Il ruolo della Sezione diagnostica dell'IZS Il Sistema Enternet nazionale e regionale.

Reggio-Emilia, 29 aprile 2014

Stefano Pongolini

IZSLER Sezione di Parma

Accertamenti analitici possibili

- **Batteri**
  - Salmonella enterica
  - Listeria monocytogenes
  - Campylobacter termofili
  - VTEC
  - Staphilococcus aureus
  - Yersinia enterocolitica
  - Chromobacter sakazakii
  - Clostridi solfitoriduttori
  - Clostridium botulinum
  - Bacillus cereus
- **Virus**
  - Norovirus
  - HAV
  - HEV
  - Rotavirus
  - Enterovirus

Accertamenti analitici possibili

- **Parassiti**
  - Criptosporidi
  - Giardia lamblia
  - Toxoplasma gondii
  - Trichinella
  - Anisakis
  - Sarcosporidi
  - Cisticerchi
  - Echinococco
- **Tossine**
  - Enterotossine stafilococciche
  - Tossine botuliniche
  - Biotossine algali (lungo elenco …)
  - (histamina)
- **Allergeni**
  - glutine
  - Proteine dell'uovo
  - Beta-lattoglobuline

Il sistema Enternet nazionale:

- La rete di sorveglianza Enternet Italia è coordinata ISS
- È costituita da 20 laboratori del SSN, Istituti Universitari, IIZZSS, ARPA.
- Dal 2008 Enternet è stato incorporato nel sistema di sorveglianza europeo per le Food- and Waterborne Diseases (FWD) coordinato dall'ECDC
- I dati raccolti attraverso Enternet Italia vengono regolarmente inviati all'ECDC attraverso il sistema TESSy (The European Surveillance System).

Il sistema Enternet nazionale:

Il programma Enternet Italia è articolato su diverse reti di sorveglianza in accordo con le priorità individuate dall'ECDC che riguardano infezioni da:

- Salmonella
- E. coli O157 ed altri E.coli produttori di Vero-citotossina (VTEC)
- Campylobacter
- Listeria monocytogenes
- Shigella
- Yersinia

Obiettivi del sistema Enternet nazionale:

- descrivere la frequenza dei sierotipi e di altre caratteristiche (fagotipi, tossinotipi, pulsotipi, etc...) dei batteri enteropatogeni
- riconoscere tempestivamente eventi epidemici sul territorio nazionale anche basandosi sulla tipizzazione dei ceppi isolati
- confrontare i risultati della sorveglianza nazionale con la rete Foodborne and Waterborne Diseases dell'ECDC
- Identificare episodi epidemici internazionali
- Integrare la sorveglianza umana, veterinaria e ambientale

Il sistema regionale:

- 10 laboratori medici coinvolti tra cui 2 grandi hub
- 1 laboratorio di riferimento regionale
- isolati di Salmonella: 15-25/settimana ~ 800-900/anno

IZSLER – Parma dal 25 giugno 2012 lab. Enternet Emilia-Romagna

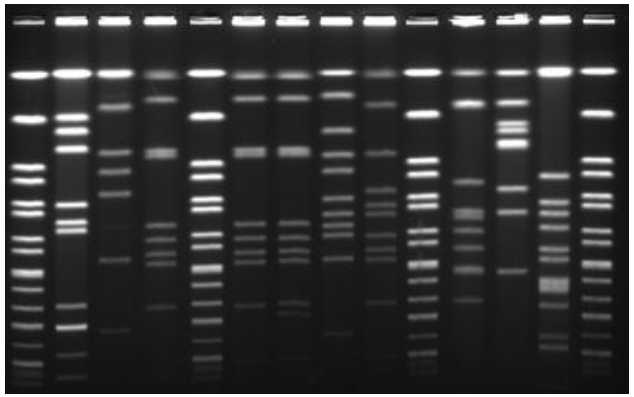
ARPA – Forlì ha svolto la funzione fine al 2012

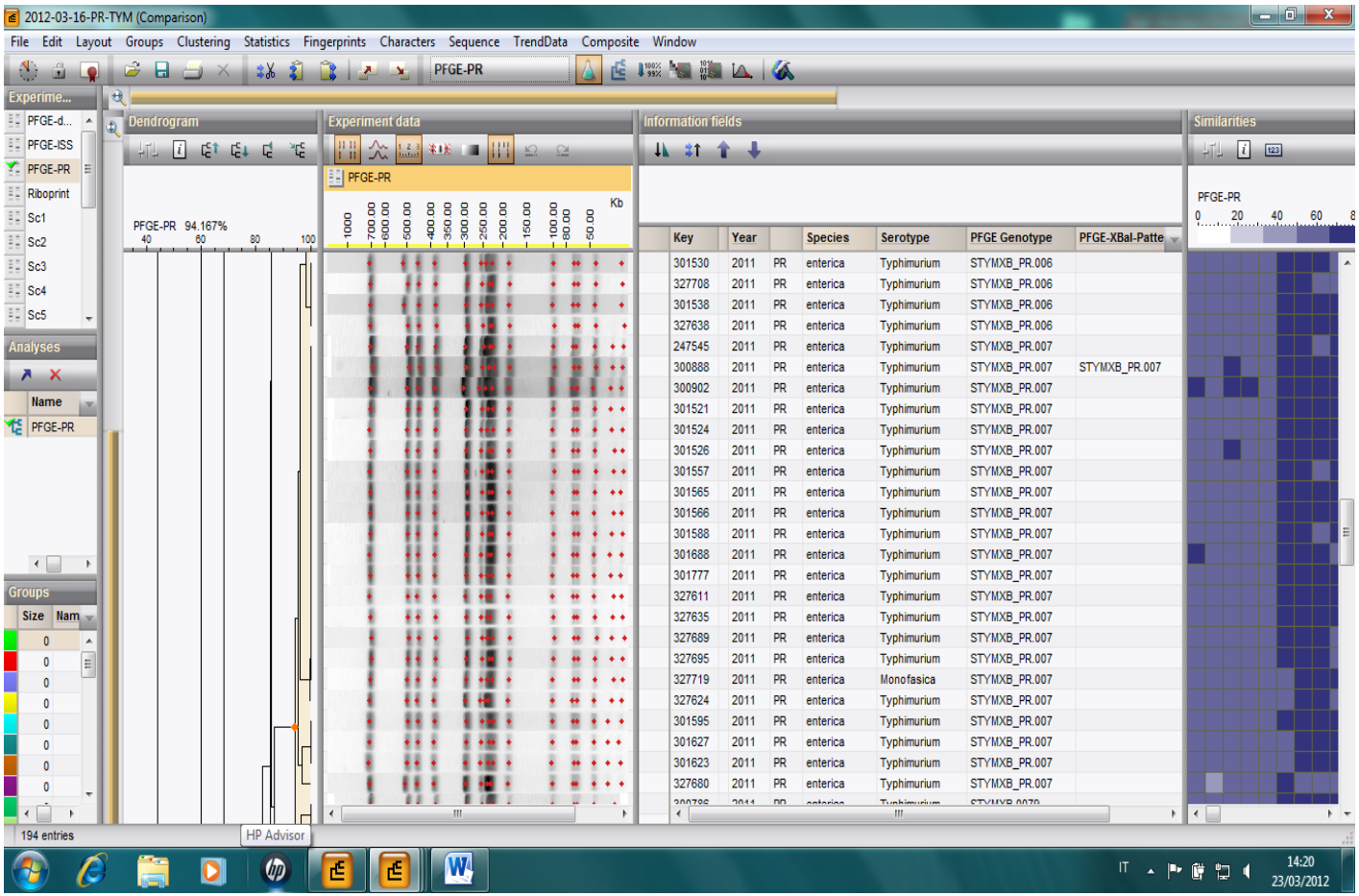
Nuove finalità del sistema ENTERNET Emilia-Romagna

- tipizzare in “tempo-reale”
- genotipizzare
- fare analisi periodica delle frequenze dei sottotipi
- segnalare potenziali focolai
- ampliare la gamma dei patogeni
- Introdurre tecniche avanzate di epidemiologia molecolare

… a questo scopo si sono introdotte modifiche al sistema:

- nuova logistica - raccolta attiva settimanale degli isolati
- genotipizzazione sistematica - PFGE su tutti gli isolati




2012-03-16-PR-TYM (Comparison)
File Edit Layout Groups Clustering Statistics Fingerprints Characters Sequence TrendData Composite Window
PFGE-PR
Experime...
PFGE-d...
PFGE-ISS
PFGE-PR
Riboprint
Sc1
Sc2
Sc3
Sc4
Sc5
Analyses
Name
PFGE-PR
Groups
Size
Dendrogram
PFGE-PR 94.167%
Experiment data
PFGE-PR
Kb
Information fields
Similarities
PFGE-PR
Key Year Species Serotype PFGE Genotype PFGE-XBal-Patte
301530 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.006
327708 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.006
301538 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.006
327638 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.006
247545 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
300888 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007 STYMXB_PR.007
300902 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
301521 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
301524 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
301526 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
301557 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
301565 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
301566 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
301588 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
301688 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
301777 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
327611 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
327635 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
327689 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
327695 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
327719 2011 PR enterica Monofasica STYMXB_PR.007
327624 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
301595 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
301627 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
301623 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
327680 2011 PR enterica Typhimurium STYMXB_PR.007
194 entries
HP Advisor
IT
14:20
23/03/2012

Origine e caratteristiche del campione biologico

- Laboratorio di origine
- Comune o località di prelievo
- Identificativo del campione

Informazione sugli stipiti di provenienza umana

- Matrice
- Sesso
- Data di nascita
- Comune di residenza
- Eventuale ospedalizzazione

Identificazione microbica e sensibilità agli antibiotici

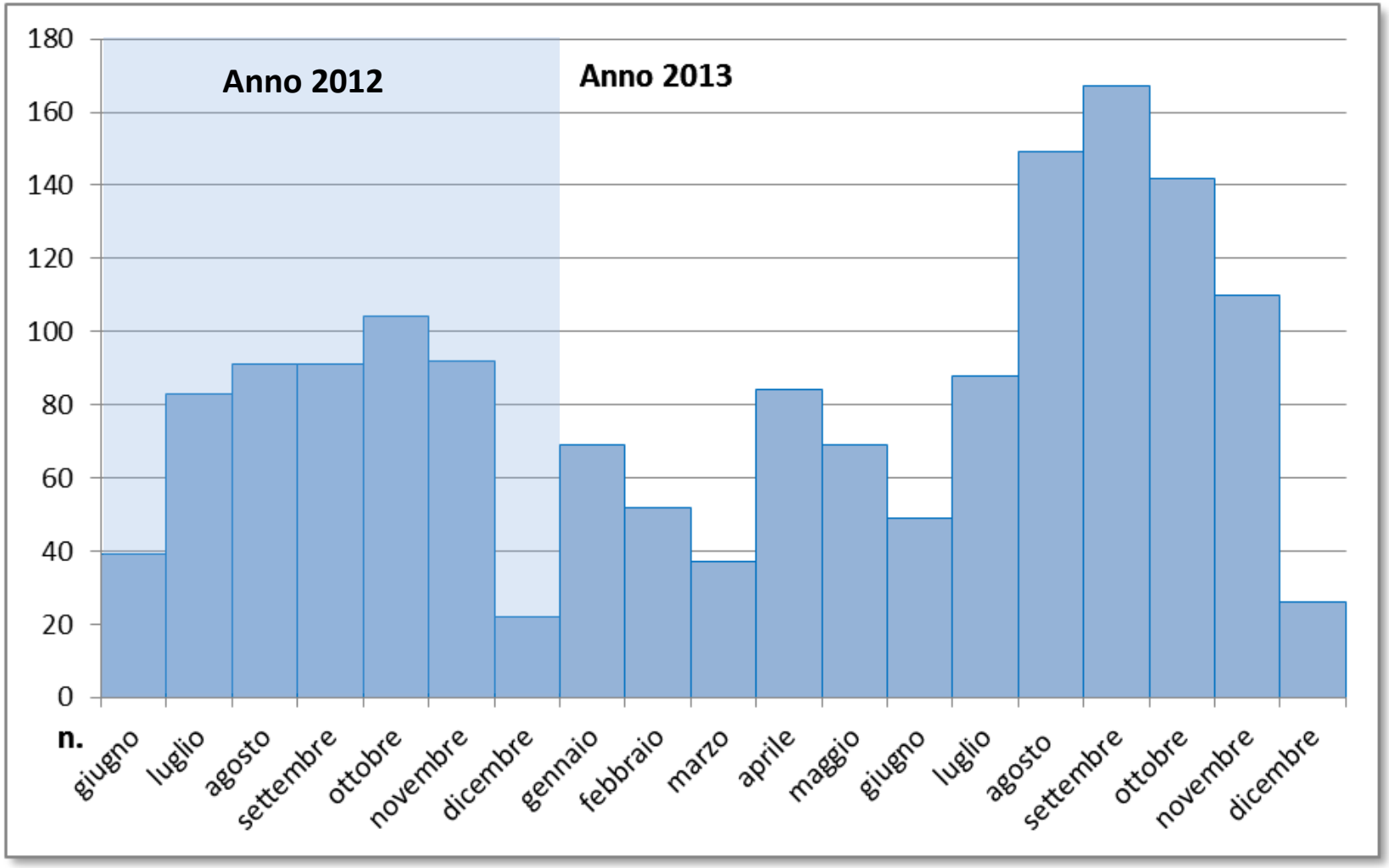
- Identificazione del patogeno
- Tipizzazione: gruppo di appartenenza
- Antibiogramma

Informazioni aggiuntive da **Scheda di notifica fonte umana ENTER-NET:** motivo di esecuzione dell'esame colturale, viaggi effettuati nei 30 giorni precedenti ai sintomi, alimenti implicati

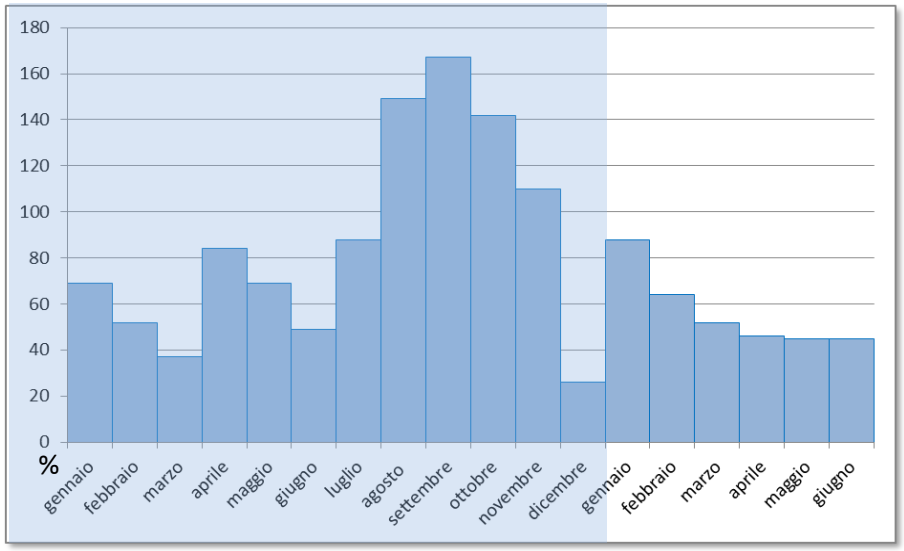
info & dati (novembre 2013):

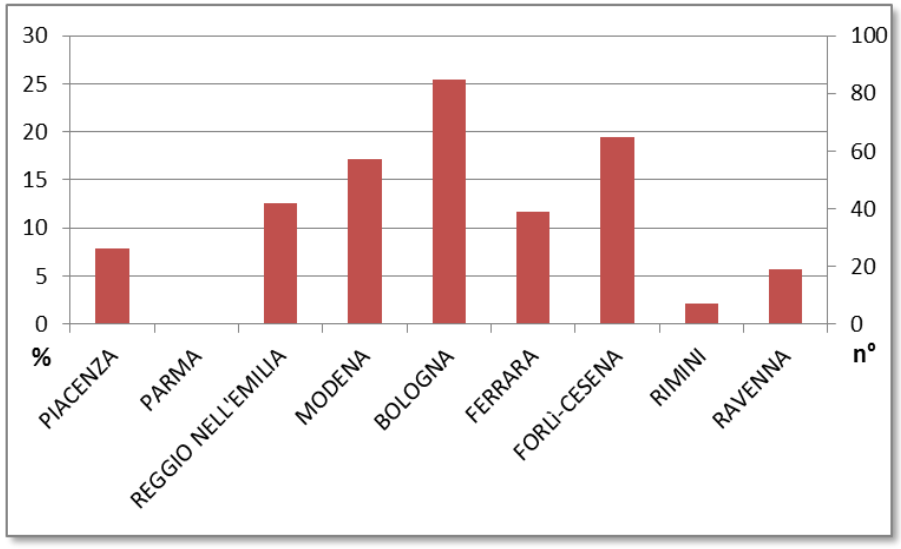
- 1 solo database Bionumerics condiviso in IZSLER
- 2 laboratori attivi (PR e BS) – codifica condivisa
- isolati nel database ~ 6100, di cui ~ 3500 umani
- genotipi identificati ~ 1116
- tutte le Typhimurium/monofasiche sono verificate PCR

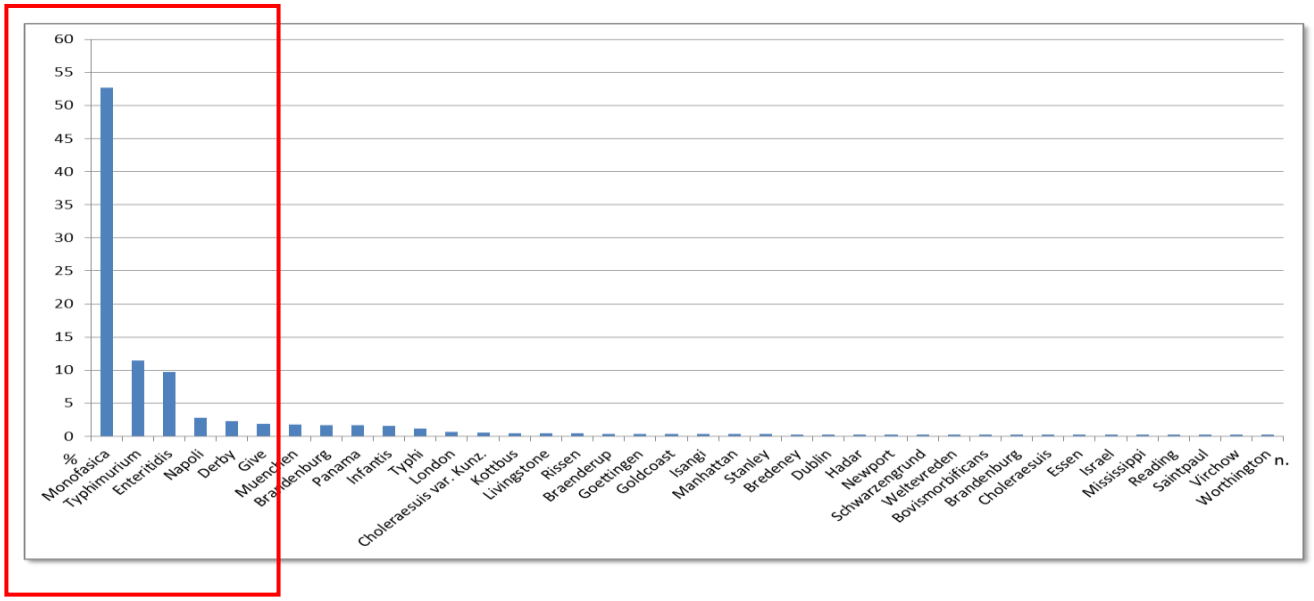
Isolati /mese periodo giugno 2012- dicembre 2013

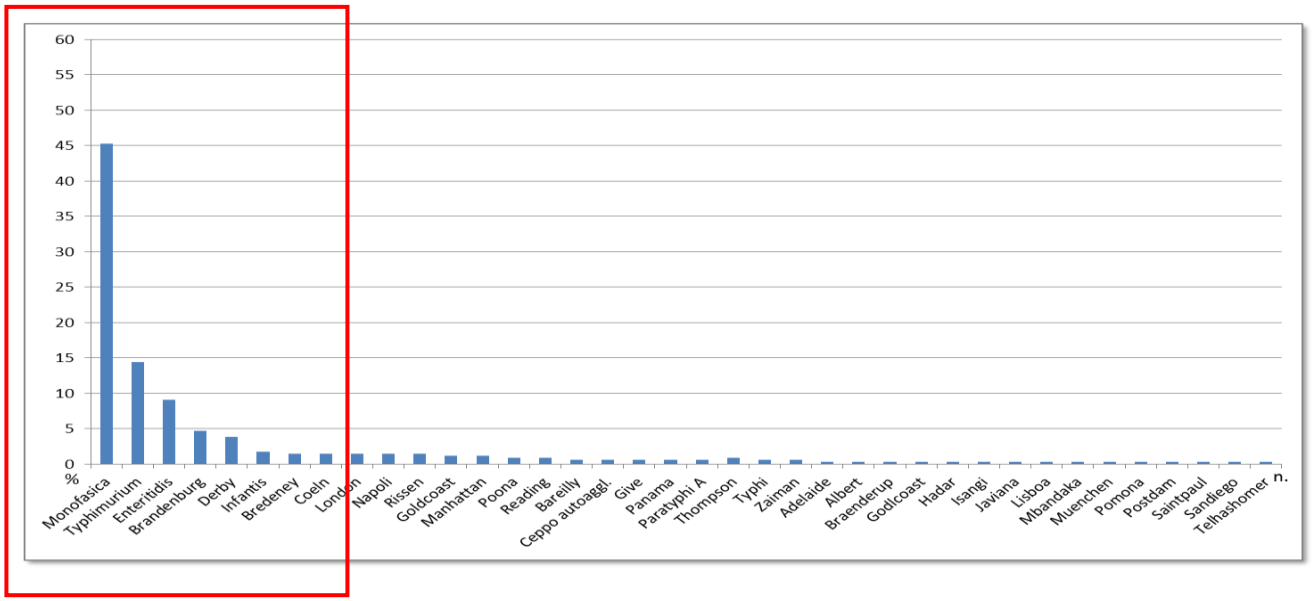


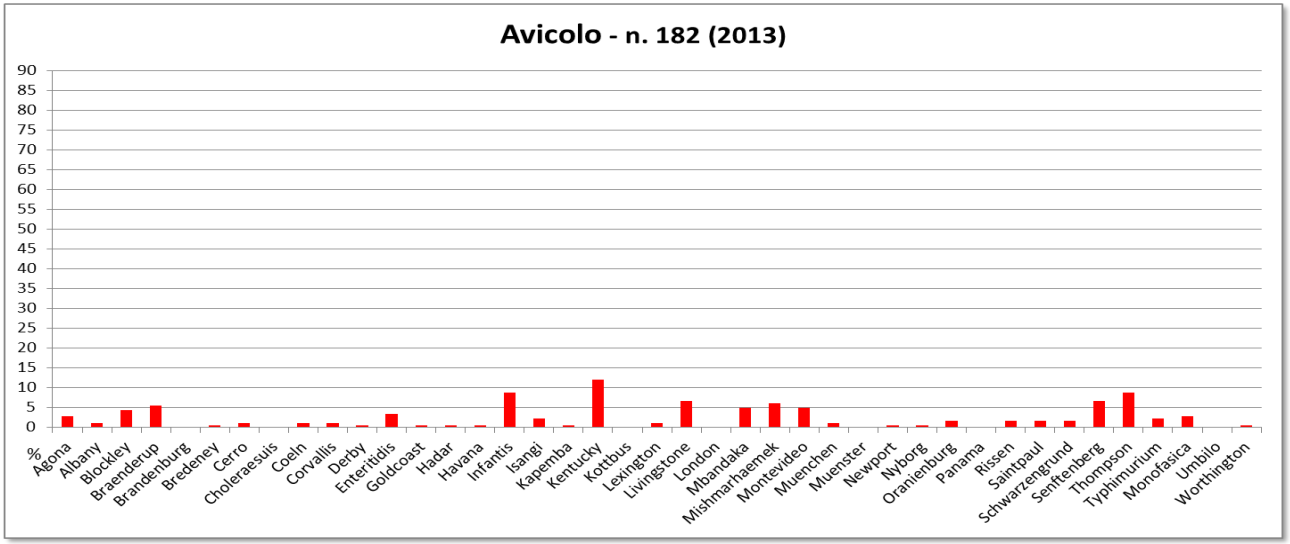
Isolati /mese periodo giugno 2012- dicembre 2013

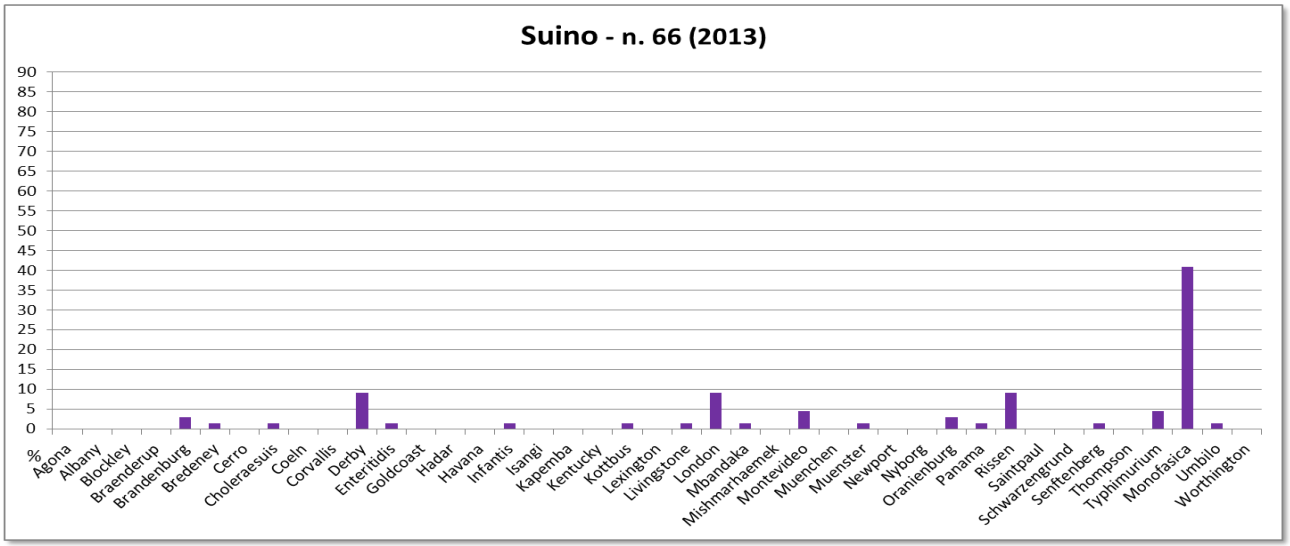





60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
%
Mondfasica
Typhimurium
Enteritidis
Napoli
Derby
Give
Muenchen
Brandenburg
Panama
Infantis
Typhi
London
Choleraesuis var. Kunz.
Kottbus
Livingstone
Rissen
Braenderup
Goettingen
Goldcoast
Isangi
Manhattan
Stanley
Bredeney
Dublin
Hadar
Newport
Schwarzengrund
Weltevreden
Bovismorbificans
Brandenburg
Choleraesuis
Essen
Israel
Mississippi
Reading
Saintpaul
Virchow
Worthington
n.


60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
%
Mondfasica
Typhimurium
Enteritidis
Brandenburg
Derby
Infantis
Bredeney
Coeln
London
Napoli
Rissen
Goldcoast
Manhattan
Poona
Reading
Bareilly
Ceppo autoaggl.
Give
Panama
Paratyphi A
Thompson
Typhi
Zaiman
Adelaide
Albert
Braenderup
Godlcoast
Hadar
Isangi
Javiana
Lisboa
Mbandaka
Muenchen
Pomona
Postdam
Saintpaul
Sandiego
Telhashomer
n.


Avicolo - n. 182 (2013)
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
%
Agona
Albany
Blockley
Braenderup
Brandenburg
Bredeney
Cerro
Choleraesuis
Coeln
Corvallis
Derby
Enteritidis
Goldcoast
Hadar
Havana
Infantis
Isangi
Kapemba
Kentucky
Kottbus
Lexington
Livingstone
London
Mbandaka
Mishmarhaemek
Montevideo
Muenchen
Muenster
Newport
Nyborg
Oranienburg
Panama
Rissen
Saintpaul
Schwarzengrund
Senftenberg
Thompson
Typhimurium
Monofasica
Umbilo
Worthington


Suino - n. 66 (2013)
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
%
Agona
Albany
Blockley
Braenderup
Brandenburg
Bredeney
Cerro
Choleraesuis
Coeln
Corvallis
Derby
Enteritidis
Goldcoast
Hadar
Havana
Infantis
Isangi
Kapemba
Kentucky
Kottbus
Lexington
Livingstone
London
Mbandaka
Mishmarhaemek
Montevideo
Muenchen
Muenster
Newport
Nyborg
Oranienburg
Panama
Rissen
Saintpaul
Schwarzengrund
Senftenberg
Thompson
Typhimurium
Monofasica
Umbilo
Worthington

Epidemiologia molecolare

- Identificazione e indagine di focolai
- Genetica di malattia
- Analisi evolutiva di microrganismi

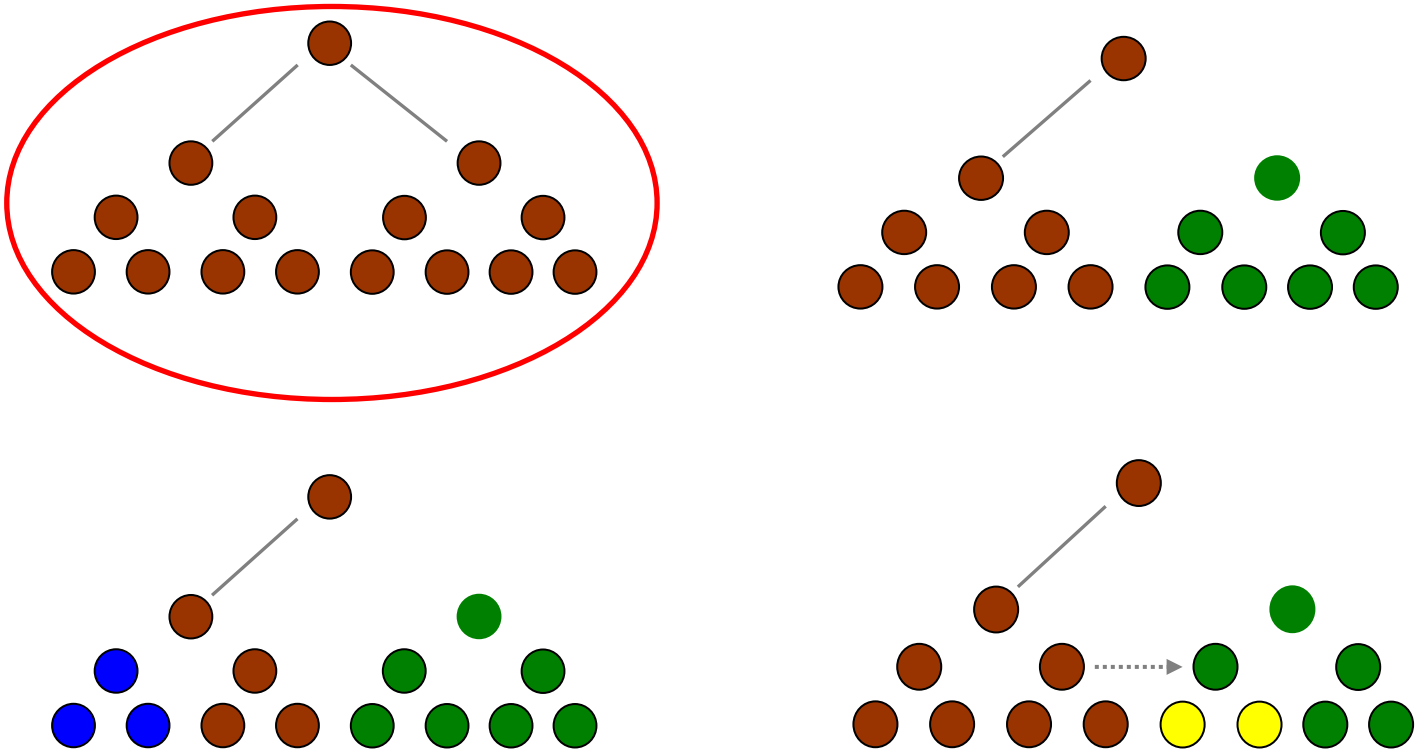
Identificazione e indagine di focolai in epidemiologia molecolare

- Si basa su
  - Sub-tipizzazione molecolare degli isolati ottenuti dai casi di malattia e dagli alimenti sospetti
  - Analisi dei sottotipi ottenuti (confronti)

- La sub-tipizzazione può essere
  - Fenotipica
  - Genotipica

Presupposto

Ceppi epidemici: singola espansione clonale di un precursore



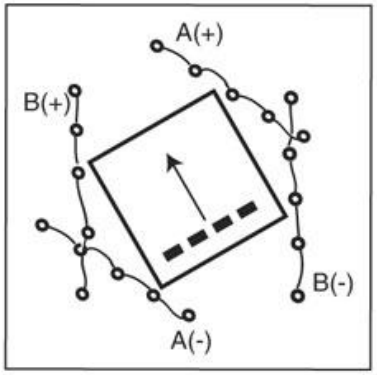
Le tecniche

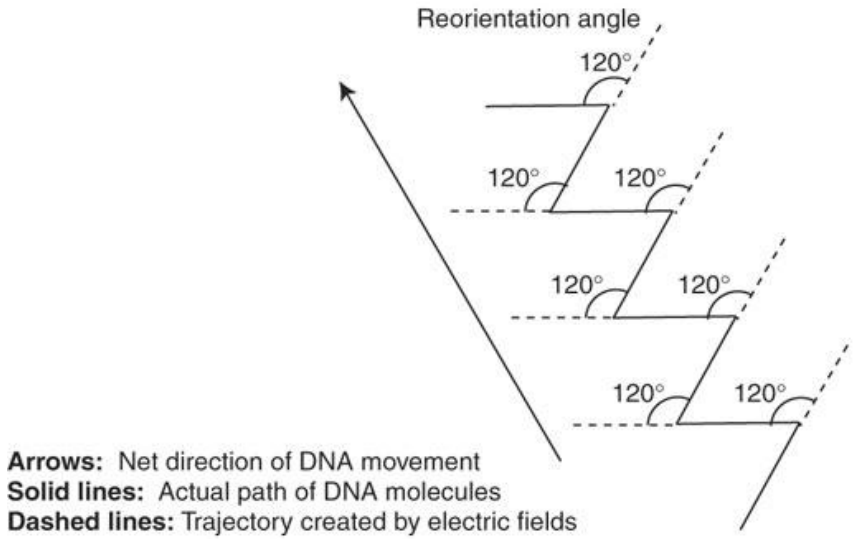
- RFLP
  - PFGE
  - RIBOTIPIZZAZIONE
  - SEQUENZE DI INSERZIONE
  - AFLP
- SEQUENZE RIPETUTE
  - ERIC
  - VNTR (MLVA)
  - SPOLIGOTYPING
- SEQUENZIAMENTO
  - RNA 16S
  - MLST
  - NGS
- RAPD
- MICROARRAY

Criticità

- Potere discriminante proporzionato allo scopo
- Riproducibilità
- Praticità
- Tipizzabilità
- Diversa variabilità genetica tra patogeni
- Stabilità dei “marcatori” genetici utilizzati
- Interpretazione dei risultati

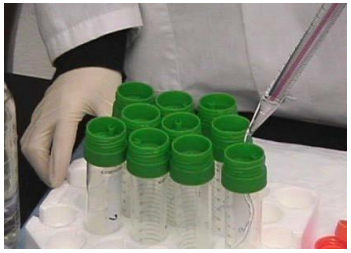
PFGE (Pulsed-Field Gel-Electrophoresis)





- Introdotta nel 1984 da David Schwartz
- È ancora lo standard

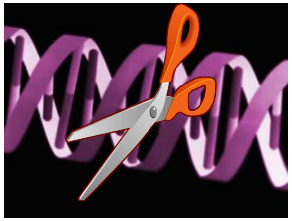
Patient Specimen Collection

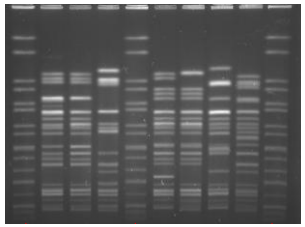


=

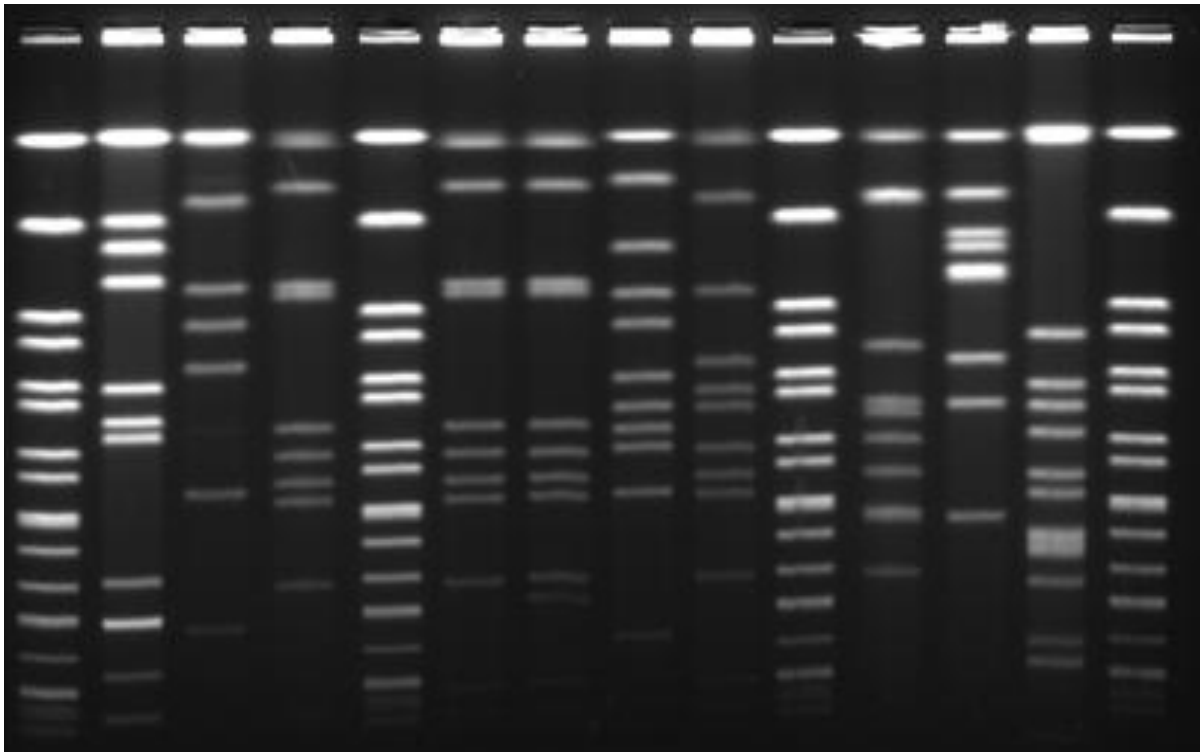
+

.

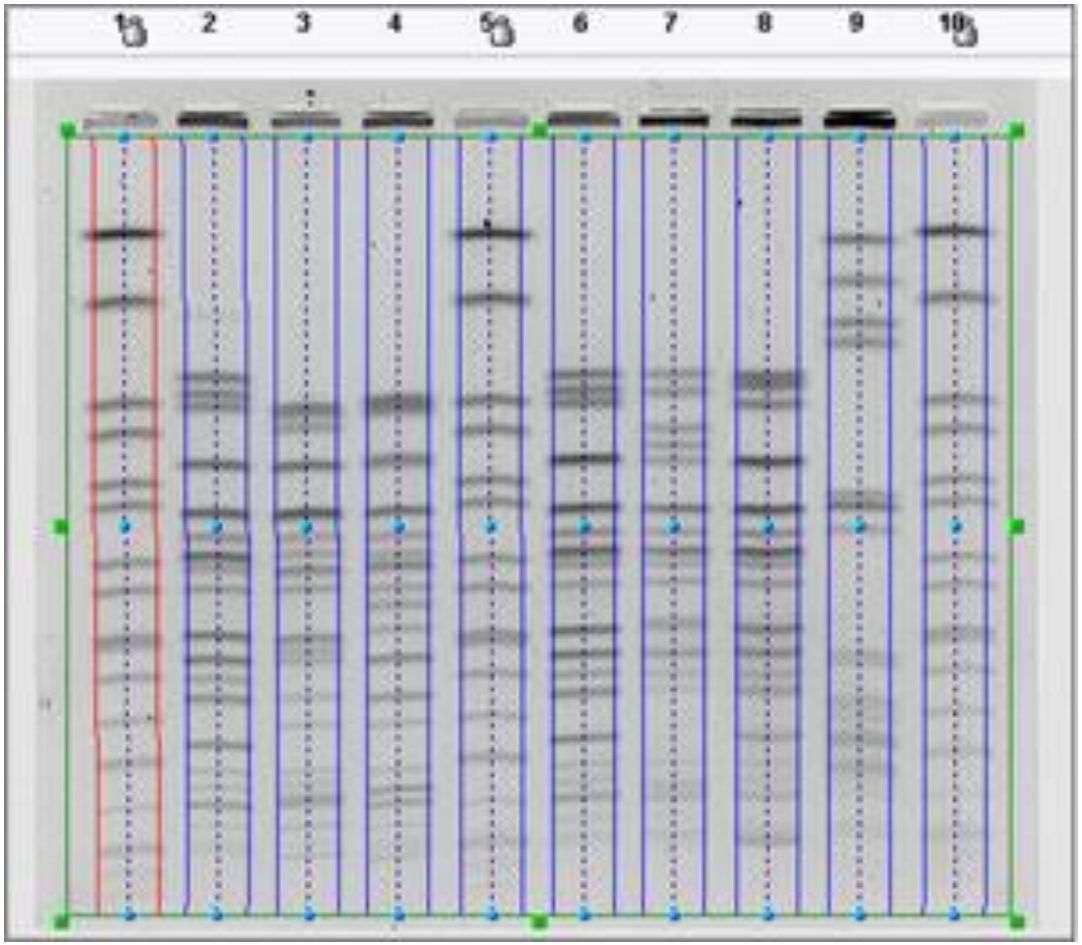




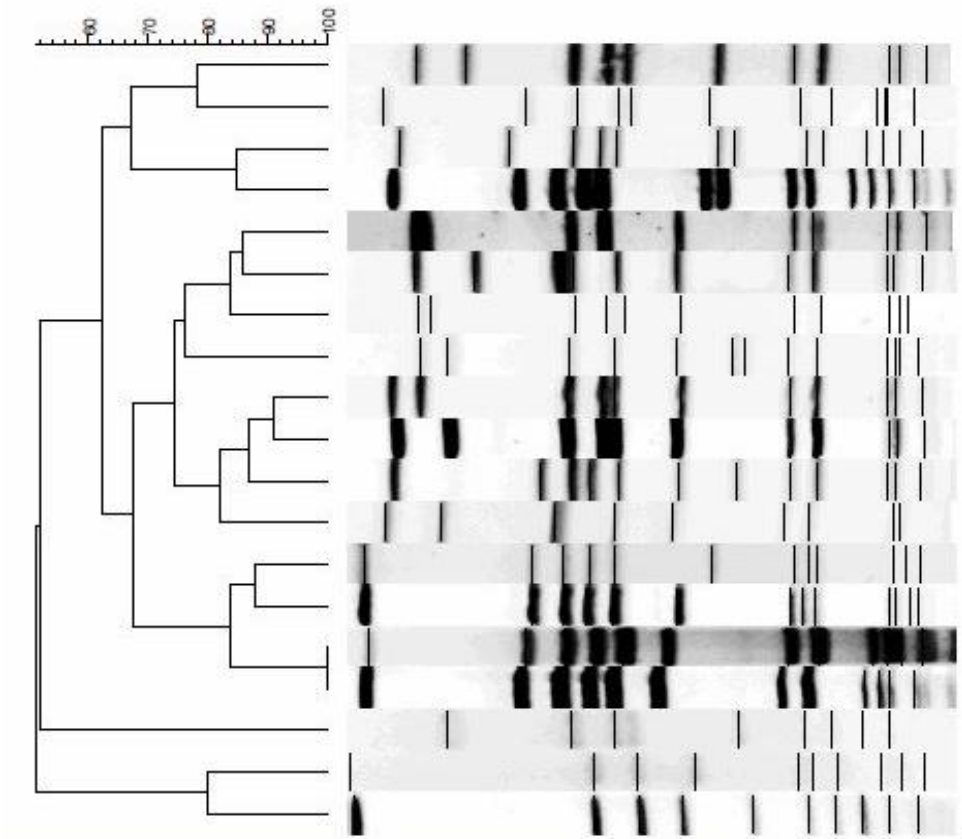
... il risultato!



Analisi dei tracciati



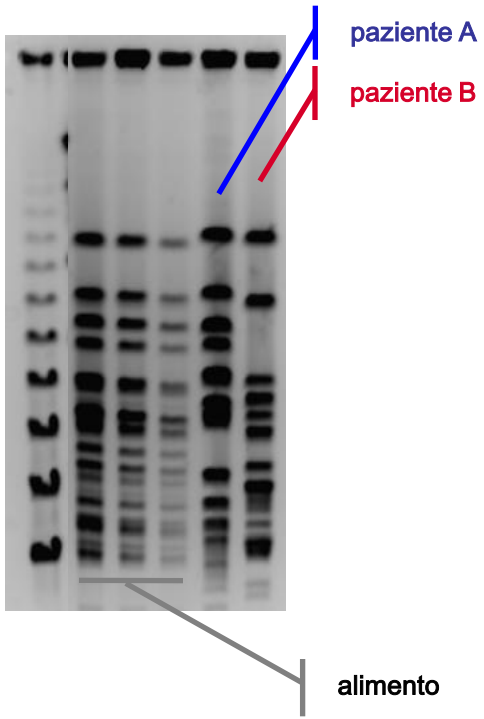
comparison

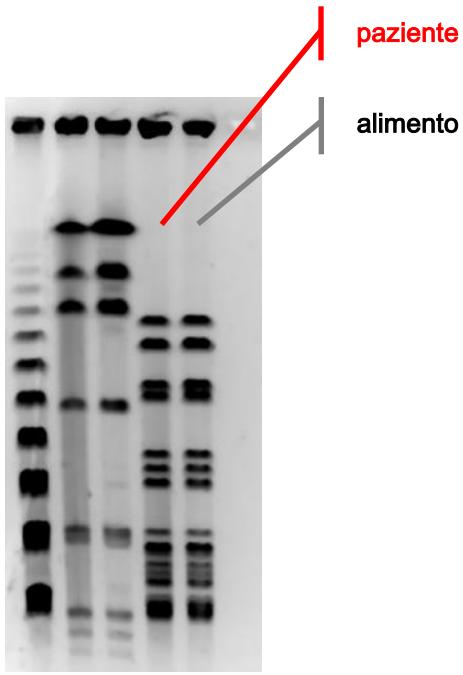


PFGE strain type	Isolate
B	1
G	1
USA400-related	1
USA400*	–
H	1
C	5
J	1
I	1
USA100-related	11
USA100*	–
E	1
F	1
USA700-related	1
USA700*	–
USA300 or related	39
USA300*	–
D	1
USA200-related	1
USA200*	–

Medscape Source: Emerg Infect Dis © 2010 Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

Listeria monocytogenes (Apa I Asc I)





Criticità

- Criteri di Tenover per PFGE

n. bande diverse	interpretazione
0	stesso focolaio
2-3	probabile stesso focolaio
4-6	possibile stesso focolaio
≥7	non stesso focolaio

PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Vantaggi

- “Universale”: applicata con successo a molti batteri
- Dotata di ottimo potere discriminante
- Abbastanza ripetibile e riproducibile
- Vasta esperienza d’uso
- Standard consolidato

PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Svantaggi

- Laboriosa
- Complessa (necessaria buona competenza tecnica)
- Non rapida
- Risultati non standardizzabili in senso assoluto (bande)
- Non tutti i ceppi sono tipizzabili

MLVA (Multi-Locus VNTR Assay)

SE1: **AACTACC**

Se1 276 **5 RIP**

CTTTTTGTGGGACTGCTTCAACCTTTGGGCAGATATCGGAAATGAAAAAGATAGACCAGGCAACTATTCGCTATCAG
AATATCCGGTACACC**AACTACC** **AACTACC** **AACTACC** **AACTACC** **AACTACC**AACAAATCATTTAGTCGATGGTC
TCGTTGCCATTGGTTCATAGAGTGTTGGTCTTGGTATGGATGG

Se1 297 **8 RIP**

CTTTTTGTGGGACtGCTTCAACCTTTGGGCAGATATCGGAAATGAAAAAGATAGACCAGGCAACTATTCGCTATCAG
AATATCCGGTACACC**AACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACTACC**AACA
AATCATTTAGTCGATGGTCTCGTTGCCATTGGTTCATAGAGTGTTGGTCTTGGTATGGATGG

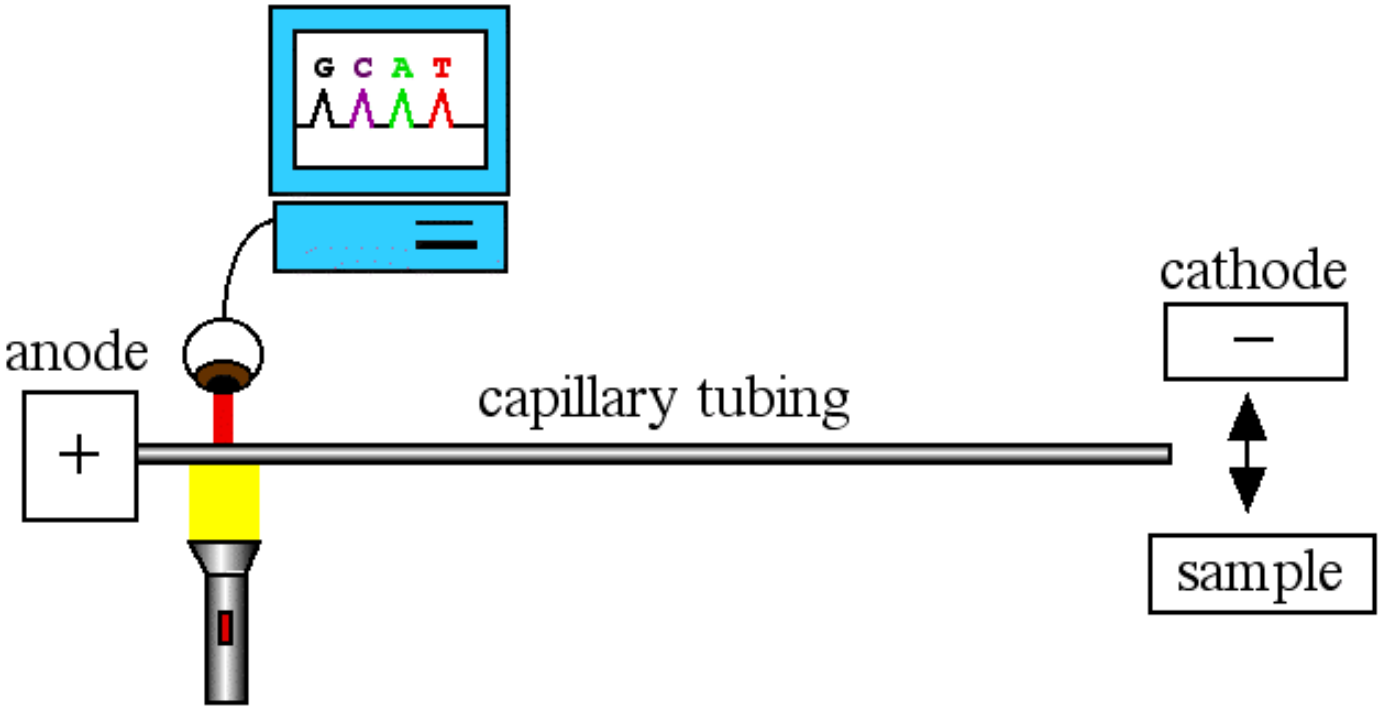
Se1 317 **11 RIP**

CTTTTTGTGGGACTGCTTCAACCTTTGGGCAGATATCGGAAATGAAAAAGATAGACCAGGCAACTATTCGCTATCAG
AATATCCGGTACACC**AACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACT**
ACCAACTACCAACTACCAACAAATCATTTAGTCGATGGTCTCGTTGCCATTGGTTCATAGAGTGTTGGTCTTGGTAT
GGATGG

Se1 331 **13 RIP**

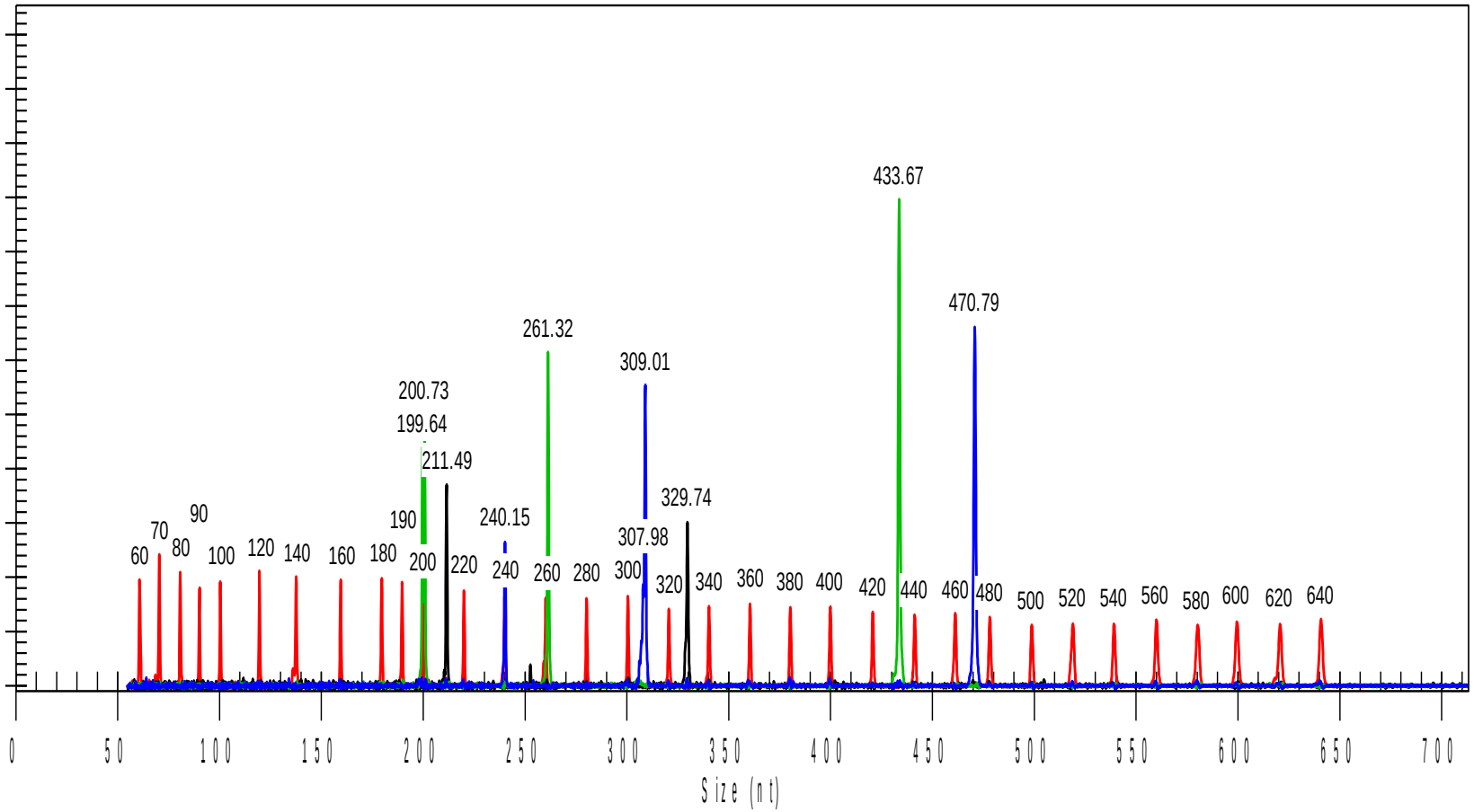
CTTTTTGTGGGACTGCTTCAACCTTTGGGCAGATATCAGAAATGAAAAAGATAGACCACGCAACTATTCGCTATCAG
AATATCCGGTACACC**AACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACT**
ACCAACTACCAACTACCAACTACCAACTACCAACAAATCATTTAGTCGATGGTCTCGTTGCCATTGGTTCATAGAG
TGTTGGTCTTGGTATGGATGG

MLVA (Multi-Locus VNTR Assay)



MLVA (Multi-Locus VNTR Assay)

MLVA (Multi-Locus VNTR Assay)



Valutazione delle performance

- Indice di diversità di Simpson (*probabilità di non incorrere in due individui dello stesso tipo*)

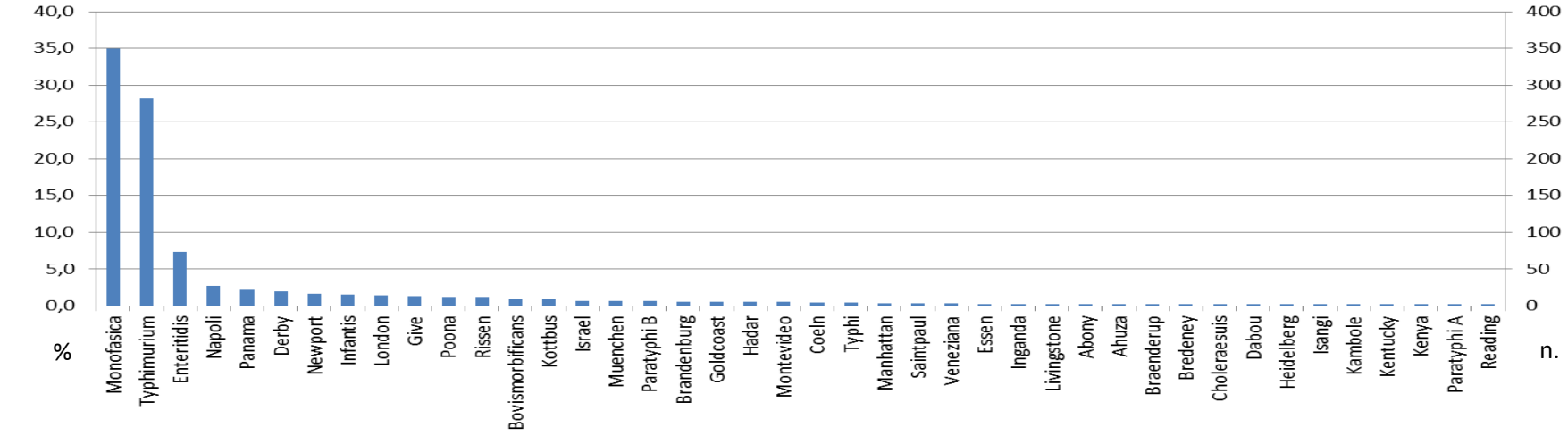
$$D = 1 - \sum_{i=1}^{S} \frac{n_i\left(n_i - 1\right)}{N\left(N - 1\right)}$$

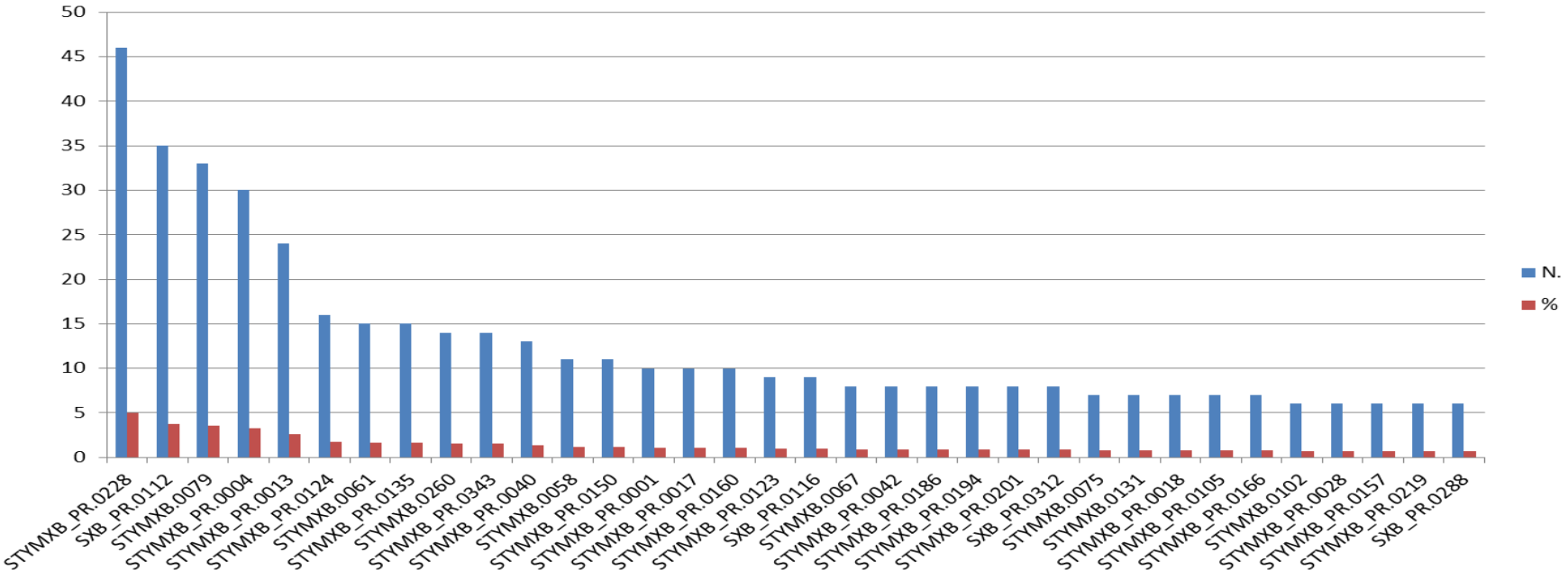
$s = \text{numero tipi}$

$n_i = \text{numero di individui nel tipo } iesimo$

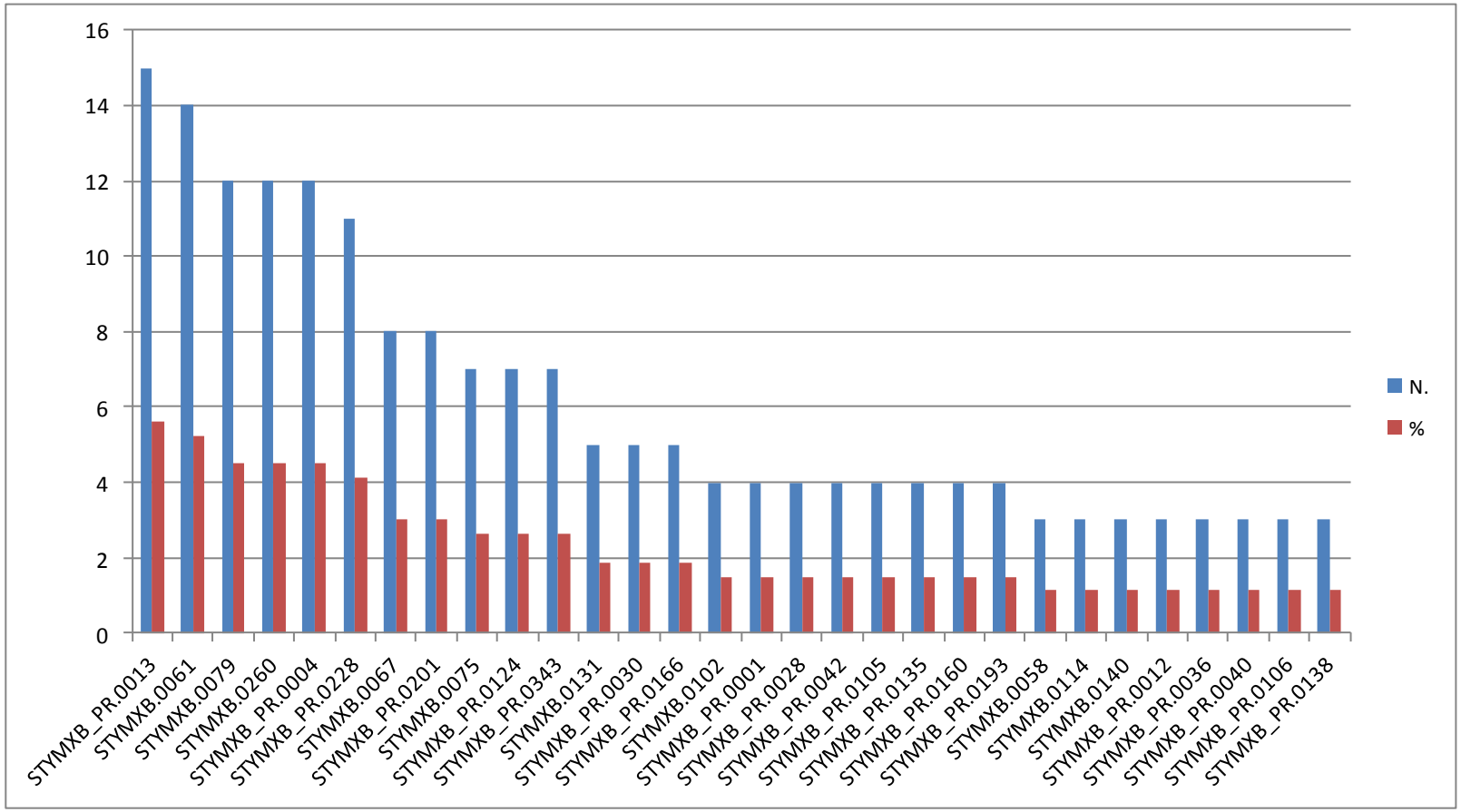
$N = \text{totale individui}$

isolati dell'anno 2012 (*n=924*) - sierotipi *vs* genotipi

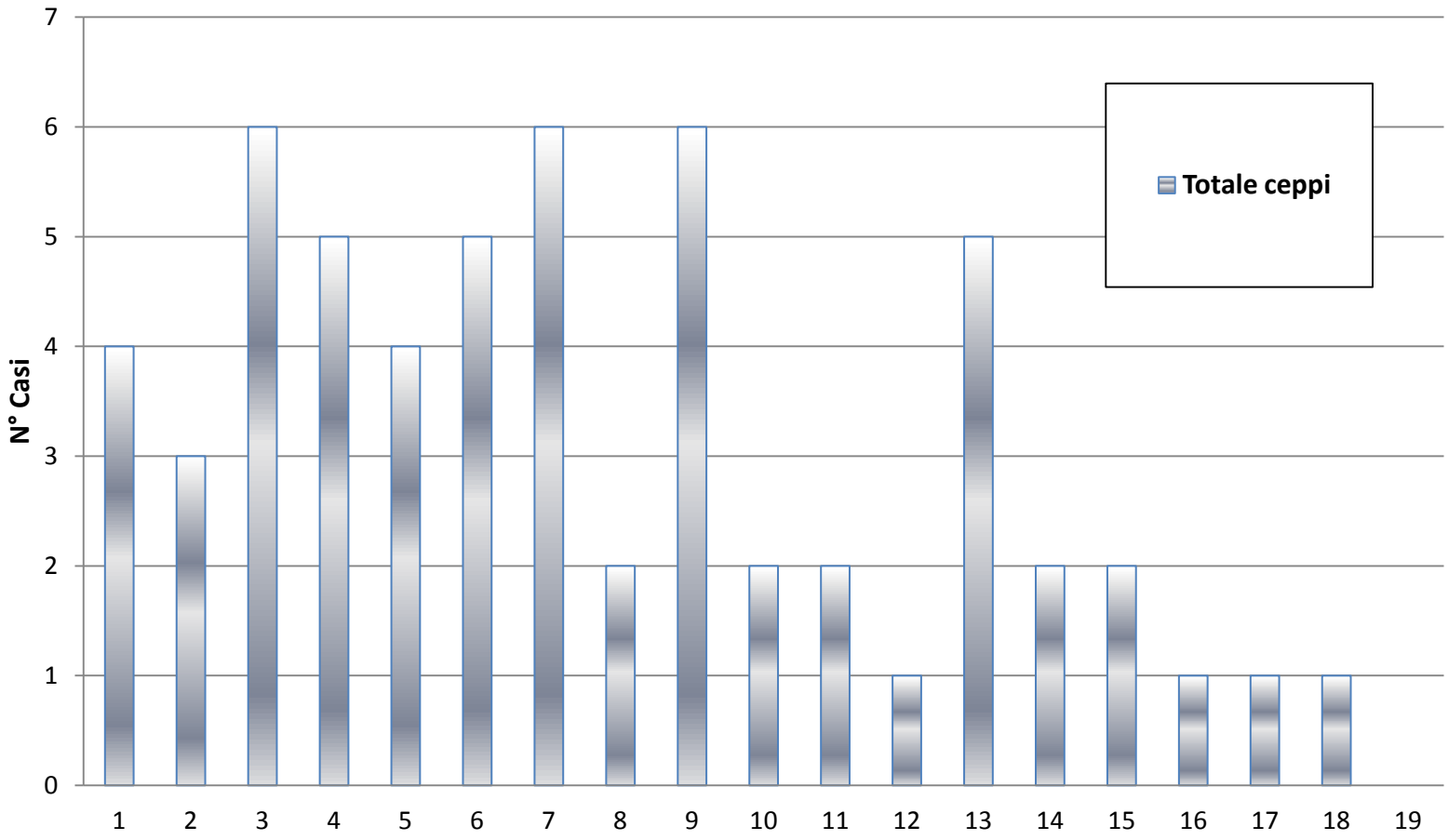




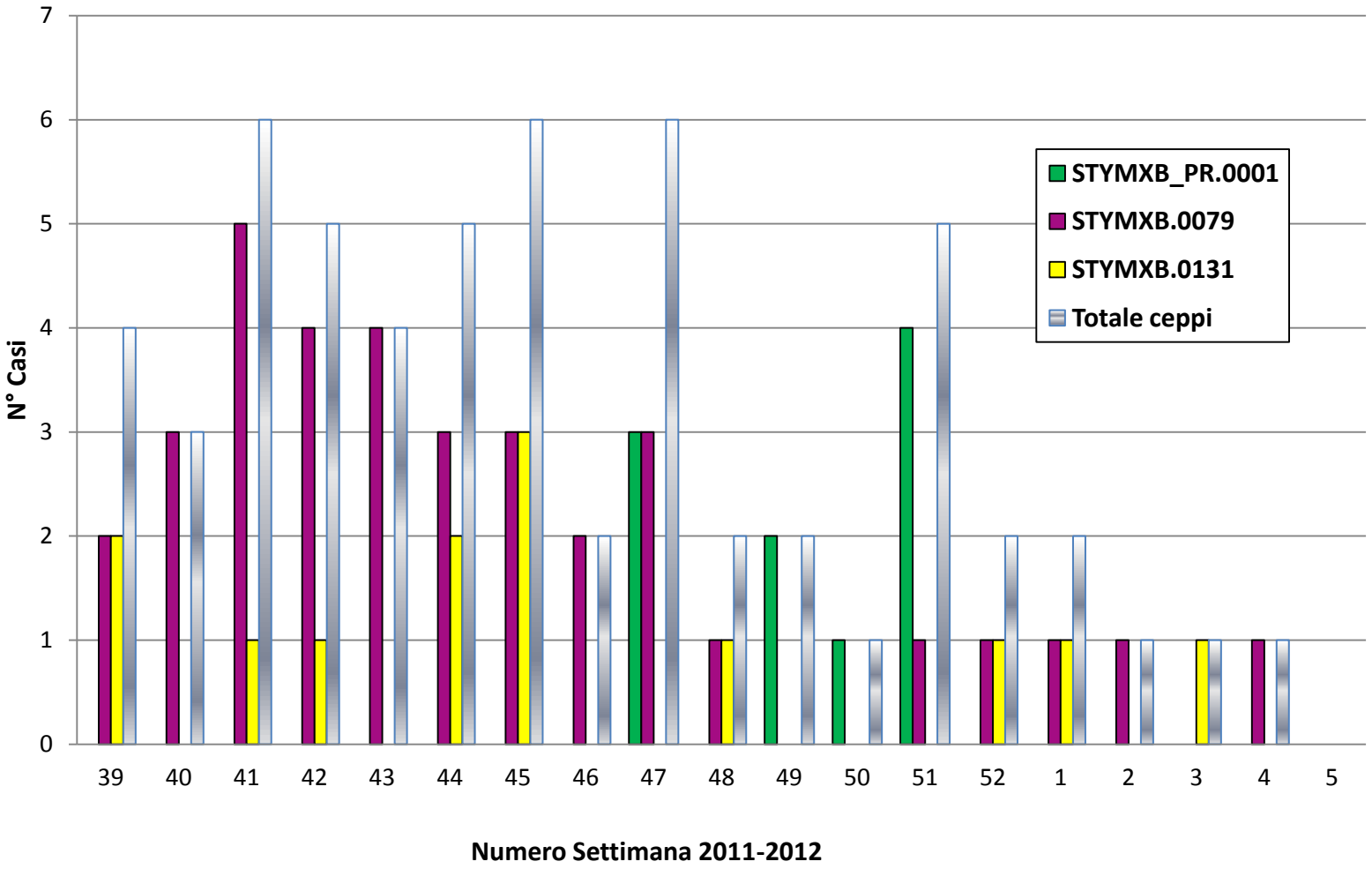
anno 2012: Typhimurium - 267 isolati, 91 genotipi (in grafico n ≥3)



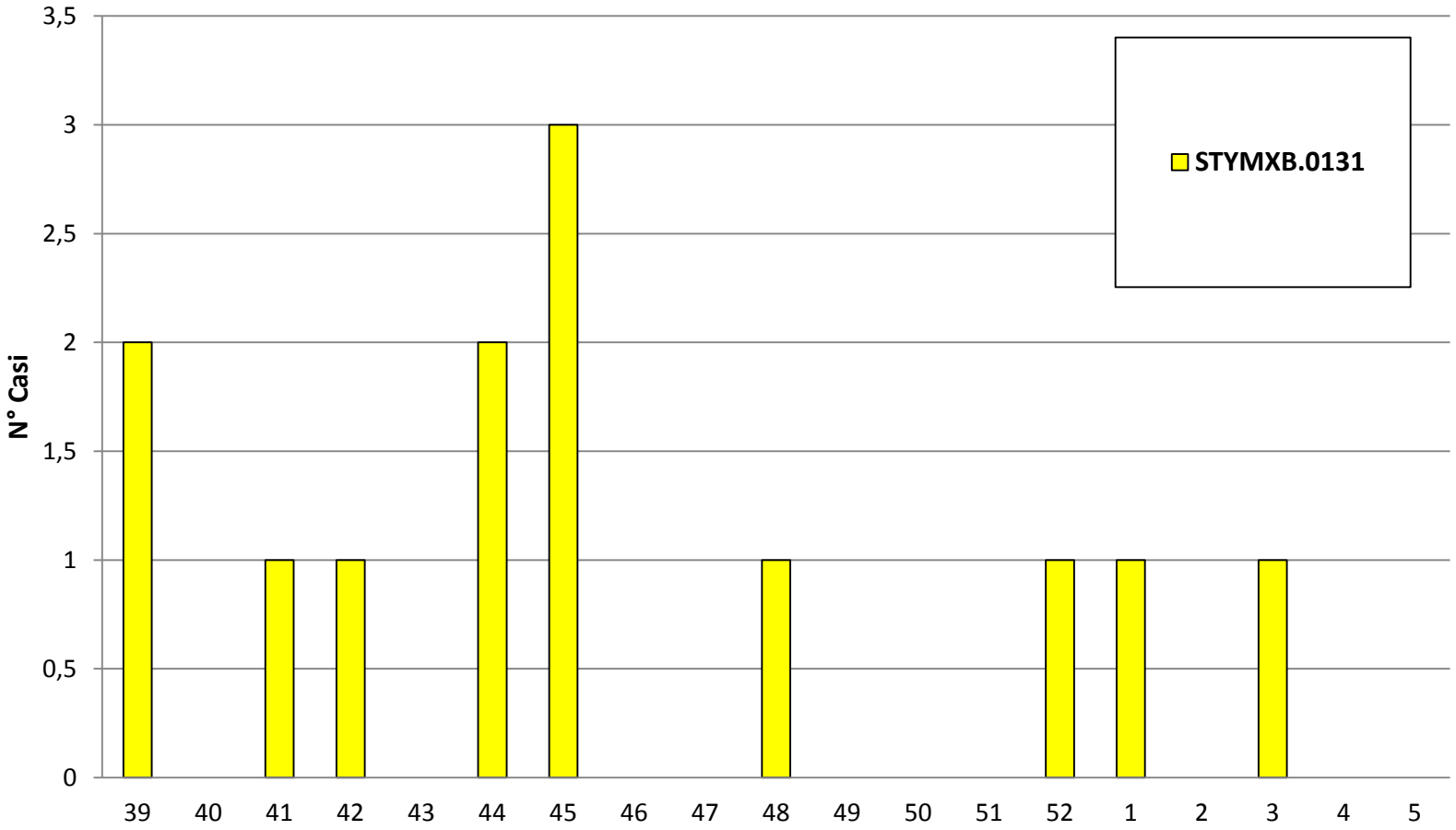
Salmonella enterica Monofasica



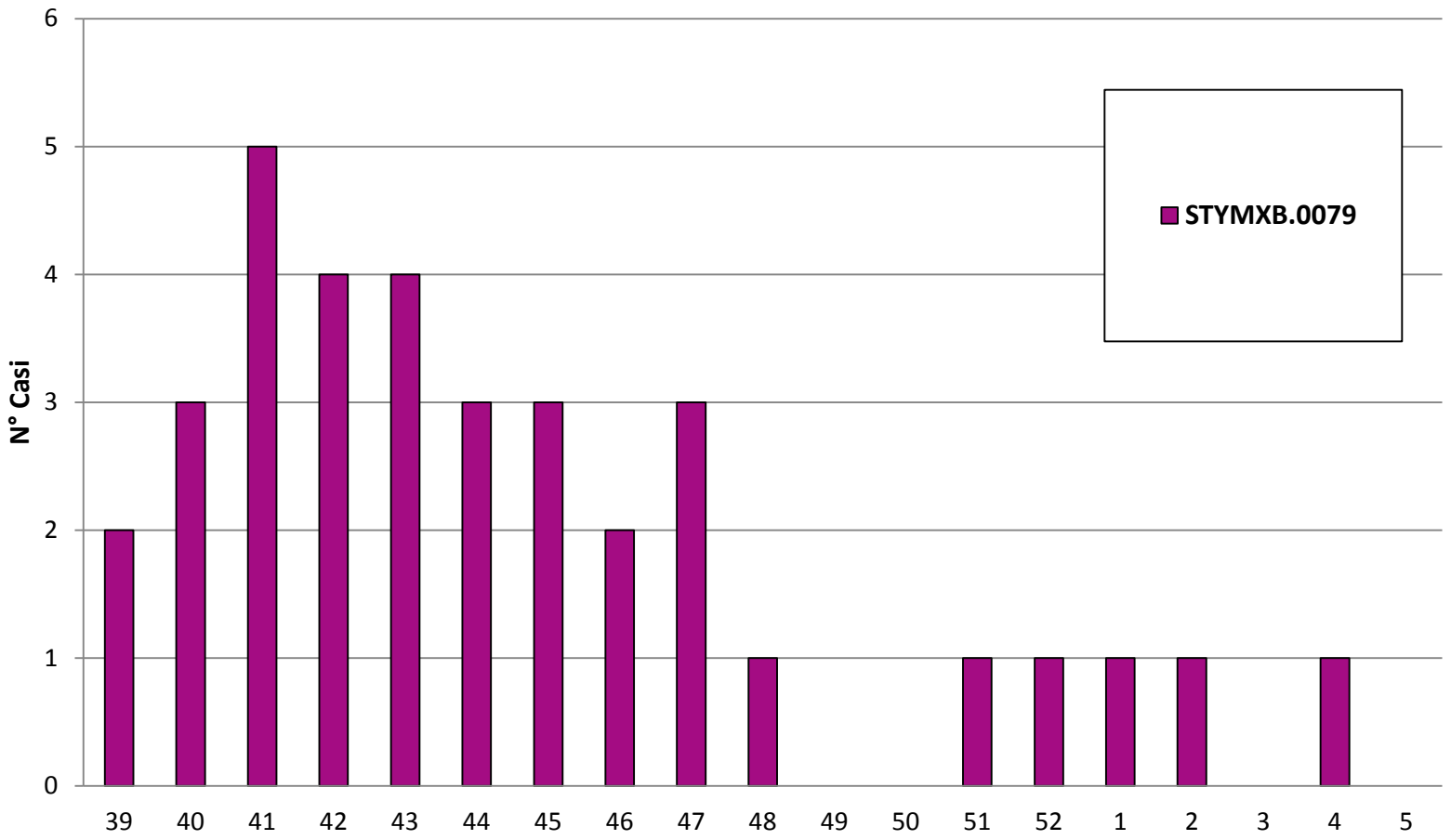
Salmonella enterica Monofasica

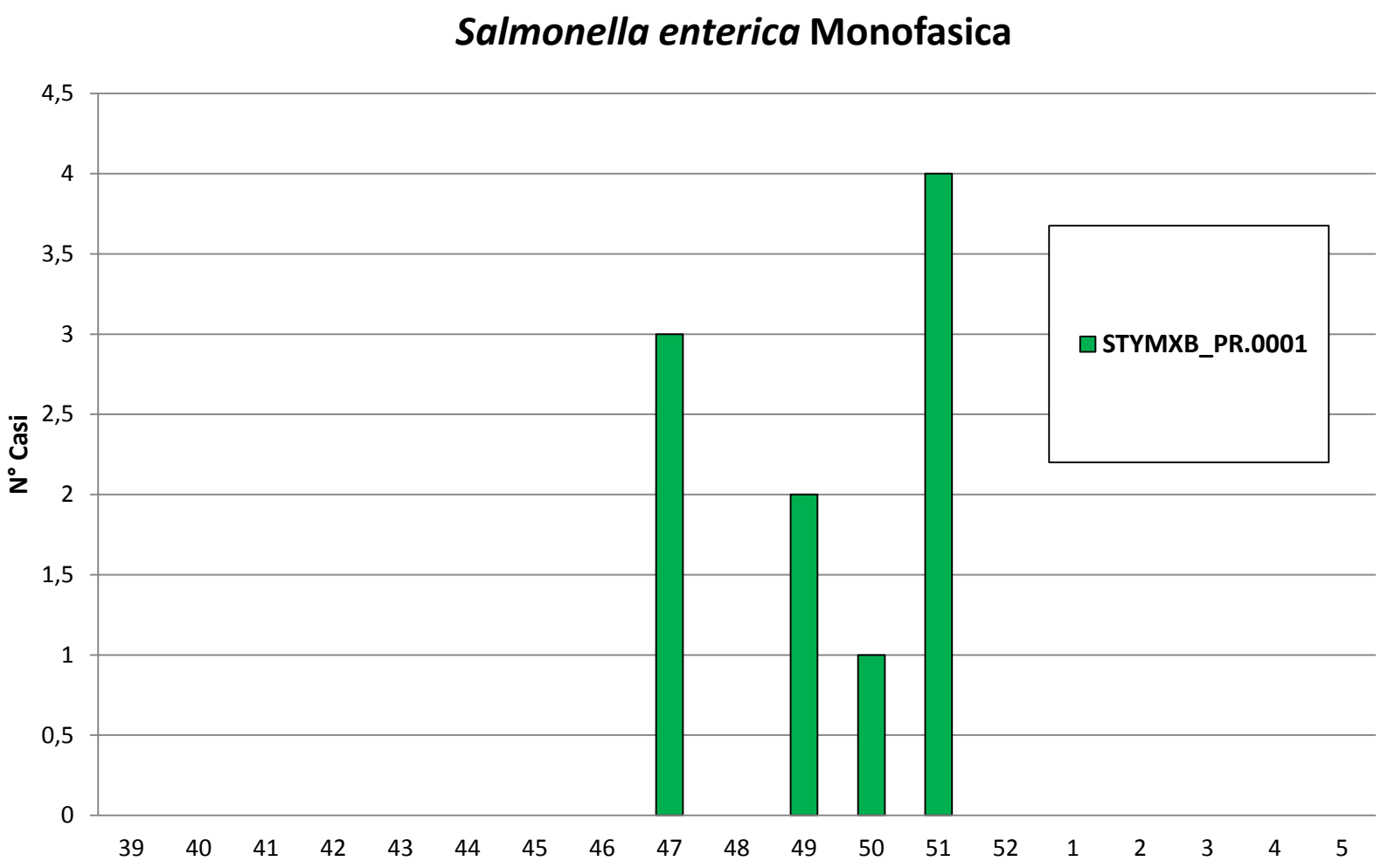


Salmonella enterica Monofasica

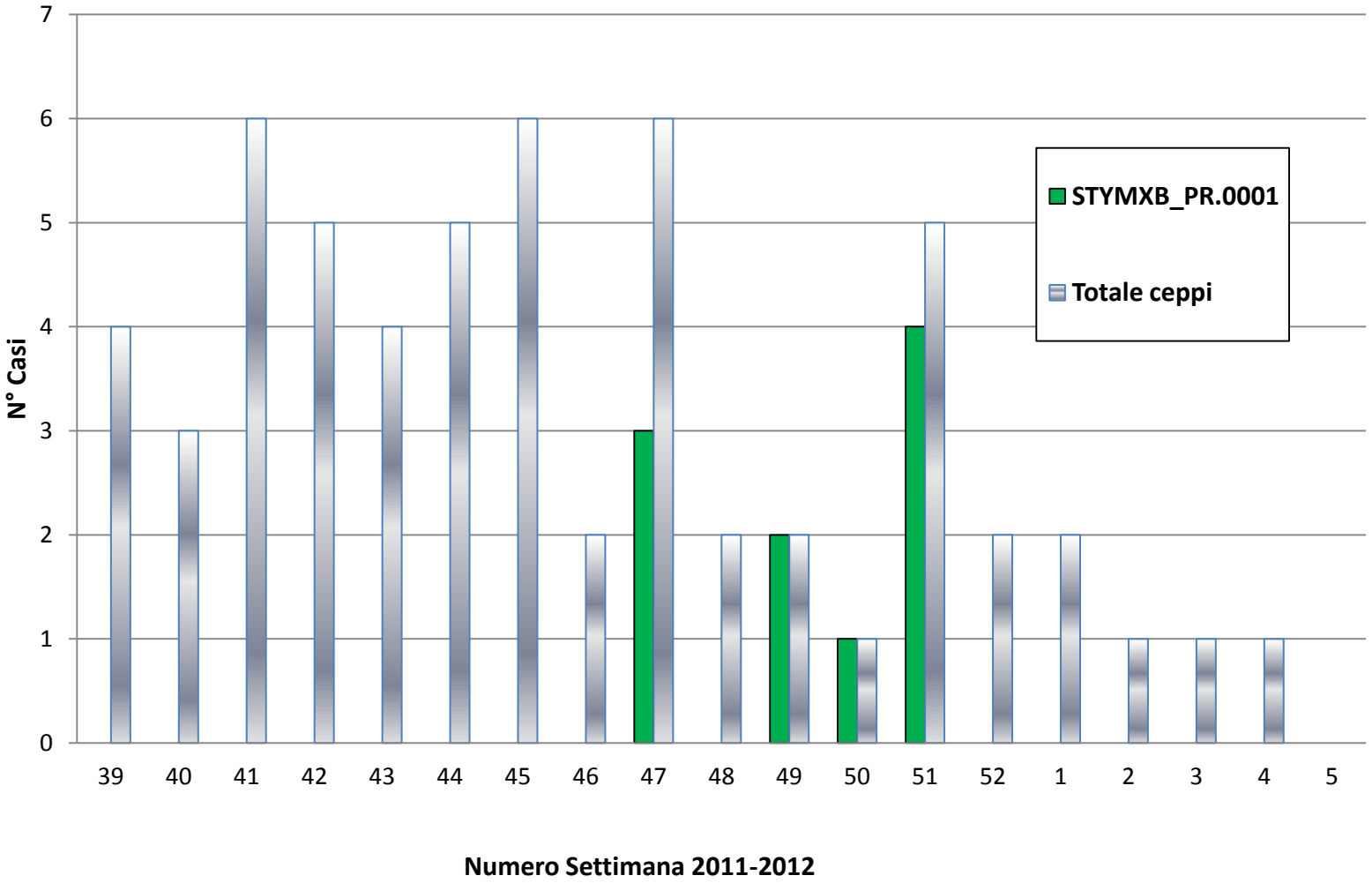


Salmonella enterica Monofasica



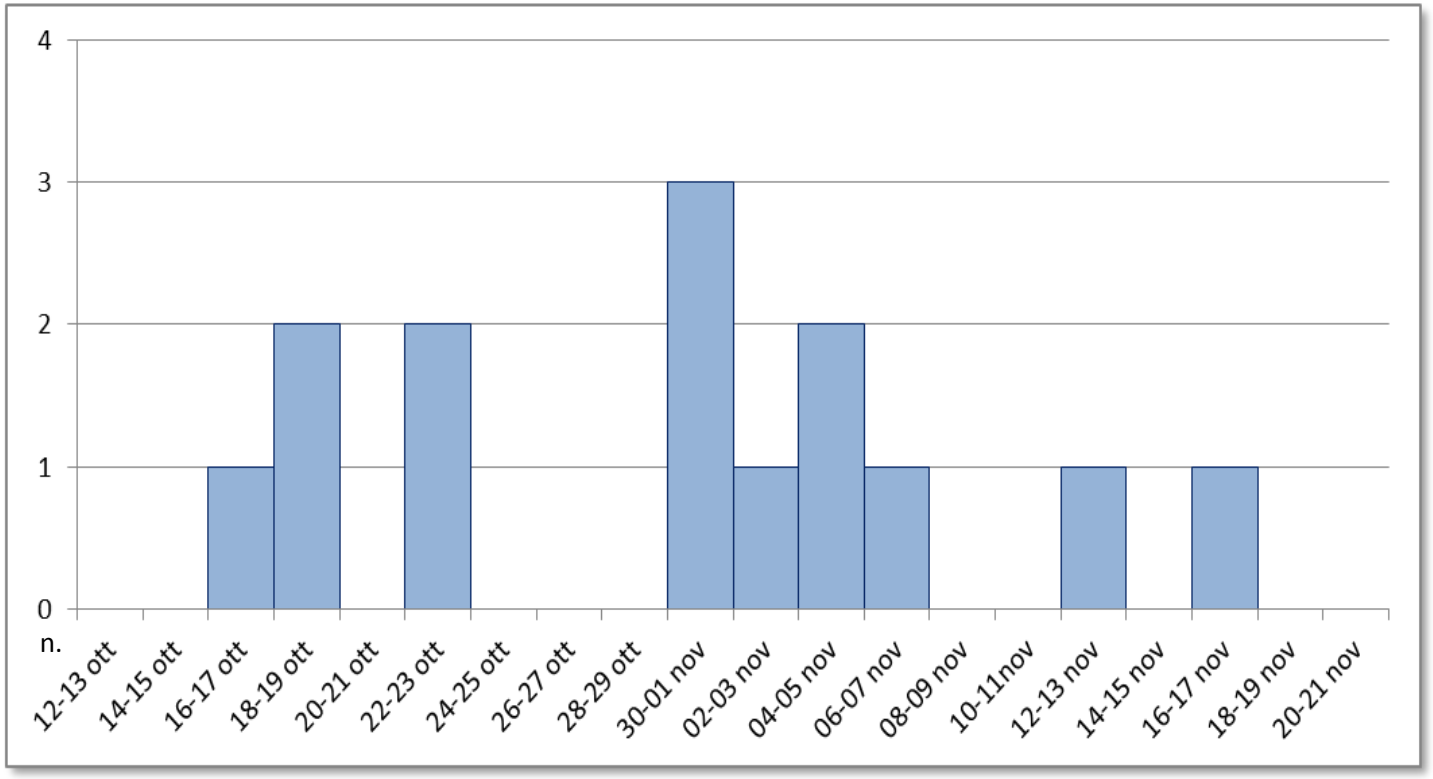

Salmonella enterica Monofasica
N° Casi
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
1
2
3
4
5
STYMXB_PR.0001

Salmonella enterica Monofasica

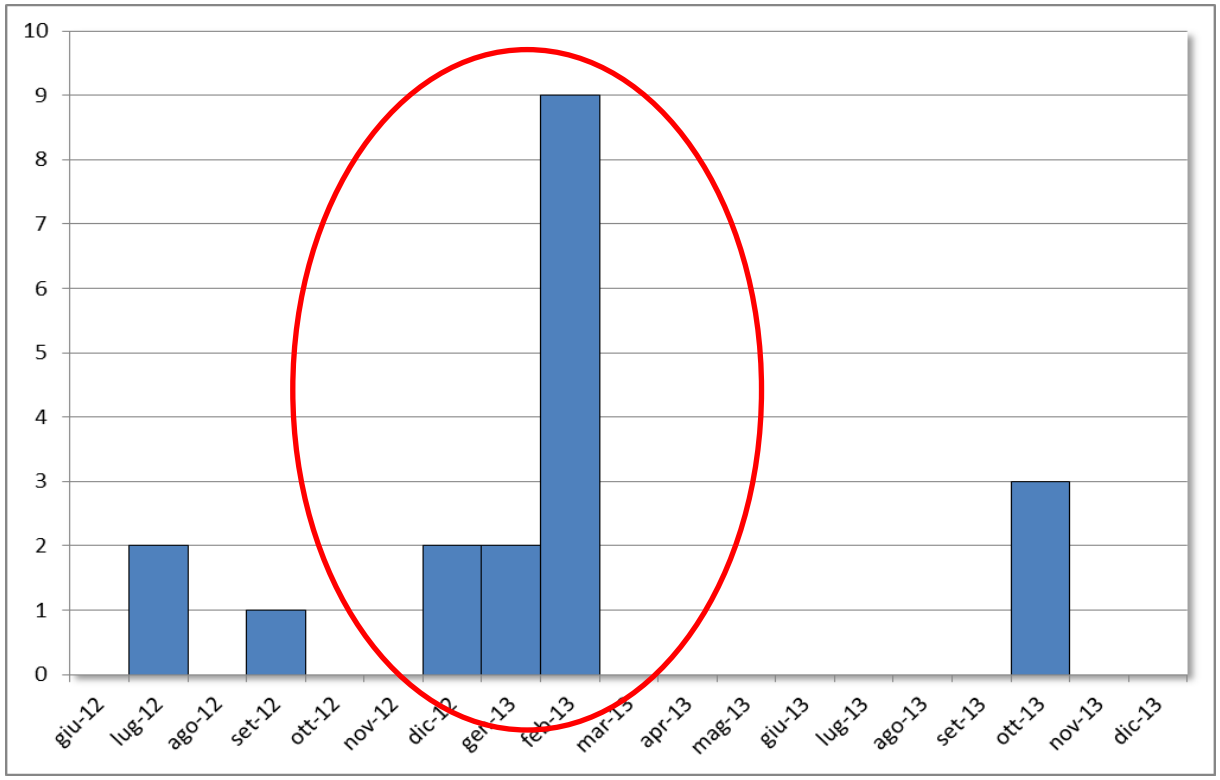


- Sierotipo Typhimurium Var. Monofasica
- **STYMXB.0260** 14 isolati nel periodo 16/10/2012-16/11/2012

3 province e 9 comuni interessati



- Sierotipo Muenchen
- **SXB_BS.0091** 13 isolati nel periodo 12/2012-02/2013
- 21 isolati **SXB_BS.0091** nel database, altri 7 in altri 3 genotipi

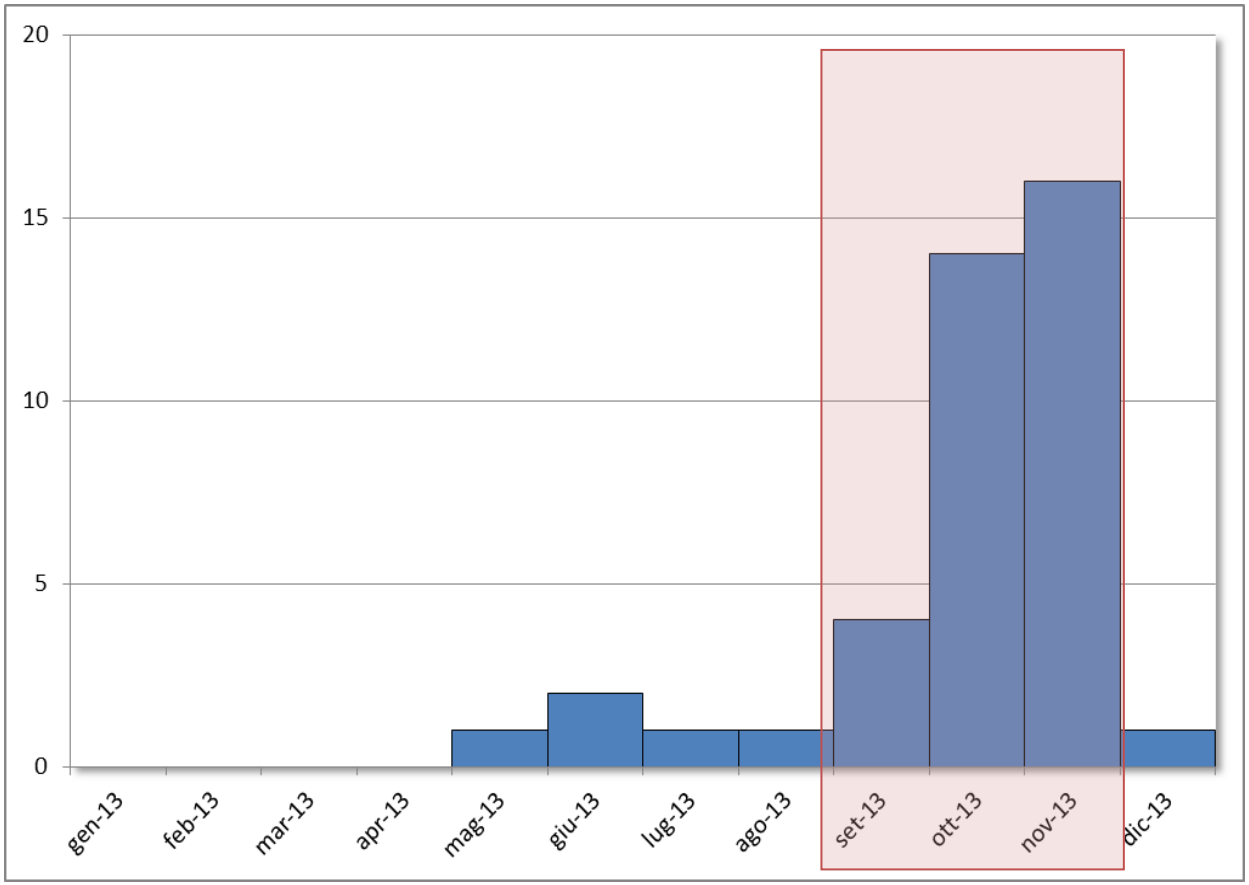


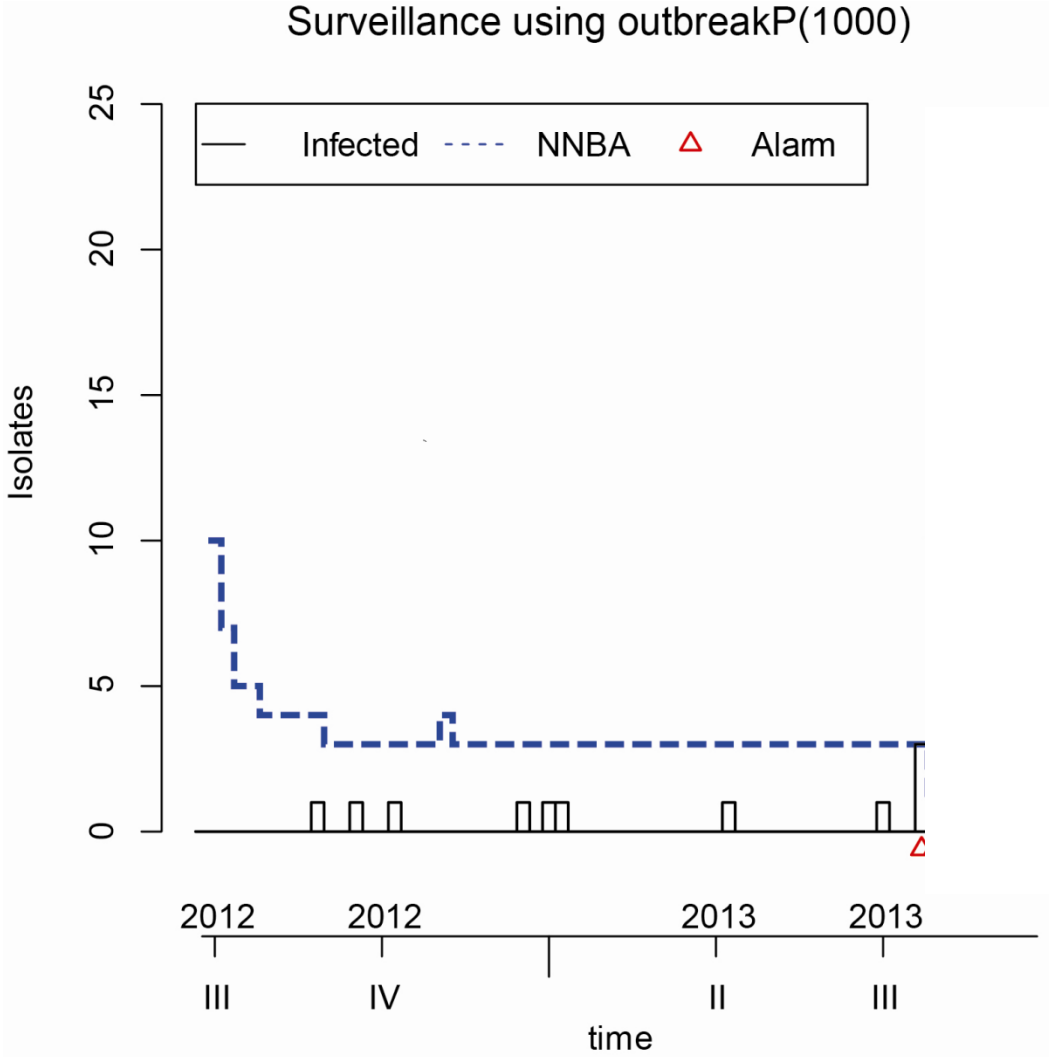
5 province

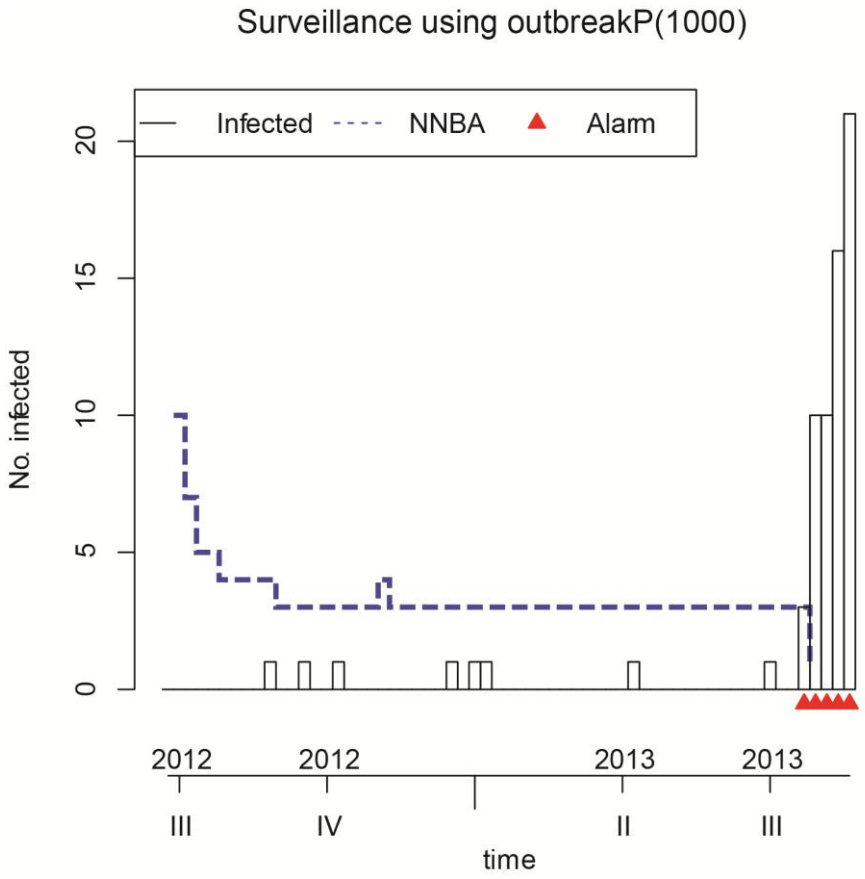
- Sierotipo Typhimurium Var. Monofasica
- **STYMXB_PR.0228** - 5 isolati in unica sezione del medesimo asilo
- 1 caso seguito dopo 19 gg da altri 4 in una sola settimana

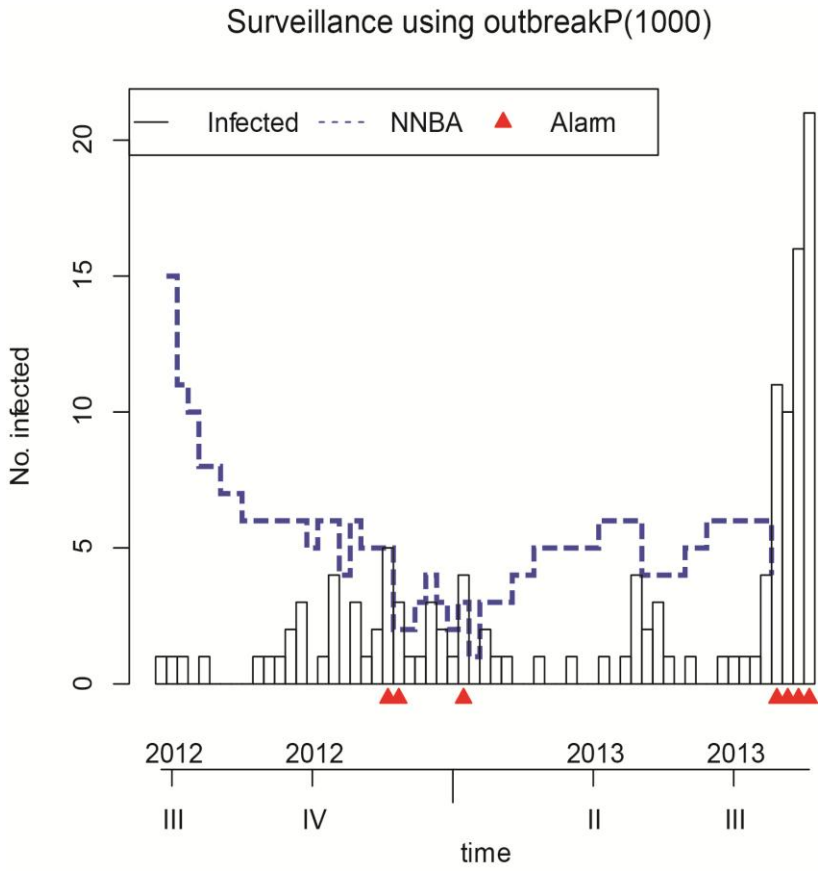
- Sierotipo Typhimurium Var. Monofasica
- **STYMXB_PR.0277** - 5 isolati in nucelo famigliare (1 decesso) 25.01.2013-01.02.2013
- salame casalingo positivo con identico genotipo
- genotipo riscontrato solo 1 sola volta in precedenza

- **STYMXB_PR.0004** - 50% casi a Modena
- Identificata la fonte in salumificio

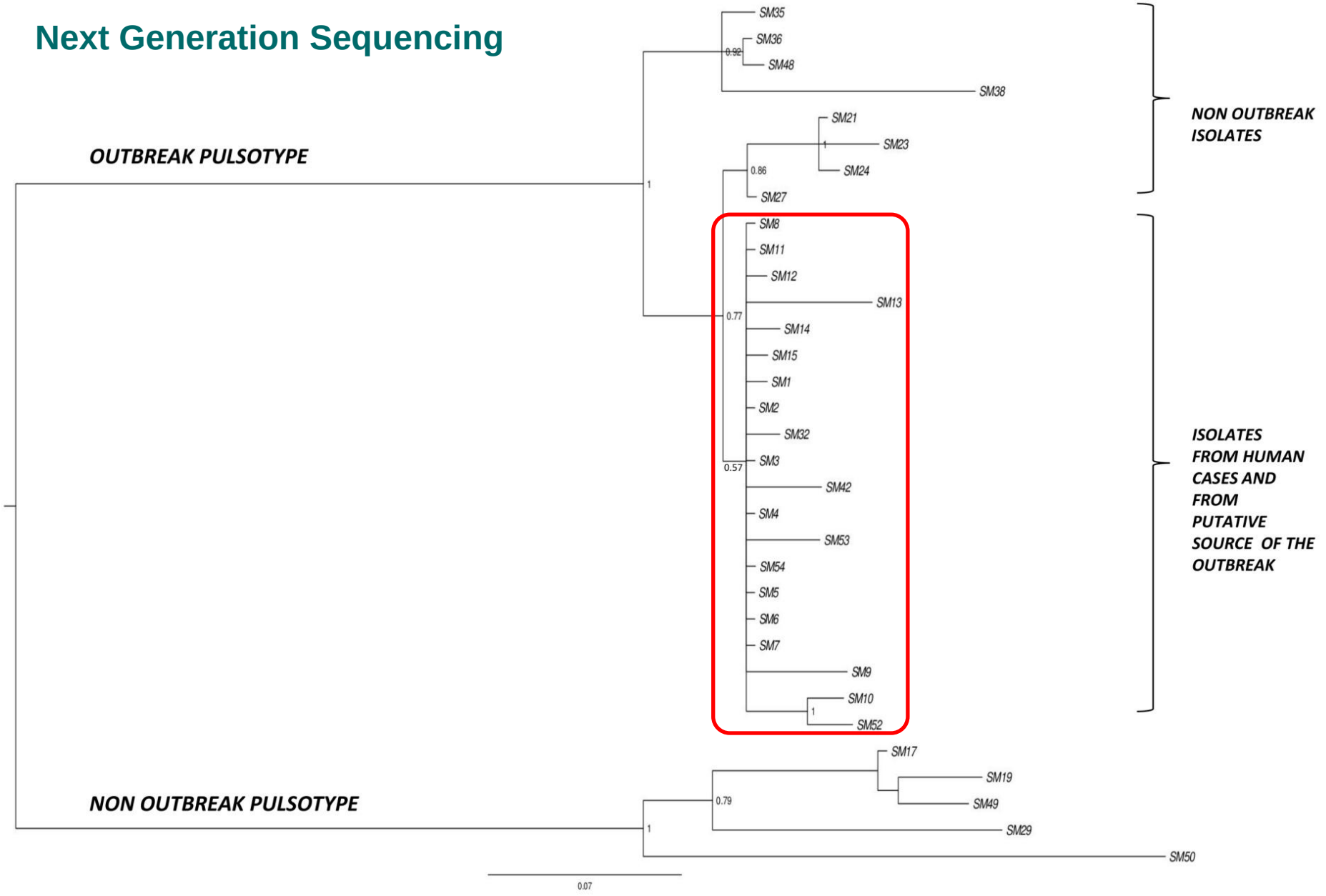


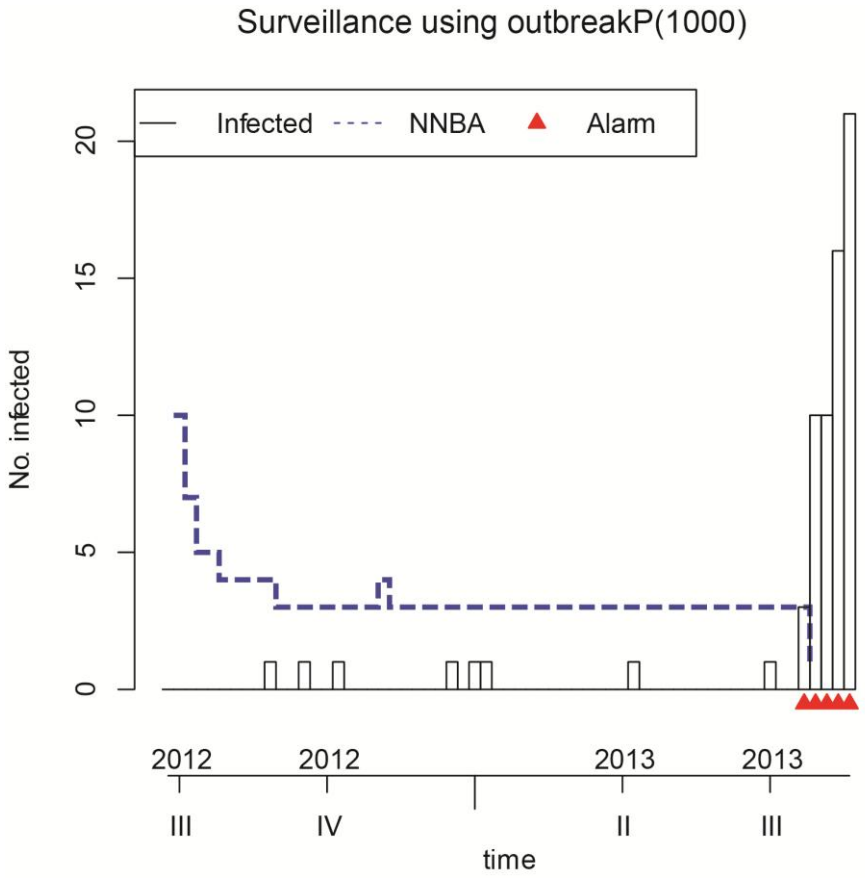

Surveillance using outbreakP(1000)
Infected
NNBA
Alarm
Isolates
0
5
10
15
20
25
2012
2012
2013
2013
III
IV
II
III
time

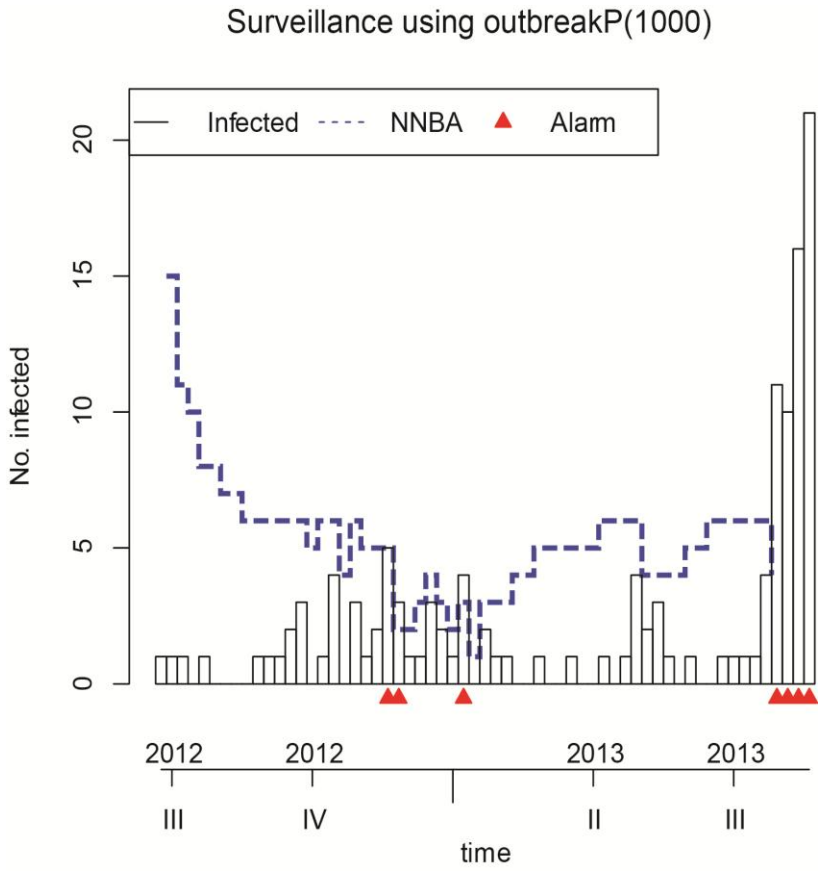

Surveillance using outbreakP(1000)
Infected
NNBA
Alarm
No. infected
0
5
10
15
20
2012
2012
2013
2013
III
IV
II
III
time

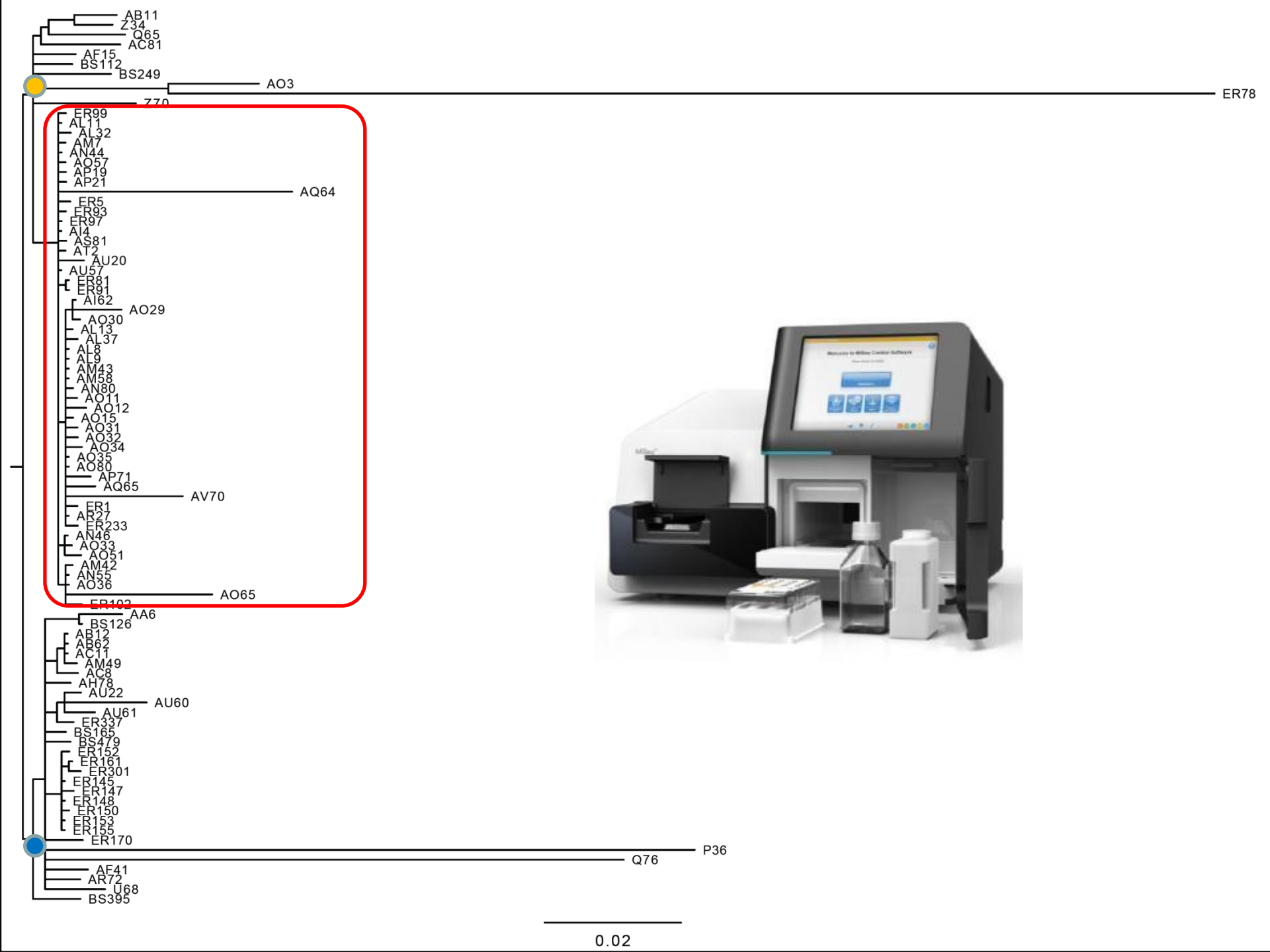

Surveillance using outbreakP(1000)
Infected
NNBA
Alarm
No. infected
0
5
10
15
20
2012
2012
2013
2013
III
IV
II
III
time

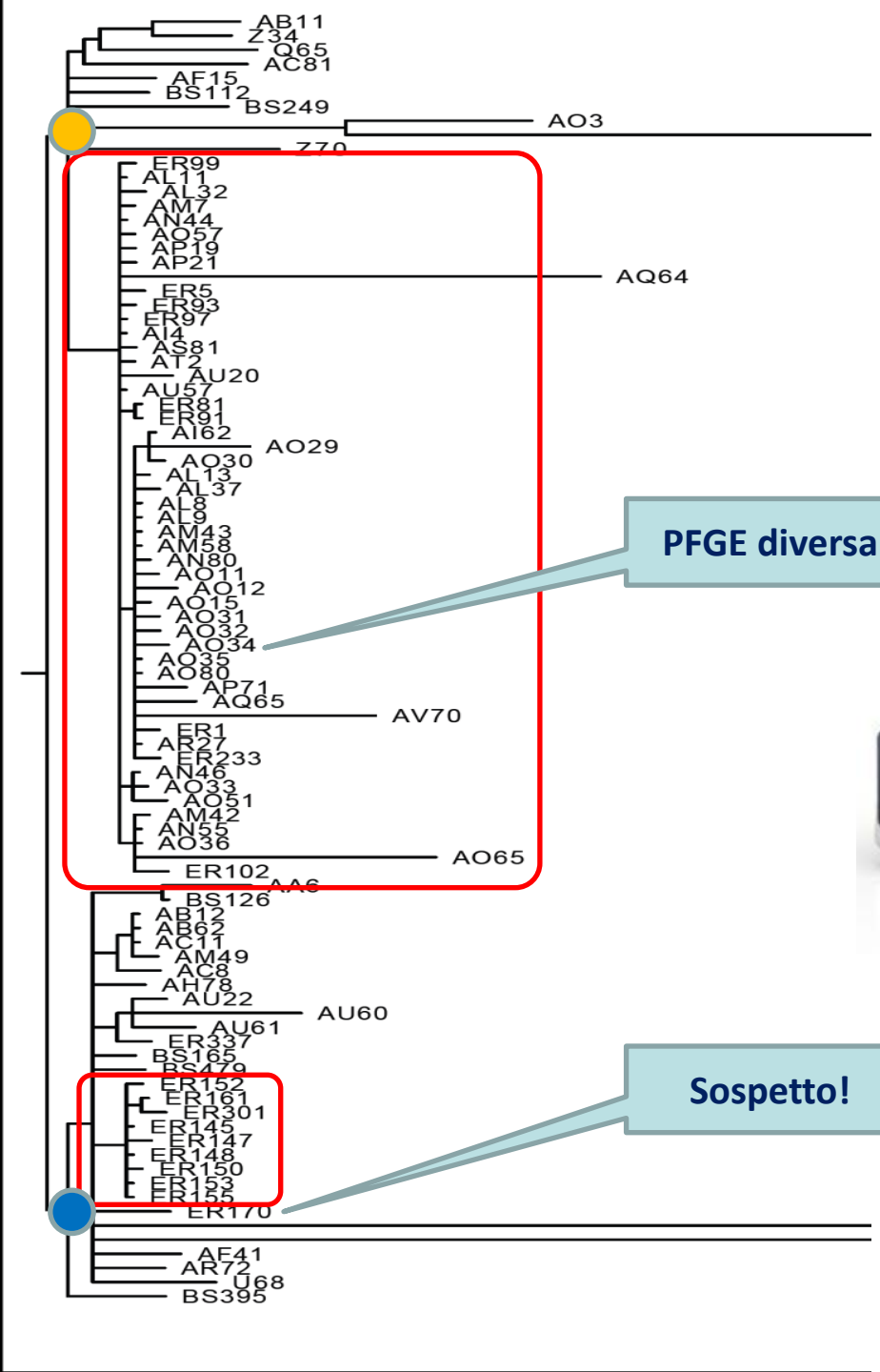
Next Generation Sequencing




Surveillance using outbreakP(1000)
Infected
NNBA
Alarm
No. infected
0
5
10
15
20
2012
2012
2013
2013
III
IV
II
III
time


Surveillance using outbreakP(1000)
Infected
NNBA
Alarm
No. infected
0
5
10
15
20
2012
2012
2013
2013
III
IV
II
III
time


AB11
Z34
Q65
AC81
AF15
BS112
BS249
AO3
ER78
Z70
ER99
AL11
AL32
AM7
AN44
AO57
AP19
AP21
AQ64
ER5
ER93
ER97
AI4
AS81
AT2
AU20
AU57
ER81
ER91
AI62
AO29
AO30
AL13
AL37
AL8
AL9
AM43
AM58
AN80
AO11
AO12
AO15
AO31
AO32
AO34
AO35
AO80
AP71
AQ65
AV70
ER1
AR27
ER233
AN46
AO33
AO51
AM42
AN55
AO36
AO65
ER102
AA6
BS126
AB12
AB62
AC11
AM49
AC8
AH78
AU22
AU60
AU61
ER337
BS165
BS479
ER152
ER161
ER301
ER145
ER147
ER148
ER150
ER153
ER155
ER170
P36
Q76
AF41
AR72
U68
BS395
0.02


AB11
Z34
Q65
AC81
AF15
BS112
BS249
AO3
Z70
ER99
AL11
AL32
AM7
AN44
AO57
AP19
AP21
AQ64
ER5
ER93
ER97
AI4
AS81
AT2
AU20
AU57
ER81
ER91
AI62
AO29
AO30
AL13
AL37
AL8
AL9
AM43
AM58
AN80
AO11
AO12
AO15
AO31
AO32
AO34
AO35
AO80
AP71
AQ65
AV70
ER1
AR27
ER233
AN46
AO33
AO51
AM42
AN55
AO36
AO65
ER102
BS126
AB12
AB62
AC11
AM49
AC8
AH78
AU22
AU60
AU61
ER337
BS165
BS479
ER152
ER161
ER301
ER145
ER147
ER148
ER150
ER153
ER170
AF41
AR72
U68
BS395
PFGE diversa
Sospetto!

Tutto questo è possibile grazie a:

- Servizio di Sanità Pubblica Emilia-Romagna
- Servizio Veterinario Emilia-Romagna
- Rete AO e ASL regionali
- IZSLER
- Chiara Chiapponi
- Marina Morganti
- Erika Scaltriti
- Luca Bolzoni
- Francesca Albonico
- Gabriele Casadei

Domande