, stabilizzazione del DNA, mantenimento dei plasmidi (**post-segregational killing**)



MATERIALI E METODI

- ✓ Identificare marker molecolari che potrebbero giustificare il successo ecologico di *S. 4,[5],12:i:-*
 - ✓ Antimicrobial resistance genes (AMRGs)
 - ✓ Heavy metal resistance genes (HMRGs) – 8 geni
 - ✓ plasmidi
 - ✓ toxin-antitoxin (TA) system
- ✓ Confrontare i genomi di *S. 4,[5],12:i:-* “classiche” e inconsistenti con il genoma di *S. Typhimurium* LT2 per individuare eventuali connessioni tra le varianti monofasiche e i ceppi progenitori bifasici

SNP – based

core genome – based

RISULTATI

- ✓ Identificare marker molecolari che potrebbero giustificare il successo ecologico di S. 4,[5],12:i:-

Profilo HMRG	N. isolati (inconsistenti)	N. isolati	
		≤ 2011	> 2011
-	4 (4)	3	1
<i>pcoA, pcoD, silA, silE</i>	20 (0)	4	16
<i>pcoA, pcoD, silA, silE + merA/terF</i>	23 (4)	12	11



**Co-localizzazione nella stessa regione genomica,
associazione con *tet(B)***

RISULTATI

- ✓ Identificare marker molecolari che potrebbero giustificare il successo ecologico di S. 4,[5],12:i:-

Profilo ARG	N. Isolati (inconsistenti)	N. isolati	
		≤ 2011	> 2011
-	4 (2)	2	2
<i>blaTEM-1, strA, strB, sul2, tet(B)</i>	29 (4)	12	17
<i>mcr-1</i> + 10 altri ARGs	1 (0)	-	1

R-type ASSuT come "clone Europeo"
MA
co-localizzazione con replicone
plasmidico (IncQ1)

mcr-1 + TA *hipBA*: co-localizzazione
con replicone plasmidico
stabilizzazione del plasmide?

RISULTATI

- ✓ Identificare marker molecolari che potrebbero giustificare il successo ecologico di *S. 4,[5],12:i-*

Panel eterogeneo di repliconi plasmidici
Nella maggior parte dei campioni sono presenti da 1 a 3 plasmidi



Uno/pochi isolati per ciascun replicone

- ✓ Difficoltà di stabilire associazioni significative con gli altri markers considerati
- ✓ Acquisizione e trasferimento di materiale genetico

Profilo TA condiviso da tutti i campioni:
rel, fic, vap, hig, phd-doc, rel/par

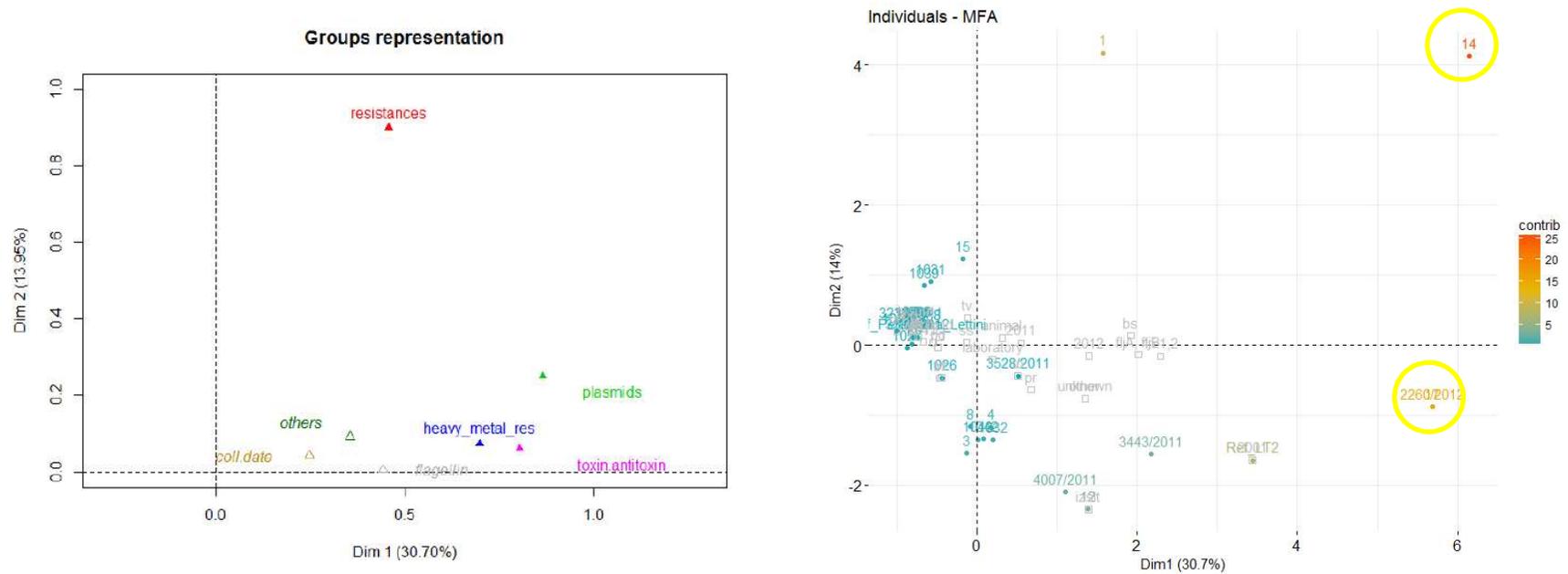
Geni rappresentativi di tutte le famiglie delle TA di tipo II

TA di tipo II meno frequenti nei ceppi non patogeni (*S. bongori*) → diffusione di ceppi patogeni (*S. enterica*)

(Lobato-Marquez, 2015)

RISULTATI

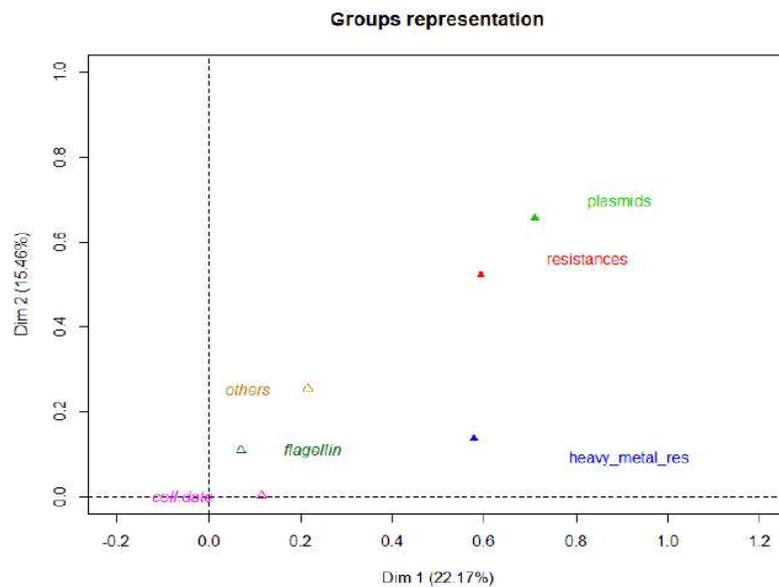
- ✓ Confrontare i genomi di S. 4,[5],12:i- “classiche” e inconsistenti con il genoma di S. Typhimurium LT2 per individuare eventuali connessioni tra le varianti monofasiche e i ceppi progenitori bifasici



ARGs, HMRGs, TA, plasmidi

RISULTATI

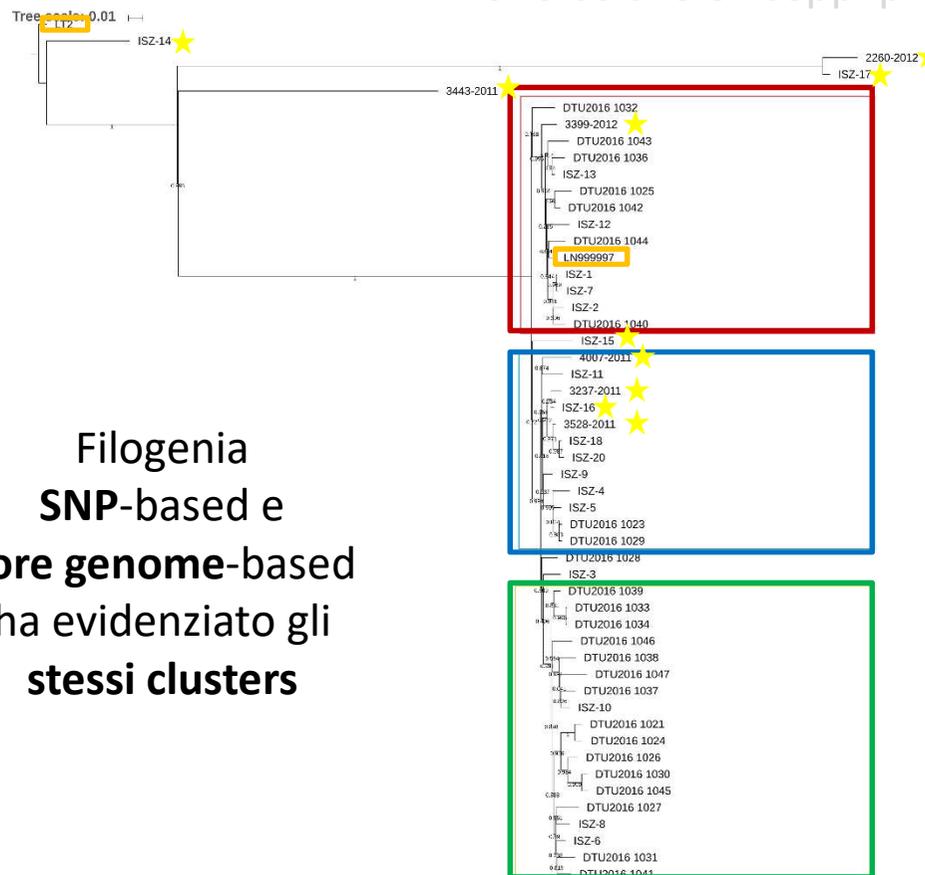
- ✓ Confrontare i genomi di *S.* 4,[5],12:i- “classiche” e inconsistenti con il genoma di *S.* Typhimurium LT2 per individuare eventuali connessioni tra le varianti monofasiche e i ceppi progenitori bifasici



ARGs, HMRGs, plasmidi

RISULTATI

- ✓ Confrontare i genomi di S. 4,[5],12:i- “classiche” e inconsistenti con il genoma di S. Typhimurium LT2 per individuare eventuali connessioni tra le varianti monofasiche e i ceppi progenitori bifasici



Filogenia
SNP-based e
core genome-based
ha evidenziato gli
stessi clusters

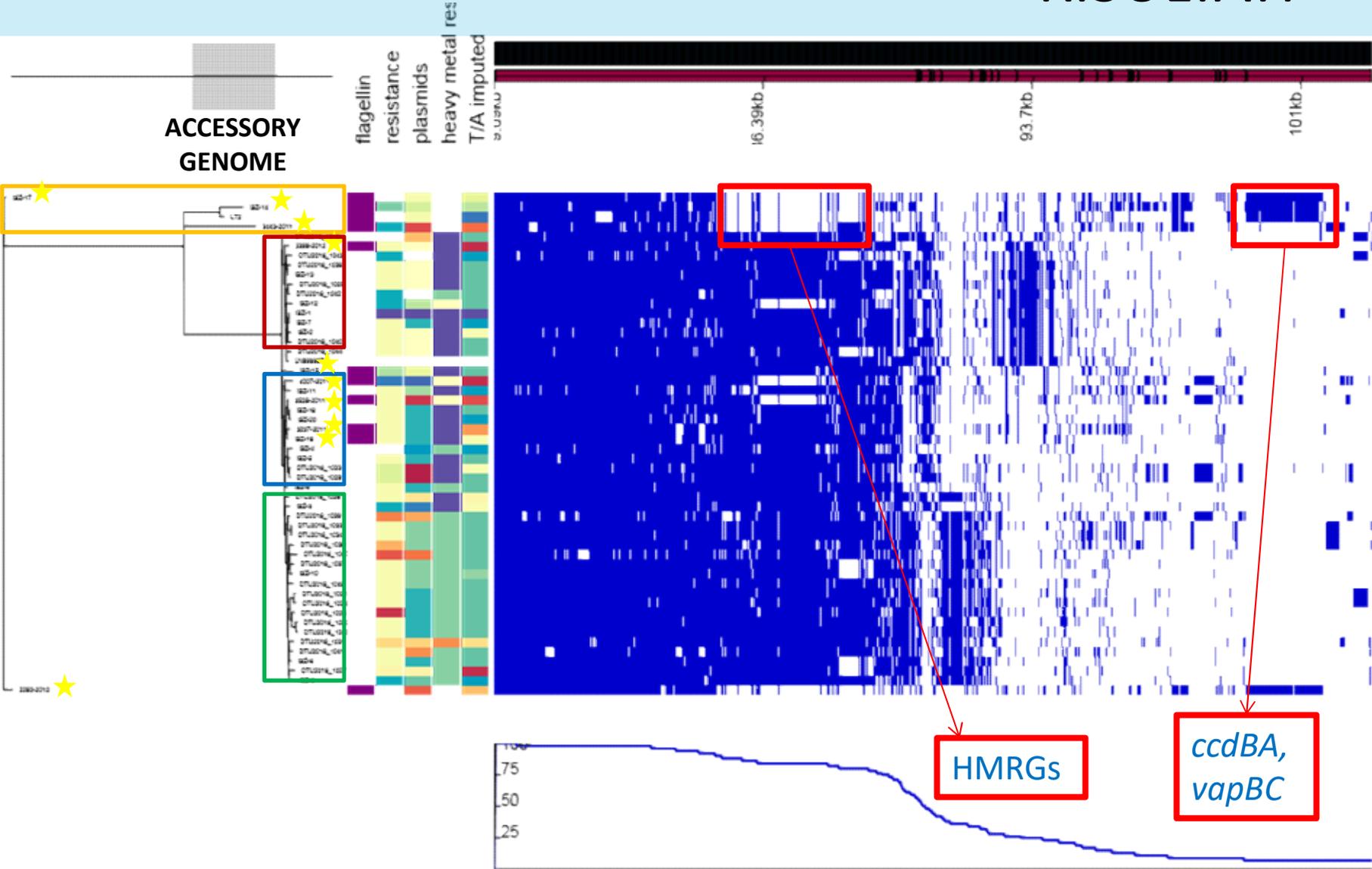
no HMRGs, TA addizionali

13 (1) – colRNAI, *tet(C)*

12 (4) – no Incl1

18 (0) – no *merA*, no Incl1, colRNAI

RISULTATI



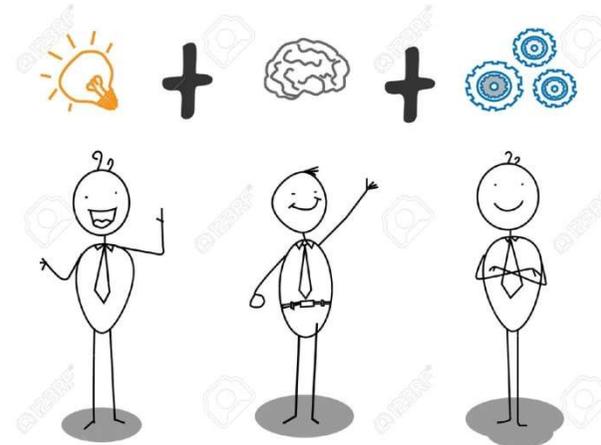
CONCLUSIONI

- ✓ *S. Typhimurium* LT2 e le varianti inconsistenti sono privi di geni di tolleranza ai metalli pesanti → la presenza di HMRGs potrebbe favorire la sopravvivenza del sierotipo 4,[5],12:i:- in ambienti sfavorevoli mangimi addizionati con metalli pesanti negli allevamenti di suini (Dębski, 2016; Mourão, 2015)
 - ✓ Co-selezione antibiotico resistenze e metallo-tolleranze (Mourão, 2015; Medardus, 2014; Baker-Austin, 2006)
 - ✓ Le varianti inconsistenti non formano un cluster compatto → diverse mutazioni/delezioni che causano questo genotipo → diverse spinte evolutive a sviluppare un fenotipo monofasico (Soyer, 2009)
- ✓ Capacità di adattamento delle varianti inconsistenti (~50% degli isolati con HMRGs, ≠ *S. Typhimurium* LT2) → sierotipo in evoluzione??

WORK IN PROGRESS

Profilo ARG	N. Isolati (inconsistenti)
-	4 (2)
<i>bla</i> TEM-1, <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	29 (4)
<i>mcr-1</i> + 10 altri ARGs	1 (0)

clone Europeo
resistenze plasmidiche?



mcr-1 + TA *hipBA*: co-localizzazione
con replicone plasmidico
stabilizzazione del plasmide?

Clonaggio di *hipB/hipA* per caratterizzare dal punto
di vista funzionale questa cassetta TA

RINGRAZIAMENTI



Mastrorilli Eleonora
Longo Alessandra
Barco Lisa
Losasso Carmen
Ricci Antonia

Dipartimento di Sicurezza Alimentare,
IZSVenezie