



Epidemiologia molecolare: indagini correlate alle malattie a trasmissione alimentare

27 ottobre 2021

Maria Laura De Marchis

Valeria Russini

UOC Microbiologia degli alimenti



Epidemiologia molecolare

L'epidemiologia molecolare è l'analisi molecolare degli acidi nucleici e/o delle proteine nello studio dei determinanti di salute e malattia nelle popolazioni



Epidemiologia molecolare delle malattie infettive

«L'epidemiologia molecolare delle malattie infettive identifica gli agenti responsabili di malattie infettive e determina la loro sorgente, le loro relazioni biologiche, le vie di trasmissione, i geni responsabili per la loro virulenza, gli antigeni rilevanti per la profilassi vaccinale, i fenomeni di resistenza ai farmaci.»

(Levin BR, Lipsitch M, Bonhoeffer S. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. Science. 1999 Feb 5;283(5403):806-9.)



Un **isolato** è una popolazione di cellule microbiche in coltura pura derivata da una singola colonia

Un **ceppo** è un isolato o un gruppo di isolati che può essere distinto da altri isolati dello stesso genere e specie per caratteristiche fenotipiche e genotipiche

Un **clone** è la progenie di un antenato comune che deriva da una catena diretta di replicazione di quell'antenato.



OBIETTIVI DI UN'INDAGINE EPIDEMIOLOGICA

- l'identificazione della **sorgente** (alimento o ambiente nel caso di MTA)
- l'identificazione delle **modalità di trasmissione** del microrganismo patogeno
- controllare e/o prevenire eventi di trasmissione o un episodio epidemico (sviluppo di un **focolaio** o **outbreak**)



E' necessario accertare la **clonalità** dei micorganismi, di una stessa specie o di uno stesso ceppo o subtipo, isolati da campioni clinici di pazienti o dall'ambiente

CLONALITA' = il grado di relazione genetica (parentela) tra organismi

FOCOLAIO = aumento improvviso della frequenza di una malattia, in relazione al tempo, al luogo e alla popolazione osservata





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

METODI DI TIPIZZAZIONE

Metodi fenotipici

Tecniche microbiologiche

- Morfologia delle colonie
- Caratteristiche di fermentazione
- Sierotipo
- Profilo di sensibilità ai batteriofagi
- Effetto citopatico virale
- Profilo di suscettibilità agli antibiotici

Metodi genomici

Tecniche molecolari

- Ibridazione degli acidi nucleici
- Ribotyping
- Analisi di sequenza degli acidi nucleici
- Analisi dei plasmidi batterici
- Elettroforesi su gel in campo pulsato
- Metodi basati sulla PCR



Metodi basati su restrizione enzimatica

- Analisi dei polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP)
- Ribotipizzazione
- Elettroforesi su gel in campo pulsato (**PFGE**)

Metodi basati su amplificazione genica

- PCR, Real Time PCR, Multiplex PCR
- PCR di segmenti di DNA scelti casualmente (RAPD-PCR)
- PCR su elementi ripetuti (rep-PCR)
- Amplificazione di loci multipli VNTR (MLVA)

Metodi basati su restrizione enzimatica seguita da amplificazione genica

- Analisi dei polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione tramite PCR (PCR-RFLP)

Metodi basati sul sequenziamento del DNA

- Sequenziamento di un singolo gene (SLST)
- Sequenziamento di più geni (**MLST**, **cgMLST**, **wgMLST**)
- Analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (**SNP**)



Parametri caratterizzanti:

- **Stabilità:** probabilità che le caratteristiche testate rimangano stabili per ogni isolato dopo il suo isolamento primario e durante la conservazione e la subcultura in laboratorio)
- **Capacità di tipizzazione** (typeability): abilità del metodo di fornire un risultato inequivocabile (caratterizzazione definitiva) per ogni isolato esaminato
- **Riproducibilità:** probabilità di ottenere lo stesso risultato ripetendo l'analisi sullo stesso isolato
- **Potere discriminante:** capacità del metodo di rilevare differenze tra cloni microbici distinti (quindi epidemiologicamente non correlati).
- **Accuratezza:** corretto posizionamento degli isolati epidemiologicamente correlati (quindi presumibilmente di derivazione clonale) nello stesso tipo

Ranjbar R, Karami A, Farshad S, Giammanco GM, Mammina C. **Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide.** New Microbiol. 2014 Jan;37(1):1-15. Epub 2014 Jan 15.



Bisogna ricordare che...

- Anche con approcci molecolari ad alta risoluzione, compresa l'analisi WGS, non è possibile stabilire quanto strettamente due isolati siano affini senza una valutazione della struttura e della diversità della popolazione batterica in questione
- **Confronto con database nazionali e internazionali**
- Nello svolgimento di indagini epidemiologiche correlate a MTA questi strumenti di analisi sono di supporto ma non sono risolutivi.
- **Link epidemiologico**: contatto con altri casi, contatto con la stessa fonte di esposizione (es: stesso alimento consumato, stesso ambiente frequentato...)



Attività di sorveglianza correlate alle MTA presso l'IZSLT

L'IZSLT individuato dalla Giunta Regionale del Lazio con delibera n. 833 del 20 febbraio 1996, quale **Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni (CREP)**

Partecipa, come nodo regionale, alla rete di sorveglianza **ENTER-VET**

- sierotipizzazione dei isolati *Salmonella* spp. da campioni di origine veterinaria (alimentare, animale e ambientale)
- trasmissione degli isolati e dei metadati al **CNRS** presso l'IZS delle Venezie

Partecipazione alla rete di sorveglianza **ENTER-NET**

- la sierotipizzazione degli isolamenti umani provenienti da ospedali e laboratori di analisi privati del Lazio e della Toscana
- trasmissione periodica di isolati e metadati all'Istituto Superiore di Sanità (ISS).
- collaborazione con il CRN e LNR per l'antibiotico resistenza presso l'IZSLT che effettua la determinazione della sensibilità antimicrobica di tutti i ceppi di origine umana.
- Ceppoteca degli isolati di *Salmonella* di origine umana

<https://www.izslt.it/crep>



GESTIONE DELLE MTA

- **DECRETO DEL COMMISSARIO AD ACTA (delibera del Consiglio dei Ministri del 21 marzo 2015)**

Piano regionale per la sorveglianza e la gestione di Emergenze Infettive durante il Giubileo Straordinario 2015-2016

→ Individuazione presso l'IZSLT del Laboratorio Regionale di Riferimento per le tossinfezioni alimentari, con particolare riguardo a Salmonella di provenienza umana, animale ed ambientale

- **DECRETO DEL COMMISSARIO AD ACTA (25 maggio 2018)**

Piano regionale della prevenzione 2014-2019. Proroga al 2019.

→ Laboratorio Regionale di Riferimento per le tossinfezioni alimentari, con particolare riguardo a Salmonella di provenienza umana, animale ed ambientale



Regione Lazio

DIREZIONE SALUTE ED INTEGRAZIONE SOCIO SANITARIA

Atti dirigenziali di Gestione

Determinazione 28 maggio 2021, n. G06447

Definizione della composizione del Gruppo Regionale per la gestione delle Malattie trasmesse da alimenti (MTA) e individuazione del laboratorio regionale di riferimento per le malattie trasmesse da alimenti e per i patogeni a trasmissione alimentare isolati dall'uomo.

Regione Lazio

DIREZIONE SALUTE ED INTEGRAZIONE SOCIO SANITARIA

Atti dirigenziali di Gestione

Atto di Organizzazione 12 ottobre 2021, n. G12436

Determinazione 28 maggio 2021, n. G06447 - Nomina del Gruppo Regionale per la gestione delle Malattie trasmesse da alimenti (MTA).



Attività del Laboratorio di Riferimento Regionale per le malattie a trasmissione alimentare (LRMTA)

- Contatti con le ASL per raccolta delle segnalazioni e organizzazione dei prelievi dei campioni alimentari e ambientali in caso di MTA
- Contatti con le strutture ospedaliere della regione Lazio per raccolta degli isolati e delle relative informazioni cliniche
- Attività di rendicontazione al SERESMI (Servizio Regionale per l'Epidemiologia, Sorveglianza e controllo delle Malattie Infettive)
- Attività di rendicontazione delle indagini svolte alle Autorità competenti e alle strutture sanitarie coinvolte
- Rapporti con l'ISS per garantire i livelli nazionali e internazionali della sorveglianza
- Partecipazione al Gruppo Regionale per la gestione delle Malattie trasmesse da alimenti (MTA) → Aggiornamento delle linee guida per la sorveglianza delle MTA e conduzioni di indagini epidemiologiche in caso di MTA



Attività del Laboratorio di Riferimento Regionale per i Patogeni a Trasmissione Alimentare di Origine Umana (LRPTAU)

- Ricevere e caratterizzare gli isolati batterici di *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* STEC, *Yersinia*, *Vibrio* e *Shigella* provenienti dai laboratori di analisi pubblici e privati;
- Restituire i rapporti di prova relativi alle caratterizzazioni ai singoli laboratori e fornire loro il supporto scientifico necessario;
- Conservare i ceppi batterici, ricevuti o isolati ai fini di sorveglianza;
- Redigere report periodici sui dati prodotti dal Laboratorio.



Attività' di ricerca corrente sulle MTA

- **PROGETTO DI RICERCA CORRENTE IZS LT 02 /19 RC**

Modello per la caratterizzazione di agenti patogeni a trasmissione alimentare e interscambio dati di tipizzazione molecolare in ottica One-Health

N. ID	Ente appartenenza	Responsabile scientifico
U.O. 1	IZSLT	Stefano Bilei
U.O. 2	IZSLT	Alessia Franco
U.O. 3	IZSLT	Ziad Mezher
U.O. 4	IZSLT	Paola Marconi
U.O. 5	IZSLT	Laura Gasperetti
U.O. 6	IZSLT	Tiziana Zottola
U.O. 7	IZSAM	Adriano Di Pasquale
U.O. 8	ISS	Stefano Morabito
U.O. 9	IZSLT	Renato Colafrancesco

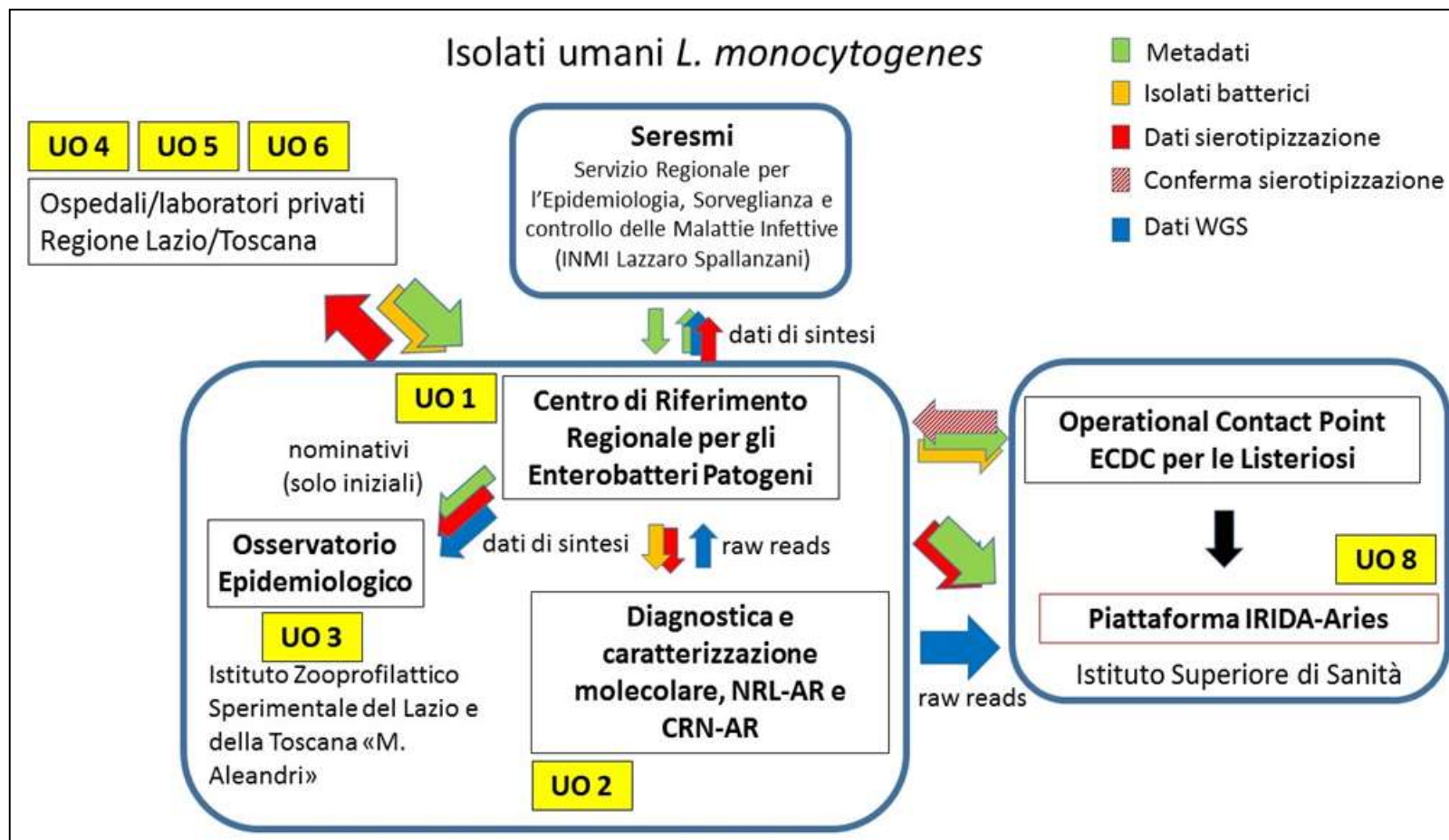


OBIETTIVI

- Studio pilota di interscambio di dati di caratterizzazione molecolare (Molecular Typing Data) di agenti batterici patogeni responsabili di malattia a trasmissione alimentare (*Listeria monocytogenes* ed *E. coli* STEC)
- Gestione metadati e dati analitici su piattaforme condivise
- Integrazione con dati epidemiologici
- Attività di supporto in corso di indagini epidemiologiche legate ad episodi di MTA



FLUSSI DI ATTIVITA'



I prodotti

Relazioni trasmesse al Ministero, alla Regione Lazio e al SERESMI nel corso di 2 indagini epidemiologiche legate ad episodi di listeriosi legati a ceppi di *L. monocytogenes* appartenente al ST5:

- Relazione: “Casi di Listeriosi - Regione Lazio - Luglio 2019 - Relazione sui risultati preliminari delle indagini in corso”
- Relazione “Sospetto eccesso di casi di Listeriosi nella Regione Lazio – Status delle indagini molecolari (su isolati da casi clinici e da matrici alimentari e ambientali)”
- Relazione “Sospetto eccesso di casi di Listeriosi nella Regione Lazio – Status delle indagini molecolari (su isolati da casi clinici e da matrici alimentari e ambientali), aggiornamento ad agosto 2019”
- Relazione “Sospetto eccesso di casi di Listeriosi nella Regione Lazio – Status delle indagini molecolari (su isolati da casi clinici e da matrici alimentari e ambientali), aggiornamento a novembre 2019”

E al ST451:

- Relazione «Sospetto di infezione di origine nosocomiale da *Listeria monocytogenes* presso un ospedale della regione Lazio».



Article

A Nosocomial Outbreak of Invasive Listeriosis in An Italian Hospital: Epidemiological and Genomic Features

Valeria Russini ^{1,†}, Martina Spaziantie ^{2,†}, Tiziana Zottola ³, Anna Giovanna Fermani ⁴, Gina Di Giampietro ⁵, Giovanni Bianco ⁵, Paolo Fabietti ⁵, Riccardo Marrone ⁵, Roberta Parisella ⁵, Sergio Parrocchia ⁵, Teresa Bossù ⁵, Stefano Bilei ¹ and Maria Laura De Marchis ^{1,*}

Next Generation Sequencing (NGS) e bioinformatica: applicazioni nel campo della sicurezza alimentare

26-27 ottobre 2021

Casi di studio

Epidemiologia molecolare: indagini correlate alle malattie a
trasmissione alimentare

27 ottobre 2021

Valeria Russini, Microbiologia degli alimenti



Article

A Nosocomial Outbreak of Invasive Listeriosis in An Italian Hospital: Epidemiological and Genomic Features

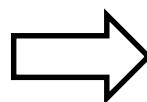
Valeria Russini ^{1,†}, Martina Spaziante ^{2,†}, Tiziana Zottola ³, Anna Giovanna Fermani ⁴, Gina Di Giampietro ¹, Giovanni Blanco ⁵, Paolo Fabietti ⁵, Riccardo Marrone ⁵, Roberta Parisella ⁵, Sergio Parrocchia ⁵, Teresa Bossù ¹, Stefano Bilei ¹ and Maria Laura De Marchis ^{1,4}

Caso I: Focolaio di listeriosi in ospedale

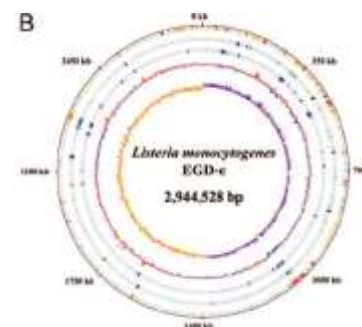
Settembre-Ottobre 2020: Accertati 4 casi di listeriosi in pazienti ricoverati presso una struttura ospedaliera

3 isolati *L. monocytogenes* nella stessa settimana + 1 isolato nel mese precedente

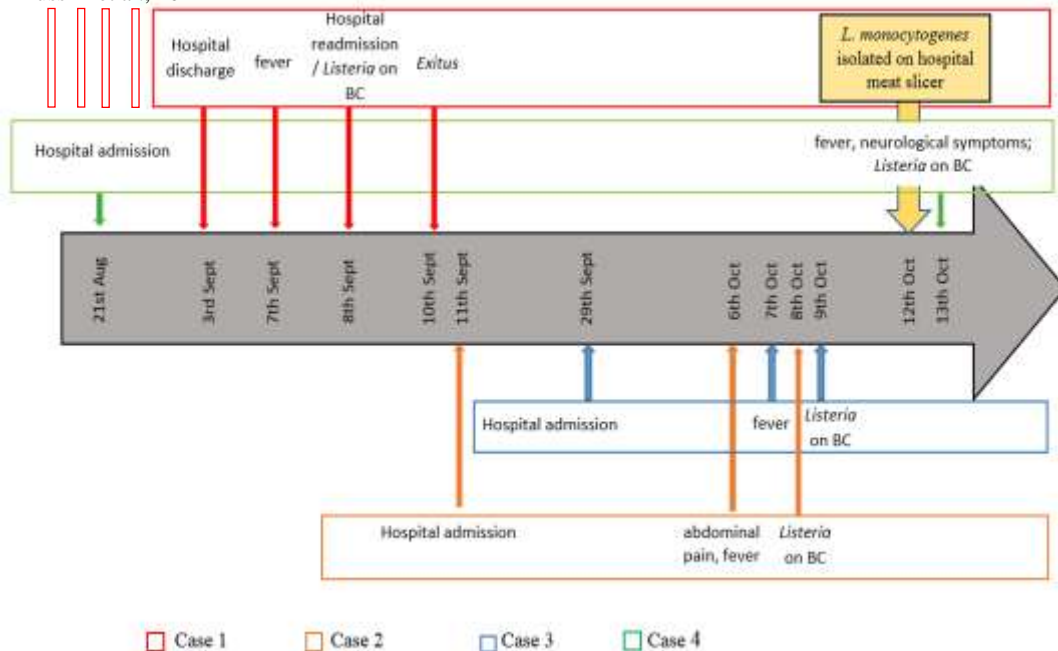
Sierotipo 1/2a
(sieroagglutinazione)



ST451
(WGS)



Russini et al., 2021



Caso 1: manifestazione sintomi dopo dimissione dallo stesso ospedale.

Deceduto pochi giorni dopo il secondo ricovero.

Caso 2: ricoverato da circa un mese prima della manifestazione sintomi.

Caso 3 ricoverato una settimana prima della manifestazione di sintomi

Caso 4: ricoverato da due mesi nella struttura prima dei sintomi

- Somministrato questionario alimentare a pazienti o parenti
- Recuperati i menu dei pazienti durante la degenza → nessun alimento in comune durante la degenza
- Successiva ispezione e campionamento nella cucina ospedaliera
- Isolato stesso ceppo di *L. monocytogenes* dall'unica **affettatrice** presente



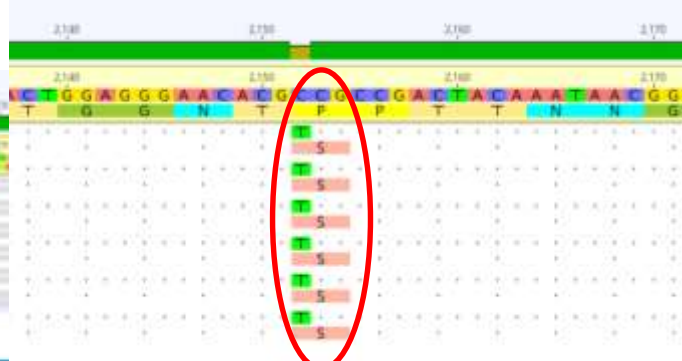
Virulenza

90/92 geni di virulenza identificati in tutti i ceppi ST451 coinvolti

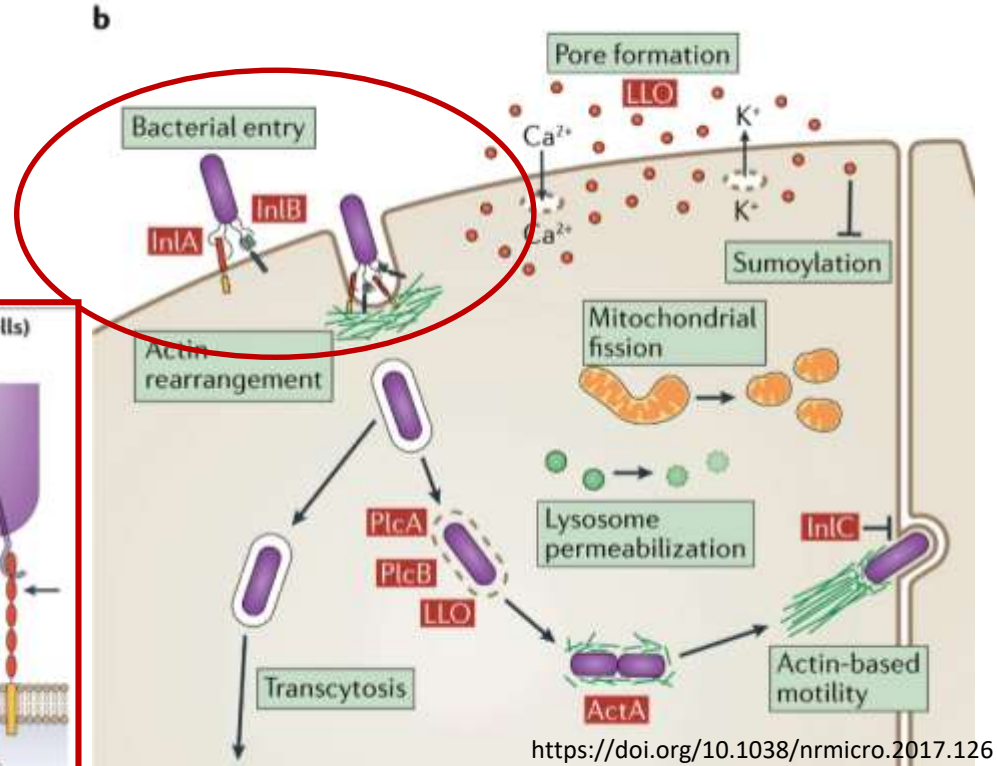
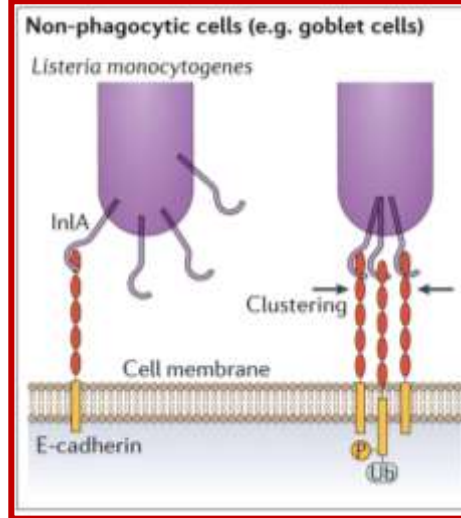
I campioni presentavano lo stesso allele per i principali geni di virulenza rispetto a altri ST451, con un'importante eccezione: il gene per internalina A (inlA) (2403bp)

Presente una nuova mutazione nella posizione 2152 dell'allele 64 (C→T), rispetto al database Pasteur, che causa una mutazione missenso (da prolina a serina).

Nuova mutazione associata strettamente ai casi correlati al focolaio.



Mutazione missenso: mutazione che produce una sostituzione amminoacidica e quindi modifica potenzialmente funzionale.



L'**internalina** (inlA) è una proteina di superficie che media l'ingresso del patogeno nelle cellule eucariotiche umane non fagocitarie e svolge un ruolo chiave nell'attraversamento della barriera intestinale, consentendo al batterio di raggiungere il flusso sanguigno dell'ospite.

Interessante studiare gli effetti di questa mutazione sull'attività in vitro e in vivo della proteina.



Ricerca geni di resistenza

Tutti gli isolati umani considerati nello studio portavano i geni per la resistenza agli antimicrobici

fosfomicina (fosX)

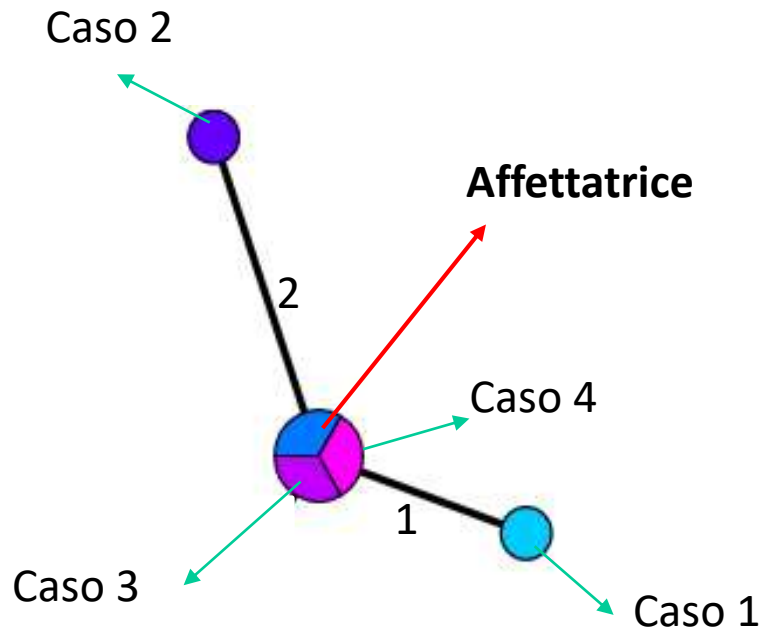
lincomicina (lin)

chinolone (norB)

sulfonamidi (sul)



Analisi del cgMLST



Il profilo cgMLST è una nuova combinazione allelica

12 nuove varianti alleliche rispetto al database di riferimento dell'Istituto Pasteur (BIGSdb-Lm)

CT9151 → Stesso profilo per tutti i ceppi relativi al focolaio

0-6 SNPs

Supporto per l'ipotesi di un evento di contaminazione secondaria che coinvolge un alimento trattato con l'affettatrice.

La fonte originale della contaminazione della cucina, da parte di questo particolare ceppo di *L. monocytogenes*, non è stata ancora identificata.

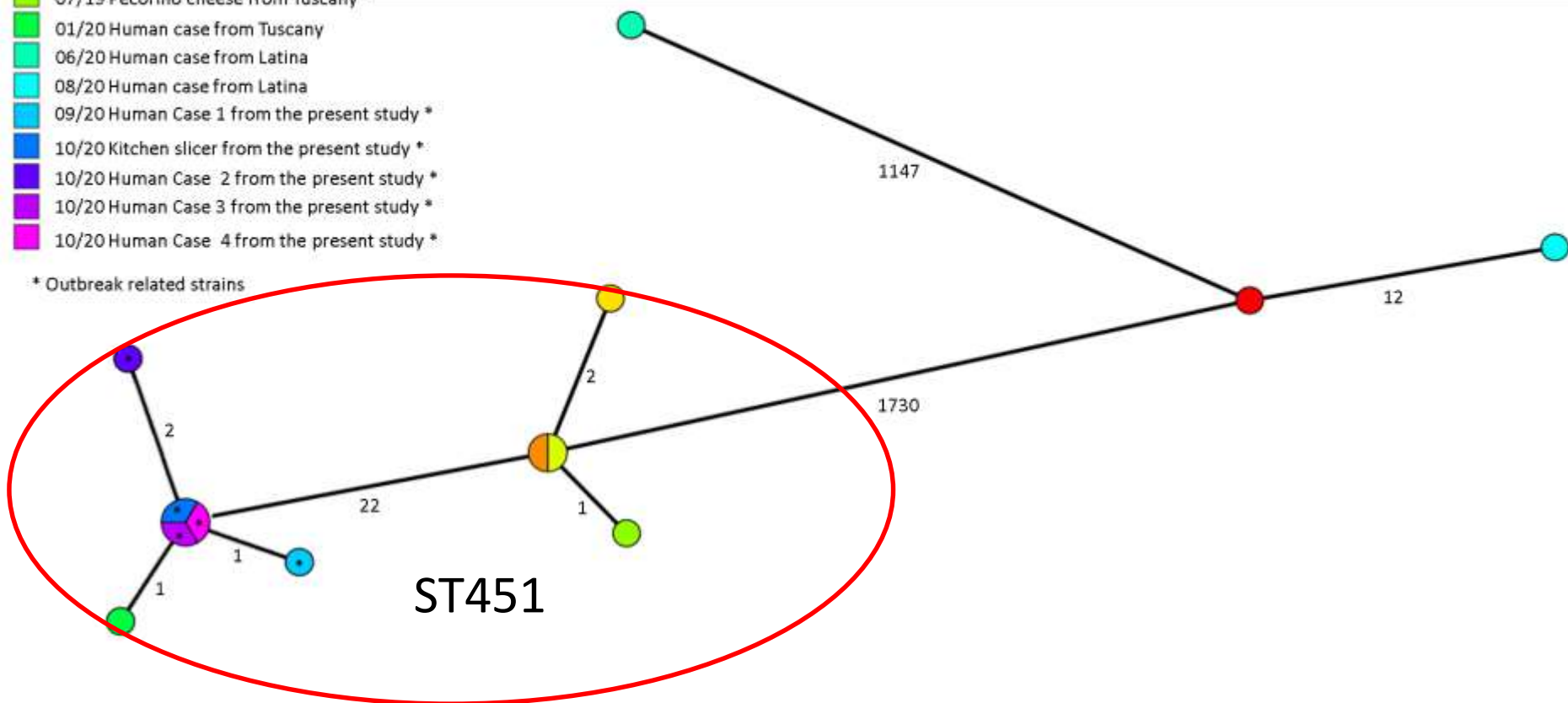


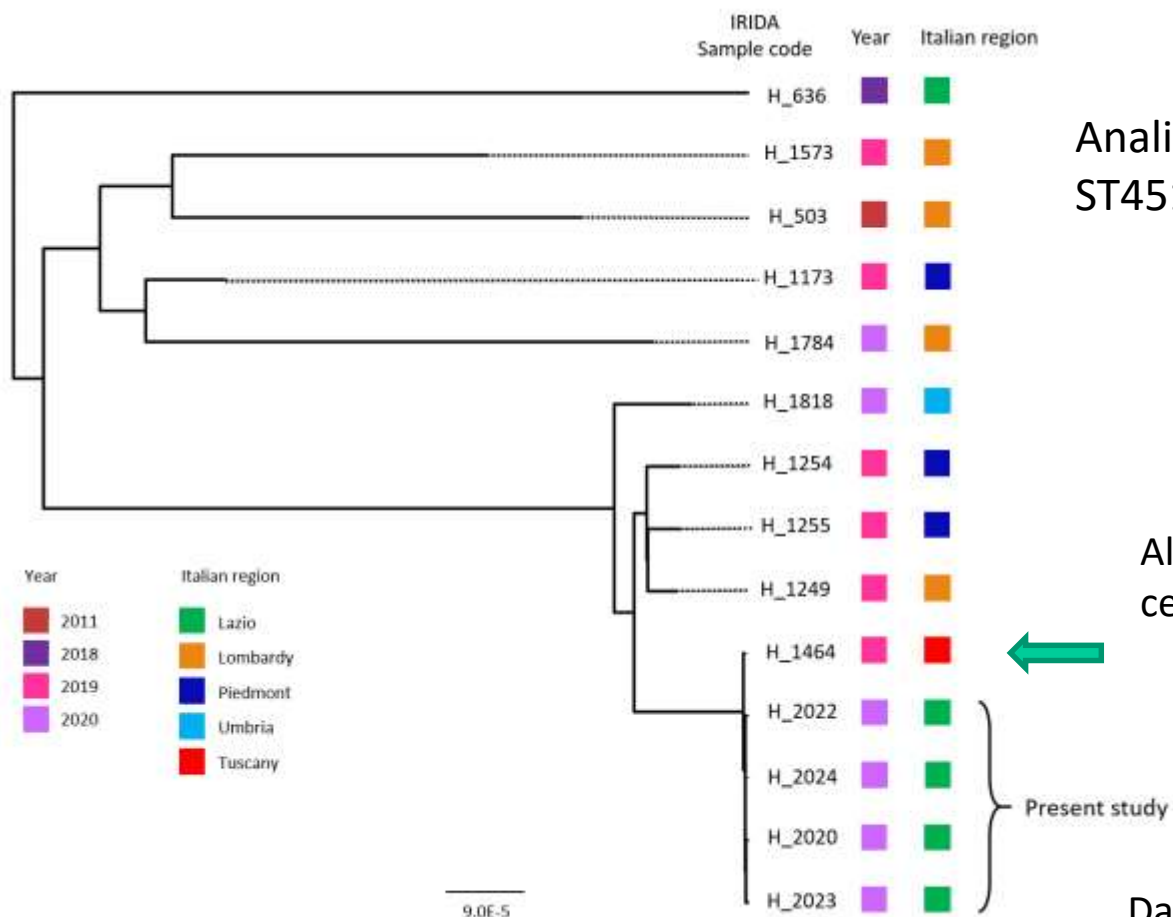
Confrontato il cgMLST di tutti i ceppi ST451
presenti nella nostra ceppoteca con altri casi
dello stesso ospedale

Isolation date (mm/yy) and origin

- 05/18 Human case from Latina
- 07/19 Pecorino cheese from Tuscany
- 07/19 Pecorino cheese from Tuscany
- 07/19 Pecorino cheese from Tuscany
- 07/19 Pecorino cheese from Tuscany
- 01/20 Human case from Tuscany
- 06/20 Human case from Latina
- 08/20 Human case from Latina
- 09/20 Human Case 1 from the present study *
- 10/20 Kitchen slicer from the present study *
- 10/20 Human Case 2 from the present study *
- 10/20 Human Case 3 from the present study *
- 10/20 Human Case 4 from the present study *

* Outbreak related strains





Analisi degli SNPs con altri ceppi ST451 in un contesto nazionale

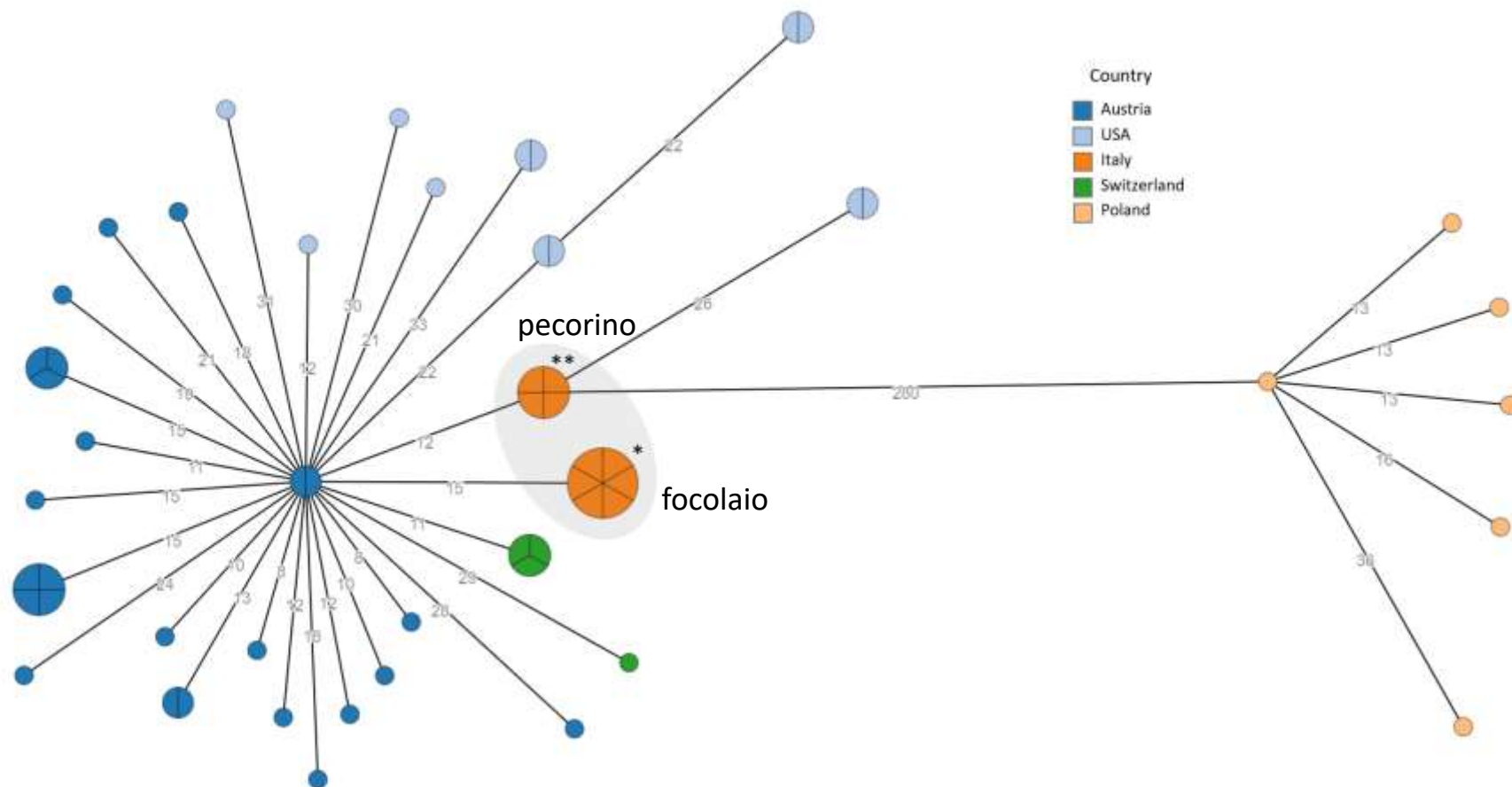
Altro caso in Toscana nel 2019, ceppo molto simile ai nostri



Present study

Da chiarire link epidemiologico





Minimum Spanning Tree (MST) di tutti i ceppi ST451 di origine accertata disponibili su database pubblici



Caso II: Listeriosi in gravidanza con parto premature

Donna in gravidanza alla 31 settimana, diagnosticata listeriosi senza sintomi evidenti

Malattia ha portato a parto prematuro, anche bambina positiva a *L. monocytogenes*



Isolato ceppo di *L. monocytogenes* solo dalla neonata

Questionario alimentare: segnalazione supermercato e macelleria per il consumo di affettati e carne equina



Campionamento carne equina (macellaio)



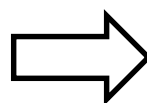
campioni negativi

Campionamento mortadella al banco
gastronomia e ambientale (supermercato)

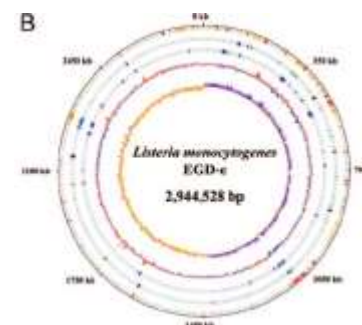


campioni positivi

Sierotipo **1/2b**
(sieroagglutinazione)



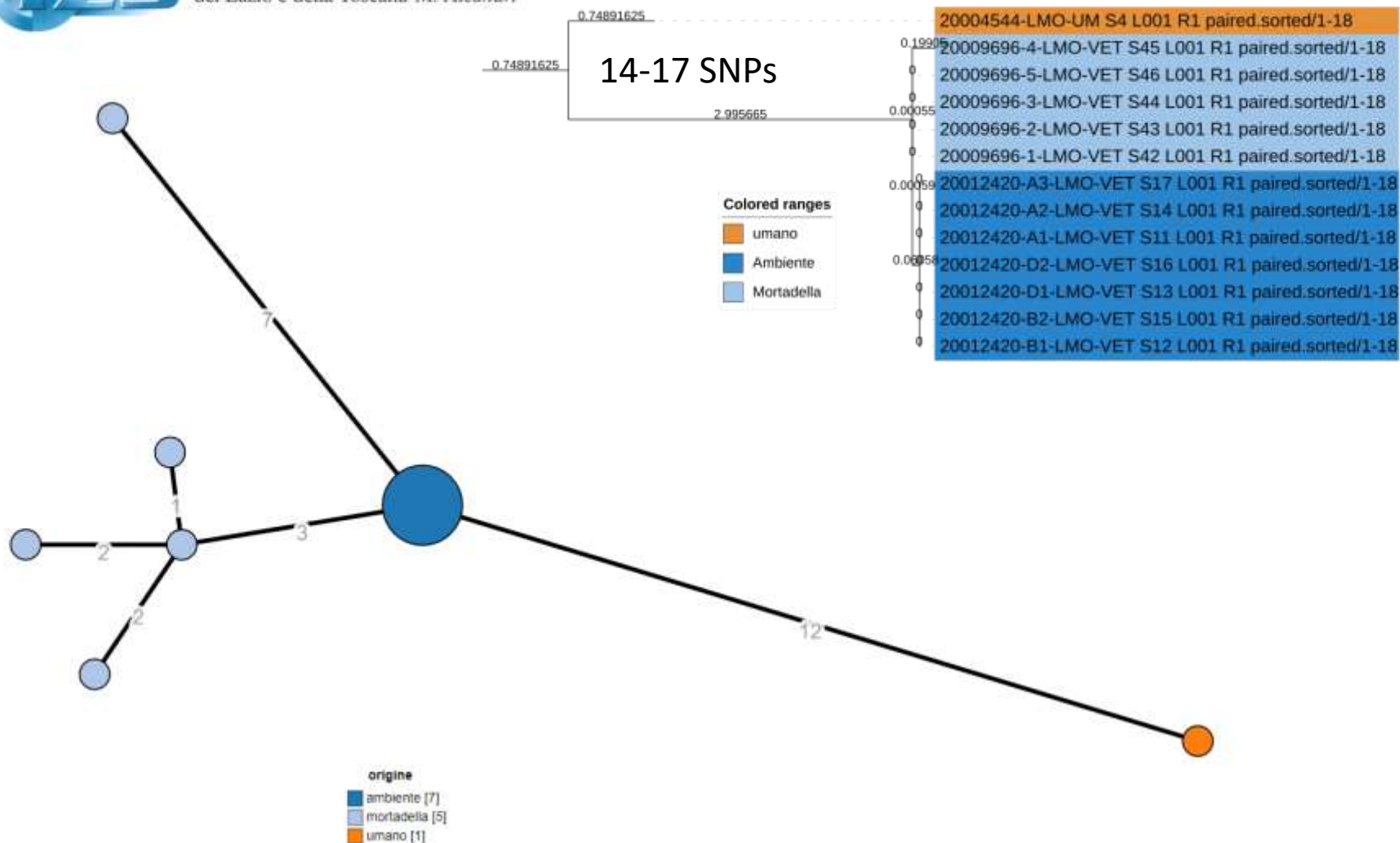
ST5
(WGS)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Tree scale: 1



Indagine epidemiologica sul territorio

Identificati e analizzati tutti i casi di isolati di *L. monocytogenes* da pazienti residenti nello stesso comune della donna

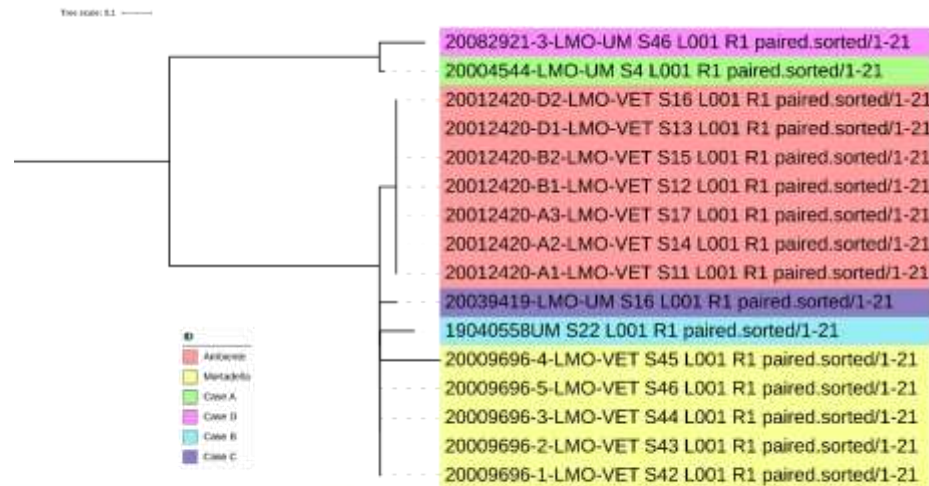
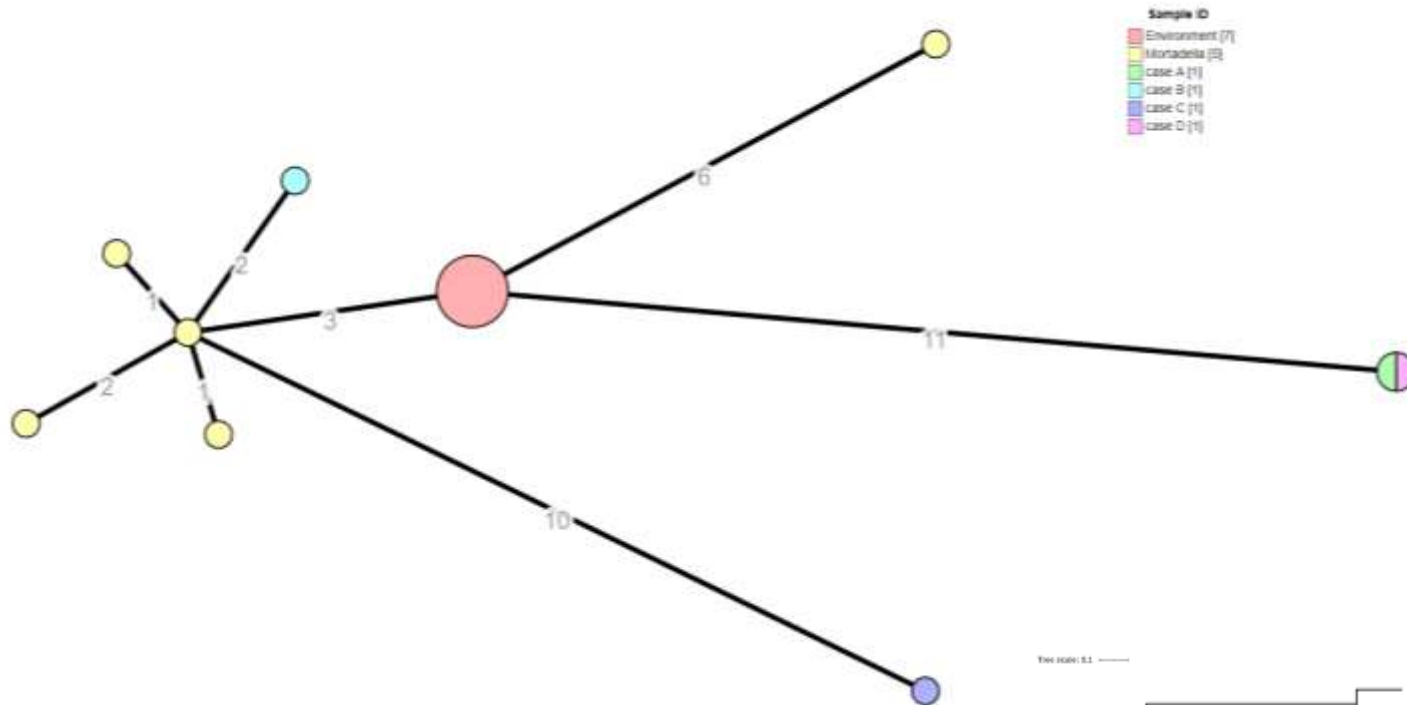
ID	Data arrivo	Età paziente	Sesso	Ospedale di provenienza	Sierotipo	Sierogruppo	ST
Caso A	10/01/20	< 1 mese	F	Policlinico Casilino (RM)	1/2b	IIb	5
Caso B	08/05/19	77	M	Ospedale Spallanzani (RM)	1/2b	IIb	5
Caso C	28/04/20	69	F	Ospedale Vannini (RM)	1/2b	IIb	5
Caso D	21/05/20	71	M	Policlinico Gemelli (RM)	1/2b	IIb	5

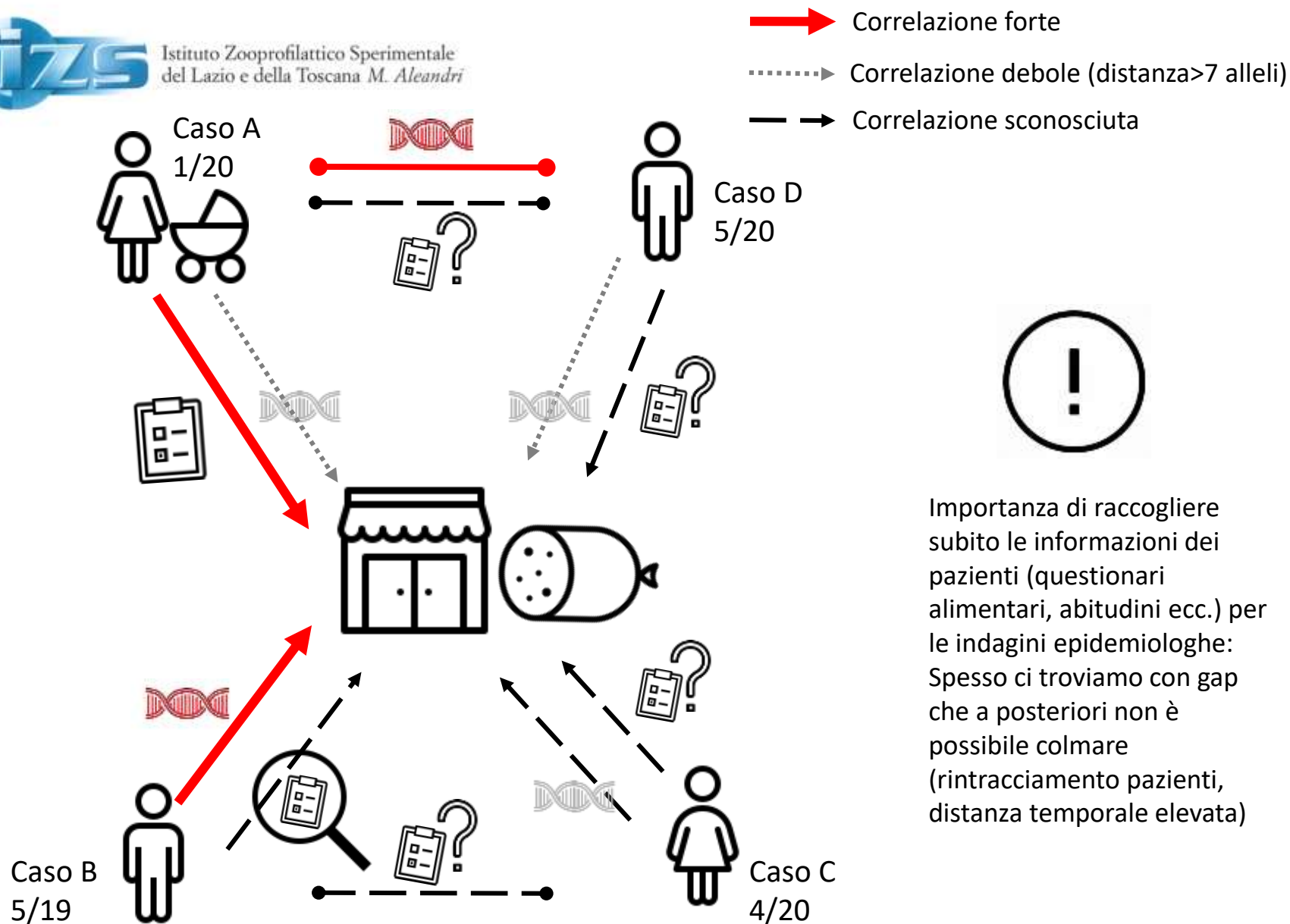
Tutti isolati appartenente allo stesso sierotipo e stesso ST

Analisi cgMLST e SNPs per chiarire le relazioni



MST e albero filogenesi







Grazie per l'attenzione!

