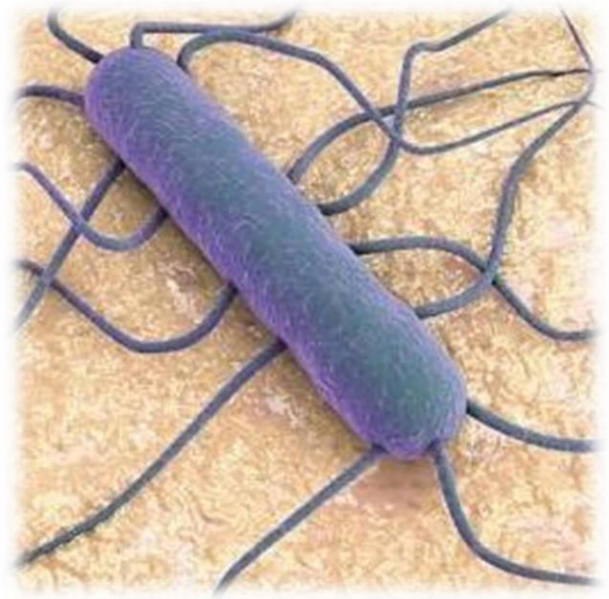


# Whole Genome Sequencing: strumento di ultima generazione per lo studio della persistenza di *Listeria monocytogenes* negli ambienti produttivi

Giuliana Blasi<sup>1</sup>, Marina Torresi<sup>2</sup>, Monica Staffolani<sup>1</sup>, Vicdalia Aniela Acciari<sup>2</sup>, Antonio Rinaldi<sup>3</sup>,  
Claudio Patavino<sup>3</sup>, Barbara Palombo<sup>1</sup>, Fabrizia Guidi<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche – Perugia

<sup>2</sup> Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes* - Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise – Teramo

<sup>3</sup> Centro di Riferenza Nazionale per Sequenze Genomiche di microrganismi patogeni: banca dati e analisi di bioinformatica - Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise – Teramo

## INTRODUZIONE

*Listeria monocytogenes* (*Lm*) è l'agente eziologico della listeriosi, zoonosi con alto tasso di mortalità trasmessa principalmente con il consumo di cibo contaminato. L'ubiquitariet  e la capacit  di moltiplicarsi e/o sopravvivere anche in ambiente refrigerato, rendono *Lm* uno tra gli agenti patogeni pi  importanti nell'ambito della produzione alimentare.

Molti ceppi sono in grado di persistere negli ambienti di lavorazione per mesi o anni, anche grazie alla capacit  di formare biofilm protettivi verso detergenti e sanificanti. Si assume che ceppi di *Lm* con un genoma sovrapponibile o strettamente correlato appartengano allo stesso clone. Si parla di persistenza se all'interno della stessa struttura, in seguito a campionamenti ripetuti, vengono isolati, per almeno tre volte nell'arco di un anno, ceppi con tali caratteristiche.

Lo scopo del presente lavoro   stato quello di verificare la presenza di ceppi persistenti in un caseificio marchigiano che dal 2013 al 2016   risultato pi  volte positivo per *Lm*, sia da alimenti che da tamponi ambientali.

## METODI

- I ceppi isolati nel triennio 2013-2016 e conservati nella collezione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, sono stati caratterizzati mediante Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), dal Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes*, secondo il protocollo *PulseNet*, utilizzando gli enzimi di restrizione *Apal* e *Ascl*. I profili ottenuti sono stati analizzati con il software BioNumerics versione 7.5 e le similarit  calcolate usando il coefficiente di Dice con parametri di ottimizzazione e tolleranza all'1% per entrambi gli enzimi. Il dendrogramma   stato costruito utilizzando il metodo Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages.
- Una selezione degli isolati   stata ulteriormente tipizzata da parte del Centro di Riferenza Nazionale per Sequenze Genomiche di microrganismi patogeni: banca dati e analisi di bioinformatica, mediante Whole Genome Sequencing (WGS) utilizzando la piattaforma Illumina. Le librerie genomiche sono state create con il kit NexteraXT ed il sequenziamento   stato effettuato con il sequenziatore NextSeq500. L'assemblaggio delle reads, dopo la fase di trimming,   stato eseguito con il software SPAdes versione 3.8. Per la clusterizzazione, basata sull'analisi dei Polimorfismi a Singolo Nucleotide (SNP),   stato impiegato il programma KSNP3 e l'albero filogenetico, ricavato mediante l'algoritmo del Neighbour-Joining (NJ),   stato costruito sulla base della matrice coreSNP.



<https://www.illumina.com>



## RISULTATI

Dei 44 ceppi analizzati mediante PFGE sono stati sequenziati 39 che avevano mostrato profilo indistinguibile per entrambi gli enzimi e uno risultato indistinguibile solo con l'enzima *Apal*.

L'albero NJ, calcolato per 38 di essi aventi coverage sufficientemente elevato, ha evidenziato una differenza media di SNPs pari a 11. L'analisi WGS ha quindi confermato i risultati ottenuti in PFGE.

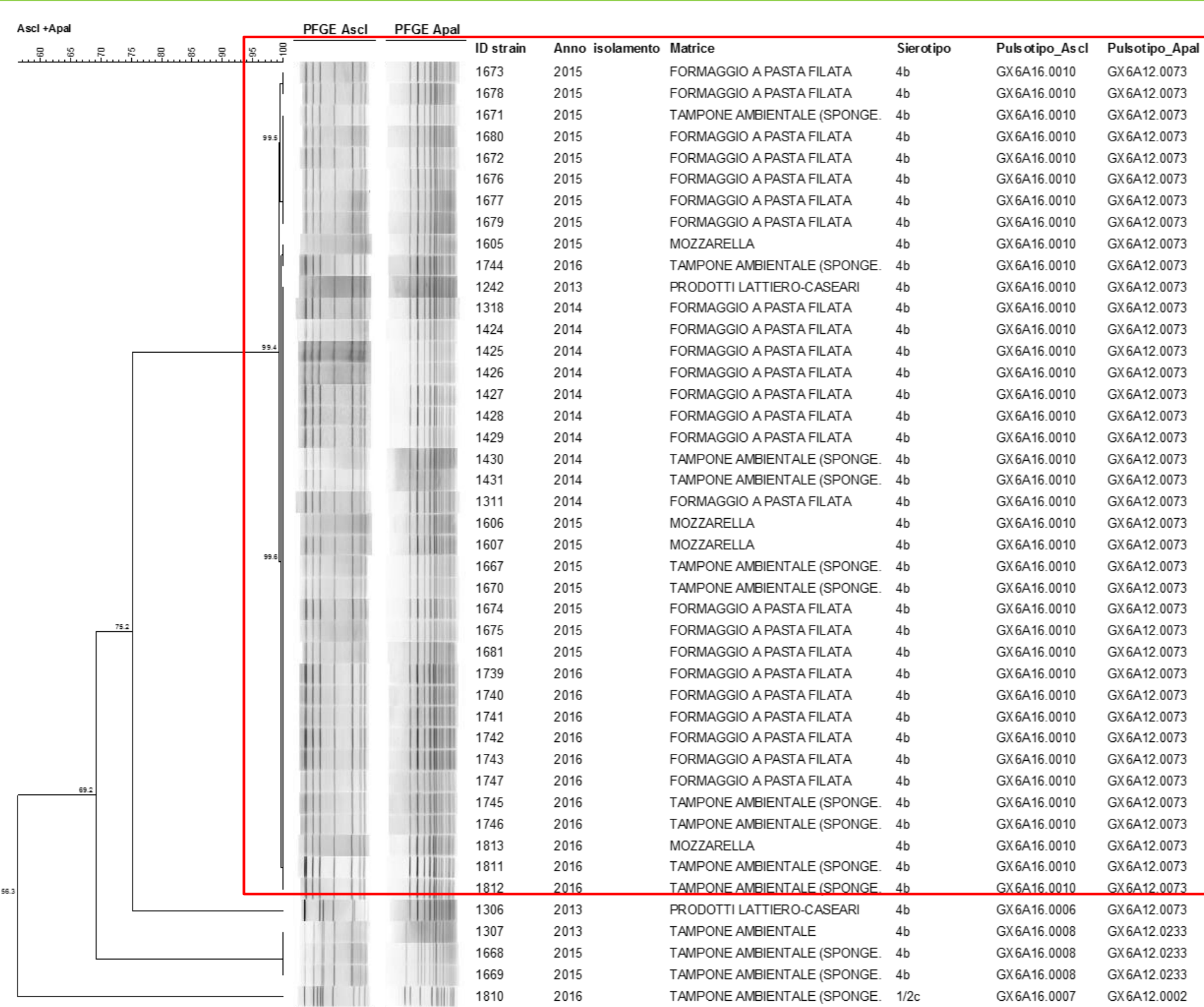


Figura 1: Dendrogramma della matrice combinata dei profili PFGE Apal e Ascl relativo ai 44 ceppi isolati.

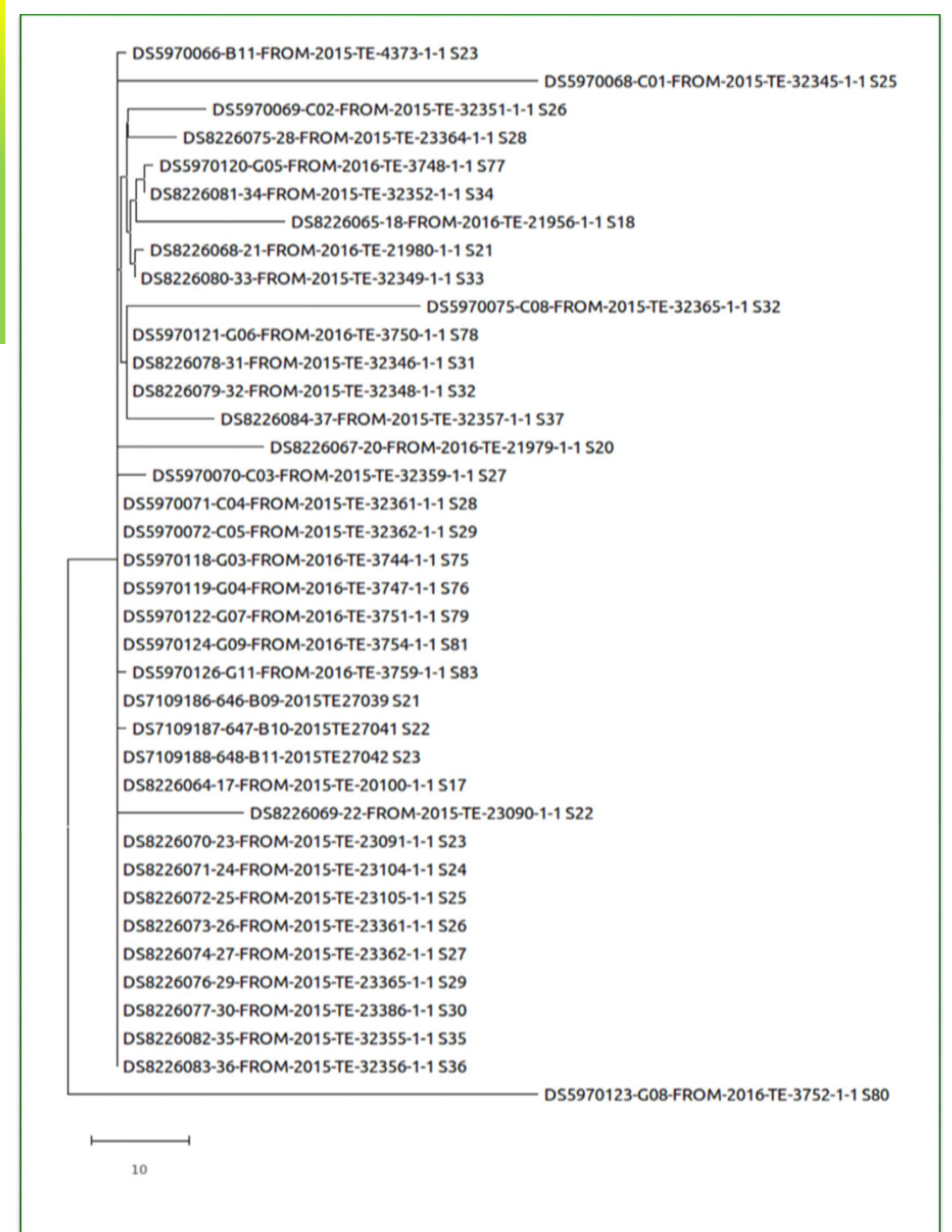


Figura 2: Albero NJ

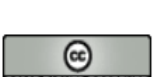
## CONCLUSIONI

Il ripetuto isolamento nel periodo 2013-2016 di ceppi con basso numero di SNPs differenti, caratterizzati quindi da una stretta correlazione filogenetica, conferma la persistenza di *Lm* nello stabilimento. L'elevato potere discriminante del WGS ha permesso di definire la correlazione filogenetica di *Lm* isolate nell'arco del tempo e di individuare ceppi persistenti le cui caratteristiche di produzione di biofilm e di resistenza ai sanificanti, potranno essere valutate in vitro.

### BIBLIOGRAFIA:

- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and control). 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA J. 15, 5077.
- Brigitte Carpentier Olivier Cerf. 2011. Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. Int. J. Food. Microbiol. 145(1): 1-8.
- PulseNet-International. 2013. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes* (accessibile su <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/listeria-pfge-protocol-508c.pdf>)

Stampato a cura dell'Unit  Operativa di Supporto Biblioteca, Informazione, Editoria (2018).



Quest'opera   stata rilasciata sotto la licenza Creative Commons Attribuzione-Non commerciale-Non opere derivate 2.5 Italia.

Per leggere una copia della licenza visita il sito web <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/it/> o spedisci una lettera a Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California, 94105, USA.