

LINEA DI RICERCA CARATTERIZZAZIONE DEI CEPPI BATTERICI di INTERESSE ALIMENTARE

INTRODUZIONE

L'identificazione accurata dei batteri isolati dagli alimenti consente di differenziare i microrganismi che possono essere patogeni per il consumatore da quelli innocui. Inoltre, risulta di rilevante importanza la fase di caratterizzazione, sia fenotipica che genotipica, dei ceppi patogeni che permette di approfondire diversi aspetti come la virulenza, la resistenza agli antibiotici, le capacità metaboliche e l'adattabilità a specifici ambienti.

Negli ultimi anni, l'introduzione di tecniche innovative fenotipiche ha rivoluzionato la capacità di caratterizzare i ceppi batterici in maniera rapida e precisa. La spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) è una delle tecnologie più avanzate in questo campo, poiché consente di identificare e caratterizzare i batteri in base ai profili proteici, riducendo drasticamente i tempi di analisi. Similmente, la spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (FT-IR) permette di identificare, caratterizzare e differenziare ceppi batterici, basandosi sulla variazione della composizione e della struttura della superficie batterica.

La tecnologia "Next Generation Sequencing" (NGS) consente il sequenziamento parallelo massivo di molecole di DNA amplificate in modo clonale: questa strategia ha rappresentato un cambiamento radicale rispetto al metodo di sequenziamento capillare. Le attuali piattaforme di NGS consentono di sequenziare frammenti genomici di dimensioni variabili in un'unica seduta analitica e ha la grande versatilità di essere impiegabile sia a scopo diagnostico che di ricerca di base. Una delle sue maggiori applicazioni è il sequenziamento dell'intero genoma (Whole Genome Sequencing - WGS), che ormai è diventato un importante strumento per la mappatura di nuovi genomi, per il completamento di genomi di organismi noti o il confronto di genomi di organismi isolati in diversi campioni. In ambito microbiologico, il WGS permette di generare genomi di riferimento precisi al fine di fornire accurati strumenti per l'identificazione microbica e studi di genomica comparativa.

L'utilizzo di tecniche fenotipiche e genotipiche permette una comprensione più profonda della diversità microbica, facilitando lo sviluppo di strategie mirate per il controllo dei patogeni alimentari o l'uso di determinate specie batteriche in settori come l'industria alimentare e la medicina.

MALDI e IR

La spettrometria di massa MALDI-TOF si è affermata negli ultimi anni come una delle tecniche più versatili per l'identificazione dei batteri a livello di genere e specie. Rispetto ai metodi tradizionali,

questa tecnologia offre numerosi vantaggi, tra cui una maggiore rapidità nell'ottenimento dei risultati e una significativa riduzione dei costi operativi.

Oltre alle sue applicazioni classiche, che prevedono l'identificazione di un ampio spettro di microrganismi, il MALDI-TOF ha dimostrato un notevole potenziale anche nella caratterizzazione più dettagliata dei ceppi batterici, inclusa la possibilità di identificare ceppi che producono tossine. I ricercatori IZSPLV, ad esempio, stanno lavorando alla creazione di nuove librerie di riferimento che consentano di rilevare direttamente le tossine prodotte da batteri come *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*,

Un altro progresso significativo nella tipizzazione batterica è rappresentato dalla spettroscopia a infrarossi a trasformata di Fourier (FT-IR). La FT-IR permette di ottenere uno spettro che rappresenta un'“impronta digitale” unica per ciascun isolato batterico. Questi spettri forniscono informazioni preziose sulla composizione molecolare dei ceppi batterici e, quando vengono comparati tra loro, consentono di caratterizzare gli isolati con un alto grado di precisione. La sinergia tra le tecniche MALDI-TOF e FT-IR amplifica significativamente la capacità di tipizzare e identificare i batteri, specialmente quelle specie che finora hanno presentato difficoltà di caratterizzazione con i metodi convenzionali.

In particolare, l'uso combinato di MALDI-TOF e FT-IR può offrire nuove opportunità non solo per migliorare l'identificazione e la tipizzazione dei batteri, ma anche per comprendere meglio la correlazione tra diversi ceppi.

Whole Genome Sequencing (WGS)

Il WGS è al momento la tecnica più accurata e ad alta risoluzione per ottenere, in una singola seduta analitica, un pacchetto di informazioni genomiche dettagliate. Questa tecnica permette di ottenere la sequenza completa del genoma da cui si possono ricavare, tramite l'analisi bioinformatica, una grande mole di dati e di informazioni come, ad esempio, la presenza di geni che conferiscano resistenza agli antibiotici, di geni di virulenza e di patogenicità.

Nell'ambito della sicurezza alimentare, il WGS è utilizzabile per la caratterizzazione dei microrganismi patogeni isolati lungo tutta la filiera produttiva e il conseguente confronto dei genomi sequenziati con quelli degli isolati umani permette di poter meglio definire e risolvere gli episodi di tossinfezioni trasmesse da alimenti. Il confronto di genomi, attraverso l'utilizzo di strumenti bioinformatici specifici, può essere operato a livello di singolo nucleotide permettendo di evidenziare anche differenze genomiche minime, approccio che è stato utilizzato negli ultimi anni nella maggior parte dei casi di tossinfezioni alimentari e che attualmente è alla base della sorveglianza genomica delle malattie infettive di origine alimentare di maggior interesse, quali la listeriosi e la salmonellosi.

La caratterizzazione genomica sistematica con l'utilizzo del WGS di ceppi patogeni di origine alimentare permette di migliorare la capacità di monitoraggio dell'insorgenza di particolari cloni epidemici per poter intervenire e rispondere in modo più efficace alle allerte nazionali ed internazionali relative agli episodi epidemici.

PROGETTI DI RICERCA

I principali progetti di ricerca presentati e finanziati nel corso degli ultimi anni in materia di caratterizzazione dei ceppi batterici di interesse alimentare dalla S.C. Sicurezza Alimentare sono riportati nella tabella sottostante:

Tipologia	Titolo	Periodo di attività	Ente finanziatore
Ricerca Corrente	L'ecosistema delle produzioni lattiero-casearie DOP: microbiota e flora lattica al servizio della sicurezza e della qualità	2021-oggi	Ministero della Salute
Ricerca corrente	Gatto e Uomo alleati contro il cancro (GUACoCa)	2021-oggi	Ministero della salute
Ricerca corrente	Un approccio multidisciplinare per lo sviluppo di protocolli vaccinali "taylor made" per la prevenzione delle infezioni da <i>Streptococcus suis</i> in allevamenti suini del Piemonte	2022-oggi	Ministero della salute
Ricerca corrente	Sicurezza dei prodotti alimentari: studio, miglioramento e applicazione dei sistemi di riutilizzo dell'acqua depurata in agricoltura, per fini zootecnici e nella filiera orticola	2022 - oggi	Ministero della salute
Ricerca corrente	Caratterizzazione di ceppi batterici di origine animale ed umana con spettrometria di massa MALDI-TOF e Spettroscopia in Trasformata di Fourier	2023-oggi	Ministero della salute
Progetto Regionale MTA	Caratterizzazione genetica di ceppi di <i>Salmonella Stanley</i> mediante Whole Genome Sequencing (WGS) e Spettroscopia a infrarossi a trasformata di Fourier – FT-IR	2024	Regione Piemonte

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

A partire dai risultati dei progetti e delle attività svolte nel corso degli anni è stato possibile predisporre numerose pubblicazioni e presentazioni a corsi e convegni; si riportano qui di seguito i principali report pubblicati negli ultimi anni:

Riviste scientifiche internazionali

- Savini, F., Romano, A., Giacometti, F., Indio, V., Pitti, M., Decastelli, L., Devalle, P., Gorra si, I. S. R., Miaglia, S., & Serraino, A. (2023). Investigation of a *Staphylococcus*

aureus sequence type 72 food poisoning outbreak associated with food-handler contamination in Italy. *Zoonoses and Public Health*, 70, 411–419.

- Romano, A.; Carrella, S.; Rezza, S.; Nia, Y.; Hennekinne, J.A.; Bianchi, D.M.; Martucci, F.; Zuccon, F.; Gulino, M.; Di Mari, C. Decastelli L. First Report of Food Poisoning Due to Staphylococcal Enterotoxin Type B in Döner Kebab (Italy). *Pathogens* 2023, 12, 1139.
- Floris, I.; Vannuccini, A.; Ligotti, C.; Musolino, N.; Romano, A.; Viani, A.; Bianchi, D.M.; Robetto, S.; Decastelli, L. Detection and Characterization of Zoonotic Pathogens in Game Meat Hunted in Northwestern Italy. *Animals* 2024, 14, 562.

Atti workshop internazionali

"*S. enterica* relevant serotypes: rapid identification by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IRS)"

Musolino N, Girola R, Pitti M, Bianchi DM, Ciardelli L, Carrella S, Cordovana M, Decastelli L
European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease 2023 - ECCMID23
online, April 15-18 2023

“Caratterizzazione fenotipica di ceppi di *Salmonella* spp. mediante spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (FTIR)”

La Brasca R, Pitti M, Tramuta C, Cordovana M, Cazzaniga GF, Marra C, Bianchi DM, Martucci F, Decastelli L

XXII Congresso Nazionale della Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria - SIDiLV
Brescia, 11-13 ottobre 2023

ATTIVITA' FUTURE

Nel futuro si mira a sviluppare nuovi protocolli per migliorare l'identificazione e la caratterizzazione di batteri e tossine attraverso tecniche avanzate di laboratorio quali MALDI-TOF e FT-IR. In particolare, si utilizzerà la spettrometria MALDI-TOF per rilevare le tossine alimentari, come le enterotossine stafilococciche, la cereulide e la tossina botulinica.

Inoltre, verrà utilizzata la spettroscopia FT-IR utilizzando tecniche di machine learning per distinguere in modo rapido e preciso specie batteriche strettamente correlate, come quelle appartenenti al genere *Staphylococcus* o al gruppo *Bacillus cereus*.

L'applicazione del WGS a ceppi di interesse alimentare, grazie alla possibilità di rianalizzare i dati prodotto e operare nuovi confronti, deve essere affiancata dalla condivisione sistematica dei dati prodotti attraverso network nazionali ed anche internazionali in modo che le informazioni genomiche prodotte possano essere utilizzate per ricostruire relazioni epidemiologiche fra i ceppi provenienti da

fonti differenti (alimenti, ambienti di lavorazione, animali e uomo) per l'identificazione in tempo reale della diffusione di cloni pericolosi per la salute pubblica con una più efficace e tempestiva comunicazione del rischio. In quest'ottica, la SC Sicurezza Alimentare continuerà a contribuire alla sorveglianza epidemiologica di patogeni di origine alimentare condividendo i dati genomici sulle piattaforme nazionali allestite *ad hoc*.