

Studio osservazionale descrittivo: indagine epidemiologica molecolare di un caso di listeriosi umana correlata a gravidanza

31 Maggio 2023

Valeria Russini, Microbiologia degli alimenti



DEFINIZIONE

Epidemiologia: l'epidemiologia è uno “**studio sulla popolazione**”.

Studio della distribuzione e dei determinanti degli stati e degli eventi correlati con la salute.

Nasce con il medico britannico John Snow, e il suo studio dell'epidemia di colera del 1854 a Londra.



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. **Unisce le informazioni ottenute dagli studi clinici con i dati provenienti da analisi genetiche o molecolari.**

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 et al., 1999)

Le tecniche molecolari consentono lo **studio dell'epidemiologia delle infezioni con un approccio integrato rispetto ai metodi tradizionali, fornendo strategie sempre più accurate di caratterizzazione** dei microrganismi patogeni, in grado di stabilire i livelli di clonalità e tracciabilità dei microrganismi isolati. L'identificazione e la tipizzazione dei microrganismi patogeni a livello di specie sono importanti per la diagnosi, la terapia e la sorveglianza epidemiologica delle infezioni, soprattutto nel caso di batteri con elevati livelli di antibiotico-resistenza e quelli implicati nelle infezioni nosocomiali o pandemiche

Sammarco et al., 2014



OBIETTIVI DI UN'INDAGINE EPIDEMIOLOGICA DI MALATTIE INFETTIVE

- 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**)

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'alimento

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

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



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 •

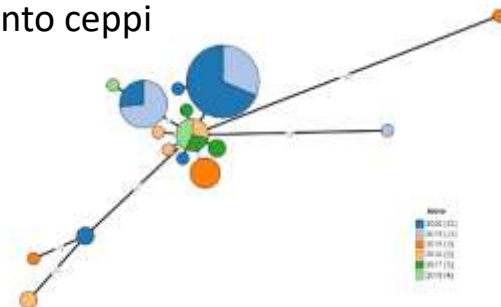
Metodi basati sulla PCR •

Metodi basati sul sequenziamento del DNA

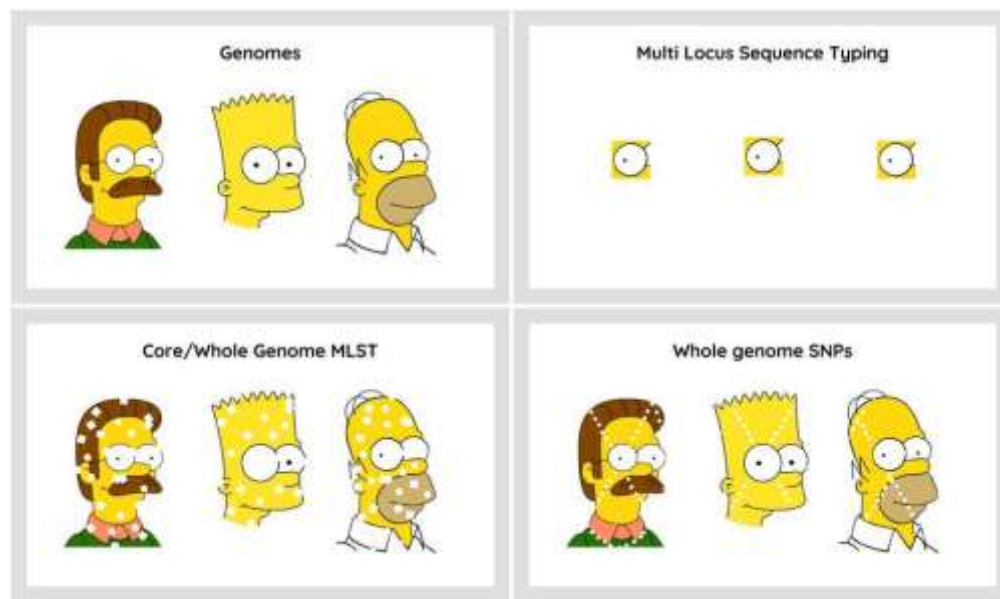
- Sequenziamento di un singolo gene (SLST)
- Sequenziamento di più geni (**MLST**, **cgMLST**, **wgMLST**)
- Analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (**SNP**)



Metodologie molecolari per identificazione e confronto ceppi



- Multi Locus Sequence Type (MLST): analizza un ridotto set di geni la cui combinazione allelica assegna ST (7 geni per *Listeria monocytogenes*)
- Core Genome MLST: analizza set di geni «core» (essenziali e funzionali) sempre presenti nella specie considerata (es. 3002 geni in *Salmonella*, 1701 *Listeria*) **la loro comparazione ci indica la distanza «allelica» dei ceppi. Soglia specifica per indentificazione focolaio** (es. 7 alleli per *L. monocytogenes*)
- Single Nucleotide Polymorphism (SNPs): indentificano i polimorfismi a singolo nucleotide, differenze puntiformi tra genomi. Indica la quantità di distanza genetica tra ceppi e la relazione filogenetica



- 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

- 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
- **Avvio delle attività di supporto nel corso di indagini epidemiologiche legate ad episodi di MTA**



Article

A whole genome sequencing based epidemiological investigation of a pregnancy-related invasive listeriosis case in central Italy

Valeria Russini¹, Martina Spaziantè², Bianca Maria Varcasia¹, Elena Lavinia Diaconu³, Piermichele Paolillo⁴, Simionetta Picone¹, Grazia Brunetti⁵, Daniela Mattia⁶, Angela De Carolis⁷, Francesco Vairo², Teresa Bossù¹, Stefano Bilei¹, Maria Laura De Marchis^{1,*}

Caso di studio: Listeriosi in gravidanza con parto prematuro

Gennaio 2020: Donna in gravidanza alla 31 settimana ricoverata con rottura prematura delle membrane (PROM) e sintomi gastrointestinali.

Parto prematuro
neonata positiva a *L. monocytogenes*



Isolato ceppo di *L. monocytogenes* solo dalla neonata
(madre subito trattata con antibiotici)

Sierotipo 1/2b, ST5

Altri casi ST5, focolaio 2019



Questionario alimentare: segnalazione di un supermercato e di una macelleria per il consumo di **affettati** (tagliati freschi) e **carne equina**

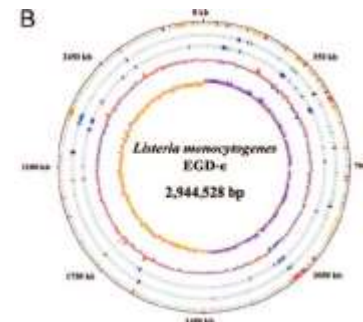
Campionamento carne equina (macellaio) → campioni negativi

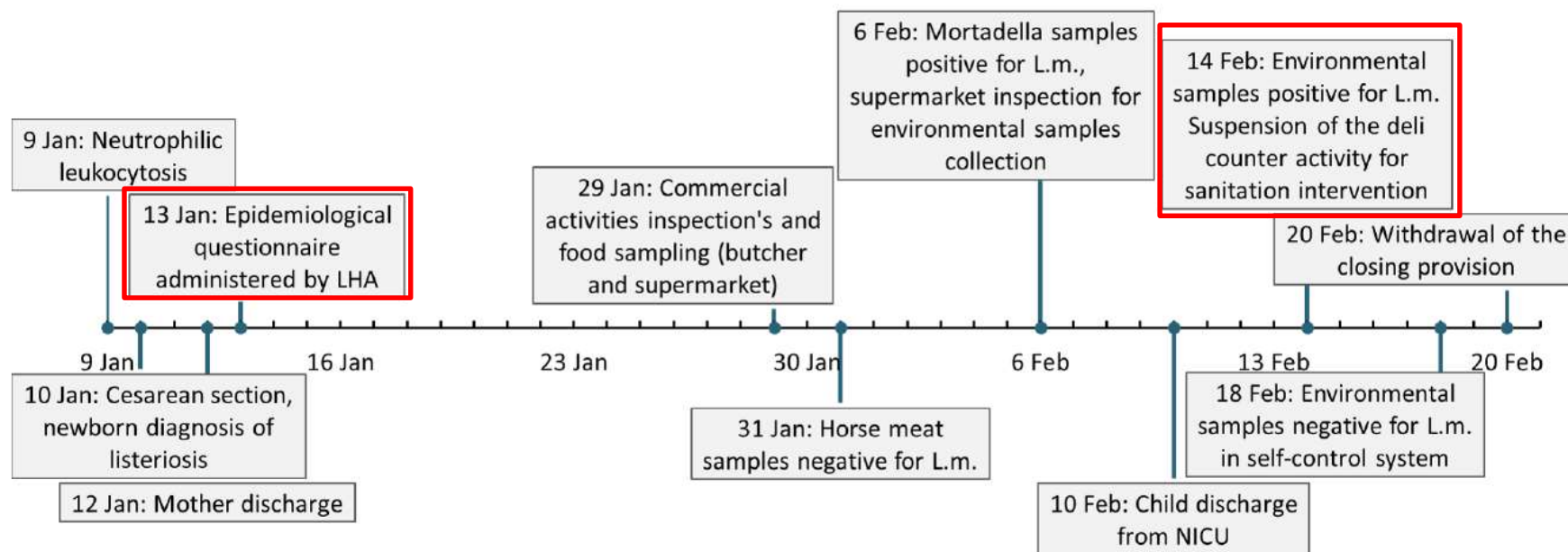
Campionamento mortadella al **banco gastronomia** e ambientale (supermercato) → **campioni positivi**

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



ST5
(WGS - MLST)





Timeline degli eventi ricostruiti durante l'indagine



Indagine epidemiologica sul territorio

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

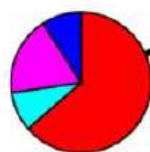
ID	Data campionamento	Età	Sesso	Sierotipo	Sierogruppo	ST
Caso A	10/01/20	< 1 mese	F	1/2b	IIb	5
Caso B	08/05/19	77	M	1/2b	IIb	5
Caso C	28/04/20	69	F	1/2b	IIb	5
Caso D	21/05/20	71	M	1/2b	IIb	5

Tutti isolati appartenente allo stesso sierotipo e stesso ST

Analisi cgMLST e SNPs per chiarire le relazioni



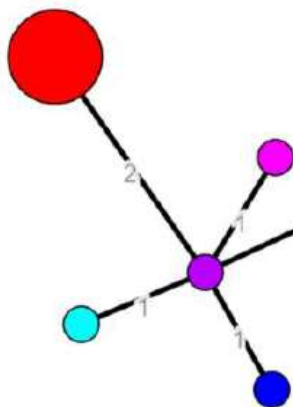
A



8



B



9

Origin

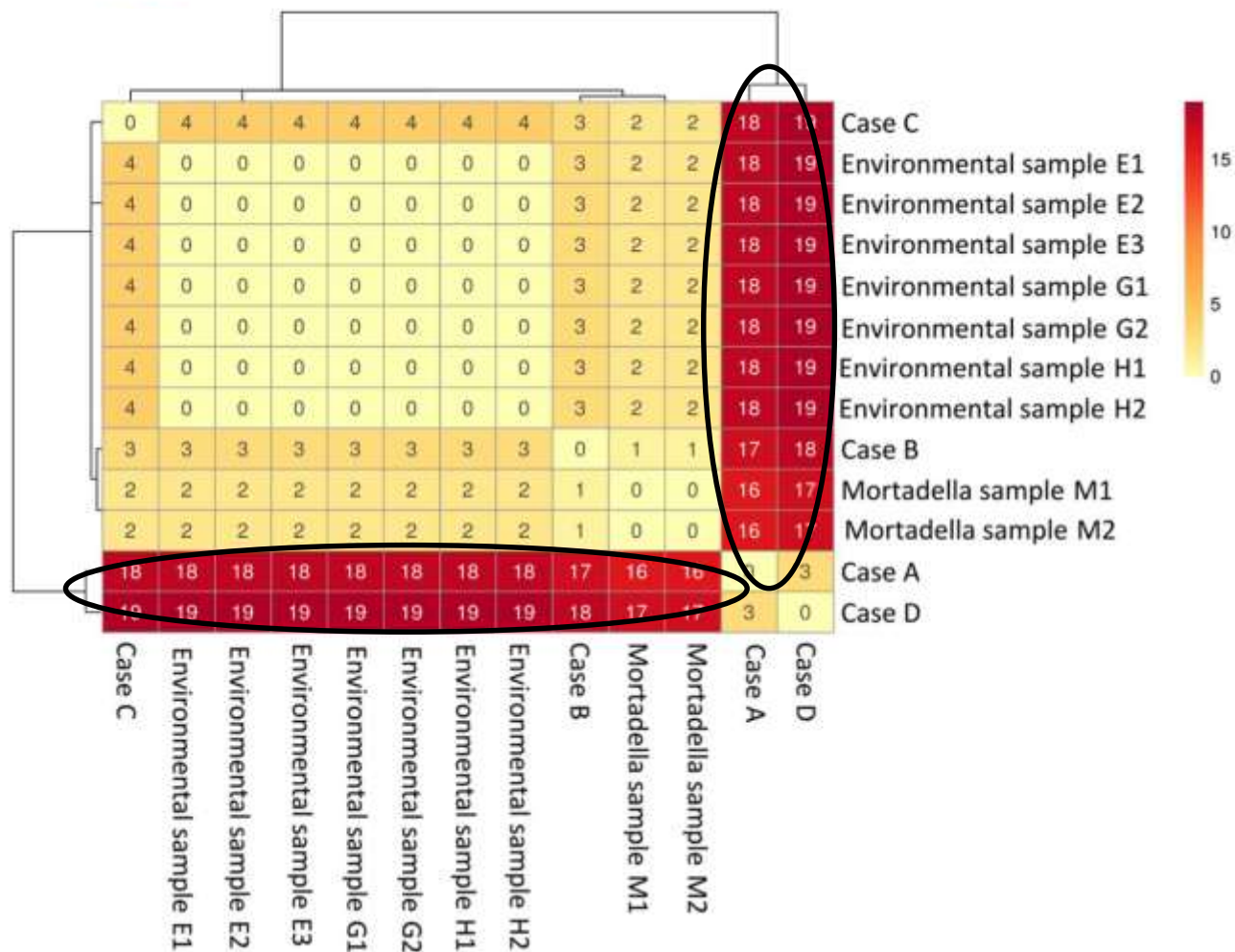
- Environmental
- Case A
- Case B
- Case C
- Case D
- Mortadella M1
- Mortadella M2



1

L'analisi del cgMLST con due metodi diversi riconosce due cluster molto vicini, ma non inferiore al valore generalmente accettato

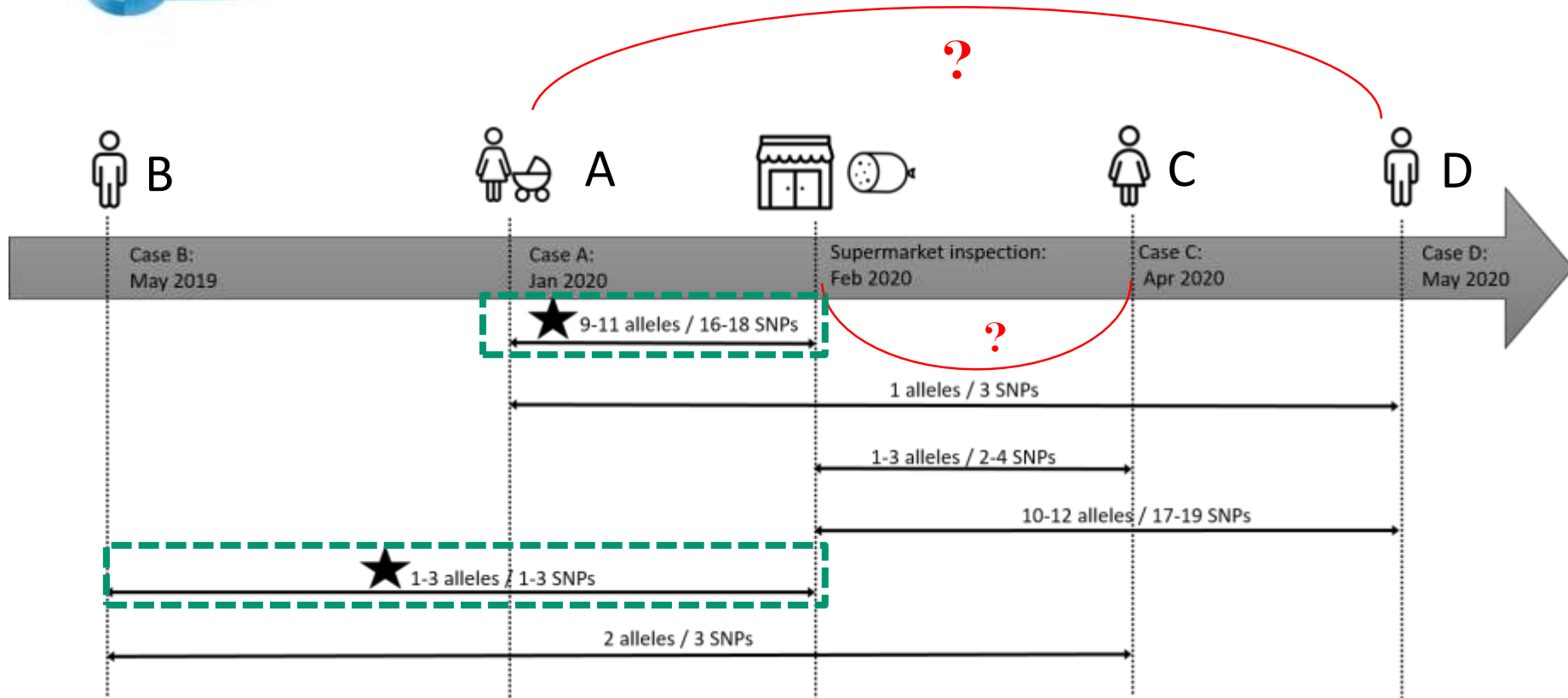
Riconoscimento di **unico cluster** dall'istituto Pasteur, che ha confrontato i nostri isolati a livello europeo.



Analisi degli SNPs, confermano la stretta correlazione all'interno dei due gruppi, tra i gruppi distanze minime (16-19 SNPs)



Ricostruzione delle relazioni



Lo studio ha sottolineato l'importanza di raccogliere subito le informazioni dei pazienti (questionari alimentari, abitudini ecc.) per le indagini epidemiologiche:
Spesso ci troviamo con gap che **a posteriori non è possibile colmare** (rintracciamento pazienti, distanza temporale elevata)



A whole genome sequencing based epidemiological investigation of a pregnancy-related invasive listeriosis case in central Italy

Valeria Russini¹, Martina Spaziante², Bianca Mar-
netta Picone¹, Grazia Brunetti³, Daniela Mattia⁴,
lei⁵, Maria Laura De Marchis⁶

Institutional Review Board Statement: This study (n. 94.21) was approved by the ethics committee “Lazio 2” (Report number 10/2021 prot. no. 0139696/2021 of 14 July 2021).

Informed Consent Statement: All the involved institutions agreed to the publication of the data presented in the study. For the main case (A) an informed consent was signed. No informed consent for the other cases were needed since it is a descriptive case series.

Comitato Etico

Per procedere allo studio e alla sua pubblicazione:
Consenso informato e Richiesta al comitato etico

Tutti gli studi sperimentali che coinvolgono casi clinici umani

→ Studi osservazionali (non interventistici) richiesta di «presa visione»



1 seduta al mese del comitato
etico

11 documenti (32 pagine + CV
sperimentatore principale)

Documenti richiesti su CD
PEC e documenti cartacei
tramite raccomandata

Preparazione documenti
Marzo-Maggio, integrazione
documenti a Giugno,
Approvazione finale a Luglio

Sede: Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri (IZSLT)
Via Appia Nuova, 1411, 00178 Roma

Data, 06/05/2021

Oggetto: Notifica della conduzione dello studio Osservazionale descrittivo no profit

Titolo dello studio: "A whole genome sequencing based epidemiological investigation of a pregnancy related listeriosis case in Italy".

Si allega la seguente documentazione:

- Richiesta di parere studio osservazionale con Dichiarazione di assenza di conflitto di interessi e autorizzazione del responsabile di Unità Operativa
- Dichiarazione sulla natura indipendente e non profit dello studio
- Dichiarazione sulla natura osservazionale dello studio
- Protocollo del caso di studio in italiano
- Sinossi del caso di studio in italiano
- Scheda informativa privacy e modulo di consenso informato
- Questionario alimentare
- Curriculum vitae dello sperimentatore principale firmato e datato
- Dichiarazione dello sperimentatore di avere tempo sufficiente, attrezzature, strutture e personale idonei per condurre la sperimentazione
- Dichiarazione di conformità alle Good Clinical Practice e nel rispetto della Dichiarazione di Helsinki
- Dichiarazione di conformità all'originale

Comitato Etico Lazio 2

Cerca...

Home

Calendario Riunioni

Composizione Comitato Etico

Documentazione

Ultime Sperimentazioni

Contatti

Benvenuto!

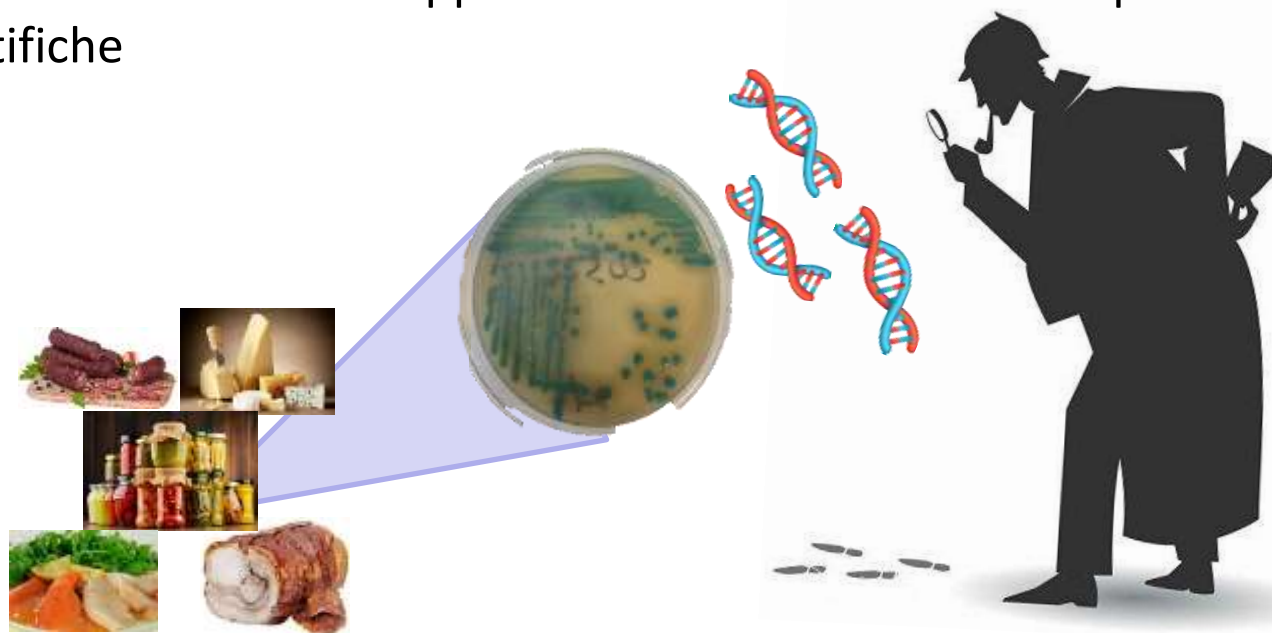
Il Comitato Etico (CE) Lazio 2 è un organismo indipendente consultivo che esprime pareri tecnico-vincolanti per le Aziende ULSS LL, Roma 2, Roma 3, Roma 6, Prosecco e Latina, per l'Azienda Ospedaliera S. Giovanni-Addolorata, per l'Ospedale Torsho; per l'Ospedale Regina Apostolorum di Albano Laziale e per l'Associazione Cavalieri di Malta, con competenza relativa al territorio delle Aziende ULSS LL, Roma 2, Roma 3, Roma 6, Prosecco e Latina, dalle quali strutture tuttavia è funzionalmente autonomo ed i cui compiti, nel campo della sperimentazione clinica, sono definiti dalla normativa vigente. Il Comitato Etico Lazio 2 ha sede presso l'Azienda USL, Roma 2.

Il CE si ispira al rispetto della vita umana così come indicato nelle Carte dei Diritti dell'Uomo, nelle Raccomandazioni degli Organismi Internazionali, nella sperimentalità medica nazionale e internazionale e in particolare nella revisione costante della Dichiarazione di Helsinki.

Il CE fa altresì riferimento alla normativa vigente in materia sanitaria e, ove applicabili, alle raccomandazioni del Comitato Nazionale per la Bioetica.

Sei qui: Home

- L'utilizzo di metodiche molecolari, in particolare il **cgMLST** e SNPs, ha identificato la più probabile fonte di contaminazione del caso in esame di altri casi prima non indagati, ma relazioni non ancora del tutto chiarite
- Lo studio ha evidenziato l'importanza della tempestività e dell'avvio delle indagini e dei questionari da parte dell'autorità competente
- Importanza del consenso informato e approvazione del **comitato etico** per le pubblicazioni scientifiche

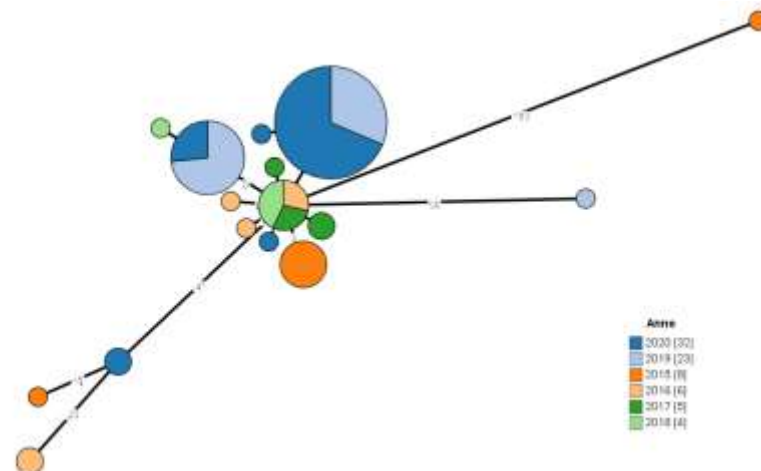


Grazie a tutti per l'attenzione!

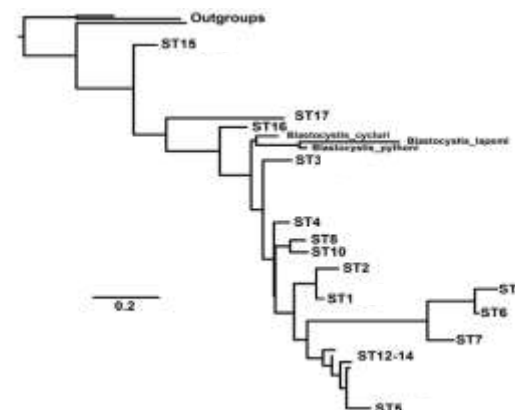




Minimum Spanning Tree: albero di copertura di costo minimo, rete che collega i punti con il valore più piccolo possibile (cgMLST)



Alberi filogenetici: rappresentazione grafica delle relazioni tra gli individui o ceppi, le distanze nell'albero riflettono le differenze genetiche calcolate tra i campioni (SNPs)



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



Pipeline per l'analisi di WGS

