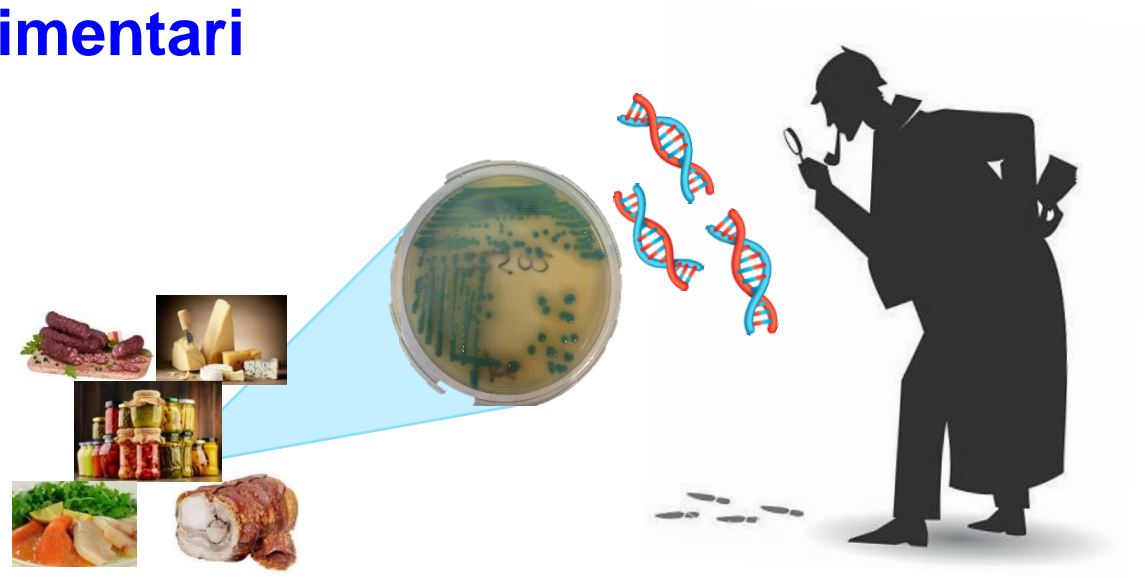


Il campionamento delle matrici alimentari



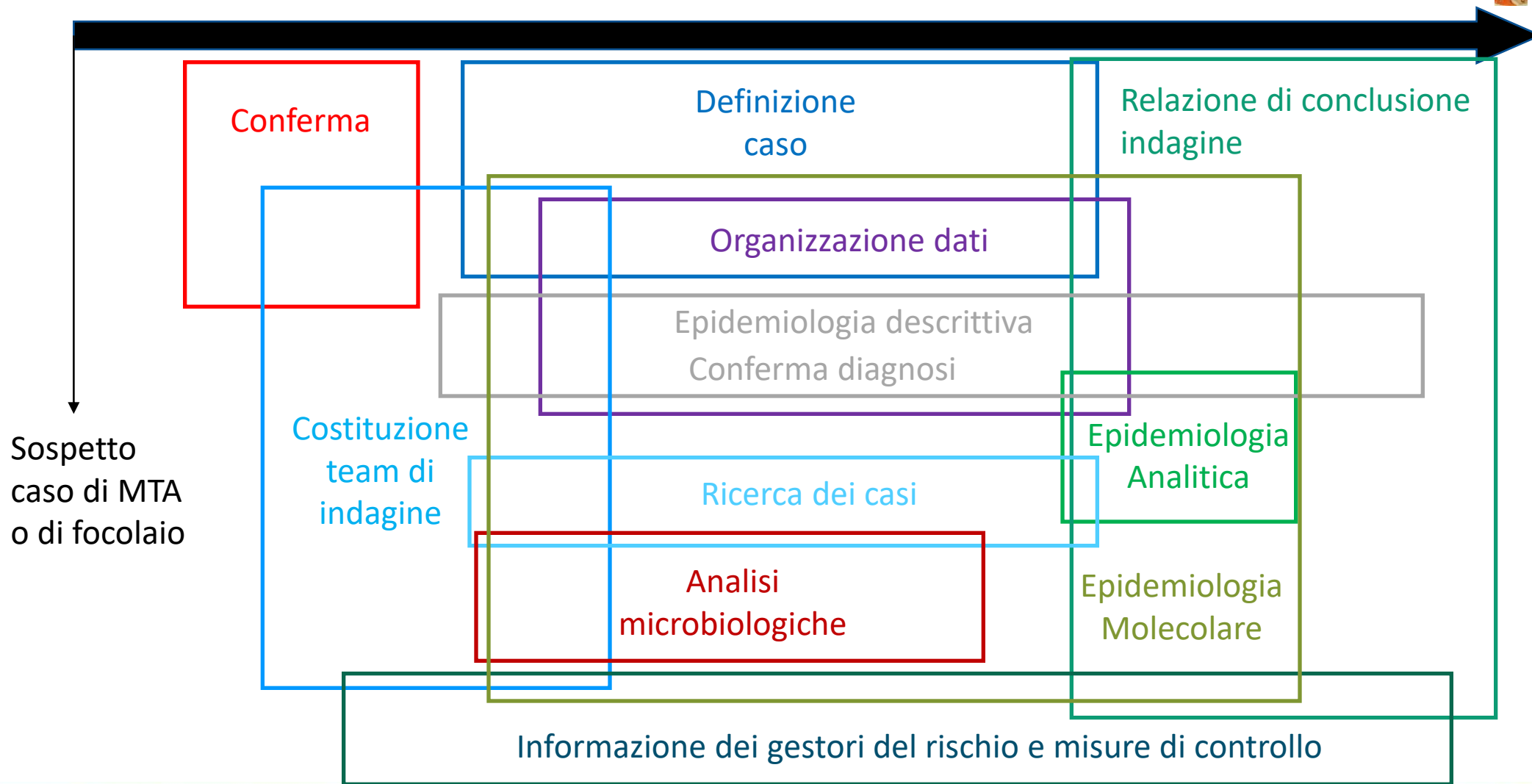
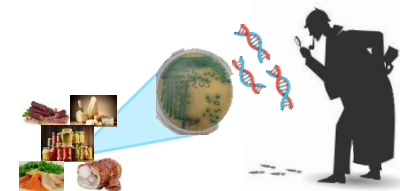
Indagini di epidemiologia molecolare: casi di studio

16 Giugno 2023

Valeria Russini, Microbiologia degli alimenti

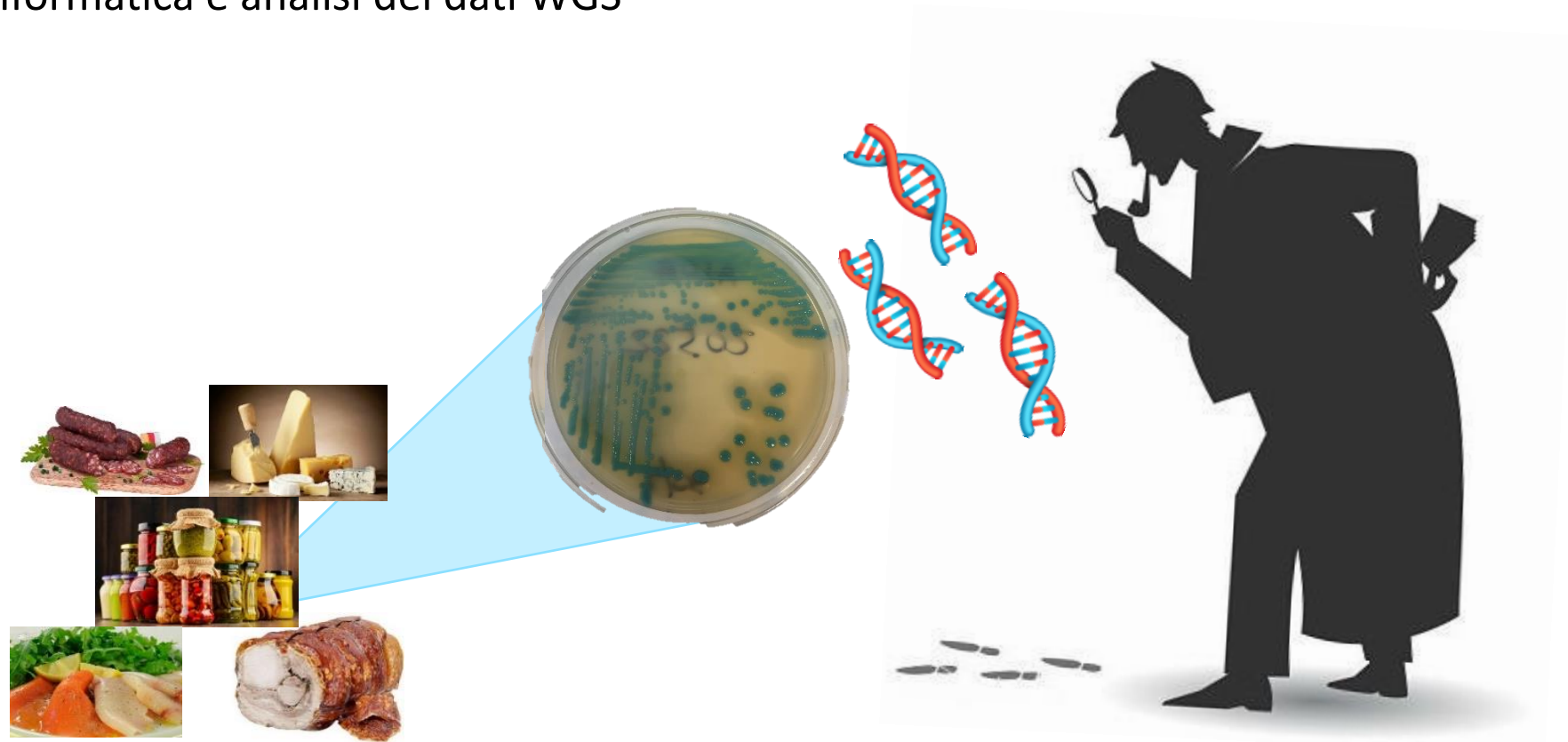


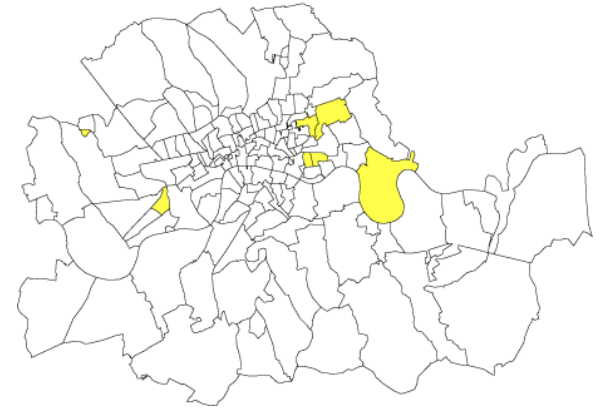
GESTIONE DELLE MTA-Epidemiologia molecolare



Di cosa parleremo:

- Indagini di epidemiologia molecolare delle malattie infettive
- Metodi di tipizzazione, bioinformatica e analisi dei dati WGS
- Casi di studio





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



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



- 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 microrganismi, 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 DI TIPIZZAZIONE MOLECOLARE

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)

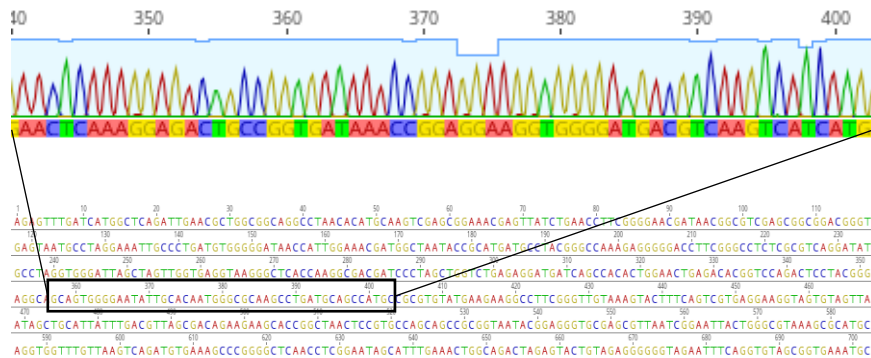
Metodi basati sul sequenziamento del DNA

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

NGS

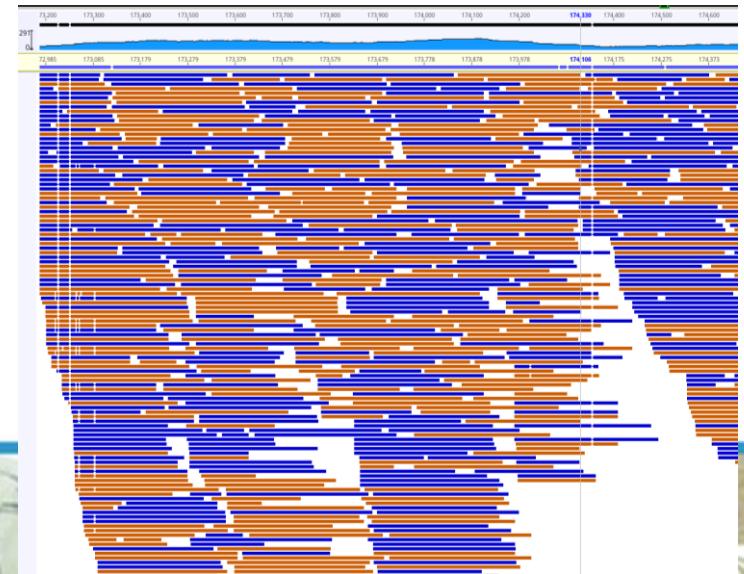


- Lunghezza media dei prodotti di sequenza (fino a 800 bp)
- Poche sequenze e campioni per corsa
- Costi mediamente elevati
- Basso tasso di errore (99,9% di accuratezza)
- Gold standard in determinati settori (es: ricerca clinica) necessario per validare ottenuti in NGS

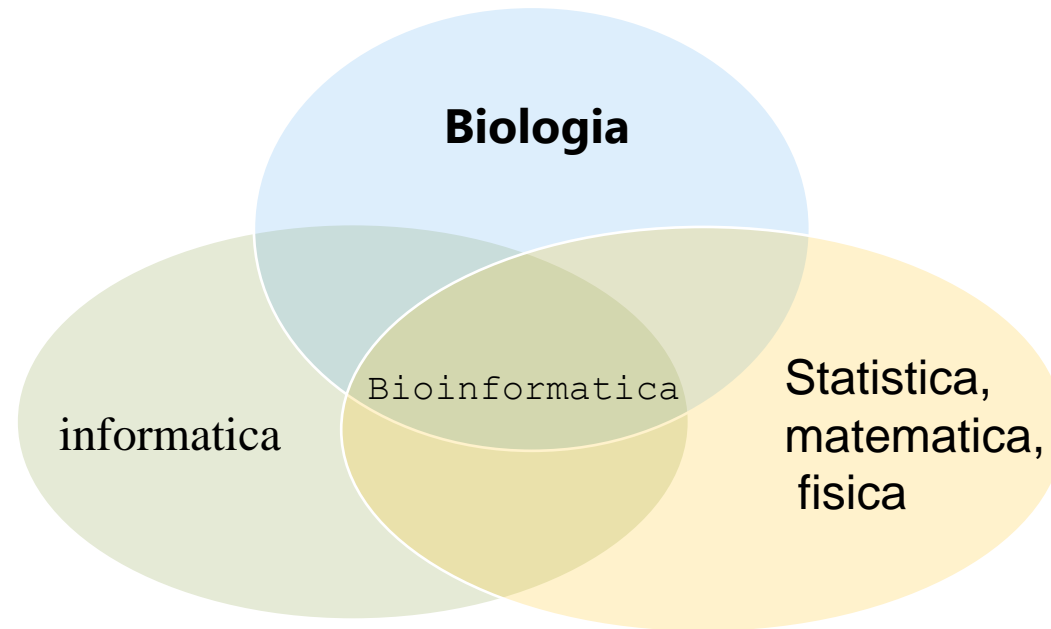


Sequenziamento Sanger vs NGS

- Lunghezza variabile dei prodotti di sequenza in base alla tecnologia di NGS (da alcune decine di bp a decine di Kb)
- **Milioni di sequenziamenti per corsa e molti campioni per corsa**
- **Costi sempre più accessibili**
- Tasso di errore variabile a seconda della tecnologia
- Ridondanza per compensare gli errori di lettura
- **Enorme quantità di dati prodotti da analizzare**



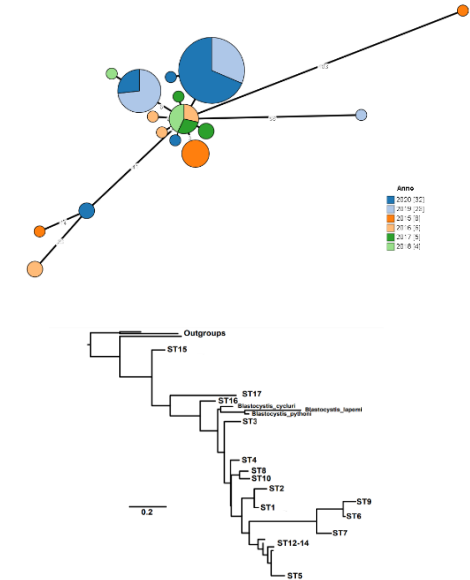
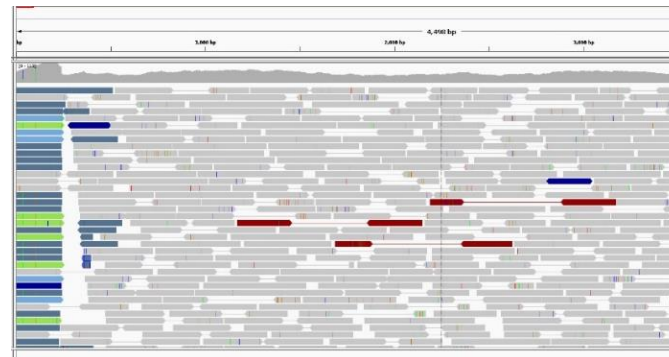
Disciplina che utilizza strumenti informatici per descrivere dal punto di vista numerico e statistico determinati fenomeni biologici (sequenze di geni, composizione e struttura delle proteine, processi biochimici nelle cellule, ecc.).



- Scienza multidisciplinare
- Nascita di una nuova professionalità
- Analisi *in silico* (DRYLAB)



Pipeline per l'analisi di WGS



• FastQC

• Trimmomatic

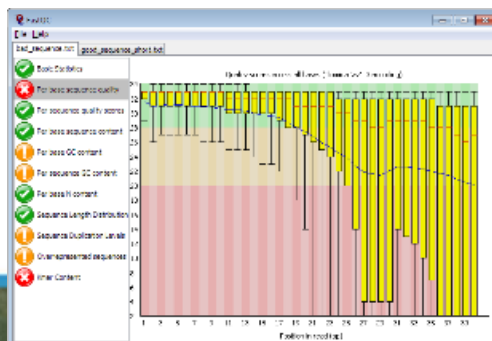
• Spades

• Pilon



• QUAST

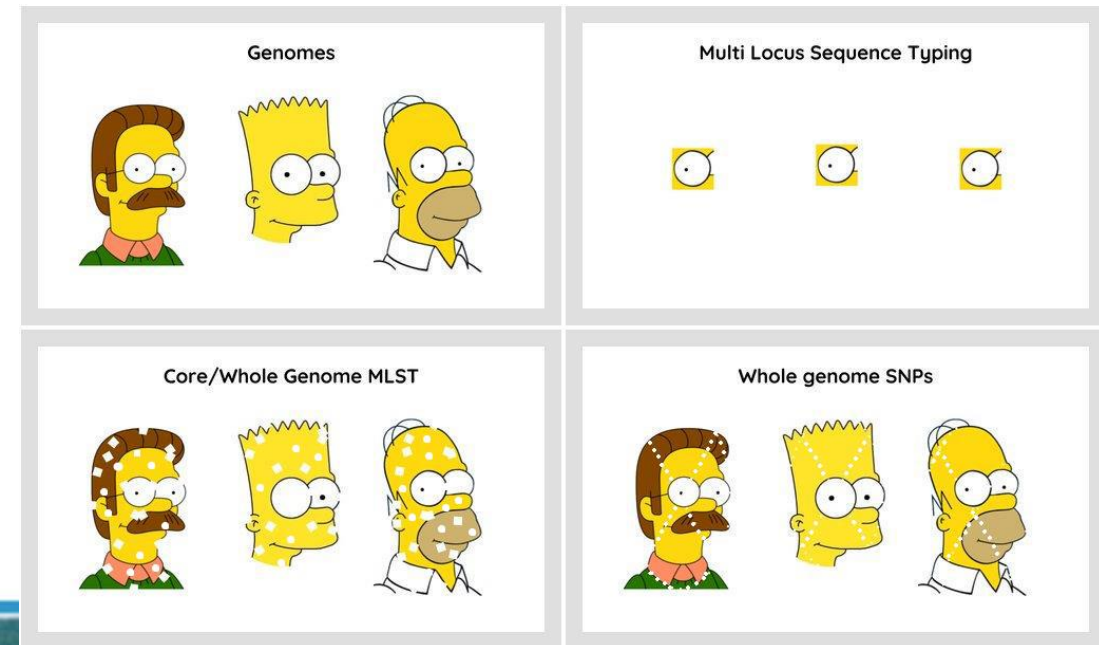
- Fattori resistenza e virulenza
- Annotazione
- MLST
- cgMLST
- SNPs



Metodologie molecolari per identificazione e confronto ceppi

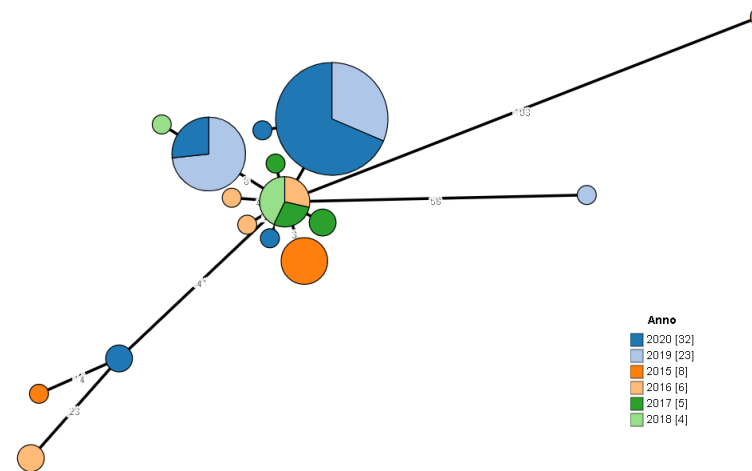


- Multi Locus Sequence Type (MLST): mlst-finder, analizza un set di geni la cui combinazione allelica assegna ST
- Core Genome MLST: chewBBACA, analizza set di geni «core» (essenziali e funzionali) sempre presenti nella specie considerata (es. 3002 geni in *Salmonella*, 1701 *Listeria*) la loro comparazione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

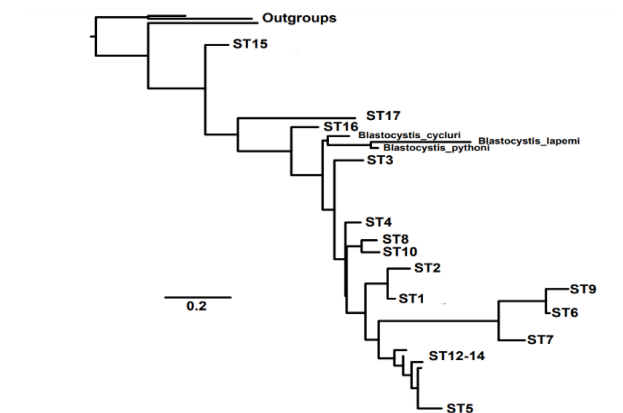




Minimum Spanning Tree: albero di copertura di costo minimo, rete che collega i punti con il valore più piccolo possibile (cgMLST)



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



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

- 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**





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

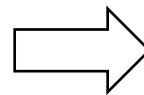
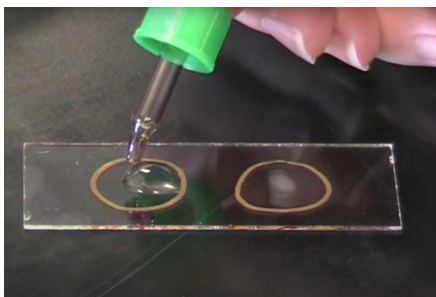
Valeria Russini ^{1,†} , Martina Spaziante ^{2,†}, Tiziana Zottola ³, Anna Giovanna Fermani ⁴, Gina Di Giampietro ¹, Giovanni Blanco ⁵, Paolo Fabietti ⁵, Riccardo Marrone ⁵, Roberta Parisella ⁵, Sergio Parrocchia ⁵, Teresa Bossù ¹, Stefano Bilei ¹ and Maria Laura De Marchis ^{1,*}

Caso I: Focolaio di listeriosi in ospedale

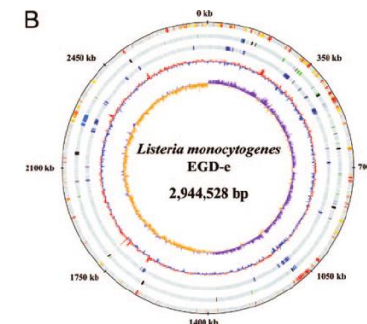
Settembre-Ottobre 2020: Accertati 4 casi di listeriosi in pazienti ricoverati presso una struttura ospedaliera

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

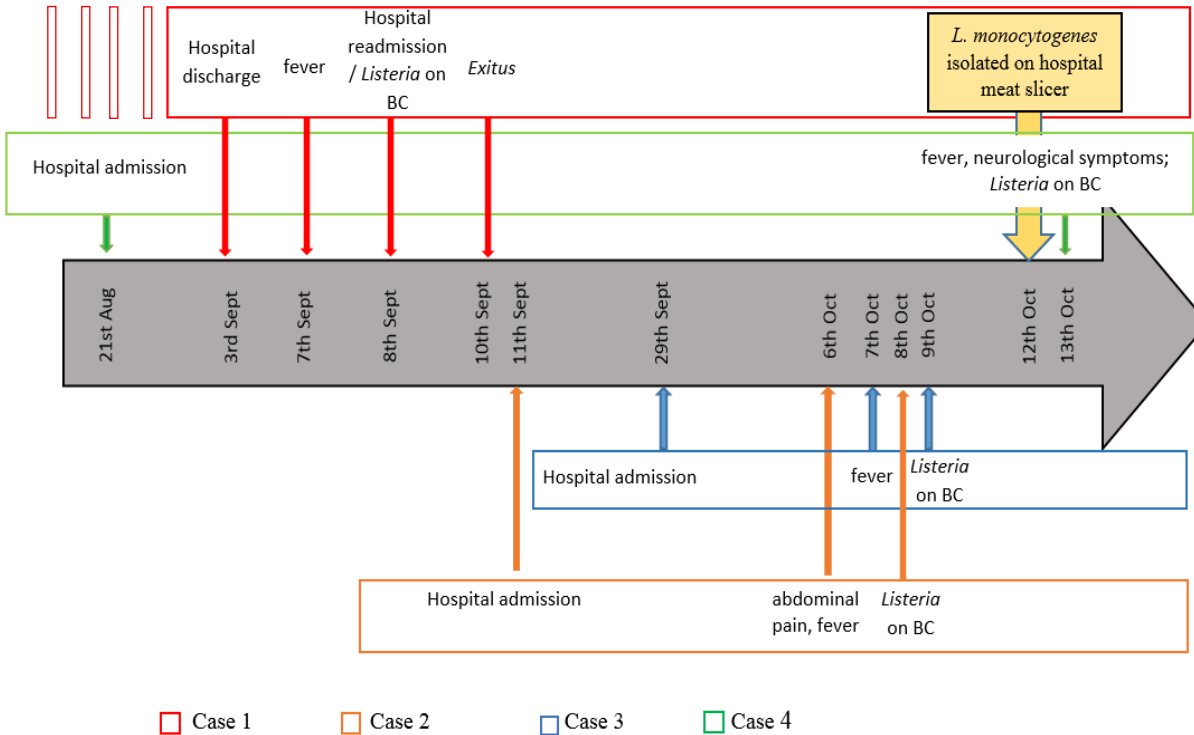
Sierotipo 1/2a
(sieroagglutinazione)



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

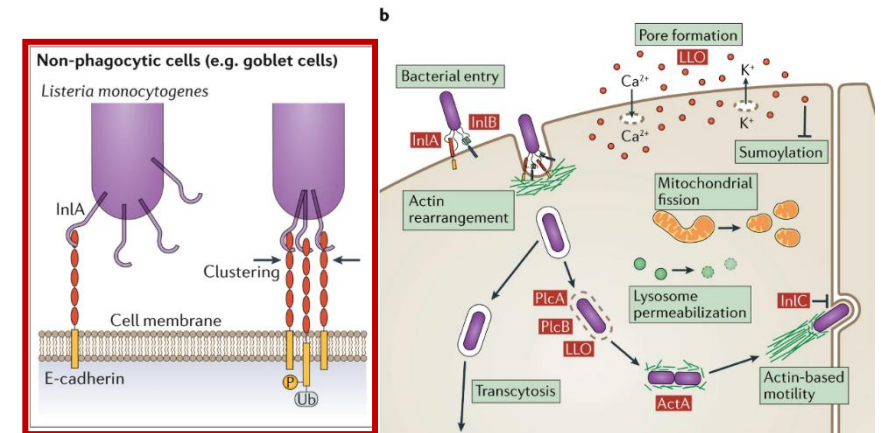
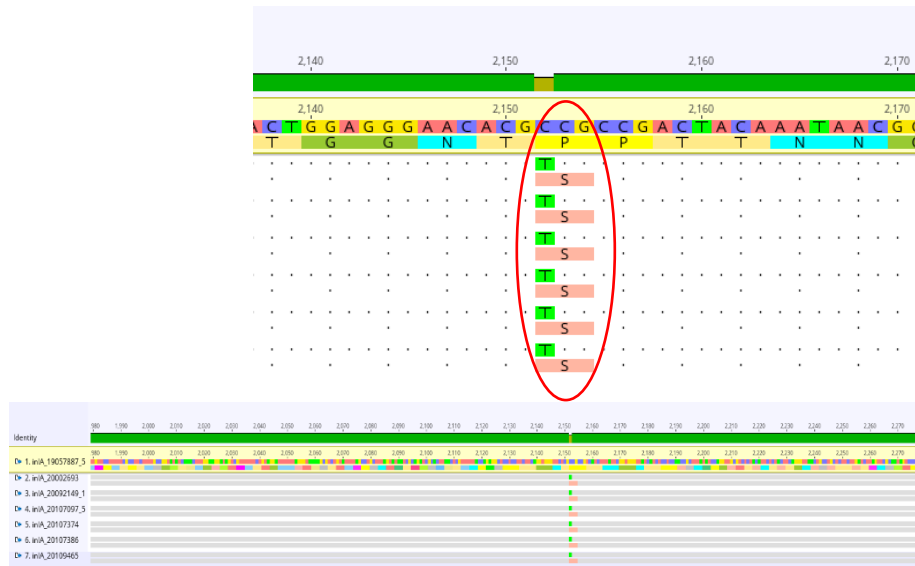
Caso 4: ricoverato da due mesi nella struttura prima dei sintomi

- 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 (ST451)





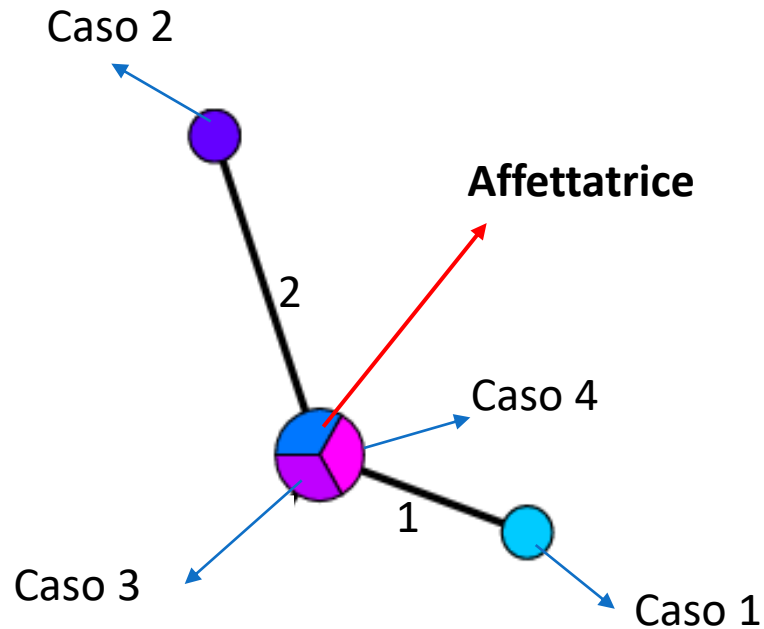
Nuova mutazione nel gene per internalina A (inlA) associata strettamente ai casi correlati al focolaio.



inLA media l'ingresso del patogeno nelle cellule eucariotiche umane e svolge un ruolo chiave nell'attraversamento della barriera intestinale



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

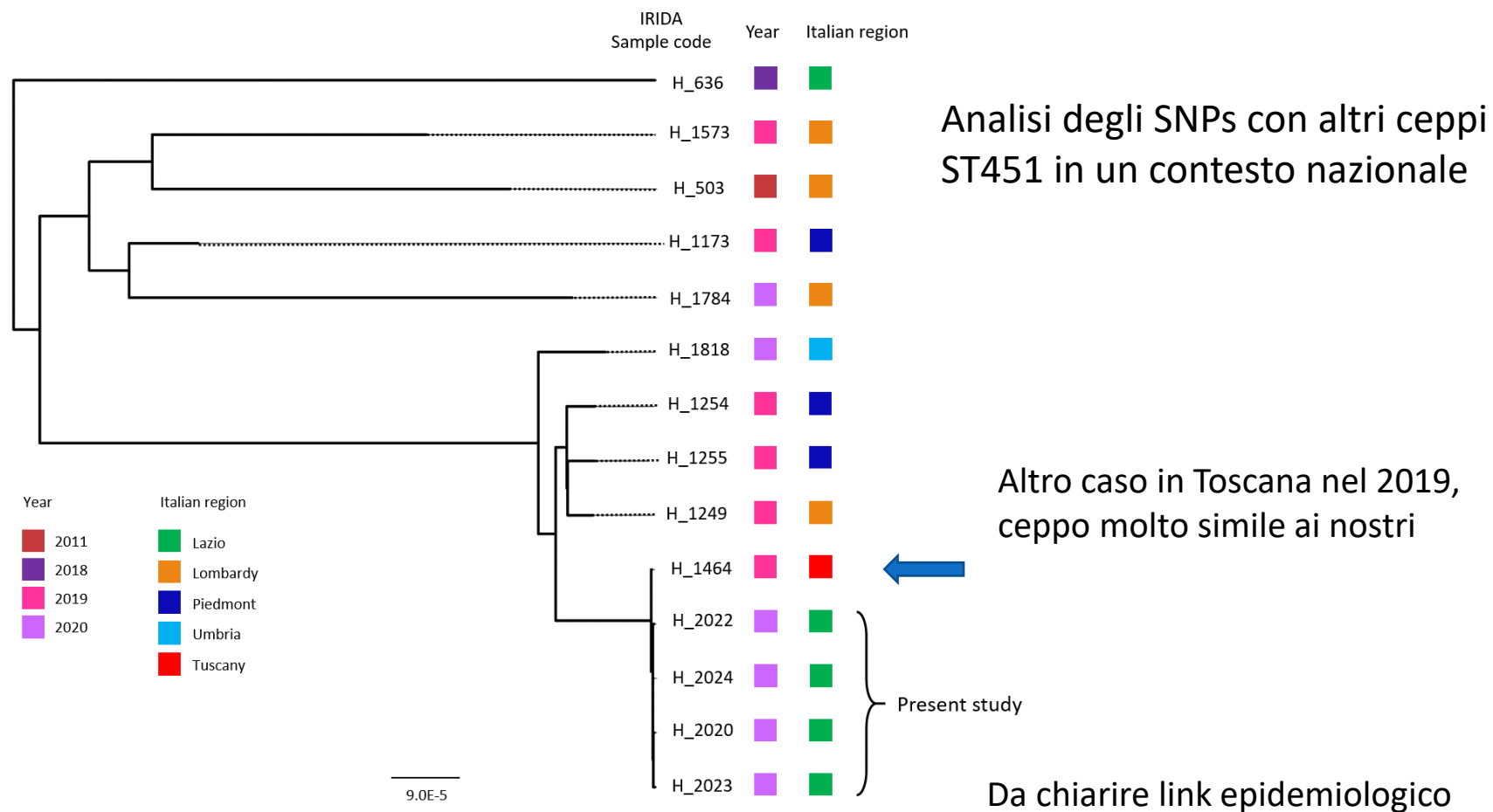
0-6 SNPs

Ipotesi di un evento di contaminazione secondaria che coinvolge un alimento trattato con l'affettatrice.

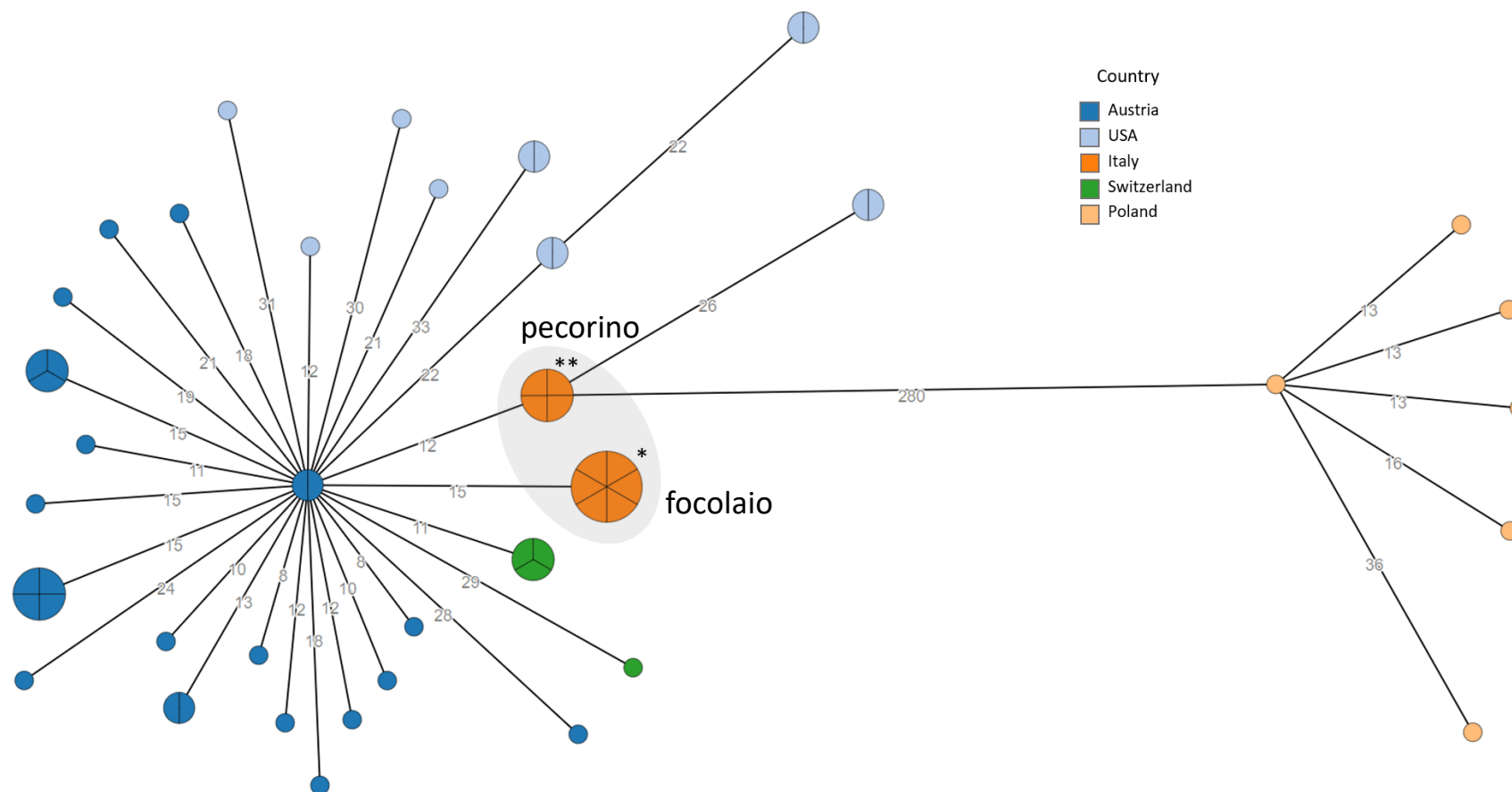
La fonte originale della contaminazione della cucina di questo particolare ceppo di *L. monocytogenes* non è stata ancora identificata.



Piattaforma IRIDA ARIES dell'ISS



Confronto cgMLST con isolati internazionali



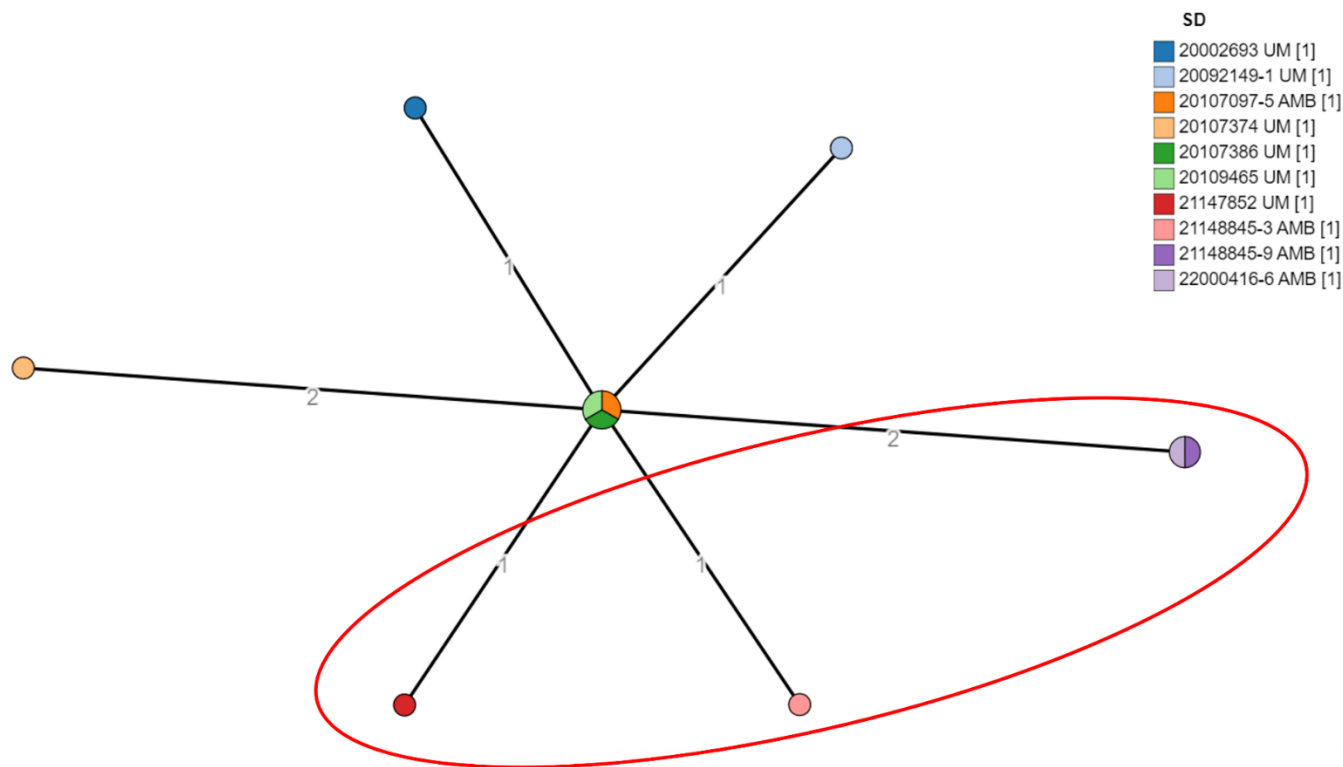
Minimum Spanning Tree (MST) di tutti i ceppi ST451 di origine accertata disponibili su database pubblici



Aggiornamenti... a volte ritornano

Nuovo caso di listeriosi nello stesso ospedale

Effettuati campionamenti nella cucina... A DISTANZA DI UN ANNO dal primo focolaio



L. monocytogenes e produzione di biofilm assicura la sopravvivenza sulle superfici per lungo tempo



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

Valeria Russini¹, Martina Spaziant², Bianca Maria Varcasia¹, Elena Lavinia Diaconu³, Piermichele Paolillo⁴, Simo-
netta Picone¹, Grazia Brunetti⁵, Daniela Mattia⁶, Angela De Carolis⁷, Francesco Vairo², Teresa Bossù¹, Stefano Bi-
lei¹, 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)



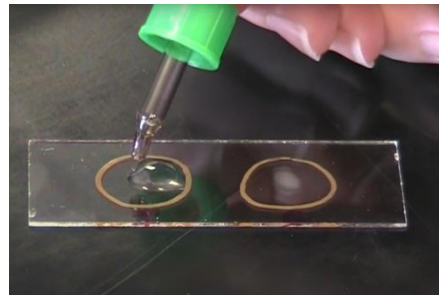
campioni negativi

Campionamento mortadella al **banco gastronomia** e ambientale (supermercato)

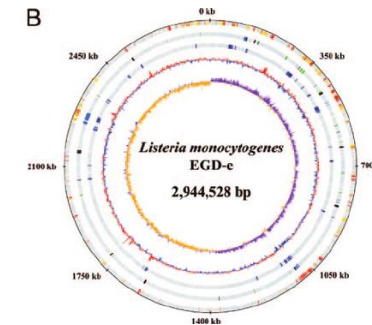


campioni positivi

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



ST5
(WGS - MLST)



Indagine epidemiologica sul territorio

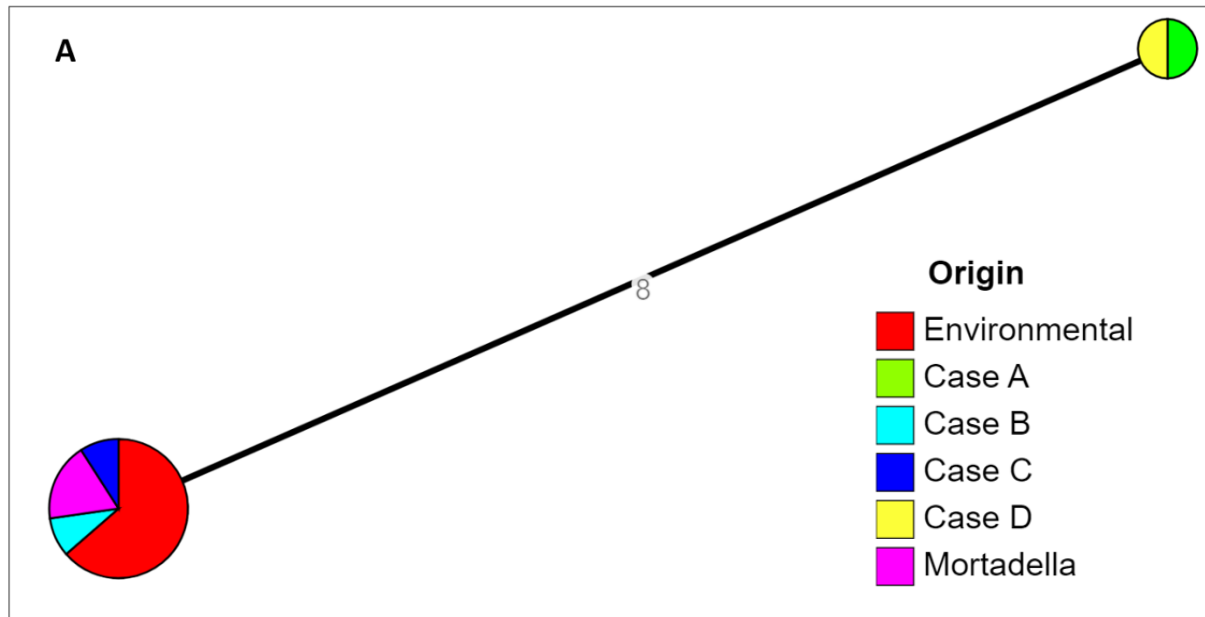
Identificati e analizzati tutti i casi di isolati di *L. monocytogenes* da pazienti residenti nello stesso comune della donna

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



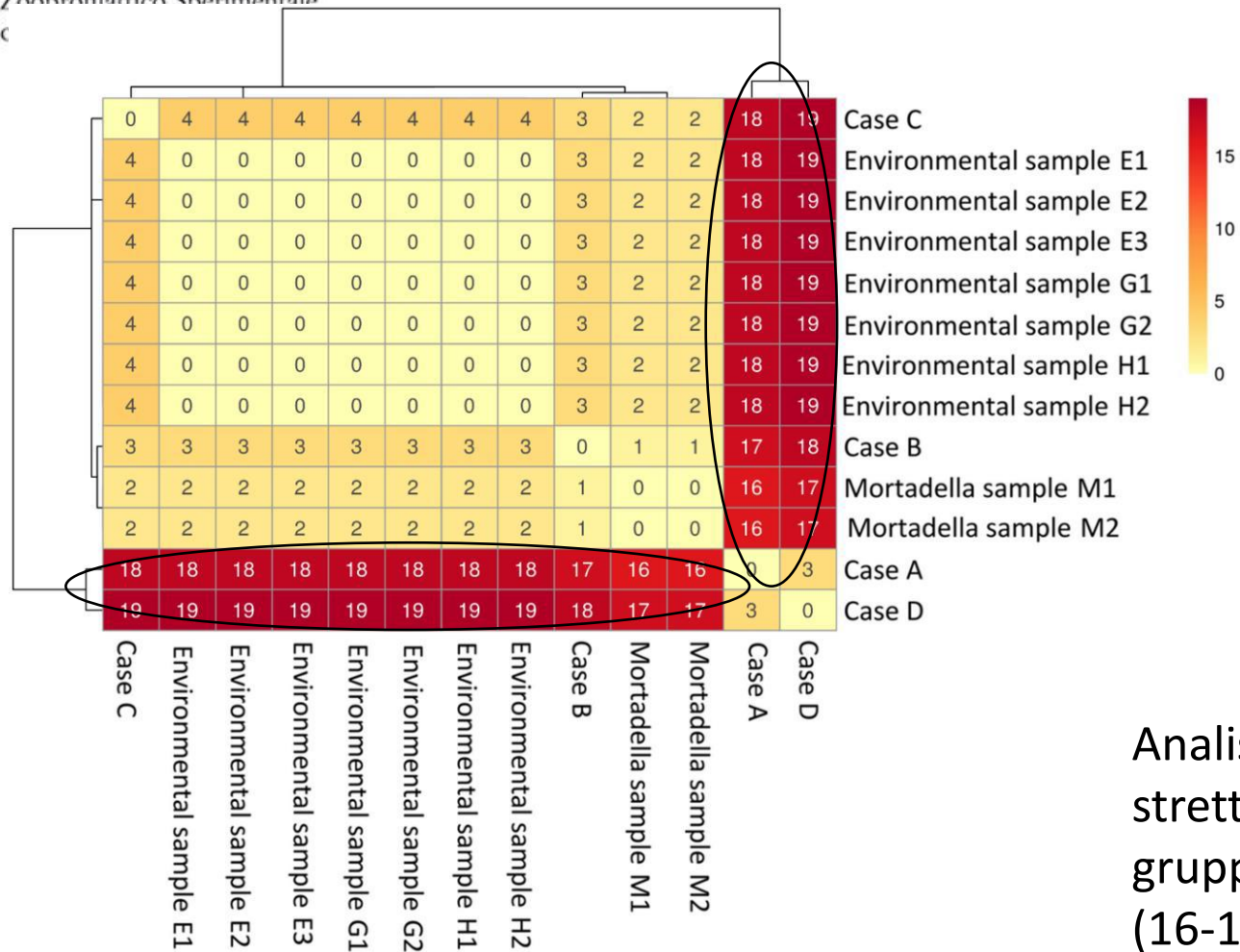


L'analisi del cgMLST riconosce due cluster molto vicini, ma non inferiore al valore generalmente accettato

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

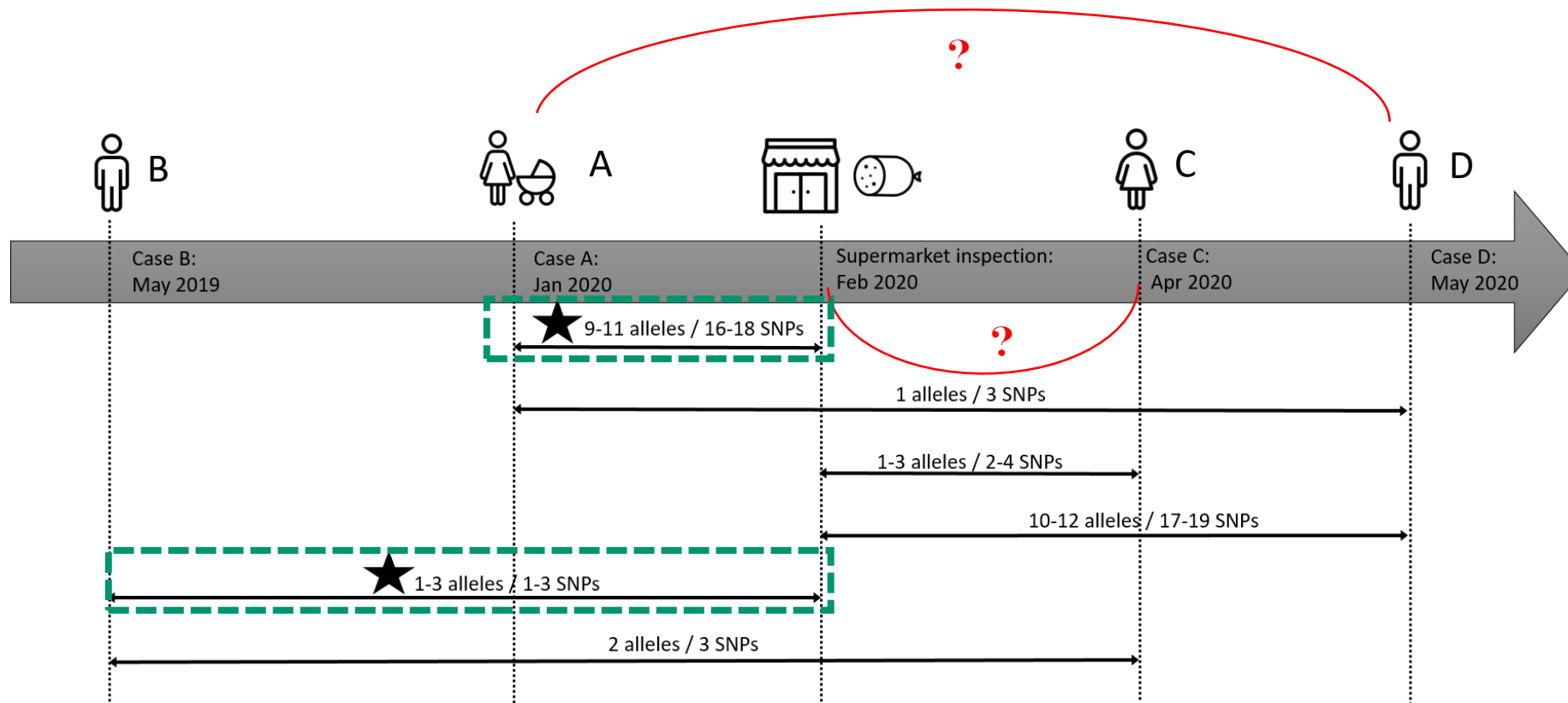
Analisi degli SNPs, confermano la stretta correlazione all'interno dei due gruppi, tra i gruppi distanze minime





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





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)

Caso III: Listeriosi collegata al consumo di salsiccia stagionata

Listeriosi in un uomo di 77 anni

→ tipizzato ceppo: **1/2b, IIb, ST5**

Questionario alimentare

→ Tossinfezione legata al consumo di
salsicce fresche stagionate in casa e
conservate sottovuoto

Campionamenti nell'abitazione e nella macelleria

Identificati:

due sierotipi diversi
(sierotipizzazione)

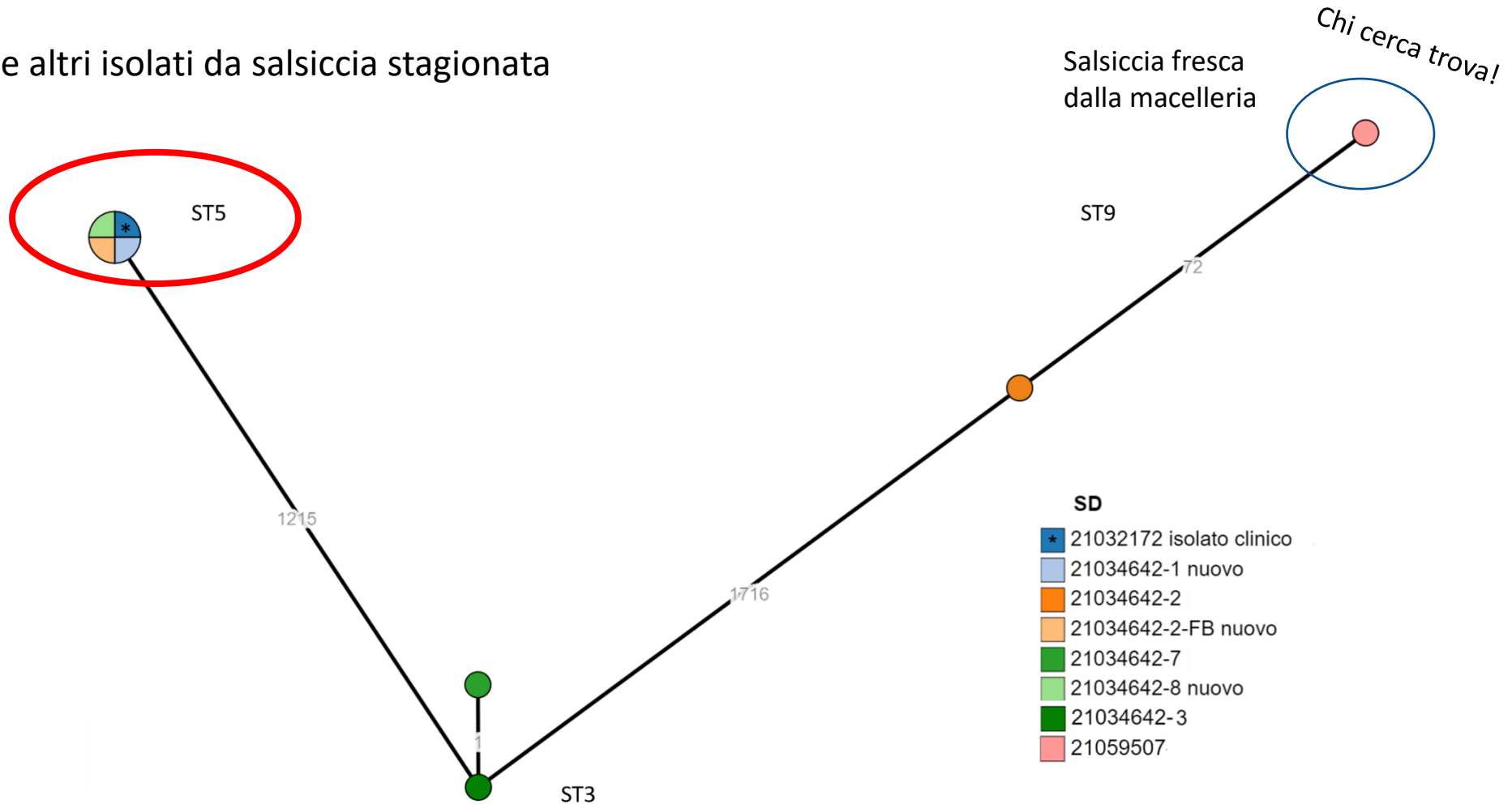
tre ST diversi
(WGS)

ID	Prelievo	Sierotipo	Sierogruppo	MLST	CC	Lineage
CAMP2	Abitazione	1/2c	IIc	9	9	II
CAMP7	Abitazione	1/2b	IIb	3	3	I
CAMP8	Abitazione	1/2b	IIb	5	5	I
CAMP3	Abitazione	1/2b	IIb	3	3	I
1 FB	Abitazione	1/2b	IIb	5	5	I
2 FB	Abitazione	1/2b	IIb	5	5	I
5	Macelleria	1/2c	IIc	9	9	II



Caso III: Listeriosi collegata al consumo di salsiccia stagionata

Caso clinico e altri isolati da salsiccia stagionata





Article

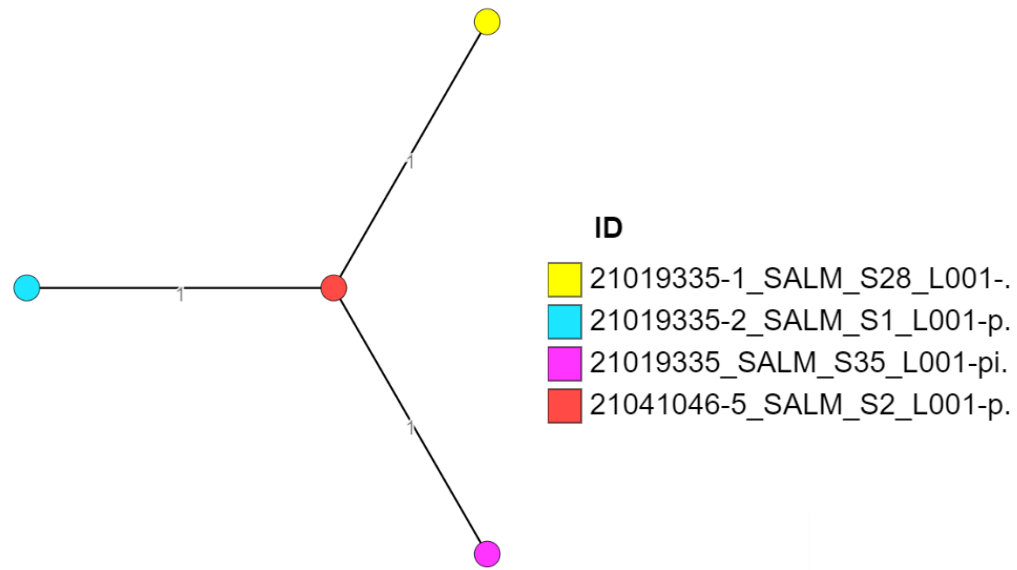
A Familiar Outbreak of Monophasic *Salmonella* serovar Typhimurium (ST34) Involving Three Dogs and Their Owner's Children

Valeria Russini ¹, Carlo Corradini ¹, Emilia Rasile ¹, Giuliana Terracciano ², Matteo Senese ²,
Federica Bellagamba ², Roberta Amoruso ³, Francesco Bottoni ³, Paola De Santis ¹, Stefano Bilei ¹,
Maria Laura De Marchis ^{1,*} and Teresa Bossù ¹

Caso IV: Salmonellosi in cani e bambini

Salmonellosi in due bambini (un solo ceppo isolato) padroni di 4 cani e altri animali domestici.
Successive analisi hanno trovato 3 cani positivi per Salmonella.

Sierotipizzazione 4 ceppi: *Salmonella* Typhimurium monofasica



Analisi del cgMLST

Ceppi appartengono
allo stesso cluster



Approfondimento dell'indagine epidemiologica: somministrazione questionario abitudini domestiche della famiglia e alimentari



shutterstock.com - 196359845



Dimostrato link tra bambini e cani ma non la direzione della contaminazione

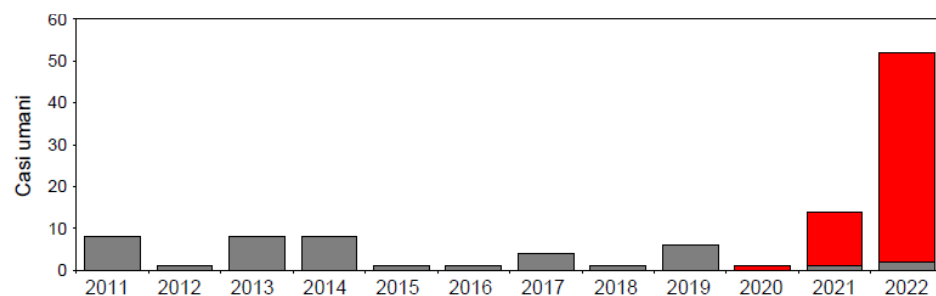
Possibili cause:

- Trasmissione alimentare con un alimento comune (avanzi alimenti umani)
- Trasmissione non alimentare cani-bambini (pet food contaminato, da cane a bambino)



<https://www.razzedicani.net/alimentazione-del-cane-anziano/>





Focolaio nazionale Listeria ST155 collegato al consumo di wurstel

MENU

CERCA

la Repubblica

ABBONATI

GEDÌ SMILE

R

ACCEDI

Batterio Listeria nei wurstel al formaggio di Eurospin: un lotto ritirato dal mercato. "Va restituito al negozio"

Il batterio che può causare la listeriosi in una tipologia di wurstel Tobias, prodotti da Agricola Tre Valli. Ecco i numeri del lotto da riportare in negozio

21 AGOSTO 2022 ALLE 22:49

Formaggio Tobias
SENZA GLUTINE
GLUTAMMATO AGGIUNTO

150g e

Valori nutrizionali medi per 100g:
Energia: 977 kJ / 235 kcal
Grassi: 19 g
di cui acidi grassi saturi: 7,8 g
Carboidrati: 1,1 g
di cui zuccheri: 0 g
Proteine: 15 g
Sale: 3,4 g

Prodotto e confezionato per: EUROSPIN ITALIA S.p.A.
Via Campitolo, 3/D - 37036 San Martino B.A. (VR)
Italia sulle stabilimento indicato con la lettera stampata sotto: (A) Piazzale Apollinare Perinese, 1 - 37036 S. Martino B.A. (VR) (B) Via Apollinare Veronese, 1 - 37060 Volograte Rocca (VR).

INVOLUCRO
PLASTICA RACCOLTA DIFFERENZIATA
Verifica le disposizioni del tuo Comune



Inizio indagine luglio 2022

- Apertura tavolo ministeriale con tutte le regioni coinvolte

Manifestazioni cliniche (forme invasive):

- Sepsi (**75%**)
- Listeriosi perigravidica
- Meningite o meningoencefalite
- Polmonite
- Gastroenterite

Aggiornamento indagine epidemiologica (Maggio 2023)

- **109** casi confermati prevalenza femmine (di cui 11 donne in gravidanza)
- Ampia distribuzione geografica (13 regioni interessate)
- Picco in età 81 -90 anni
- pochi casi in bambini (1-10 anni)
- 6 decessi, 1 nato morto pretermine
- ufficialmente 4 casi nel Lazio (ci risultano 6 casi)
- 6 casi Toscana



Origine alimentare identificata:

- Wurstel al formaggio consumato non cotto (non pastorizzato alla produzione)
- Ditta produttrice Veneto (stabilimento IT 04 M)



Focolaio Listeria ST8 collegato al consumo di mortadella

Nel periodo della sorveglianza ST155 emerso un nuovo ST associato a focolaio epidemico inizialmente segnalato in Emilia Romagna, successivamente 9 regioni coinvolte:

- correlato al consumo di prodotto alimentare «Mortadella in tranci»
- 9 casi Toscana

RICHIAMO	
Data: 04/11/2022	Marchio del prodotto: Veroni
Denominazione di vendita: Mortadella supergigante a tranci	
Nome o ragione sociale dell'OSA a nome del quale il prodotto è commercializzato: F.lli Veroni fu Angelo S.p.a.	
Lotto di produzione: PO2222303 - PO2223702 - PO2224309 - PF2227316	
Marchio di identificazione dello stabilimento/del produttore: IT 280L CE	
Nome del produttore: F.lli Veroni fu Angelo S.p.a.	
Sede dello stabilimento: Viale Saltini 15/17, 42015 Correggio (RE)	
Data di scadenza o termine minimo di conservazione: 27/11/2022 - 12/12/2022 - 25/12/2022 - 09/01/2023	
Descrizione peso/volume unità di vendita: 350g (peso variabile)	
Motivo del richiamo: Non conformità microbiologica: possibile presenza di Listeria monocytogenes	
Avvertenze: I clienti che avessero acquistato questi prodotti sono pregati di non consumarli e restituirli ai punti vendita. Per ulteriori informazioni scrivete alla seguente mail: servizioclienti@veroni.it	



Inserire immagine uno:



Inserire immagine due:

Struttura di una relazione per le Autorità Competenti:

- Riferimento ai casi
- Descrizione dei campioni
- Esiti analitici
- Evidenze link genetici tra isolati clinici ed isolati alimentari/ambientali

Direzione Operativa Microbiologia degli Alimenti
Centro di Riferimento della Regione Lazio per gli Enterobatteri Patogeni (CREP)

SERESMI - Istituto INMI Lazzaro Spallanzani
Via Portuense, 292 - Roma
c.a. dott. Francesco Vairo

c.a. Direttore Sanitario
dott. [redacted]

Roma, 10 novembre 2020

Oggetto: Sospetto di infezione di origine nosocomiale da *Listeria monocytogenes* presso Ospedale [redacted]

Nel corso dell'ultimo triennio, 7 ceppi umani ed 1 ceppo di origine ambientale di *Listeria monocytogenes*, isolati dall'[redacted] sono pervenuti presso l'IZSLT per essere sottoposti a caratterizzazione sierologica tramite sierotipizzazione.

Successivamente sono state condotte analisi di approfondimento che hanno riguardato la caratterizzazione molecolare profonda tramite Whole Genome Sequencing (WGS) e la successiva analisi bioinformatica.

La seguente Tabella riporta i risultati relativi a sierotipo, sierogruppo *in silico*, Sequence Type (ST), Clonal Complex (CC) e il Lineage di appartenenza dei 7 isolati di origine umana.

Focolaio nosocomiale

Direzione Operativa Microbiologia degli Alimenti
Centro di riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni (CREP)
Laboratorio di riferimento Regionale per le Malattie a Trasmissione Alimentare (LRMTA)
Laboratorio di riferimento Regionale per i Patogeni a Trasmissione Alimentare di origine Umana (LRPTAU)

Roma, 21.04.2022

SERESMI - Istituto INMI Lazzaro Spallanzani
Via Portuense, 292 - Roma
c.a. dott. Francesco Vairo

Prot. IZSLT [redacted]
del 22/4/22

Oggetto: Eccesso casi di Listeriosi legati al Sequence Type 5 nella Regione Lazio – Status delle indagini molecolari (su isolati da casi clinici e da matrici alimentari e ambientali) eseguite nel territorio di [redacted], aggiornamento ad aprile 2022.

La presente relazione si inquadra come un aggiornamento sulle indagini molecolari effettuate sugli isolati di *Listeria monocytogenes* di origine umana, alimentare e ambientale, pervenuti presso l'IZS.T, Sede Centrale, appartenenti al Sequence type 5 e segnalati a partire dal mese di luglio 2019 (vedi relazioni precedenti in allegato), con particolare riguardo ai casi legati al territorio di [redacted].

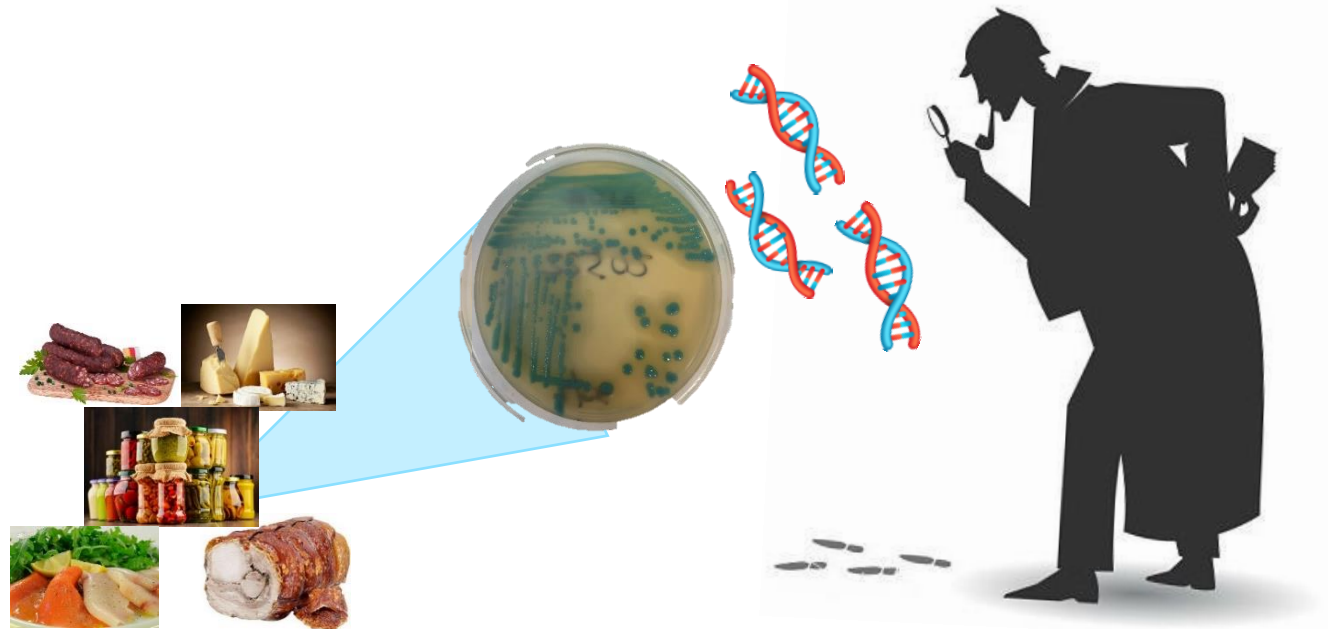
L'indagine è partita da un caso di trasmissione materno-fetale di listeriosi avvenuto nel 2020 nella città di [redacted] ([redacted] caso A, tabella 1) che è stato collegato, con approccio retrospettivo, ad altri casi residenti nella stessa città della gestante (Casi B, C e D, tabella 1).

Indagine legata alla listeriosi in
gravidanza



Conclusioni

- L'utilizzo di metodiche molecolari, in particolare il **cgMLST** e SNPs, fondamentale al supporto delle indagini epidemiologiche e ricerca originale della fonte di contaminazione (source attribution)
- I casi mostrati hanno evidenziato l'importanza della tempestività e dell'avvio delle indagini e dei questionari da parte dell'autorità competente
- Importante la collaborazione tra tutte le parti interessate e l'interscambio di dati analitici e clinici, soprattutto in casi nazionali



Grazie a tutti per l'attenzione!

