



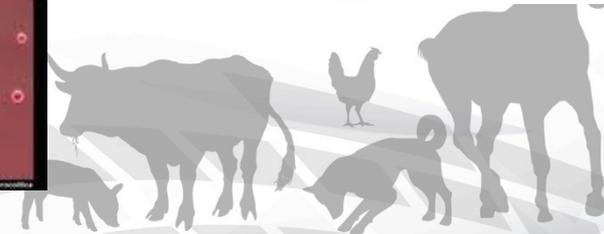
IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

***Yersinia enterocolitica*: caratterizzazione dei ceppi e messa a punto di una PCR multiplex per identificazione e rilevazione dei principali geni di patogenicità.**

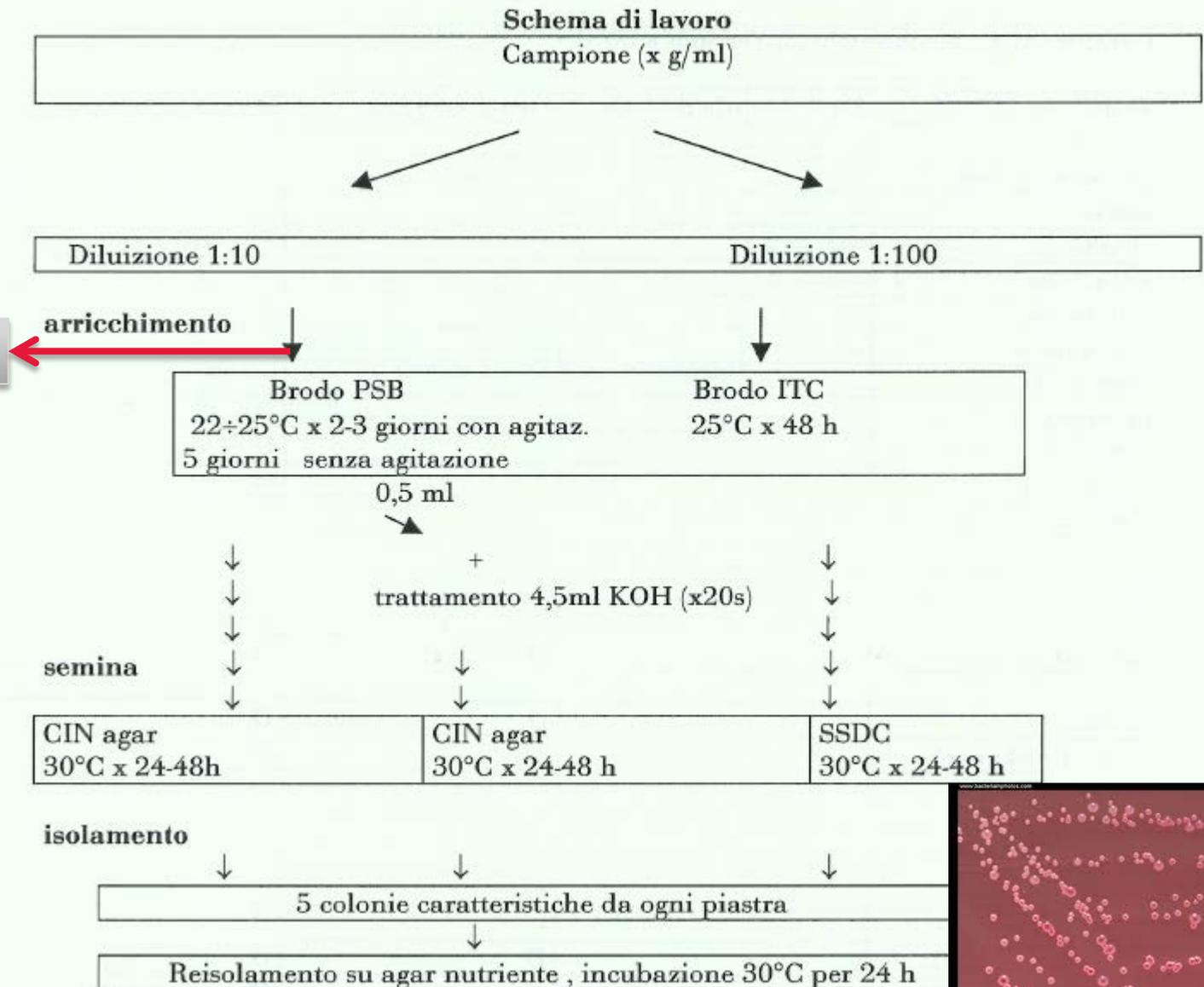


Ricerca e caratterizzazione di *Y. enterocolitica*

- ISO 10273:2003 Microbiology of food and animal feeding stuff - Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*.
- Multiplex PCR.
- Biotipizzazione e sierotipizzazione.
- Antibiogramma.
- PFGE.



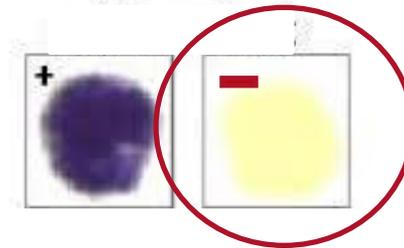
Ricerca *Yersinia enterocolitica*



Semina diretta



Test presuntivi di conferma

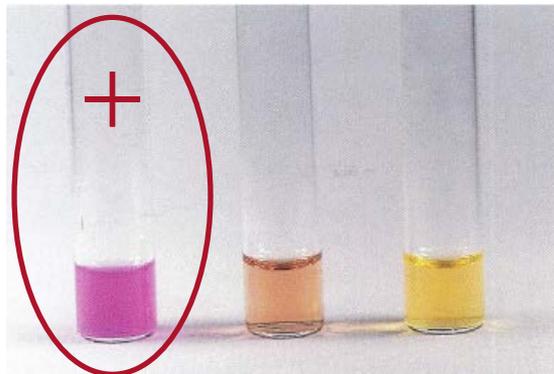


Test dell'ossidasi:
rapido



Kligler agar:
30°C x 24-48h.

Lattosio, Glucosio,
formazione di gas
glucosio e H₂S
negativo.



Rilevazione di ureasi:
30°C x 24h



Rilevazione dell'indolo:
30°C x 24h o rapido

Positivo/Negativo



Conferma biochimica

Gallerie API



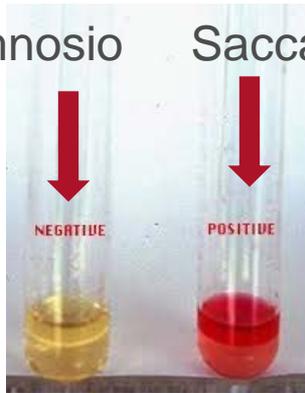
Sistema miniaturizzato Vitek2



Test presuntivo patogenicità: selezione colonie

Ramnosio

Saccarosio



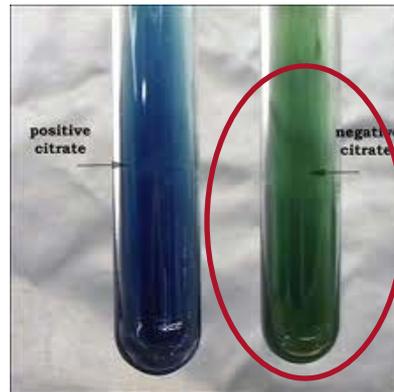
Fermentazione del
saccarosio e ramnosio



Test dell'ornitina



Test della lisina



Test del
citrato





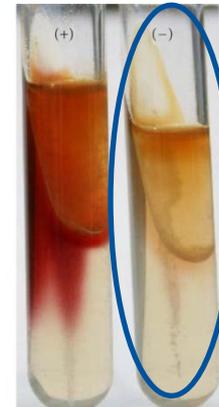
IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

Test presuntivi di patogenicità

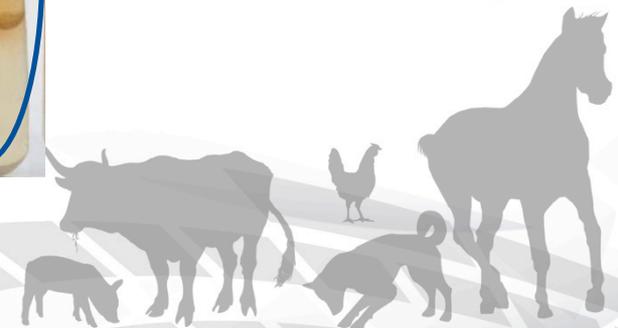


Richiesta di calcio a 37°C: 48h

Fermentazione
dell'esculina:
30°Cx24h



Rilevazione della
pirazinamidasi:
30°Cx48h



Considerazioni

Test
biochimici

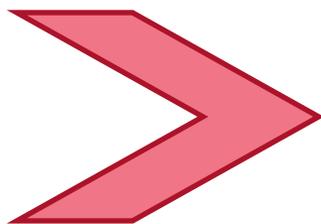
VS

Multiplex
PCR

Ossidasi, ureasi, indolo,
Kliger agar

Lisina, ornitina, saccarosio,
ramnosio, citrato

Esculina, pirazinamidasi,
Calcio dipendenza a 37°C



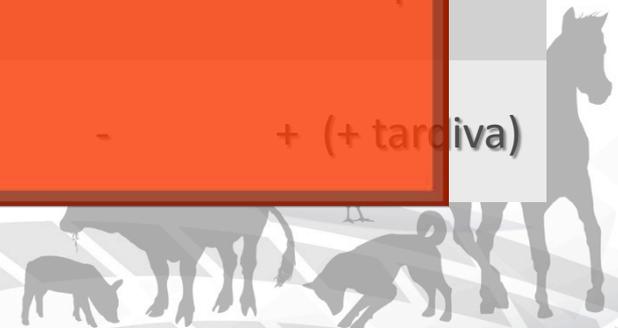
Tempi di esecuzione
Tempo operatore
Costo materiali



Schema biotipo

Biotipo	Xylosio	Trealosio	Esculina	Indolo	VP
1A	←	←	+/- NON PATOGENO		
1B	←	←	ALTAMENTE PATOGENO		
2	←	←	-	- 24h + 7gg	+
3	←	←	-	-	+(Var -)
4	←	←	-	-	+
5	←	←	-	-	+(+ tardiva)

PATOGENI



Sierotipizzazione *Y. enterocolitica*

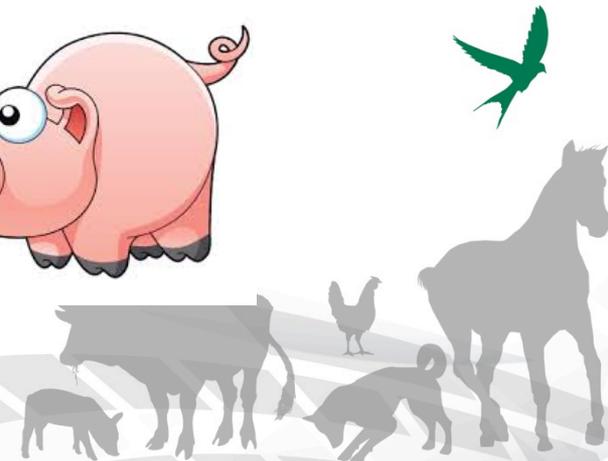
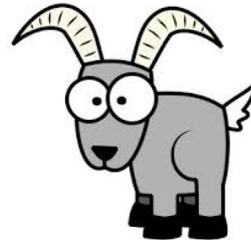
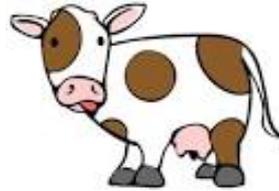
Sierotipi patogeni

O:3; O:5,27; O:9; O:8

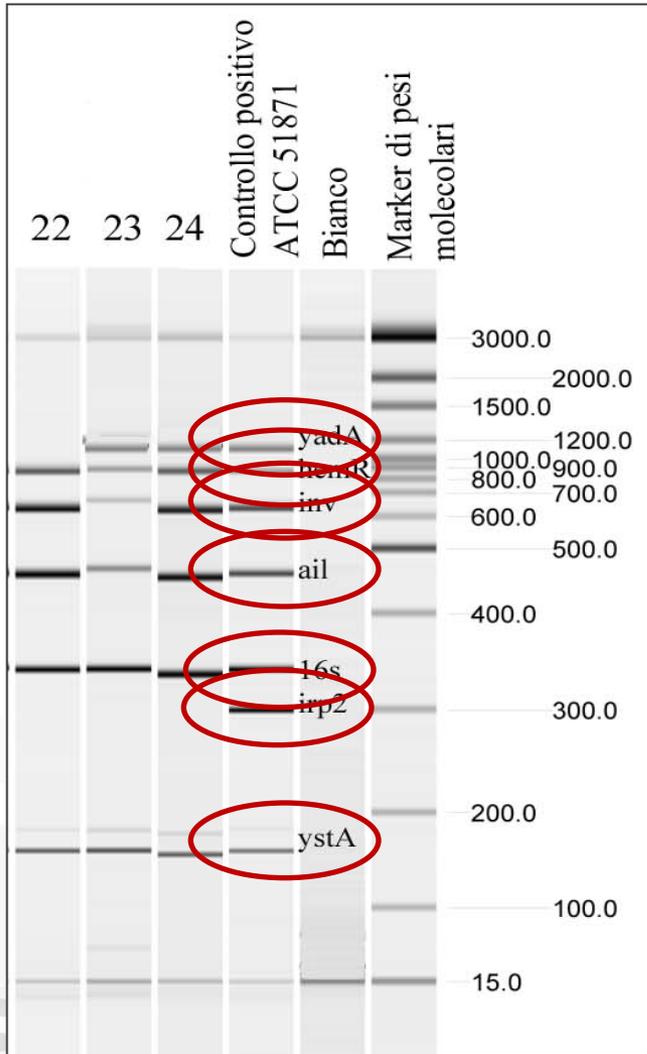
Biotipo 4

Biotipo 2

Biotipo 1B



Multiplex PCR per *Y. enterocolitica*



Identifica i ceppi patogeni e i biotipi 1A, 1B.

- **yadA**: gene plasmidico codificante per un'adesina coinvolta nei processi di autoagglutinazione, resistenza al siero e adesione.
- **hemR**: gene cromosomico codificante per una proteina esterna di membrana regolatrice del trasporto del ferro.
- **inv**: gene cromosomico codificante per proteina responsabile dell'invasione cellulare.
- **ail**: gene cromosomico codificante per proteina responsabile dell'adesione cellulare. **Se non presente identifica il biotipo 1A, considerato non patogeno.**
- **16s**: gene ribosomiale che identifica *Y. enterocolitica*.
- **irp2**: gene cromosomico presente nell'isola di alta patogenicità (HPI). **Identifica il biotipo 1B.**
- **ystA**: gene cromosomico codificante per un'enterotossina termostabile.



Risultati Multiplex PCR

- Assenza del biotipo 1B altamente patogeno (*irp2*⁻).
- Assenza del biotipo 1A, non patogeno (*ail*⁺).
- Tutti gli isolati sono positivi per i geni *ystA*, *inv*, *hemR*, ad eccezione di un ceppo *hemR*⁻.
- Il 72% dei ceppi ha conservato il plasmide di patogenicità (*yadA*⁺).



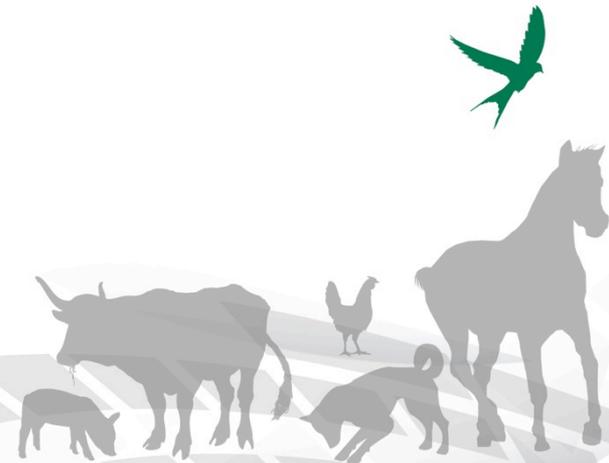
Risultati biotipizzazione e sierotipizzazione



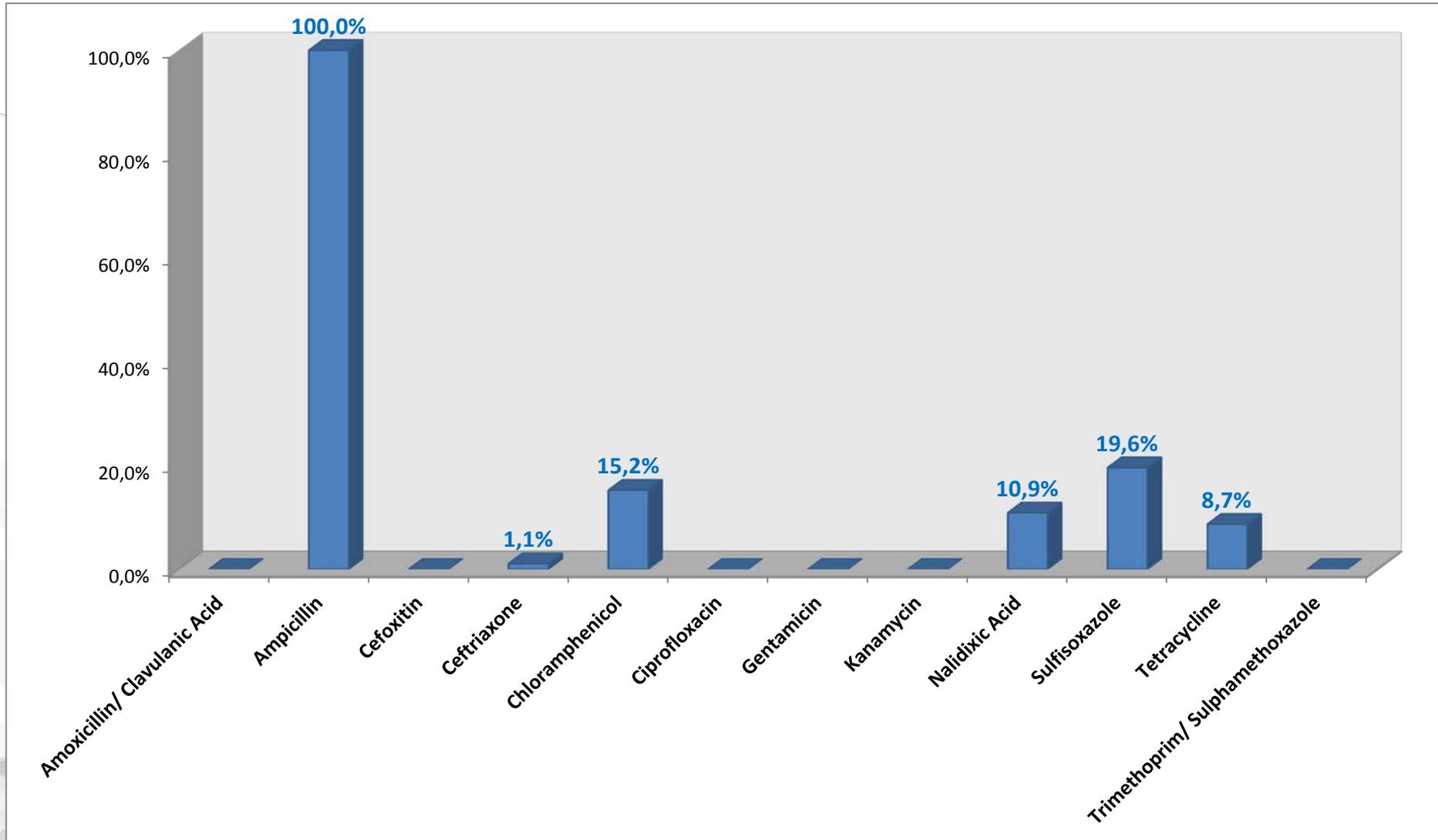
Tutti i ceppi di *Y. enterocolitica* identificati sono di biotipo 4 e sierotipo O:3.



YERSINIA
ENTEROCOLITICA



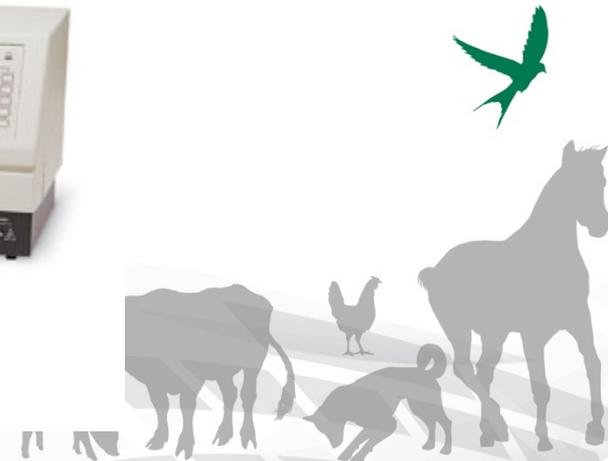
Antibiotico-resistenza *Y. enterocolitica*



PFGE: punto di partenza



**One-Day (24-28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of
Yersinia pestis
by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**



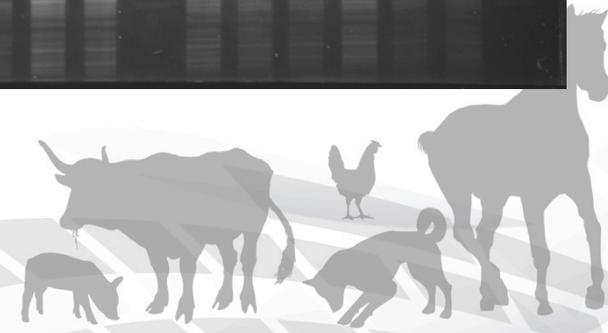
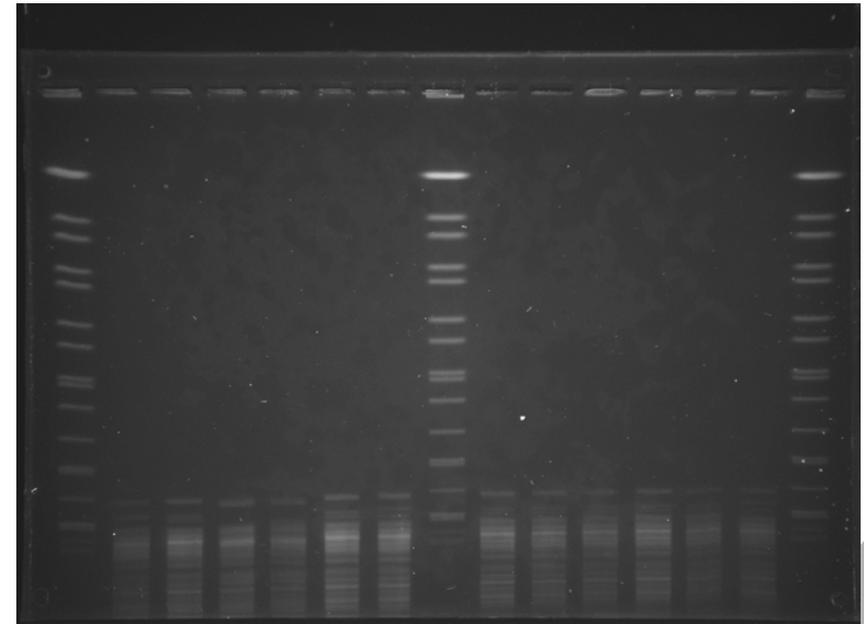
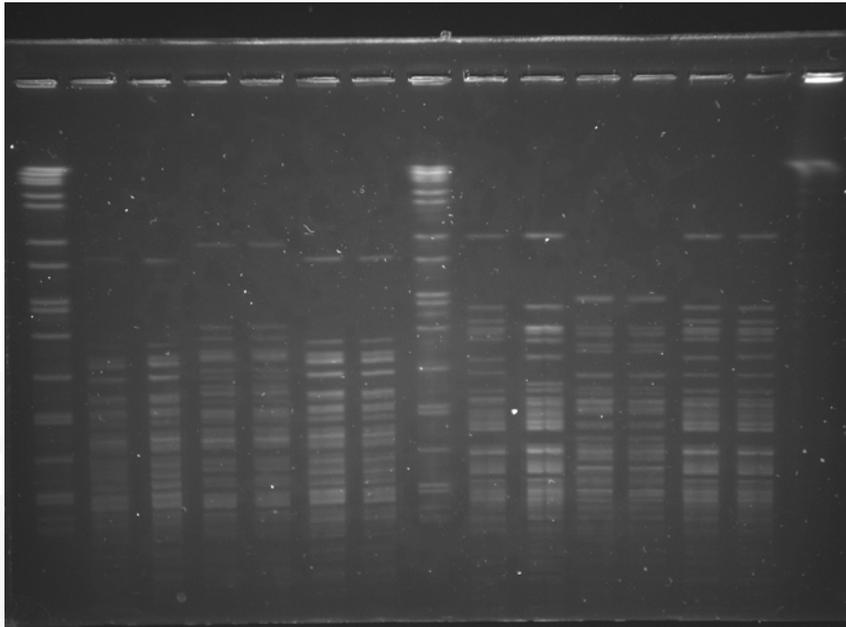
...messa a punto PFGE



Ascl

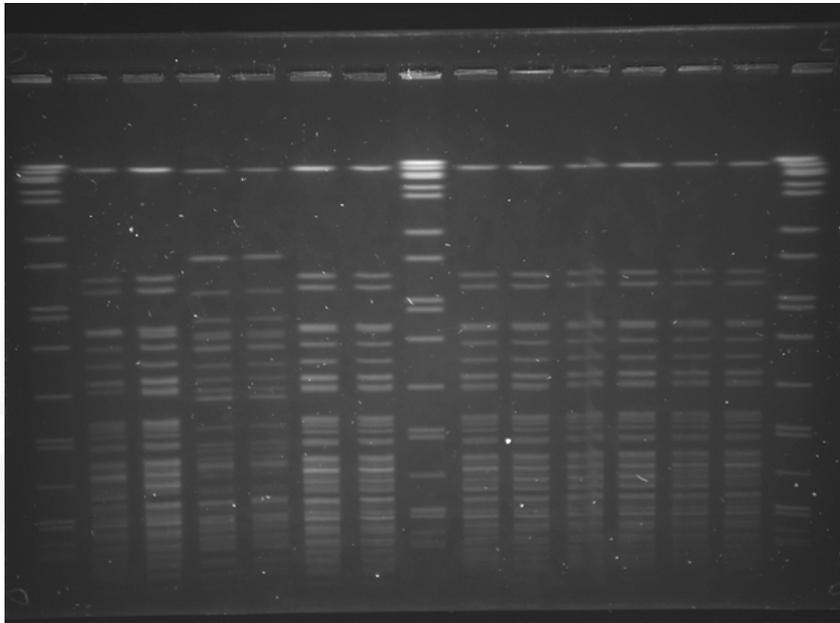
Spel

Kpnl



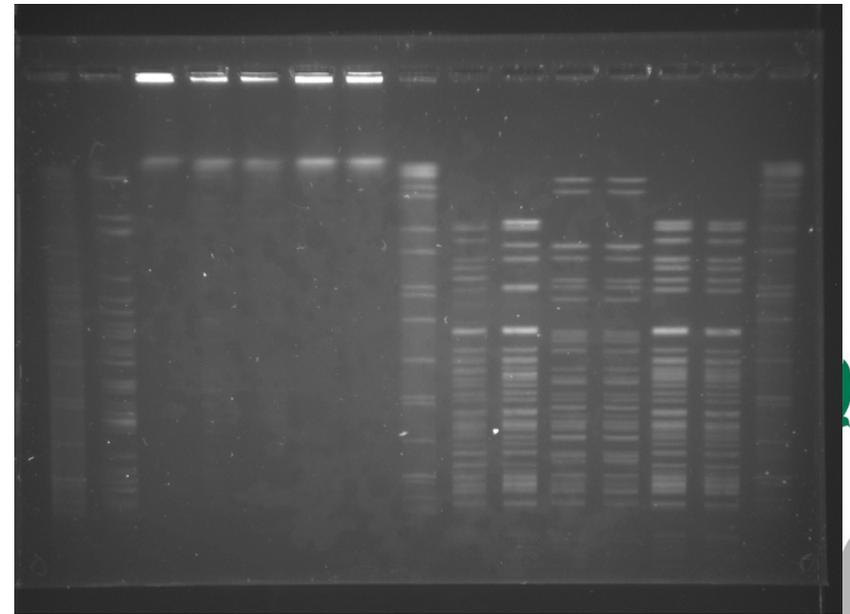
...messa a punto PFGE

XbaI



ApaI

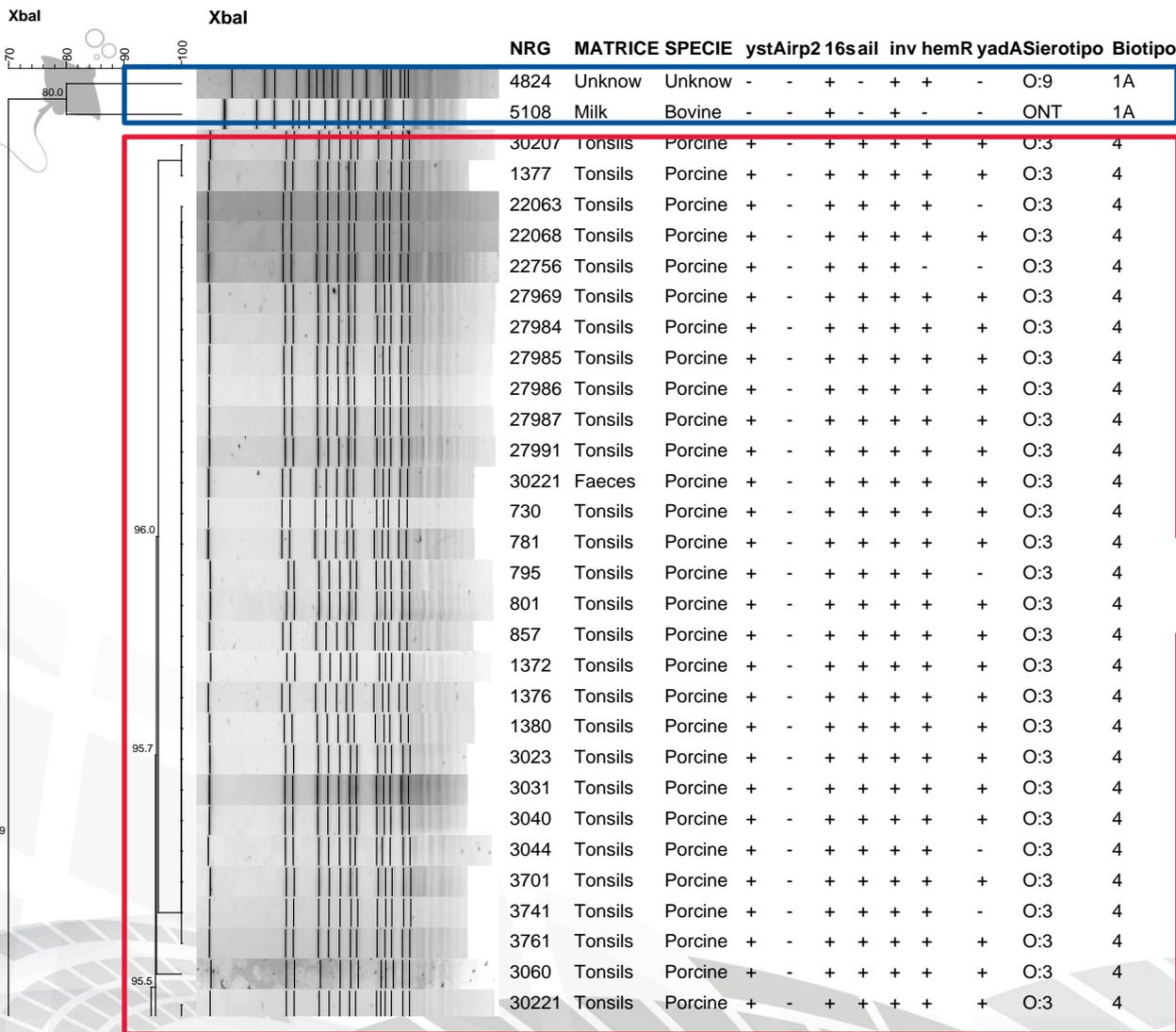
NotI



Low Mw 20 kb; High Mw 215 kb
Run time: 19h



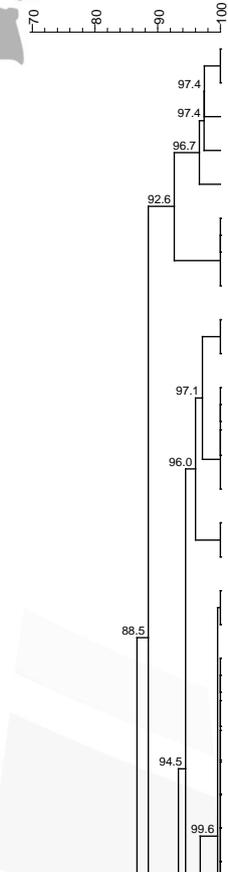
PFGE XbaI *Y. enterocolitica*



PFGE NotI *Y. enterocolitica*

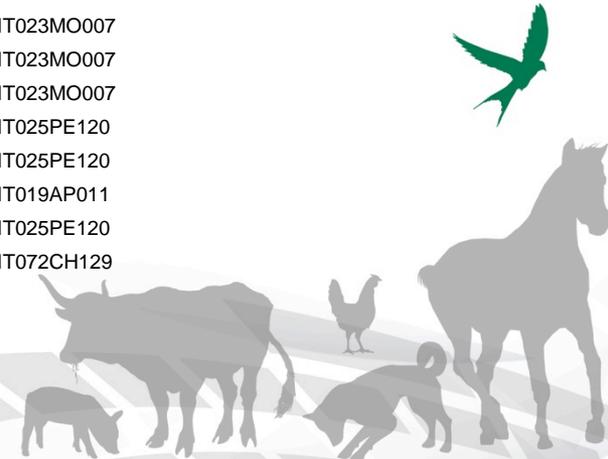
NotI

NotI

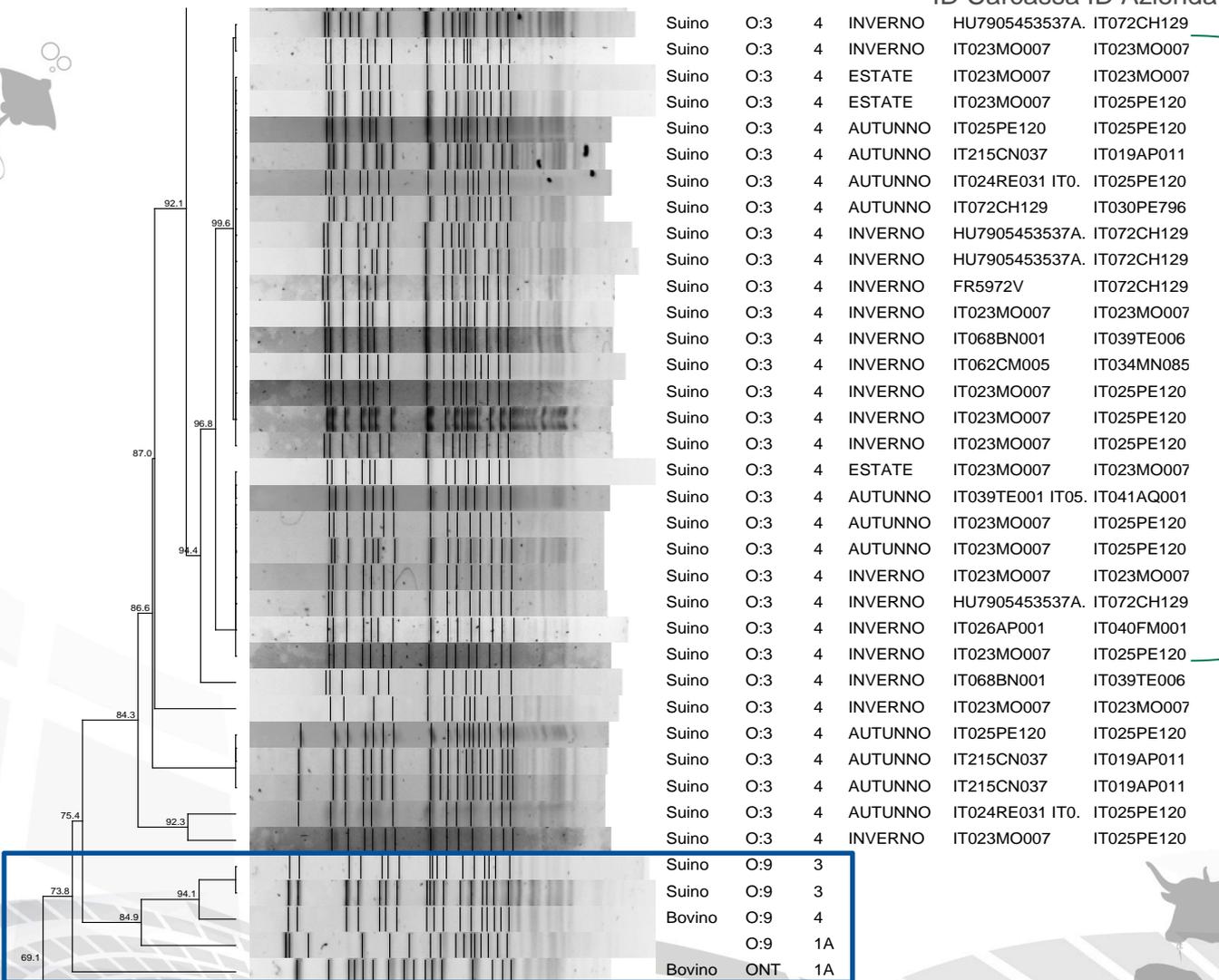


+	AUTUNNO	IT019PE432	IT019PE432
+	AUTUNNO	IT039TE001 IT052PG092 IT.	IT041AQ001
-	AUTUNNO	IT072CH129	IT030PE796
+	AUTUNNO	IT072CH129	IT030PE796
+	INVERNO	IT012AR002	IT051PG572
+	AUTUNNO	IT025PE120	IT025PE120
-	AUTUNNO	IT215CN037	IT019AP011
+	AUTUNNO	IT215CN037	IT019AP011
+	AUTUNNO	IT025PE120	IT025PE120
+	INVERNO	IT023MO007	IT023MO007
+	ESTATE	HU	IT072CH129
+	AUTUNNO	IT025PE120	IT025PE120
+	AUTUNNO	IT025PE120	IT025PE120
+	AUTUNNO	IT072CH129	IT030PE796
+	INVERNO	IT012AR002	IT051PG572
+	INVERNO	IT026AP001	IT040FM001
+	INVERNO	HU7905453537AL716	IT072CH129
+	INVERNO	IT023MO007	IT023MO007
-	ESTATE	IT023MO007	IT023MO007
+	ESTATE	IT023MO007	IT023MO007
-	ESTATE	IT023MO007	IT025PE120
+	AUTUNNO	IT025PE120	IT025PE120
-	AUTUNNO	IT215CN037	IT019AP011
+	AUTUNNO	IT024RE031 IT023MO007	IT025PE120
+	INVERNO	HU7905453537AL716	IT072CH129

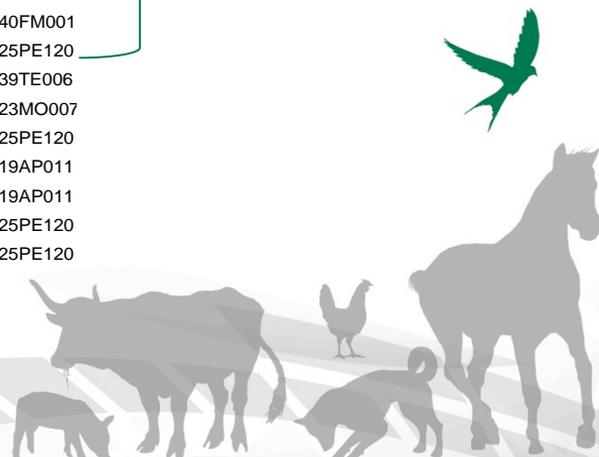
Maggior grado di discriminazione, con formazione di mini cluster



PFGE Notl *Y. enterocolitica*



Profilo genetico altamente conservato in ceppi dello stesso biosierotipo



Conclusioni

- 
- Vantaggi Multiplex PCR.
 - Profilo di antibiotico-resistenza confermato.
(Baumgartner A. et al., 2007; von Altrock A. et al., 2010)
 - Profili genetici strettamente correlati.



Ringraziamenti

- 
- Reparto Batteriologia
 - Gabriella Parisciani
 - Flavio Sacchini
 - Gabriella Di Serafino
 - Federico Di Fabio
 - Katuscia Zilli
 - ASL Pescara

