

Confronto dei metodi di tipizzazione molecolare per la caratterizzazione di ceppi di *Listeria monocytogenes* circolanti in Italia

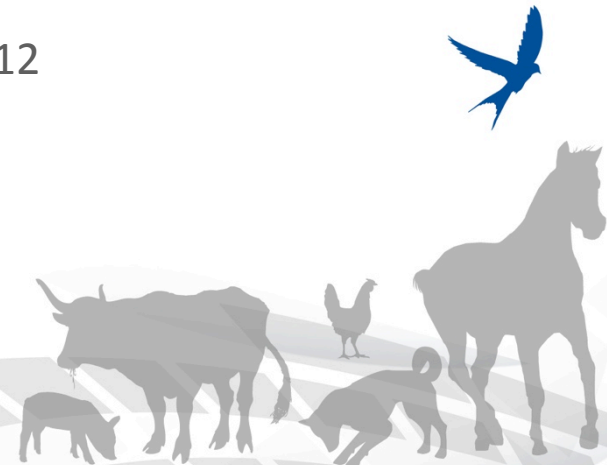
La Next Generation Sequencing

Progetto ricerca corrente MSRCTE0212


Iolanda Mangone

Ricerca e Sviluppo Biotecnologie

Teramo, 9 giugno 2015



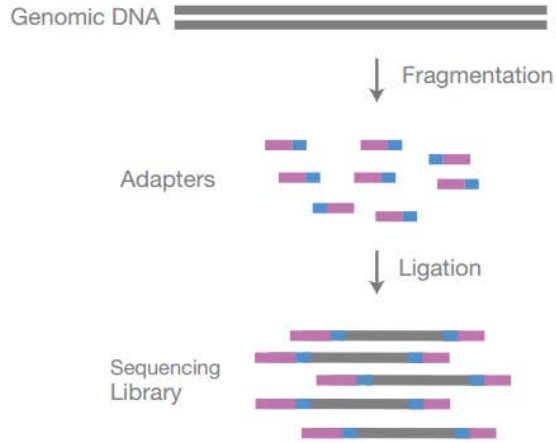
Cos'è la Next Generation Sequencing (NGS)

- 
- La NGS è anche chiamata high-throughput sequencing
 - Esistono diverse piattaforme NGS, sviluppate da diverse compagnie (Illumina, Life, ecc.)
 - Tutti questi sistemi seguono tre step principali:
 - la preparazione della libreria di DNA/RNA
 - la reazione di amplificazione
 - la reazione di sequenziamento



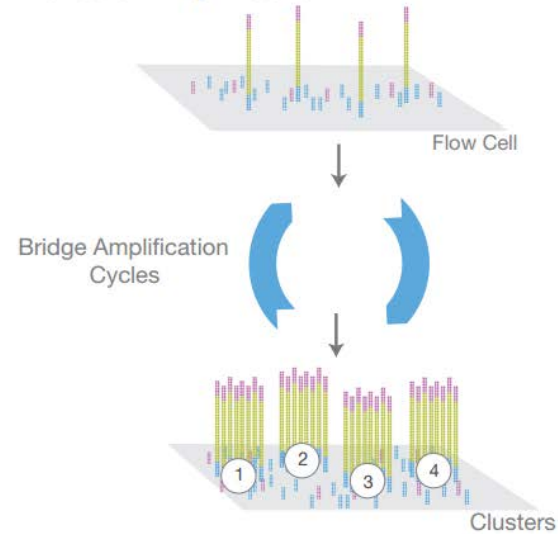
Il sequenziatore illumina

A. Library Preparation

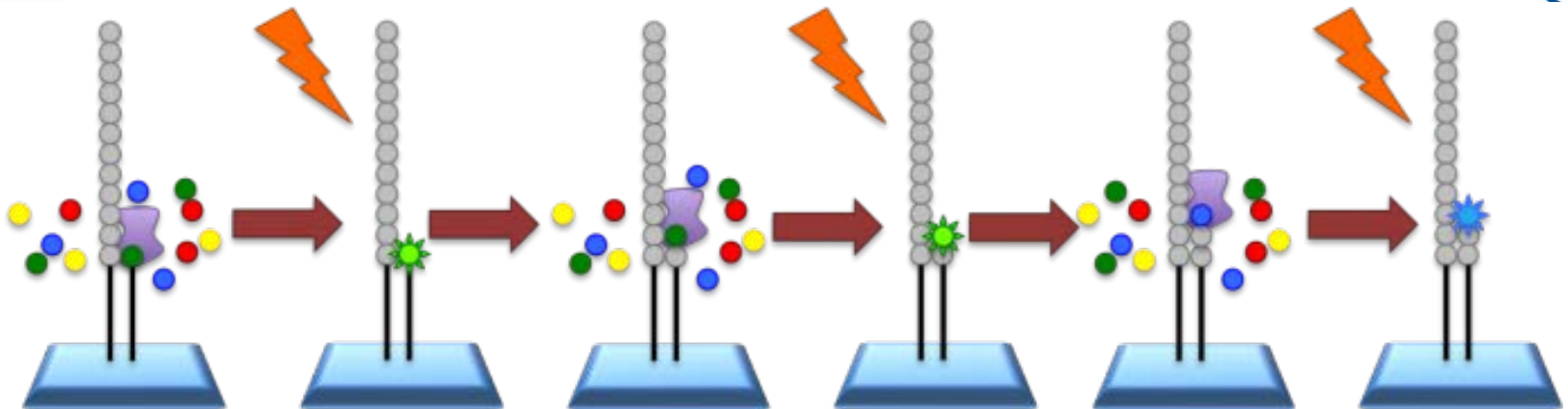


NGS library is prepared by fragmenting a gDNA sample and ligating specialized adapters to both fragment ends.

A. Cluster Amplification

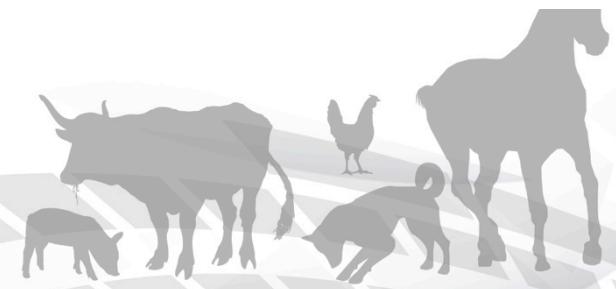
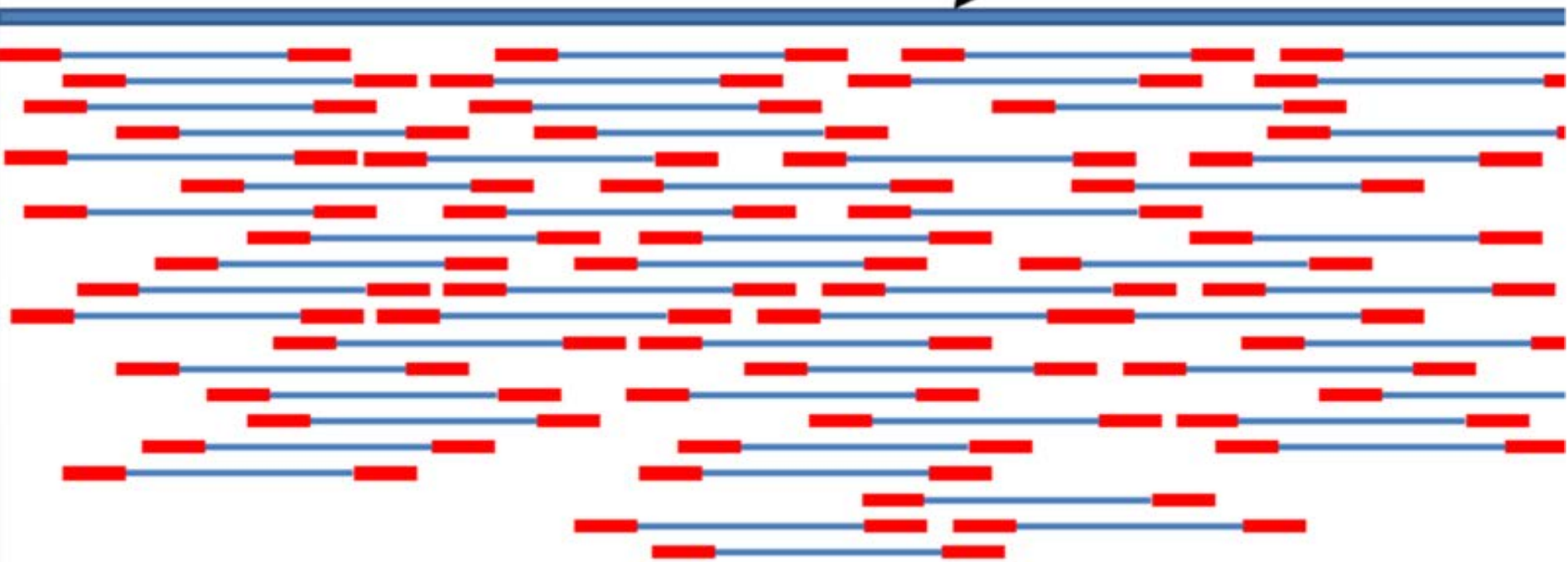



Library is loaded into a flow cell and the fragments hybridize to the flow cell surface. Each bound fragment is amplified into a clonal cluster through bridge amplification.

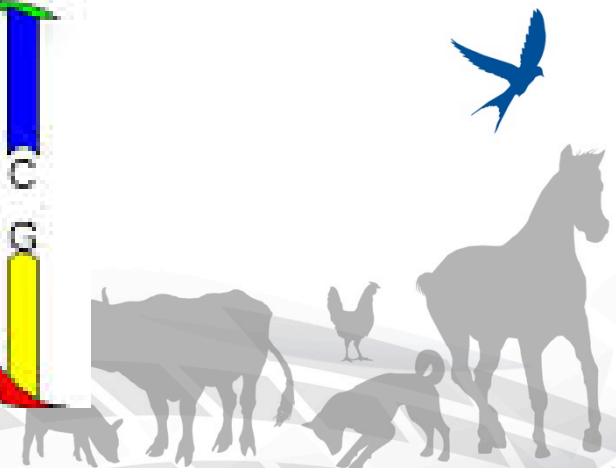
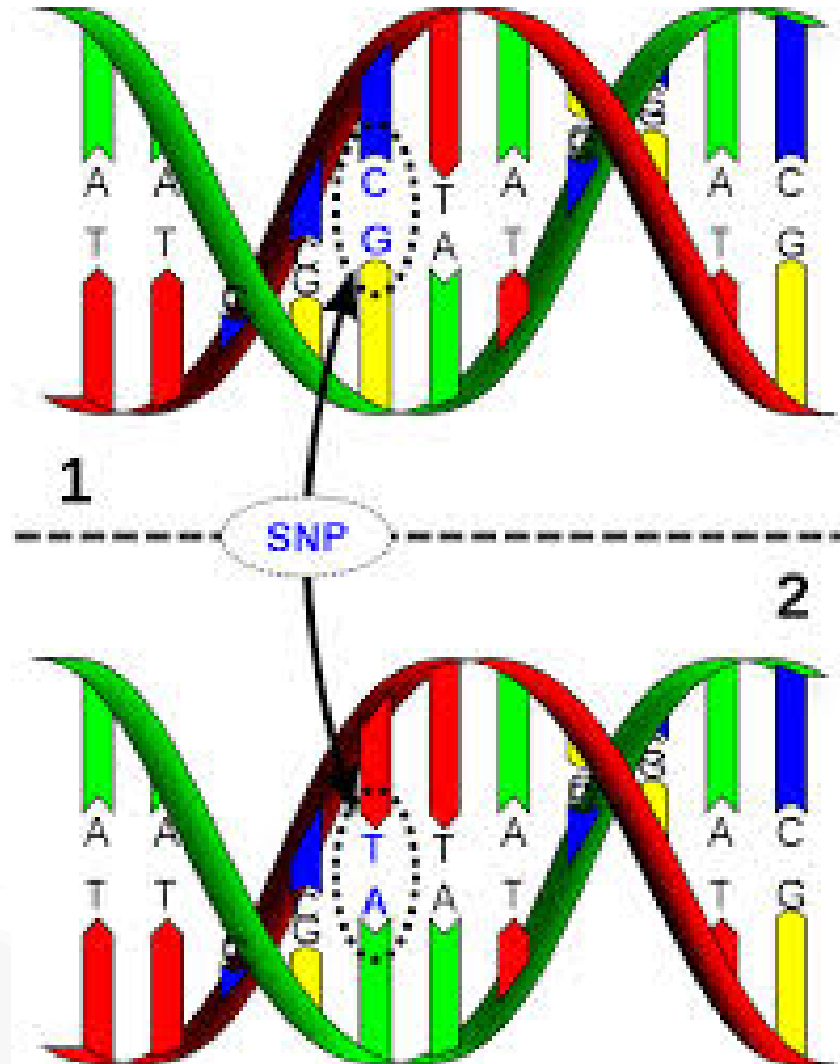


Allineamento delle reads

Reference Genome Sequence



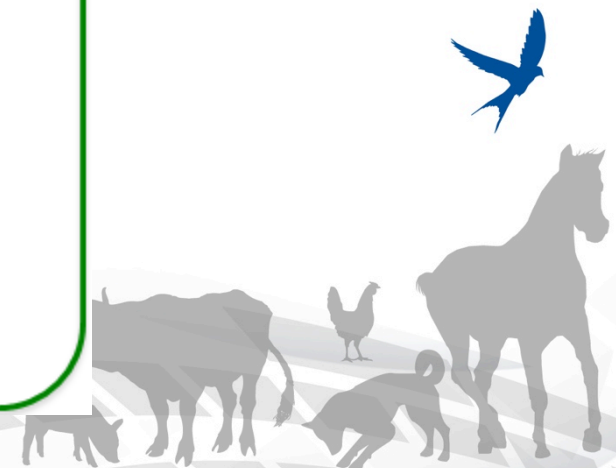
Cos'è uno SNP



SNP-pipeline

ACGATATTACACGTACACTCAAGTCGTTTCGGAAACCT	Reference
ACGATATTACACGTACATTCAAATCGT	Aligned Reads
ACGATATTACACGTACATTCAAATCGT	
ACGATATTACACGCACATTCAAAGTCGT	
CGATATTACACGTACATTCAAAGTCGTT	
ATATTTCACGTACATTCAAAGTCGTTTCG	
ATATTAAACGTACATTCAAAGTCGTTTCG	
ATTACACGTACATTCAAAGTCGTTTCGGAA	
ATTACACGTACATTTCACGTCGTTTCGGAA	

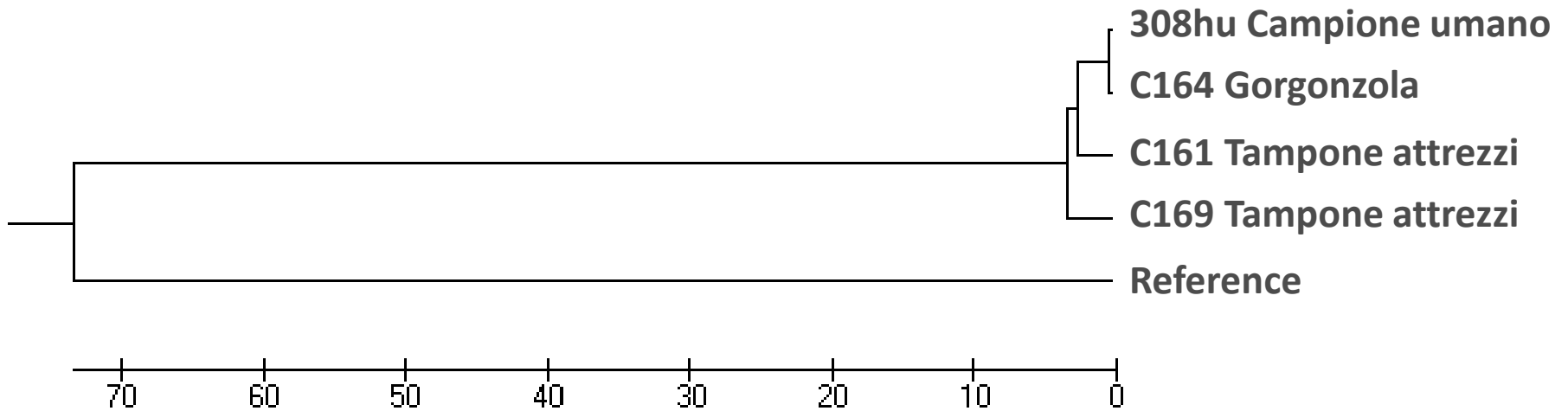
		Position in Reference						
		5442	5451	5511	6096	•	•	•
Strain	1	A	C	G	T			
	2	G	T	G	C			
	3	G	A	C	T			
	4	C	G	T	A			
	•					•		
	•						•	
	•							•



Risultati: l'albero ottenuto

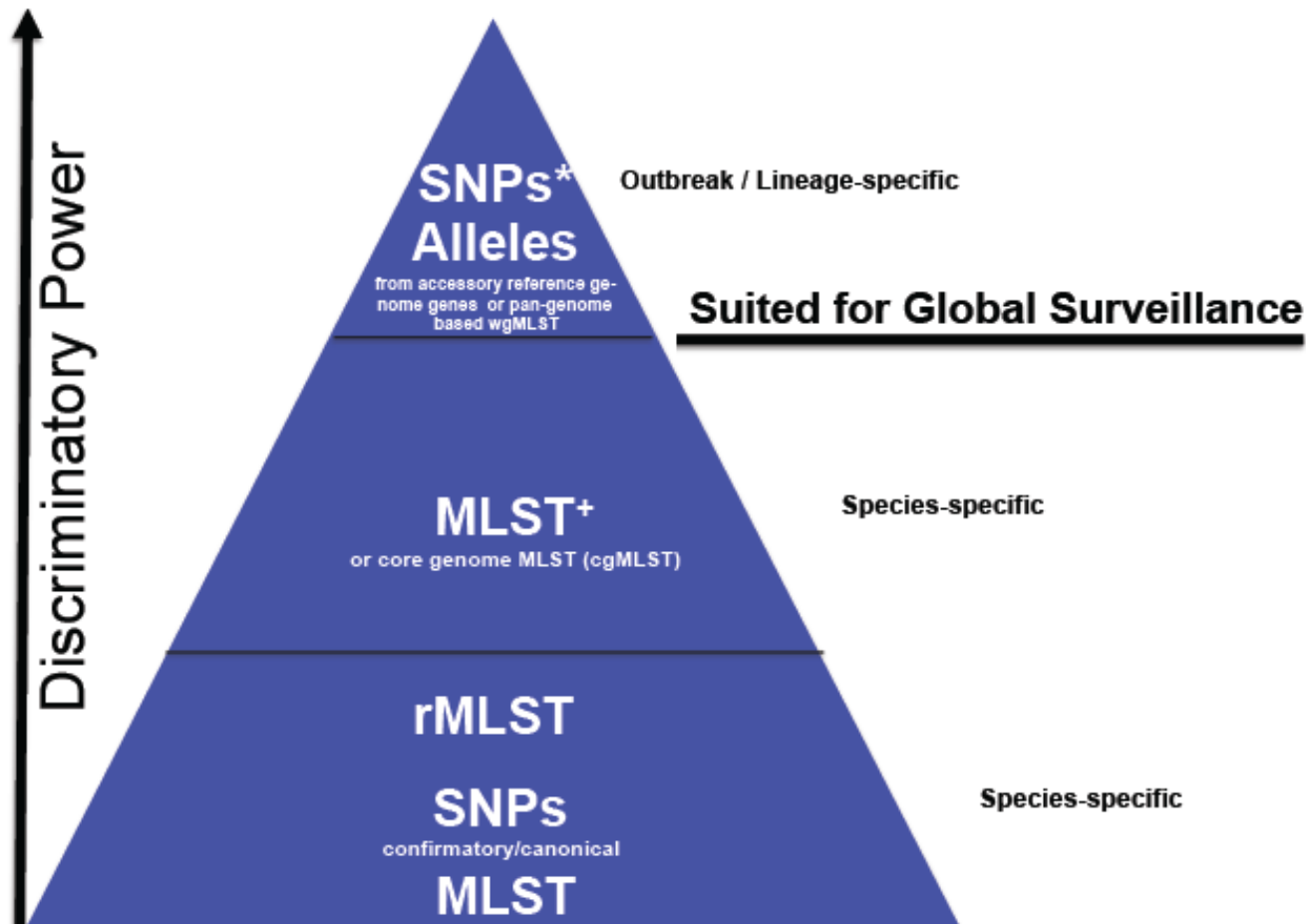
Pulsotipo: GX6A16.0071 GX6A12.0051

ST3



MLST, MLST+, SNPs

Standardized Hierarchical Microbial Typing



Conclusioni e direzioni future

- Questo studio **preliminare** ha confermato l'alto potere discriminatorio dell'NGS comparato con gli altri metodi di tipizzazione molecolare
- Sequenziando ed analizzando in **larga scala**, ceppi provenienti da ambiente ed alimenti e comparandoli con isolati umani potremmo aumentare la nostra capacità di identificare clusters di *L. monocytogenes* migliorando il **sistema di sorveglianza**.
- Identificazione della sorgente e dei modi di trasmissione di *L. monocytogenes*





IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

GRAZIE A TUTTI PER L'ATTENZIONE...

...e grazie a:

Cesare Cammà

Maurilia Marcacci

Massimiliano Orsini

Massimo Ancora

Marco Di Domenico

e tutto il reparto Ricerca e Sviluppo Biotecnologie!

