

PROSPETTIVE APPLICATIVE DELLA NORMATIVA UNIONALE SUI CONTROLLI UFFICIALI IN SICUREZZA ALIMENTARE E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA: RISCHI EMERGENTI, CONTROLLI UFFICIALI E MTA

Approcci epidemiologici alla gestione dei focolai di
malattie a trasmissione alimentare. Il Ruolo
dell'Osservatorio Epidemiologico Regionale in caso
di MTA (parte 2)

Priverno, 18/10/19

Roberto Condoleo – IZSLT
Osservatorio Epidemiologico



AGENDA

- Tecniche di laboratorio applicate in microbiologia alimentare
- Tecniche di caratterizzazione dei microrganismi
- Caso studio: Sospetto focolaio di listeriosi



Prove indirette

Si basano su tecniche che permettono di evidenziare la presenza del microrganismo rilevando una parte di esso (es. antigene o materiale genetico)



Tecniche

ELFA - Enzyme Linked Fluorescent Assay

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

PCR - Polymerase Chain Reaction

Target

Antigeni del microrganismo

Materiale genetico



Tecniche di laboratorio applicate in microbiologia alimentare

ELFA

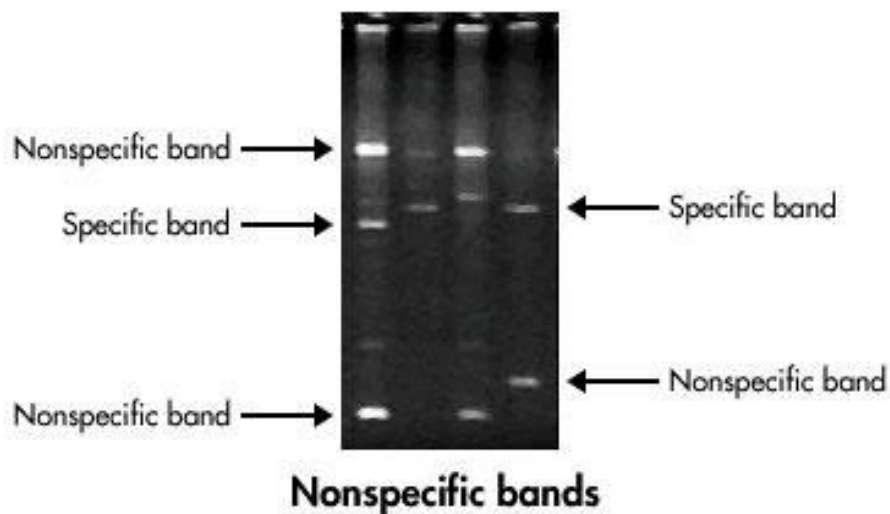
Tecniche

ELFA - Enzyme Linked
Fluorescent Assay

(Enzyme Linked
Fluorescent Assay)



ELISA - Enzyme-linked
immunosorbent assay



PCR - Polymerase Chain
Reaction



Tecniche di laboratorio applicate in microbiologia alimentare

Prove dirette

Si basano su tecniche che permettono di avere evidenza della presenza del microrganismo vitale nella matrice



Tecniche

Isolamento colturale

Prova biologica

Principio

Evidenziare lo sviluppo di un microrganismo in ambienti di crescita a lui favorevoli

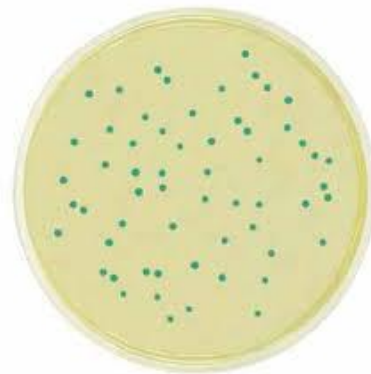
Rilevazione effetti dopo inoculo in animali



Tecniche di laboratorio applicate in microbiologia alimentare

Tecniche

Isolamento colturale



Prova biologica



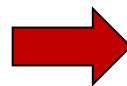
Tecniche di laboratorio applicate in microbiologia alimentare

Prove indirette

ELFA - Enzyme Linked Fluorescent Assay

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

PCR - Polymerase Chain Reaction

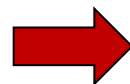


Solitamente
utilizzate come
prove di
screening

Prove dirette

Isolamento colturale

Prova biologica



Solitamente
utilizzate come
conferma



TECNICHE UTILIZZATE DA IZSLT

TECNICA

ELFA - ESAME COLTURALE - RICERCA

ELFA - RICERCA

ESAME COLTURALE - CONTA MPN

ESAME COLTURALE - CONTA UFC

ESAME COLTURALE - RICERCA

ESAME COLTURALE - RICERCA USDA

PCR REAL TIME

PCR REAL TIME - QUALITATIVA

PCR REAL TIME REVERSE TRASCRPTION

PROVA BIOLOGICA - RICERCA

- ➔ Tecnica adottata per alcune prove (anche unità territoriali come Latina)
- ➔ Tecnica adottata da tutte le sedi
- ➔ Tecnica adottata in sedi centrali
- ➔ Tecnica raramente adottata in sede centrale



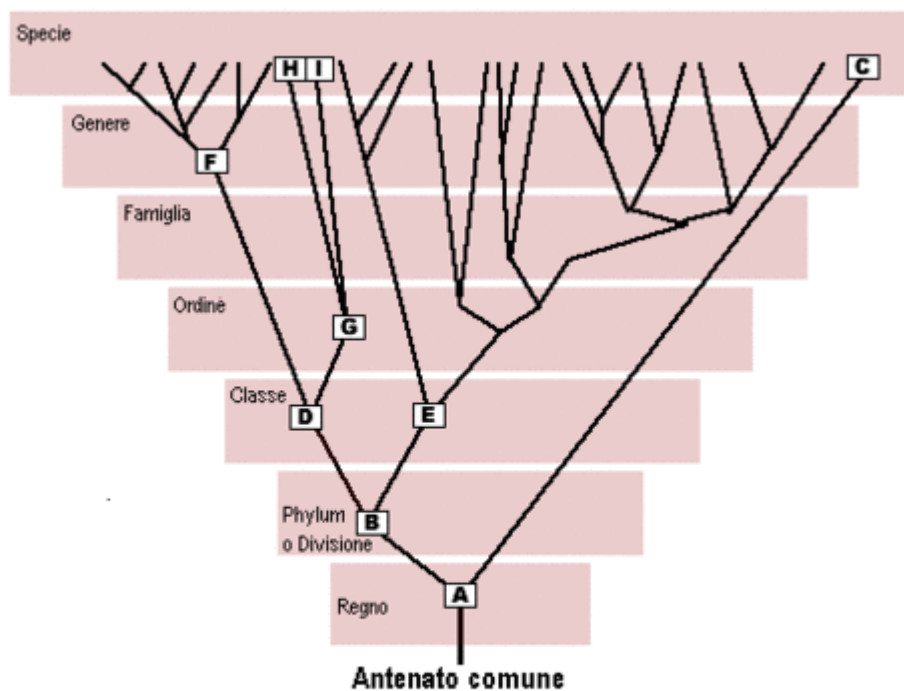
Tecniche di laboratorio applicate in microbiologia alimentare

La **tassonomia** (dal greco: τάξις, tàxis, ordinamento e νόμος, nòmos, norma o regola; talora tassinomìa) è, nel suo significato più generale, la disciplina della classificazione.

Abitualmente, si impiega il termine per designare la **tassonomia biologica**, ossia i criteri con cui si ordinano gli organismi in un sistema di classificazione composto da una gerarchia di *taxa* annidati.



Tecniche di laboratorio applicate in microbiologia alimentare



Riferimenti :
 ■ : Categorie tassonomiche
 | : Porzione dell'albero filogenetico
 A B C ... : Alcuni nodi dell'albero

Categoria (taxon)	Esempio
DOMINIO	<i>Bacteria</i>
PHYLUM	<i>Proteobacteria</i>
CLASSE	<i>γ-Proteobacteria</i>
ORDINE	<i>Enterobacteriales</i>
FAMIGLIA	<i>Enterobacteriaceae</i>
GENERE	<i>Shigella</i>
SPECIE	<i>S. dysenteriae</i>

Tecniche di laboratorio applicate in microbiologia alimentare

Taxa				
Regno	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Animalia
Phylum	Proteobacteria	Proteobacteria	Proteobacteria	Chordata
Classe	Gamma proteobacteria	Gamma proteobacteria	Bacilli	Mammalia
Ordine	Enterobactericales	Enterobactericales	Bacillales	Primates
Famiglia	Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae	Listeriaceae	Hominidae
Genere	<i>Escherichia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>	<i>Homo</i>
Specie	<i>coli</i>	<i>enterica</i>	<i>monocytogenes</i>	<i>sapiens</i>
Subspecie	-	enterica		



IN QUALE SITUAZIONI DEVO DISCRIMINARE TRA MICRORGANISMI APPARTENENTI ALLA STESSA SPECIE?



Le tecniche prima citate si fermano generalmente a livello di specie...

Noi vogliamo sapere se due o più microrganismi derivano dallo stesso ceppo*

Applico una tecnica con
potere discriminante...



- BIOVAR: variante biochimica o fisiologica
- MORFOVAR: variante morfologica, morfotipo
- SEROVAR: variante antigenica (sierovariante, sierotipo)
- GENVAR: variante genetica

CEPPO: popolazione discendente da un unico individuo o da un isolato in coltura pura



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Tecniche di caratterizzazione dei microrganismi

SIEROLOGICA

Salmonella

Antigene somatico O

Antigene flagellari H

Antigene capsulari Vi (K)



Schema di Kauffmann- White

(es. *Napoli*, *Typhi*, *Agona*,
Enteritidis...)

L. monocytogenes

1/2a

1/2b

1/2c

3a

3b

4b

4d

STEC

Antigene somatico O

Antigene flagellari H

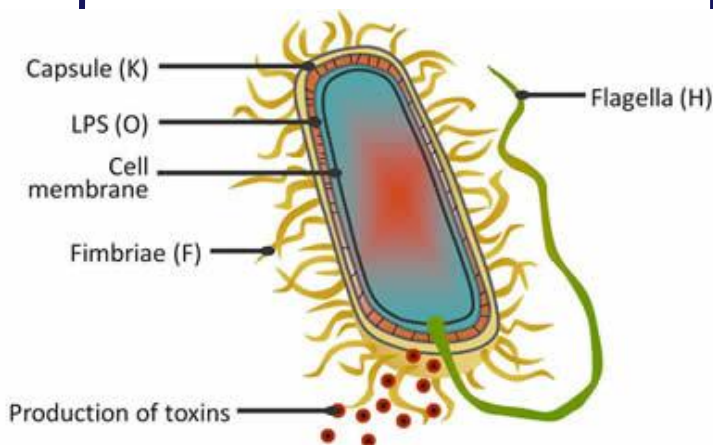


E. Coli O157:H7

E. Coli O26

E. Coli O111

E. Coli O103



Tecniche di caratterizzazione dei microrganismi

SIEROLOGICA

PRO

Tecnica «collaudata»

In alcuni casi e per alcuni
microrganismi può essere
risolutiva

CONTRO

Basso potere discriminante

Costi dei reagenti

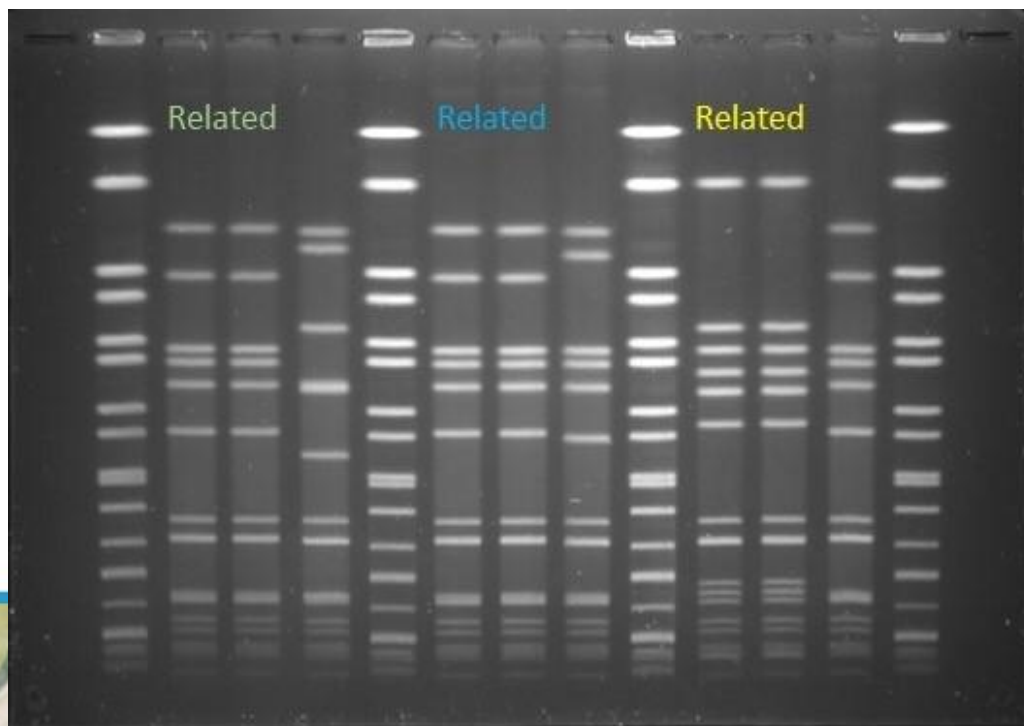
Time consuming

Tecnica «manuale»



ELETTROFORESI IN CAMPO PULSATO (PFGE) FASI

- Digestione del DNA genomico con uno o più enzimi di restrizione
- Separazione dei frammenti di restrizione ottenuti mediante elettroforesi a inversione di campo
- Risoluzione dei frammenti su gel di agarosio
- Profilo elettroforetico del singolo ceppi definito «pulsovar»



ELETTROFORESI IN CAMPO PULSATO (PFGE)

PRO

Buon potere discriminante

Può essere applicata a diversi
batteri

CONTRO

Necessità di protocolli standardizzati

Time-consuming (piuttosto
macchinosa)

Costosa

Scarsa riproducibilità



Whole Genome Sequencing (WGS)* (Sequenziamento intero genoma)

Genericamente, è il processo che porta a determinare in un unico momento la sequenza di DNA che costituisce il genoma di un organismo

Vantaggi

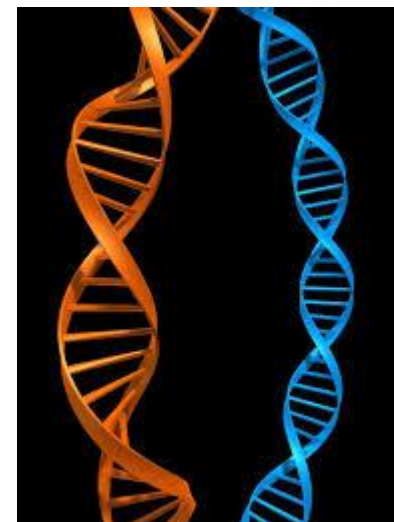
Enorme quantità di informazioni provenienti da uno specifico microrganismo

Svantaggi

Necessità di protocolli standardizzati

Grandi quantità di dati da conservare ed elaborare

Database necessari per effettuare comparazioni



*Conosciuta anche come full genome sequencing, complete genome sequencing or entire genome sequencing, Next Generation Sequencing

Esempi di applicazione della Whole Genome Sequencing (WGS)

Multilocus Sequence Typing (MLST)

Analizzo la variazione allelica di un numero variabile di *housekeeping genes* (6-7 di solito) di ogni isolato

Quindi attribuisco, sulla base di uno **schema**, un

- **Sequence Type**
- Clonal complex
- Lineage



Tecniche di caratterizzazione dei microrganismi

Institut Pasteur scheme

↙ **Loci**

↗ **Sequence
type**

Numero
possibili
alleli

ST	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhkA	CC	Lineage
1	3	1	1	1	3	1	3	CC1	I
2	1	1	11	11	2	1	5	CC2	I
3	4	4	4	3	2	1	5	CC3	I
4	1	2	12	3	2	5	3	CC4	I
5	2	1	11	3	3	1	7	CC5	I
6	3	9	9	3	3	1	5	CC6	I
7	5	8	5	7	6	2	1	CC7	II
8	5	6	2	9	5	3	1	CC8	II
9	6	5	6	4	1	4	1	CC9	II
10	3	1	20	1	3	1	3	CC1	I
11	7	6	10	6	1	2	1	CC11	II
12	5	8	5	7	6	22	1	CC7	II
13	7	6	17	6	10	8	1	ST13	II
14	8	6	13	6	5	2	1	CC14	II
15	8	13	13	6	5	2	1	CC14	II
16	5	6	2	7	5	2	1	CC8	II
17	14	6	2	7	5	2	1	CC8	II
18	7	6	15	18	12	6	1	CC18	II
19	7	6	19	6	1	24	1	CC19	II
20	17	13	3	6	5	7	1	CC20	II
21	7	7	3	10	5	6	1	CC21	II
22	7	7	3	10	5	13	1	CC21	II

271 243 257 328 219 484 235



Tecniche di caratterizzazione dei microrganismi

TABLE 1 | Characteristics of 80 *L. monocytogenes* strains isolated from retail ready-to-eat food in this study.

Strain/isolate	Strain origin	Sample city	Year	Serovar ^a	Antibiotic susceptibility ^a	ST	hly	inlB	inlA	inlC	inlJ	llsX	EC
859-1LM	Cold vegetable dish in sauce	Hefei	2012	1/2a-3a	AMP-CIP-DA	ST-8	+	+	+	+	+	-	-
859-2LM	Cold vegetable dish in sauce	Hefei	2012	1/2b-3b-7	CIP-DA-E-K-RD-S-TE	ST-87	+	+	+	+	+	-	-
859-3LM	Cold vegetable dish in sauce	Hefei	2012	1/2a-3a	DA-RD	ST-8	+	+	+	+	+	-	-
859-4LM	Cold vegetable dish in sauce	Hefei	2012	1/2a-3a	DA	ST-8	+	+	+	+	+	-	-
860-1LM	Cold noodles dishes in sauce	Hefei	2012	1/2b-3b-7	AMP-CIP-DA	ST-87	+	+	+	+	+	-	-
860-2LM	Cold noodles dishes in sauce	Hefei	2012	1/2a-3a	AMP-CIP-DA	ST-8	+	+	+	+	+	-	-
860-3LM	Cold noodles dishes in sauce	Hefei	2012	1/2b-3b-7	CIP-DA	ST-5	+	+	+	+	+	-	-
860-4LM	Cold noodles dishes in sauce	Hefei	2012	1/2a-3a	DA	ST-8	+	+	+	+	+	-	-
959-1LM	Cold vegetable dish in sauce	Wuhan	2012	1/2b-3b-7	DA	ST-87	+	+	+	+	+	-	-
959-2LM	Cold vegetable dish in sauce	Wuhan	2012	1/2a-3a	AMP-KF-C-DA-E-CN-K-RD-S-TE-VA	ST-8	+	+	+	+	+	-	-
959-3LM	Cold vegetable dish in sauce	Wuhan	2012	1/2a-3a	DA	ST-8	+	+	+	+	+	-	-
959-4LM	Cold vegetable dish in sauce	Wuhan	2012	1/2a-3a	DA	ST-8	+	+	+	+	+	-	-
1009-1LM	Cold vegetable dish in sauce	Chengdu	2012	1/2b-3b-7	DA	ST-224	+	+	+	+	+	+	-
1009-2LM	Cold vegetable dish in sauce	Chengdu	2012	1/2b-3b-7	DA	ST-224	+	+	+	+	+	+	-
1009-3LM	Cold vegetable dish in sauce	Chengdu	2012	1/2b-3b-7	E	ST-224	+	+	+	+	+	+	-



Multilocus Sequence Typing (MLST)

TABLE 2 | Allelic profile (STs) of RTE *L. monocytogenes* isolates for MLST.

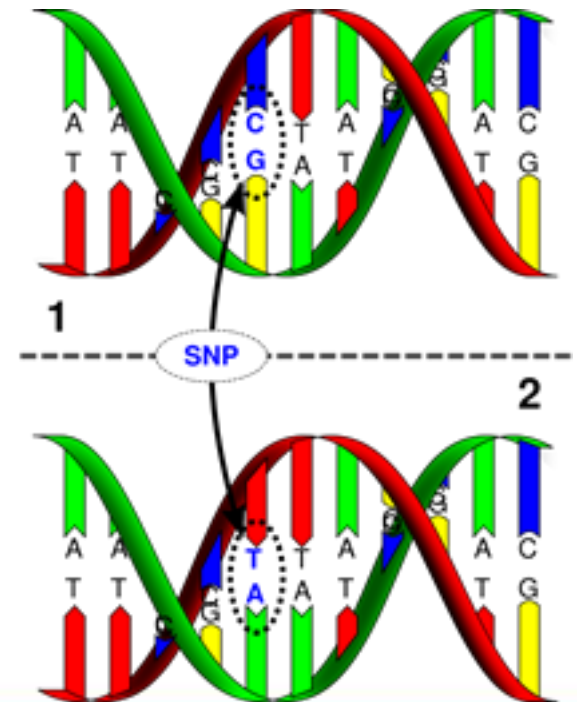
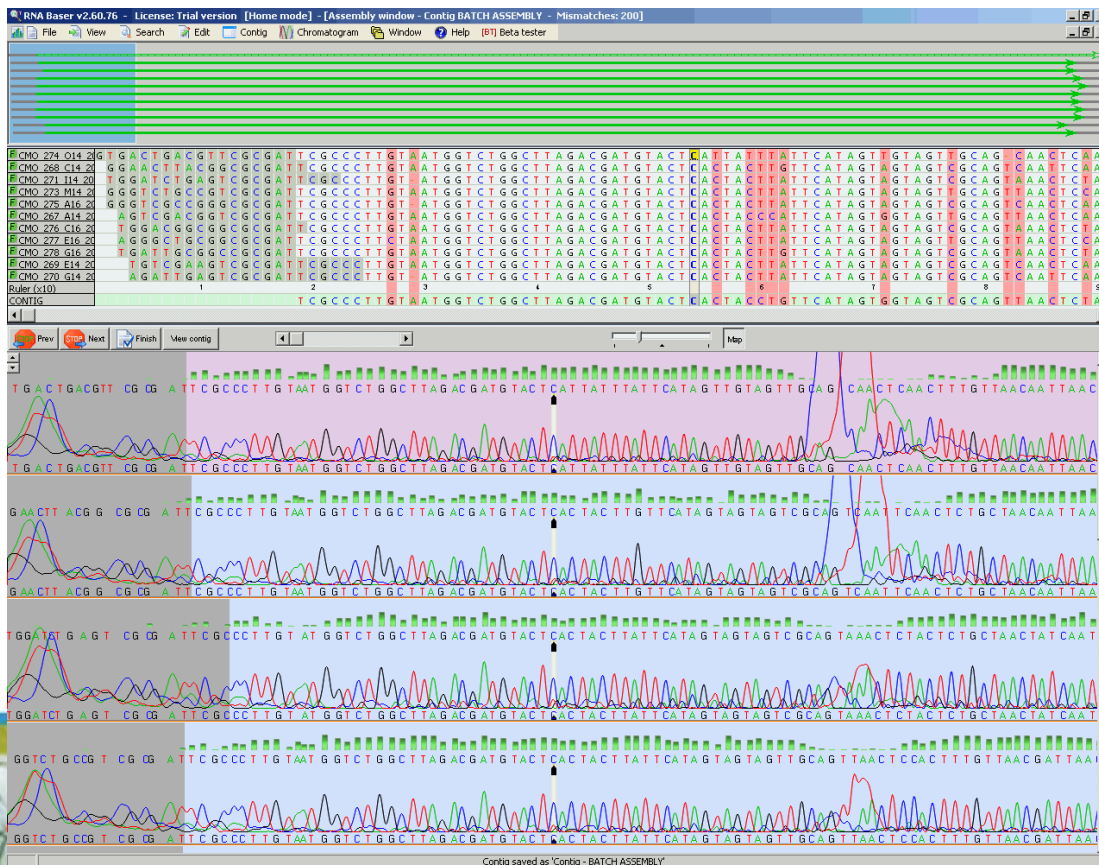
STs	Profile							No. of isolates (%)	Serovar
	<i>abcZ</i>	<i>bglA</i>	<i>cat</i>	<i>dapE</i>	<i>dat</i>	<i>ldh</i>	<i>lhkA</i>		
8	5	6	2	9	5	3	1	24 (30)	1/2a-3a
1	3	1	1	1	3	1	3	16 (20)	4b-4d-4e
87	12	1	4	14	3	39	4	7 (8.75)	1/2b-3b-7
9	6	5	6	4	1	4	1	5 (6.25)	1/2c-3c
807	106	1	1	1	3	1	3	5 (6.25)	4b-4d-4e
7	5	8	5	7	6	2	1	4 (5)	1/2a-3a
155	7	10	16	7	5	2	1	4 (5)	1/2a-3a
224	11	3	12	38	3	94	2	4 (5)	1/2b-3b-7
3	4	4	4	3	2	1	5	3 (3.75)	1/2b-3b-7
804	4	4	4	3	5	1	5	2 (2.5)	1/2b-3b-7
121	7	6	8	8	6	37	1	2 (2.5)	1/2a-3a
806	7	10	16	7	5	1	1	2 (2.5)	1/2a-3a
5	2	1	11	3	3	1	7	1 (1.25)	1/2b-3b-7
805	4	4	4	3	1	1	1	1 (1.25)	1/2b-3b-7



Whole Genome Sequencing (WGS)

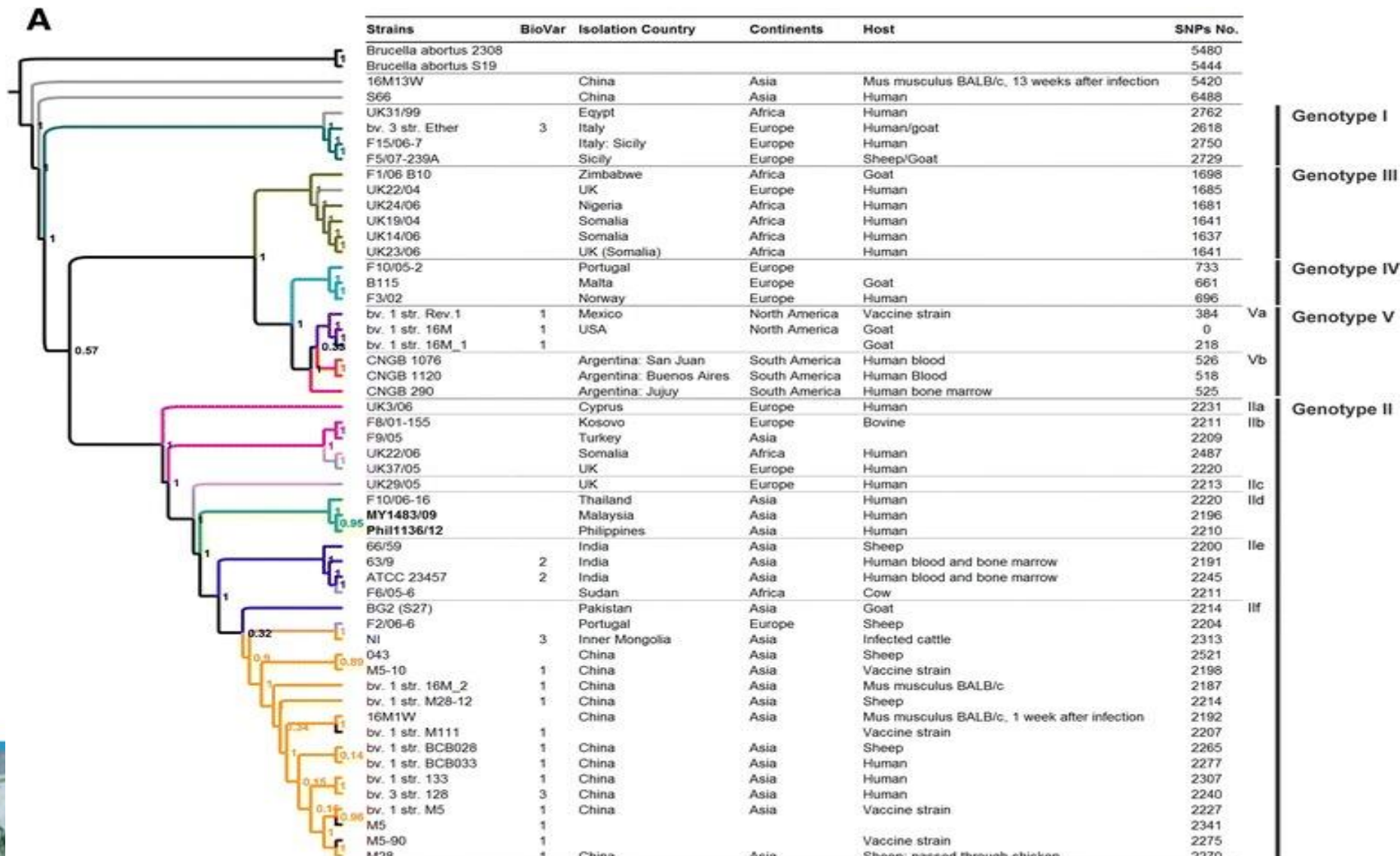
Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Sostituzione di un singolo nucleotide che avviene in una posizione specifica del genoma



Tecniche di caratterizzazione dei microrganismi

Phylogenetic tree of *B. melitensis* isolates. The phylogenetic tree was reconstructed using 13,728 polymorphic nucleotide sites and rooted with two *B. abortus* strains. (Andres Garcia-Lor et al., 2011)



Whole Genome Sequencing (WGS)

core genome MLST (cgMLST)

Scelta dei loci da analizzare (es. 1748 *loci* per protocollo L.
monocytogenes)



Inclusione solo degli isolati con un certo numero di loci rilevati (es.
 $\geq 95\% = 1661$)

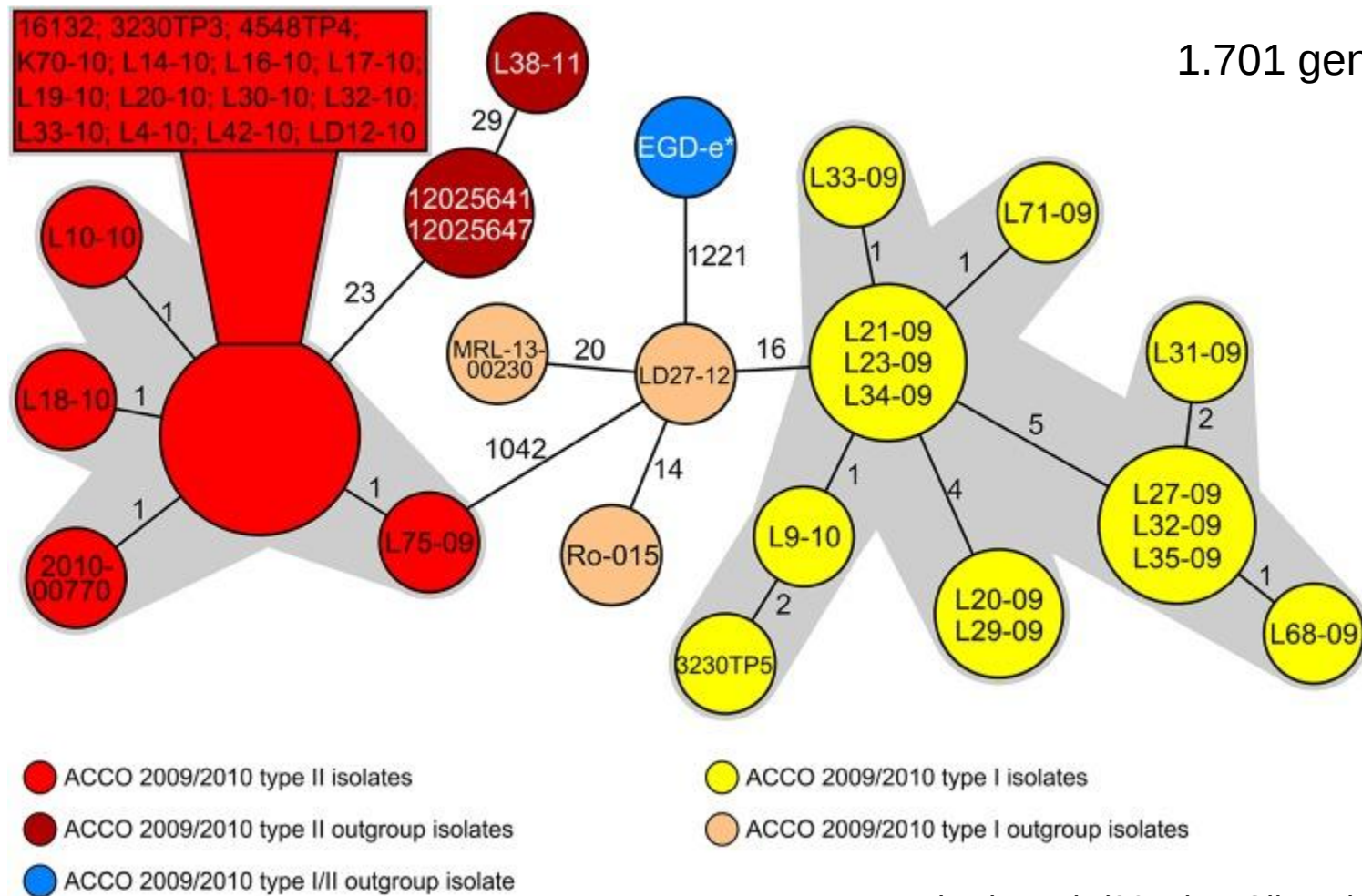


Definisco un cut-off di differenze alleliche -> Es. Due isolati sono
differenti differiscono per più di 7 loci



Tecniche di caratterizzazione dei microrganismi

core genome MLST (cgMLST) -> **Minimum spanning tree**

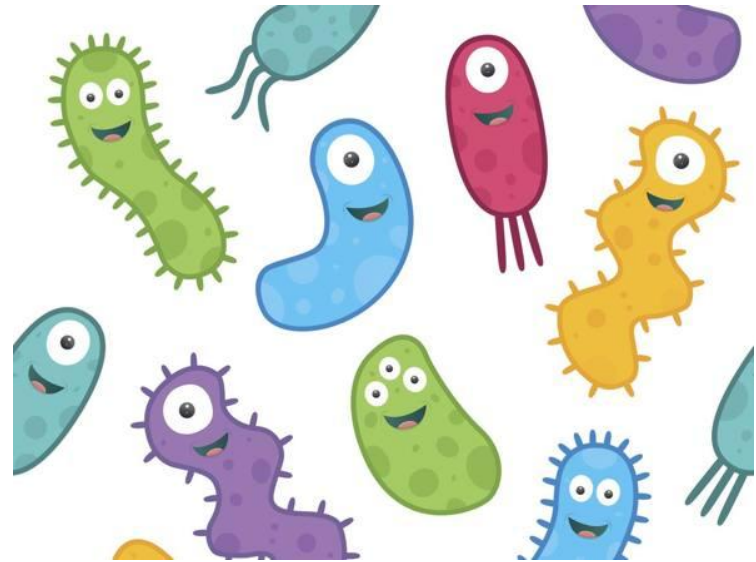


Ruppitsch et al. (2015) J. Clin. Microbiol.

Each circle represents an allelic profile based on sequence analysis of 1,701 genes. The numbers on the connecting lines illustrate the numbers of target genes with differing alleles. The different groups of strains are distinguished by the colors of the circles. Closely related genotypes (≤ 10 allele difference) are shaded in gray. The NCBI RefSeq strain is marked with an asterisk.

Grazie dell'attenzione

Your last
mistake
is your
best
teacher



Dr. ROBERTO CONDOLEO

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
LAZIO E TOSCANA «M. Aleandri»

- OSSERVATORIO EPIDEMIOLOGICO VETERINARIO -

Via Appia Nuova 1411, Roma; Tel.06/7990360

Roberto.condoleo@izslt.it ; www.izslt.it

