

Le tecniche molecolari nell'epidemiologia infettiva e nella sorveglianza delle Hospital Acquired Infections (HAI)

Dott.ssa G. Scalet

Sezione Microbiologia-Dipartimento Di Patologia e Diagnostica

Università di Verona

CIBIO-Università di Trento

Analisi del genoma in batteriologia

Obiettivi

- **identificazione rapida a diversi livelli tassonomici**
- **stabilire la relazione clonale tra ceppi**
- **studio di popolazioni microbiche**
 - » a livello globale
 - » a livello nazionale/regionale
 - » a livello di singolo ospedale/reparto
- **identificare geni di virulenza**
- **identificare determinanti di resistenza agli antimicrobici**



Importanza del genotyping nell'epidemiologia delle HAI

- **Determinare la fonte di infezione.**
- **Monitorare la cross-trasmissione dell'agente.**
- **Riconoscere ceppi noti per essere
particolarmente virulenti.**

Criteria for the choice of the method

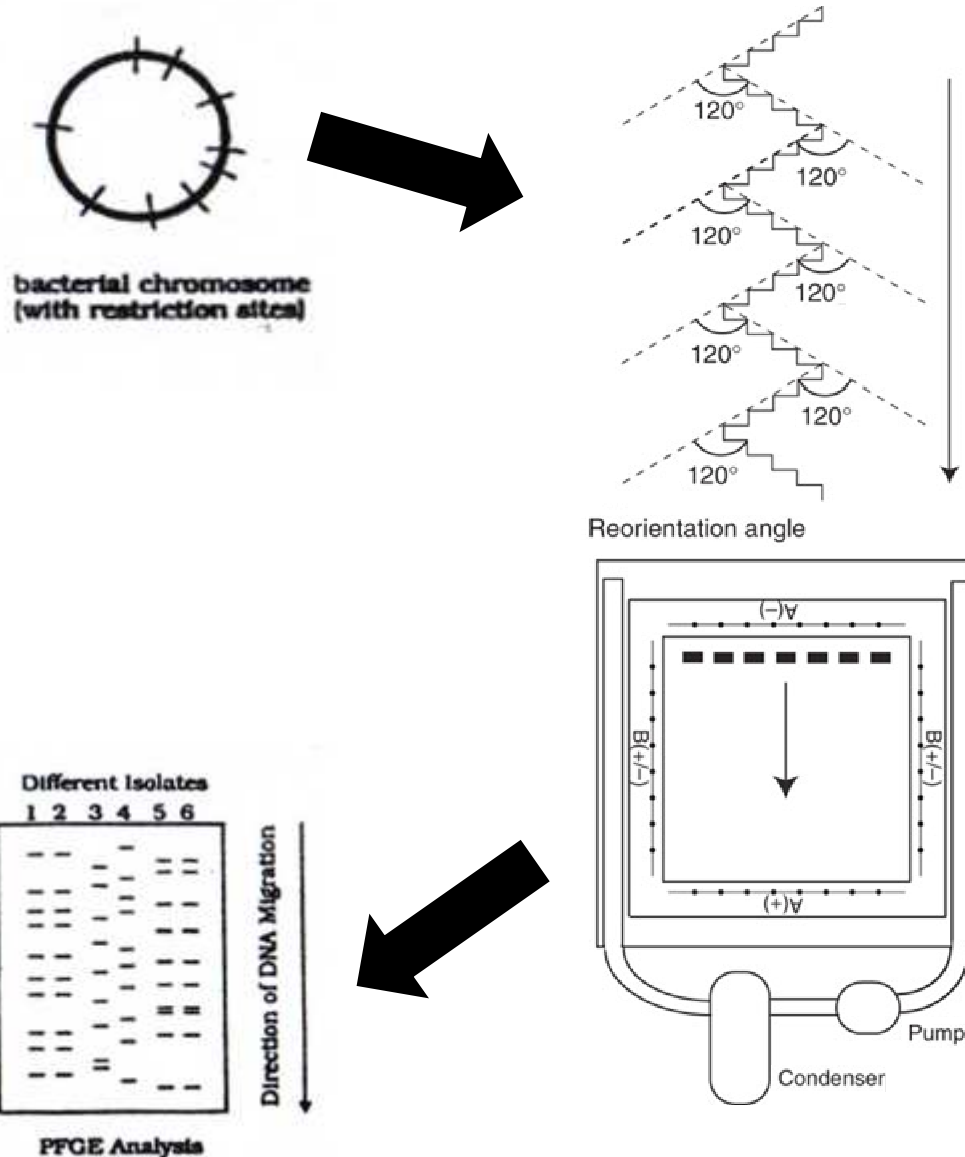
- **applicabile a tutti i ceppi di una specie**
- **elevato potere discriminante**
- **buona riproducibilità intra- e interlaboratori**
- **rapidità**
- **facilità di interpretazione**
- **facilità di esecuzione**
- **basso costo**

Tecniche di genotyping batterico in epidemiologia

- **restrizione del DNA (RLFP, PFGE)**
- **restrizione & ibridizzazione (ribotipo, RFLP)**
- **PCR (locus specific RFLP, RAPD, REP, ERIC ecc.)**
- **sequenziamento**

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Batteri inclusi in agarosio
↓
Trattamento con proteasi
↓
Digestione con enzima di
restrizione che riconosce siti
infrequenti
↓
Elettroforesi in campo pulsato per
la separazione di frammenti di
10-800kb
↓
Interpretazione

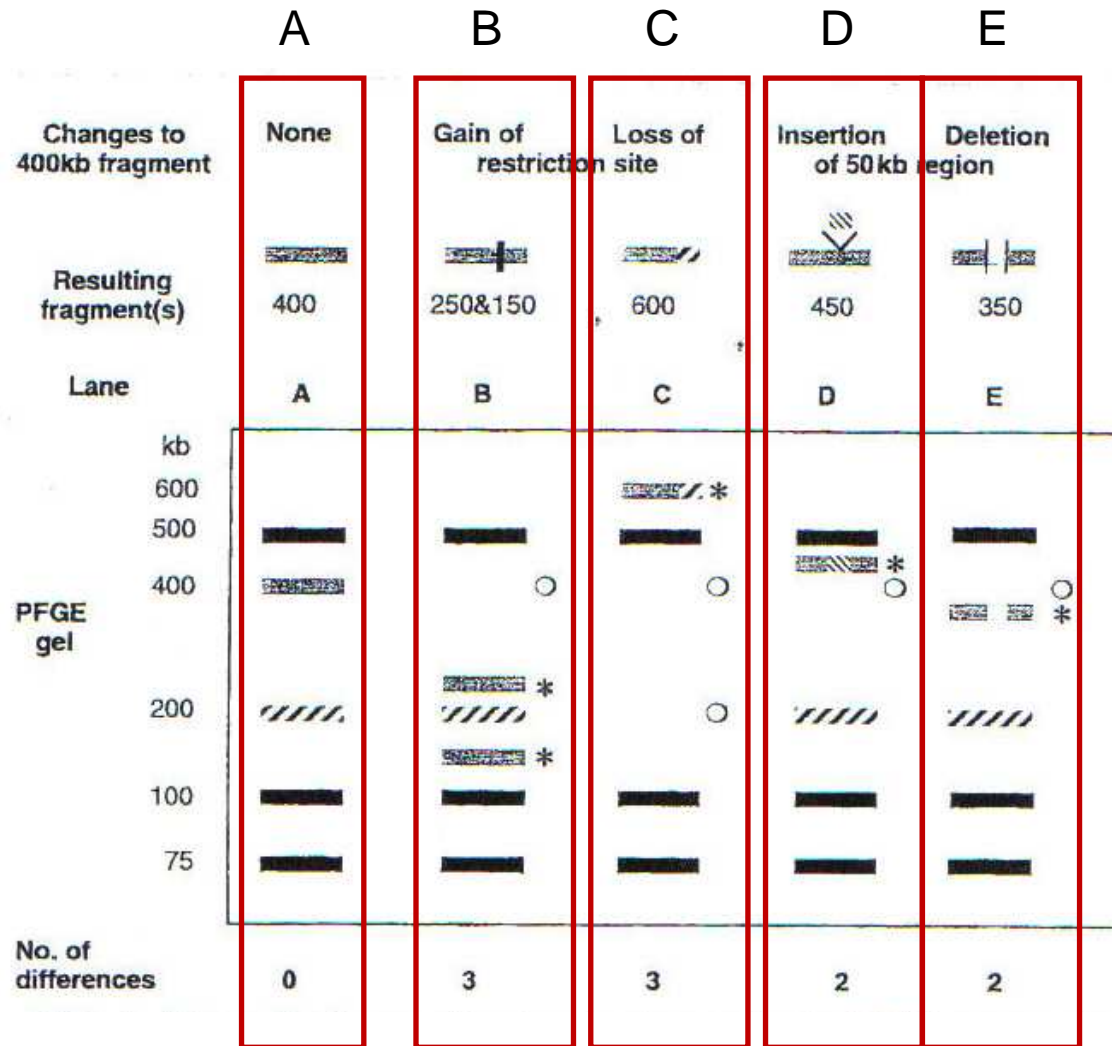


Interpretazione PFGE

criteri di Tenover

Categoria	Numero di mutazioni	Numero di bande differenti	Interpretazione epidemiologica
Indistinguibili	0	0	Il ceppo fa parte dell'epidemia
Strettamente correlati	1	2-3	Il ceppo è probabilmente parte dell'epidemia
Possibilmente correlati	2	4-6	Il ceppo è possibilmente parte dell'epidemia
Non correlati	>3	>7	Il ceppo non è parte dell'epidemia

Interpretazione PFGE



A = ceppo responsabile dell'epidemia

B = acquisizione di sito di restrizione dell'enzima

C = perdita del sito di restrizione dell'enzima

D = inserzione di frammento

E = delezione di frammento

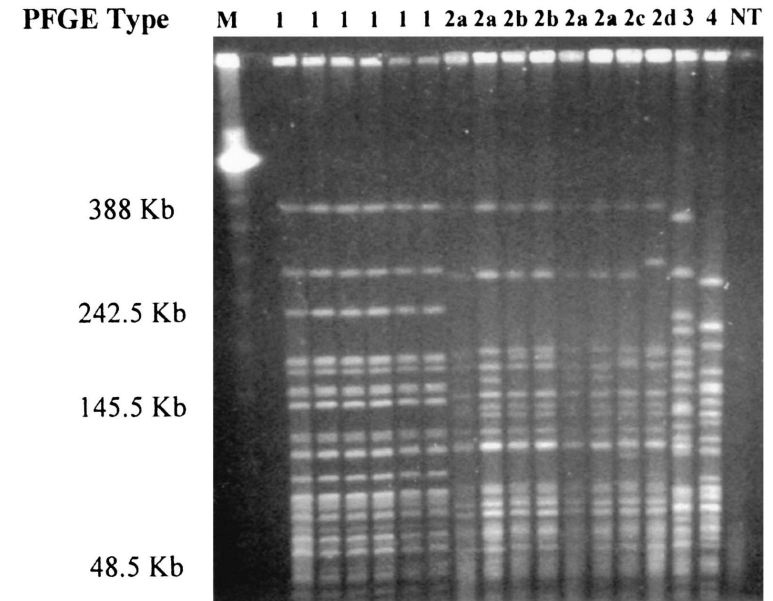
O = frammento presente solo in A

* = frammento assente da A

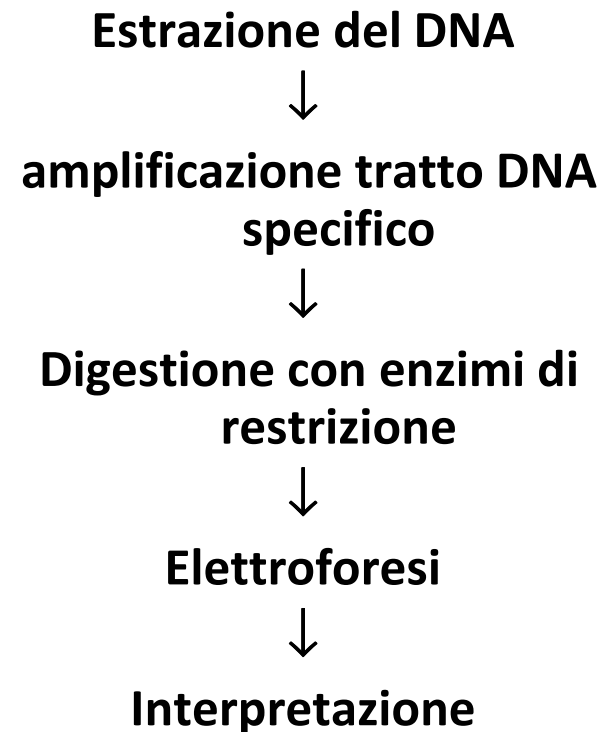
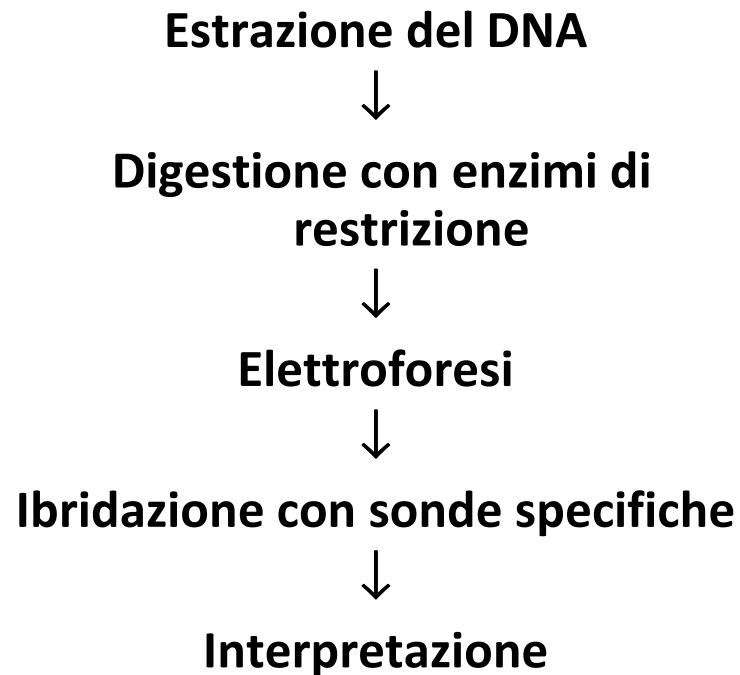
Caratteristiche PFGE

- **GOLD STANDARD**

- Moderatamente facile da usare
- Facile da interpretare
- Elevato potere discriminante
- Risultato in 3 giorni
- Buona riproducibilità intra- e interlaboratori;
- Costi moderati
- Database online

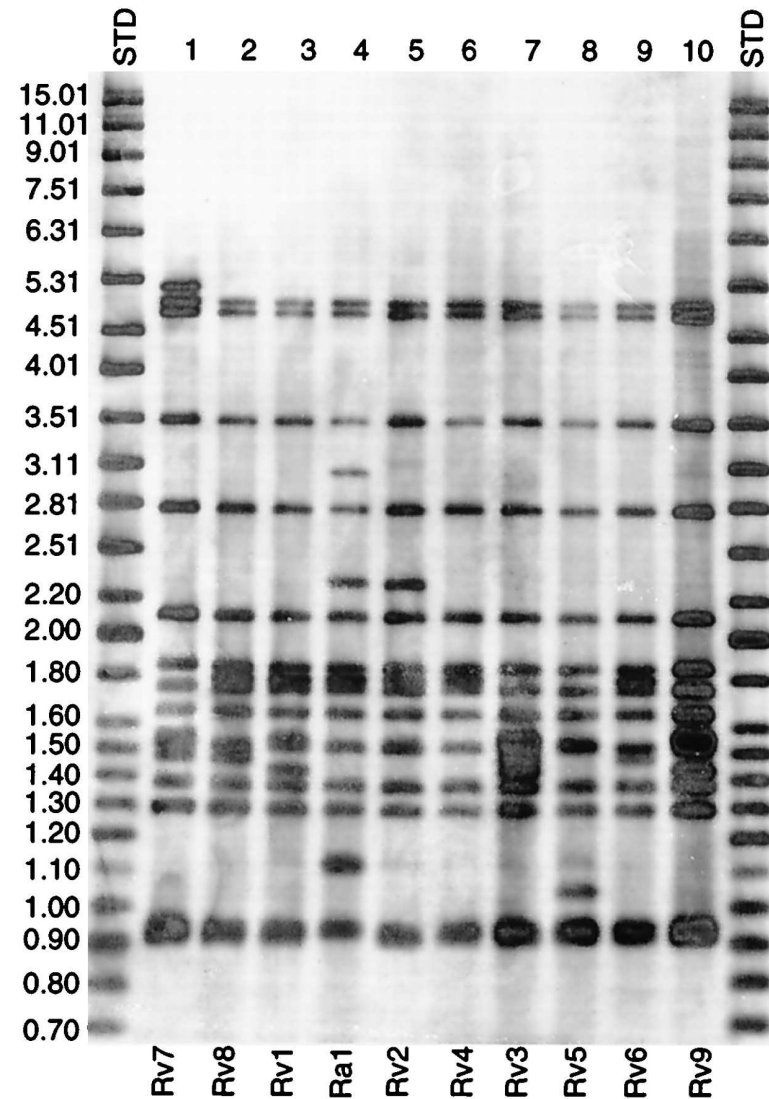


Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) es. ribotyping



Caratteristiche RFLP

- Facile da usare
- Facile da interpretare
- Moderato potere discriminante
- Risultato in 1 giorno
- Buona riproducibilità intra- e interlaboratori
- Costi moderati



Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

- Amplificazione con *primer* corti (9-10 bp) non specifici in condizioni di bassa stringenza

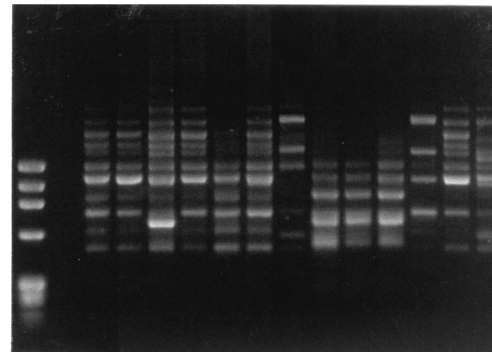


- elettroforesi su gel di frammenti differenti in misura e numero a seconda del ceppo



- confronto dei profili ottenuti dai vari isolati

1353 bp
1078 bp
603 bp
310 bp



Caratteristiche

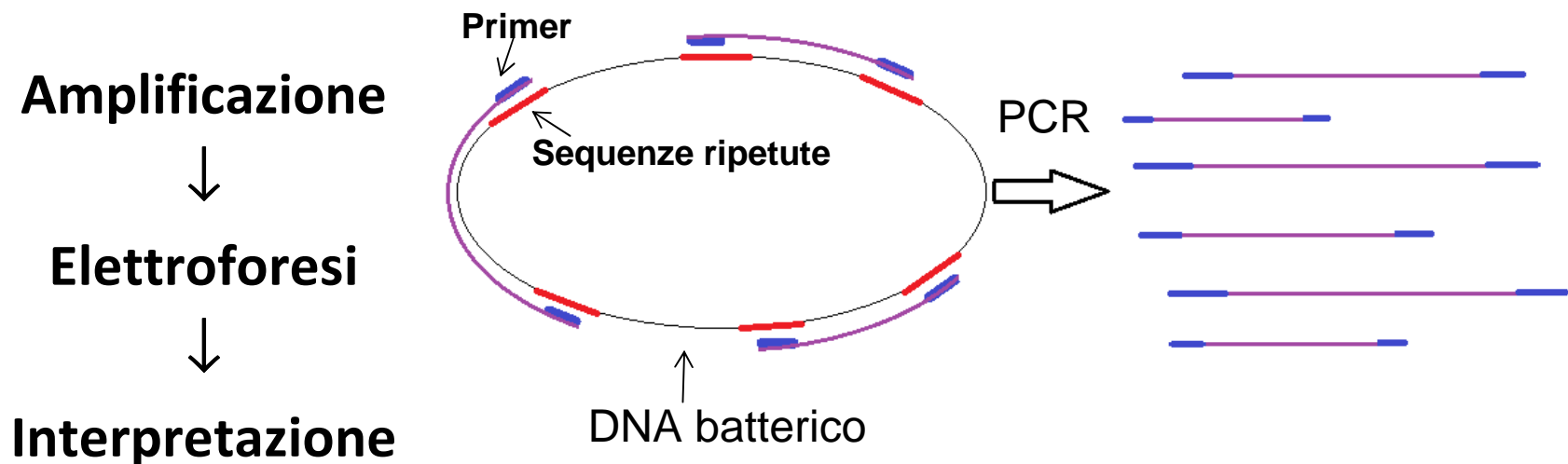
- Facile da usare
- Facile da interpretare
- Risultato in 1 giorno
- Moderata riproducibilità intralaboratorio
- Scarsa riproducibilità interlaboratori
- Costo moderato

Amplificazione di sequenze ripetute (REP)

Si basa sull'amplificazione di regioni genomiche situate fra delle caratteristiche sequenze ripetute che sono state identificate nella maggior parte dei Gram – e Gram +.

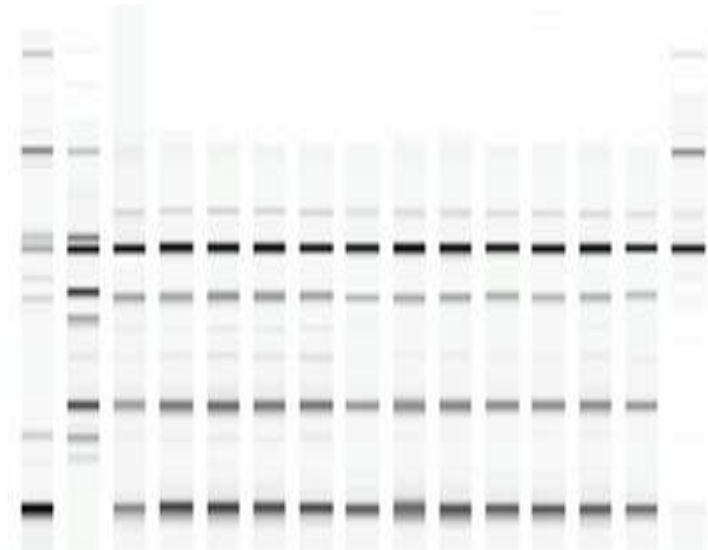
3 famiglie di sequenze ripetute:

- 35-40 bp repetitive extragenic palindromic (**REP**)
- 124-127 bp enterobacterial repetitive intergenic consensus (**ERIC**)
- 154 bp **BOX**



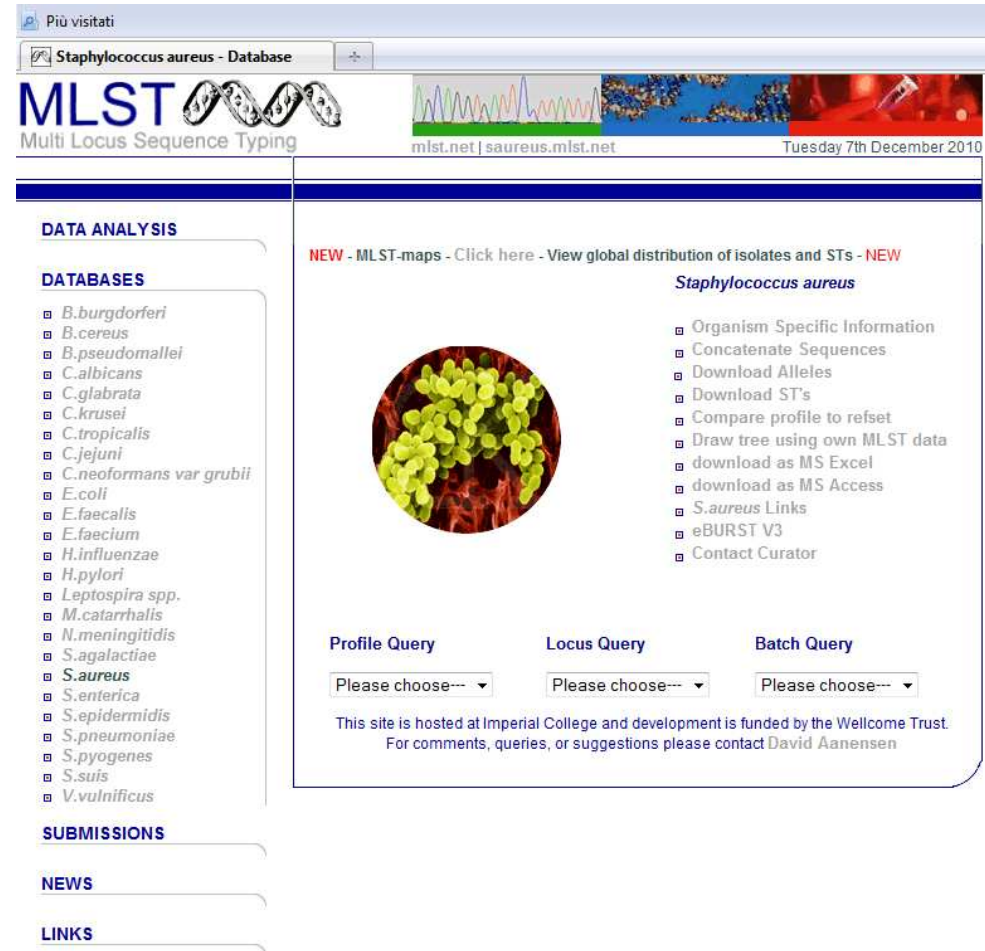
Caratteristiche REP

- Facile da usare
- Facile da interpretare
- Elevato potere discriminante
- Risultato dopo 1 giorno
- Buona riproducibilità intra laboratori
- Moderata riproducibilità interlaboratori
- Non necessita conoscenze pregresse sull'organismo
- Costo moderato



Multilocus sequencing typing (MLST)

- Sequenziamento di 7-8 frammenti di DNA appartenenti a geni *house-keeping*
- Le sequenze sono confrontate *on-line* con una banca dati contenente tutti gli alleli fino ad oggi sequenziati
- Ogni allele viene identificato con un numero
- Il ceppo è tipizzato mediante un codice numerico



Più visitati

Staphylococcus aureus - Database

MLST Multi Locus Sequence Typing

mlst.net | saureus.mlst.net

Tuesday 7th December 2010

DATA ANALYSIS

DATABASES

- ▣ *B.burgdorferi*
- ▣ *B.cereus*
- ▣ *B.pseudomallei*
- ▣ *C.albicans*
- ▣ *C.glabrata*
- ▣ *C.krusei*
- ▣ *C.tropicalis*
- ▣ *C.jejuni*
- ▣ *C.neoformans var grubii*
- ▣ *E.coli*
- ▣ *E.faecalis*
- ▣ *E.faecium*
- ▣ *H.influenzae*
- ▣ *H.pylori*
- ▣ *Leptospira spp.*
- ▣ *M.cattarrhalis*
- ▣ *N.meningitidis*
- ▣ *S.agalactiae*
- ▣ ***S.aureus***
- ▣ *S.enterica*
- ▣ *S.epidermidis*
- ▣ *S.pneumoniae*
- ▣ *S.pyogenes*
- ▣ *S.suis*
- ▣ *V.vulnificus*

SUBMISSIONS

NEWS

LINKS

NEW - MLST-maps - Click here - View global distribution of isolates and STs - NEW

Staphylococcus aureus

- ▣ Organism Specific Information
- ▣ Concatenate Sequences
- ▣ Download Alleles
- ▣ Download ST's
- ▣ Compare profile to reset
- ▣ Draw tree using own MLST data
- ▣ download as MS Excel
- ▣ download as MS Access
- ▣ *S.aureus* Links
- ▣ eBURST V3
- ▣ Contact Curator

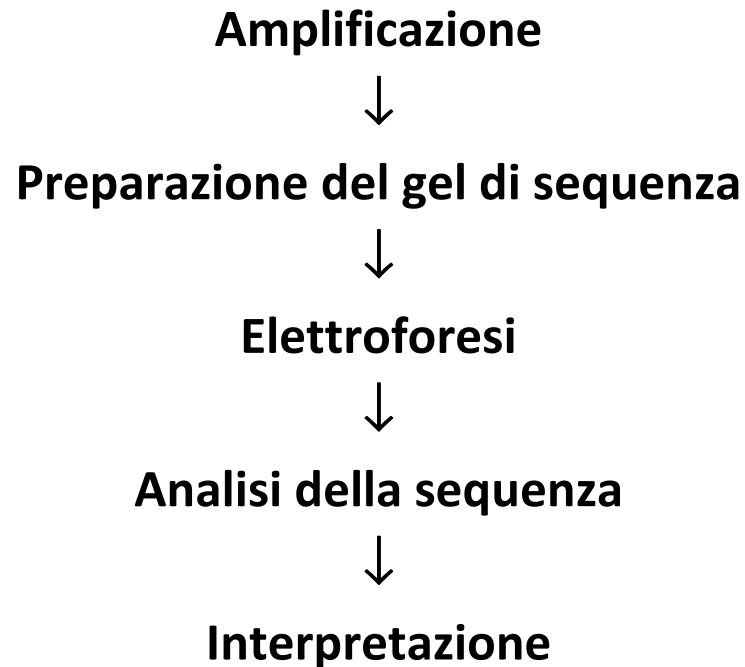
Profile Query **Locus Query** **Batch Query**

Please choose--- Please choose--- Please choose---

This site is hosted at Imperial College and development is funded by the Wellcome Trust.
For comments, queries, or suggestions please contact David Aanensen

Sito web: <http://mlst.net>

Sequenziamento



Caratteristiche sequenziamento

- Difficile da fare
- Non facile da interpretare
- Elevato potere discriminante
- Risultato in due giorni
- Buona riproducibilità intra e interlaboratori
- Costo elevato

Automazione

Sistemi di automazione reperibili sul mercato:

- Ribotyping: **RiboPrinter**[®]
Microbial Characterization
System (DuPont-Qualicon)
- Rep PCR: **DiversiLab**[™] system
(bioMérieux)





Comparative Evaluation of an Automated Repetitive-Sequence-Based PCR Instrument versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis in the Setting of a *Serratia marcescens* Nosocomial Infection Outbreak[▽]

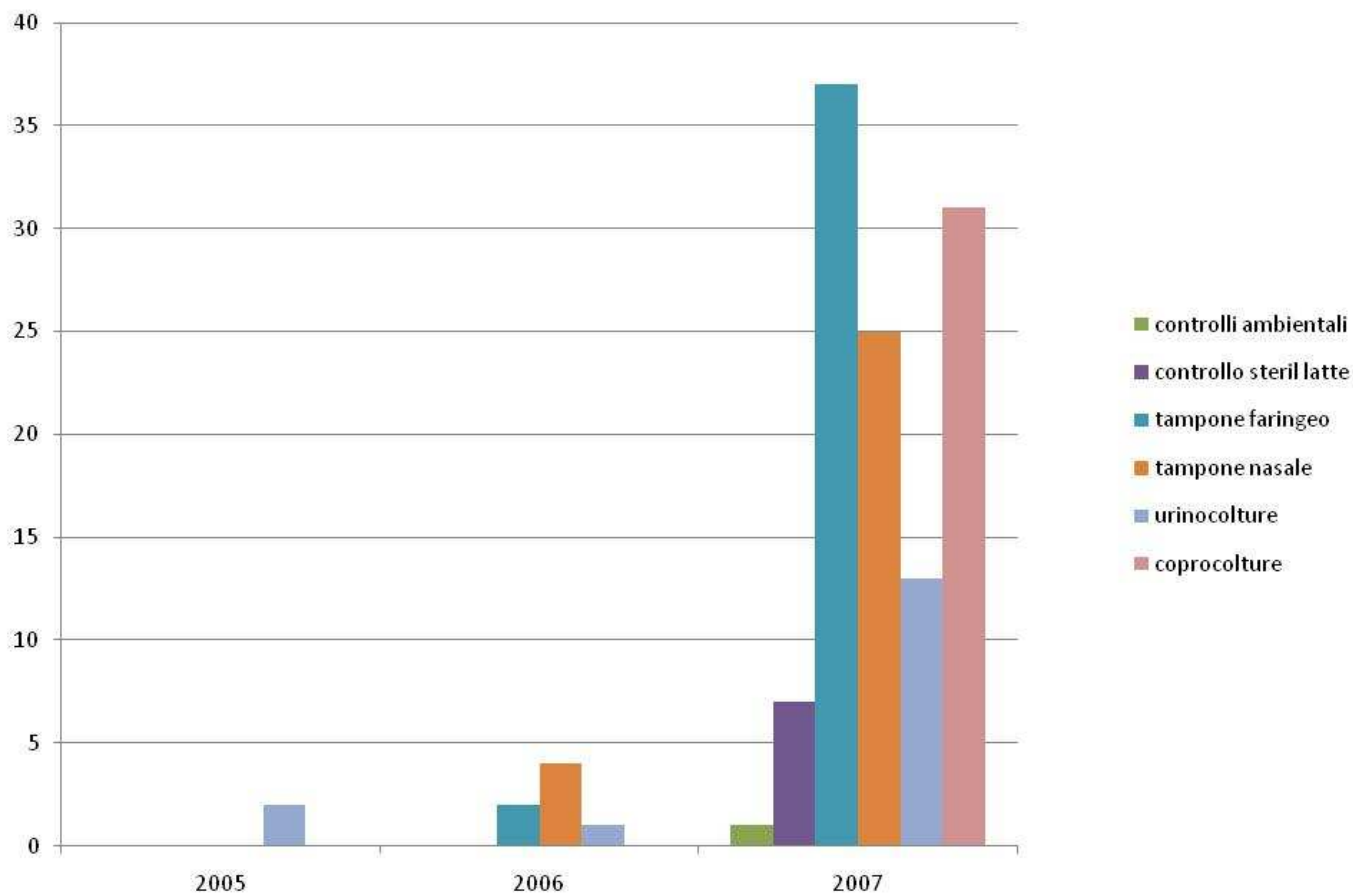
Marco Ligozzi,¹ Roberta Fontana,¹ Marco Aldegheri,¹ Giovanna Scalet,¹ and Giuliana Lo Cascio^{2*}

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia, Università di Verona, Verona, Italy,¹ and Servizio di Microbiologia, Immunologia e Virologia, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona, Italy²

Received 8 August 2009/Returned for modification 6 November 2009/Accepted 10 March 2010

A semiautomated, repetitive-sequence-based PCR (rep-PCR) instrument (DiversiLab system) was evaluated in comparison with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to investigate an outbreak of *Serratia marcescens* infections in a neonatal intensive care unit (NICU). A selection of 36 epidemiologically related and 8 epidemiologically unrelated isolates was analyzed. Among the epidemiologically related isolates, PFGE identified five genetically unrelated patterns. Thirty-two isolates from patients and wet nurses showed the same PFGE profile (pattern A). Genetically unrelated PFGE patterns were found in one patient (pattern B), in two wet nurses (patterns C and D), and in an environmental isolate from the NICU (pattern G). Rep-PCR identified seven different patterns, three of which included the 32 isolates of PFGE type A. One or two band differences in isolates of these three types allowed isolates to be categorized as similar and included in a unique cluster. Isolates of different PFGE types were also of unrelated rep-PCR types. All of the epidemiologically unrelated isolates were of different PFGE and rep-PCR types. The level of discrimination exhibited by rep-PCR with the DiversiLab system allowed us to conclude that this method was able to identify genetic similarity in a spatio-temporal cluster of *S. marcescens* isolates.

Prevalenza degli isolamenti di *Serratia marcescens* in campioni ambientali e clinici: confronto dello stesso periodo (agosto-dicembre) dal 2005 al 2007



Definizione dell'epidemia

0.2 caso/mese 2005-2006 → 4 casi mese 2007

16 pazienti infetti e/o colonizzati:

- ✓ 6 infetti: batteriemia, congiuntivite, batteriuria, infezione ferita ombelicale.
- ✓ 12 colonizzati: positività tampone faringeo, nasale, perianale.

Genotipizzazione

- Su richiesta della Direzione Medica (Prot. 5209 del 28 Novembre 2007) si è provveduto a sottoporre i ceppi di *Serratia marcescens* a tipizzazione molecolare.

La genotipizzazione è stata eseguito con:

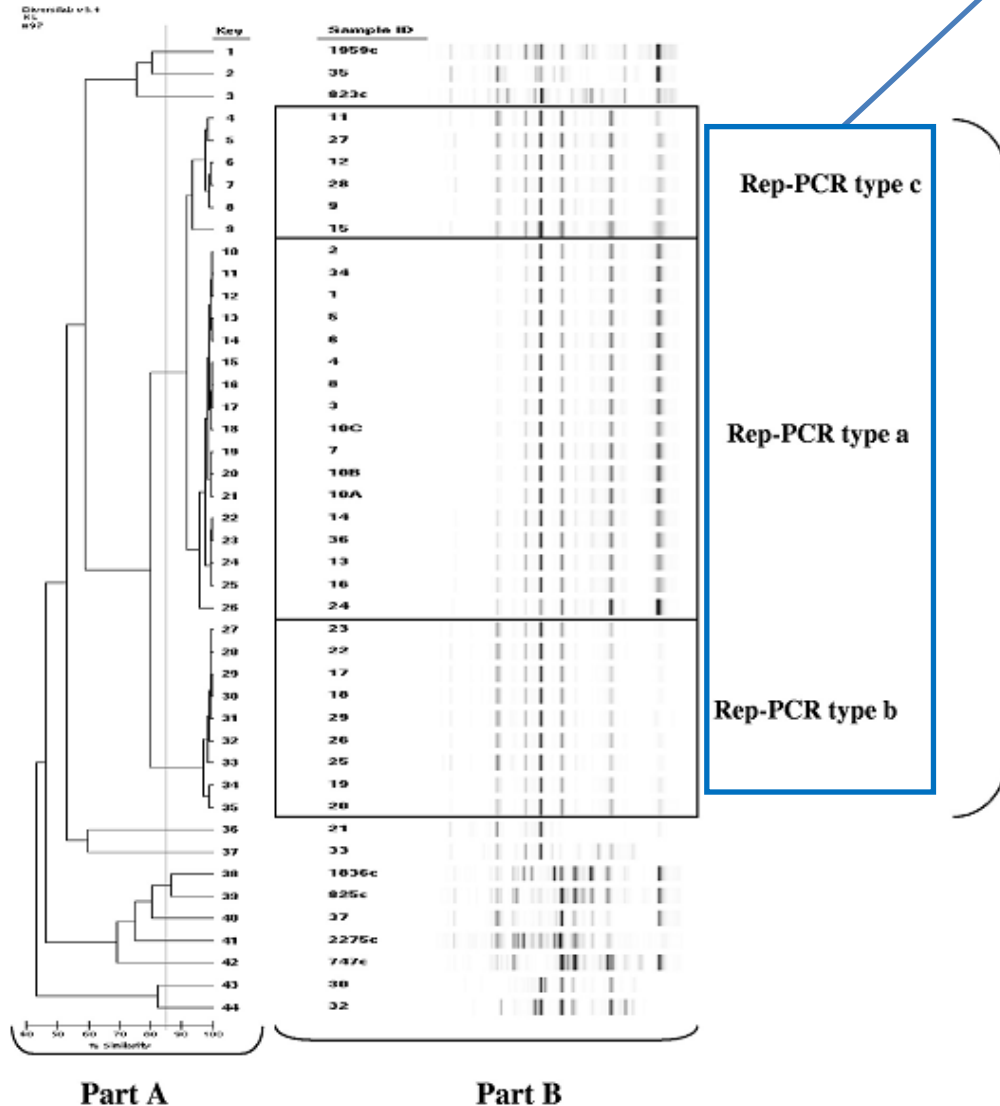
- **rep-PCR (DiversiLab, BioMerieux), un metodo rapido e semi-automatizzato che si basa su amplificazione di sequenze ripetute.**
- **PFGE (Gold standard)**

Genotipizzazione

La tipizzazione molecolare è stata eseguita su:

- 36 ceppi di *Serratia marcescens*, isolati tra il 21/9 e il 4/12, di questi:
 - 28 da campioni clinici di bambini diversi
 - 7 dal latte di tre madri donatrici
 - 1 ambientale NICU (scarico del lavandino)
- 8 ceppi di *Serratia marcescens* non correlati con l'epidemia

Risultati

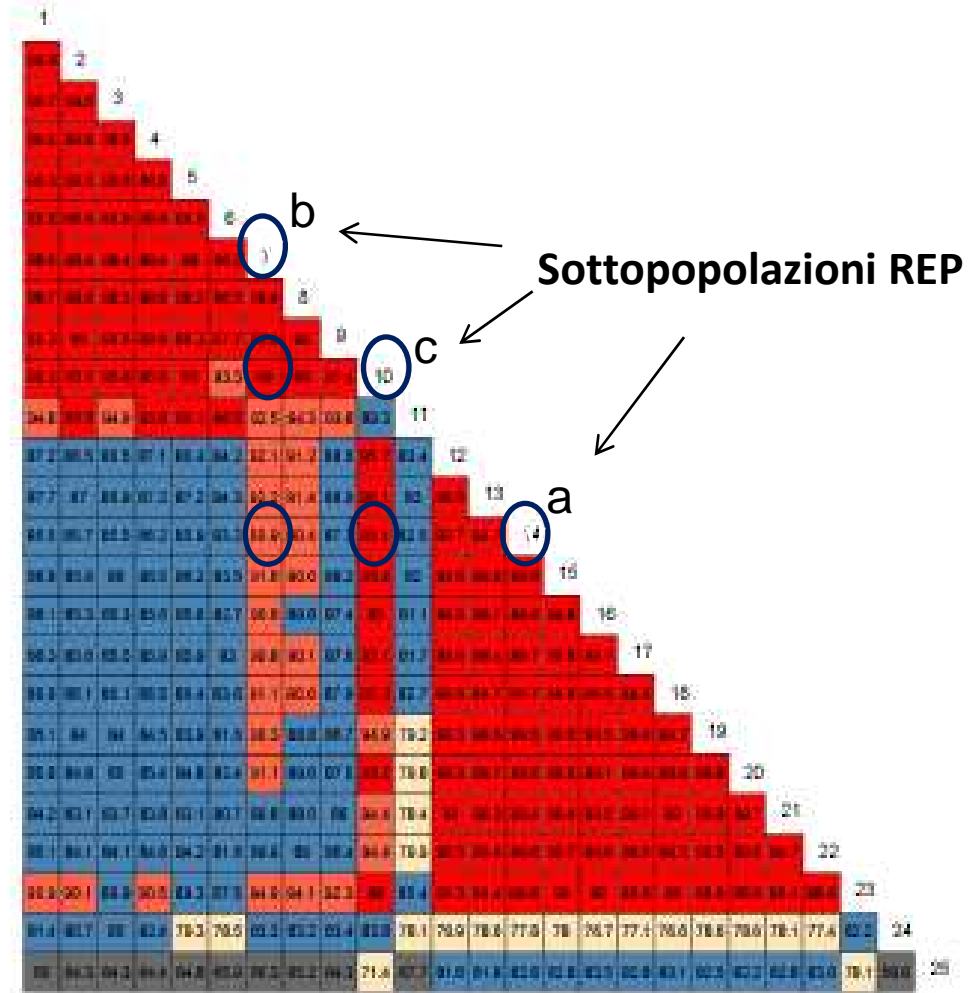
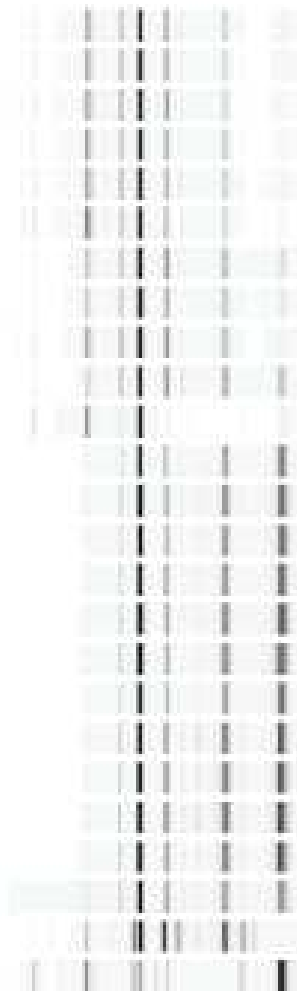
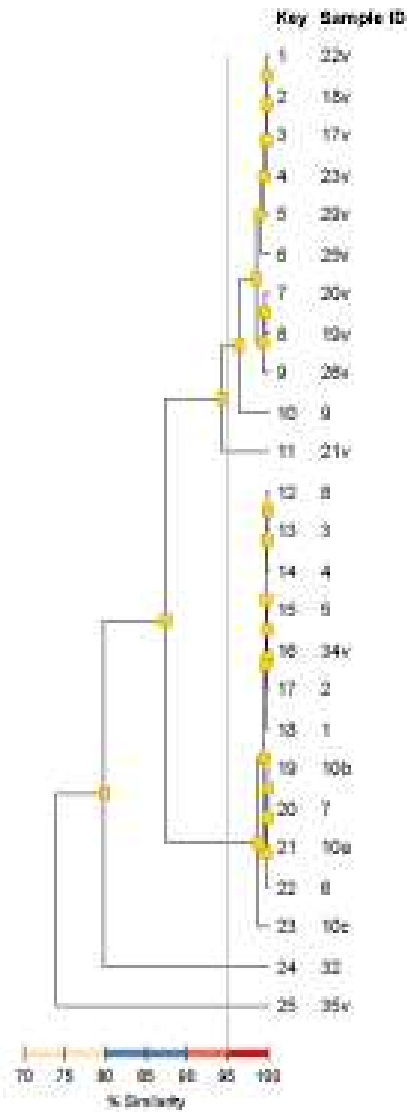


La REP-PCR ha apparentemente identificato tre sottopopolazioni all'interno del pulsotipo A, la successiva analisi visiva del pattern di bande e del dendrogramma ha consentito di classificare come simili i 3 tipi

PFGE A

La PFGE ha individuato l'origine clonale (clone A) dell'epidemia in quanto ha dimostrato lo stesso profilo per 32 ceppi su 36.

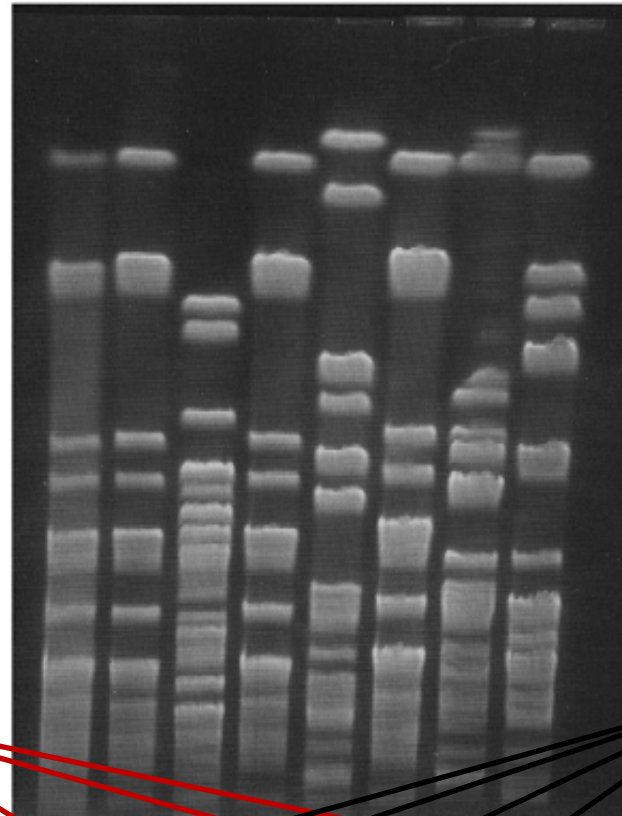
Interpretazione del pattern di bande e del dendrogramma



Risultati

Confronto di profili PFGE di alcuni ceppi testati

1 2 3 4 5 6 7 8



Pulsotipo A, epidemico

Ceppi non correlati

PFGE Type **A** **A** **B** **A** **D** **A** **G** **F**

CONCLUSIONI

- L'epidemia si conferma di origine clonale
- Non è stato possibile individuare il caso indice o il serbatoio del ceppo epidemico
- Il marker utilizzato per la rep-PCR è evolutivamente meno stabile di quello utilizzato per la PFGE
- La variabilità mostrata con la rep-PCR rispecchia l'evoluzione genetica del ceppo che la PFGE non rileva.

Prospettive future

L'evoluzione dei sistemi di genotipizzazione per la sorveglianza delle HAI deve basarsi su:

- **Automazione** con incremento delle **capacità analitiche**, della **riproducibilità** e possibilmente del **caricamento in continuo**
- **Gestione informatica** sia della strategia di tipizzazione sia dell'interpretazione
- Miglioramento del **potere discriminante** mediante analisi di più target nella stessa seduta analitica

Ringraziamenti

- Prof.ssa Roberta Fontana
- Dott.ssa Giuliana Lo Cascio
- Dott. Marco Ligozzi
- Marco Aldegheri
- Carmen Ceriani
- Mariella Ceriani
- Ennio Mortani



Grazie per l'attenzione!!

ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: SCALET_Le

STACK:

```
(5)  
/Title  
( )  
/Subject  
(D:20110128103910+01'00' )  
/ModDate  
( )  
/Keywords  
(PDFCreator Version 0.9.5)  
/Creator  
(D:20110128103910+01'00' )  
/CreationDate  
(5317841)  
/Author  
-mark-
```