XVI Congresso Nazionale
S.I.Di.L.V.
30 settembre - 2 ottobre 2015
Montesilvano (PE)

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes
Laboratorio Nazionale di Riferimento

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

Patrizia Centorame[1], Vicdalia Aniela Acciari[1], Federica Di Simone[1], Antonella Pompei[1], Marina Torresi[1], Ettore Amato[2], Francesco Pomilio[1], Mirella Pontello[2], Giacomo Migliorati[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo, Italy
[2] Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze della Salute, Milano, Italy

Keywords
Listeria monocytogenes, MLST, PFGE.

Introduzione

Listeria monocytogenes causa la listeriosi, una malattia che colpisce l'uomo e gli animali. Il numero dei casi di listeriosi umana è aumentato negli ultimi anni nonostante ci sia stata una riduzione del numero di isolamenti di *L. monocytogenes* in alimenti pronti per il consumo (RTE) (3). La caratterizzazione dei ceppi di *L. monocytogenes* è essenziale per rintracciare la fonte di infezione, sia nei focolai sia nei casi sporadici, e identificare gli alimenti o le altre fonti di contaminazione. La *Pulsed Field Gel Electrophoreses* (PFGE), è considerata oggi il *gold standard* per la caratterizzazione di *L. monocytogenes*, tuttavia, non risponde più alle esigenze di rapidità, riproducibilità ed economicità per una rapida diffusione e confronto dei risultati tra i laboratori. Altri metodi di analisi quali la *Multi Locus Sequence typing* (MLST), basata sull'amplificazione di sette geni *housekeeping,* sono stati sviluppati per la caratterizzazione di *L. monocytogenes* per migliorare la capacità di rintracciare i ceppi responsabili delle infezioni (6). In particolare, la MLST rileva tutte le variazioni genetiche all'interno dei frammenti di specifici geni *housekeeping* mentre la PFGE esamina le variazioni che si riscontrano lungo tutto il genoma nei siti di restrizione specifici per l'enzima *Apa*I e *Asc*I. La maggiore differenza tra le due metodiche riguarda l'analisi dei dati: in PFGE l'interpretazione soggettiva dei risultati e la differenza nei vari protocolli applicati possono condurre ad una minore accuratezza del dato rispetto al metodo MLST.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di comparare le due metodiche (PFGE e MLST), attualmente in uso nel Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes* (LNR Lm) per evidenziare *cluster* genetici, al fine di determinare la loro concordanza.

Materiali e metodi

Sono stati selezionati 40 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da casi umani (n = 6) e alimenti (n = 34) appartenenti ai sierotipi 1/2a, 3a, 4b e 1/2b, raggruppati sulla base dei risultati con la PFGE in 6 *cluster* (**Figura 1**). I sei ceppi clinici, presentavano pulsotipi diversi tra di loro, ottenuti usando il protocollo PulseNet (2). Per ciascuno dei ceppi umani sono stati selezionati tutti ceppi di origine non umana (alimenti e ambienti di lavorazione), presenti nel database del LNR Lm, con pulsotipi aventi grado di similarità del 100% (**Tabella 1**).

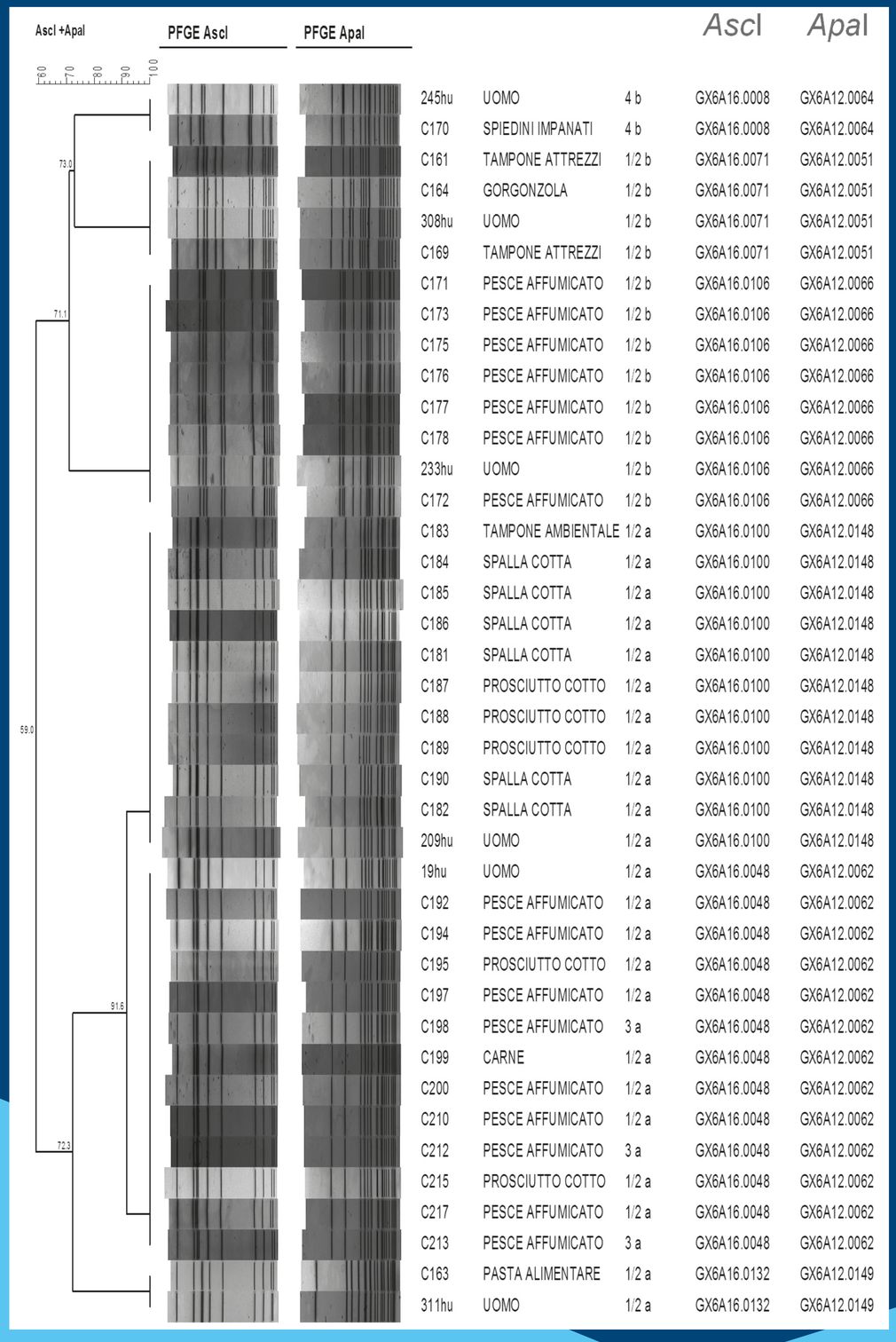
I ceppi così selezionati (n = 40) sono stati caratterizzati con MLST secondo il protocollo di Haase *et al*. 2013 (4) apportando alcune modifiche. I profili di MLST sono stati assegnati in base al database internazionale www.pasteur.fr/mlst. Il dendrogramma è stato costruito usando il programma BioNumerics ver. 6.6.

Tabella 1. Elenco dei ceppi selezionati e dei loro relativi sierotipi e pulsotipi.

ID CEPPO UMANO	ID CEPPO ALIMENTARI	SIEROTIPO	PULSOTIPO	
			Ascl	*Apal*
245	C170	4b	GX6A16.0008	GX6A12.0064
308	C161, C164, C169	1/2b	GX6A16.0071	GX6A12.0051
233	C171, C172, C173, C175, C176, C177, C178	1/2b	GX6A16.0106	GX6A12.0066
209	C181, C182, C183, C184, C185, C186, C187, C188, C189, C190	1/2a	GX6A16.0100	GX6A12.0148
19	C192, C194, C195, C197, C199, C200, C210, C215, C217	1/2 a	GX6A16.0048	GX6A12.0062
	C198, C212, C213	3a		
311	C163	1/2a	GX6A16.0132	GX6A12.0149

Figura 1. Dendrogramma della matrice combinata dei profili di macrorestrizione di *Asc*I e *Apa*I.

Le similarità tra i profili di macrorestrizione sono state calcolate usando il coefficiente di Dice con parametri di ottimizzazione e tolleranza fissati all' 1% per entrambi gli enzimi. La clusterizzazione e la costruzione del dendrogramma sono state effettuate con metodo UPGMA.



Risultati e Conclusioni

I risultati ottenuti in MLST evidenziano la distribuzione dei 40 ceppi esaminati in 5 *cluster*. Due *cluster* generati da due differenti profili in PFGE *Ascl/Apa*l (GX6A16.0048/GX6A12.0062; GX6A16.0100/GX6A12.0148) (**Figura 1**) sono risultati indistinguibili in MLST, appartenenti ad un unico *cluster* con ST 8 e *Clonal complex* 8 (**Figura 2**).

La concordanza tra i due metodi è p = 41,5 % (limite confidenza inferiore 27,7%, limite confidenza superiore 56,7%).

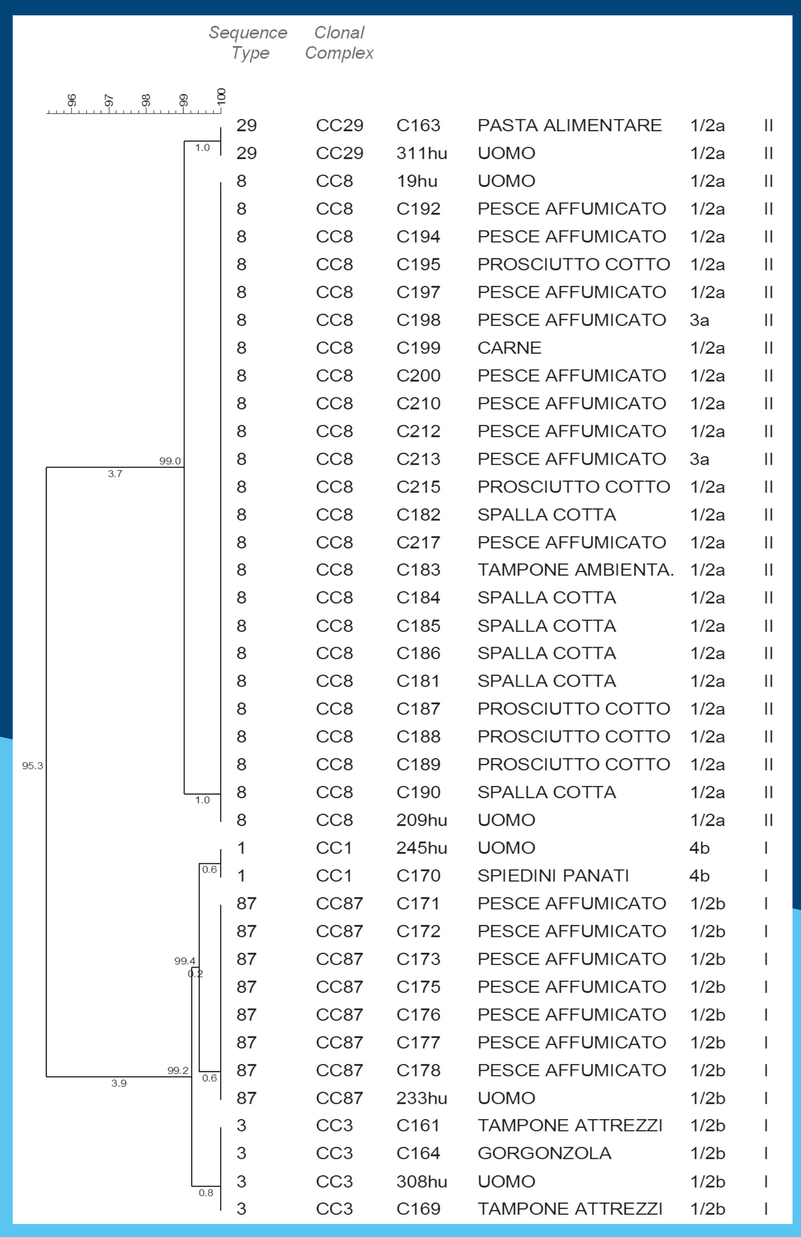
La PFGE da sola o in combinazione con la sierotipizzazione è attualmente il metodo di scelta per la caratterizzazione dei ceppi di *L. monocytogenes* e per identificare l'origine dei focolai di listeriosi. Anche la MLST è oggi considerata uno dei metodi di tipizzazione molecolare per caratterizzare diversi batteri, tra cui *L. monocytogenes* (1, 5).

In questo lavoro si evidenzia che la metodica MLST risulta avere un minor potere discriminante rispetto alla PFGE, in accordo con altri autori (6). Tuttavia, la bassa concordanza ottenuta tra i due metodi dimostra che le due tecniche possono essere considerate complementari.

In conclusione, nelle indagini epidemiologiche è auspicabile l'utilizzo di entrambe le metodiche, al fine di migliorare la caratterizzazione dei ceppi di *L. monocytogenes* isolati durante le malattie di origine alimentare, per individuare le fonti di contaminazione. Inoltre, la MLST può essere utilizzata per determinare le relazioni filogenetiche tra i ceppi di *L. monocytogenes*, migliorando così la comprensione dei meccanismi evolutivi compresi gli isolati di origine umana.

Figura 2. Dendrogramma della matrice combinata degli alleli *abc*Z , *bgl*A, *cat*, *dap*E, *dat*, *ldh*, *lhk*A.

Le similarità tra gli alleli sono stati calcolati usando il coefficiente di fast algorithm. La clusterizzazione e la costruzione del dendrogramma sono state effettuate con metodo UPGMA



Bibliografia

1. Cai S., Kabuki D.Y., Kuaye A.Y., Cargioli T.G., Chung M.S., Nielsen R., and Wiedmann M. 2002. Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol,* **40**, 3319-3325.

2. Center of Disease Control and Prevention (CDC). 2004. PulseNet USA: Standardized protocol for molecular subtyping of *Listeria monocytogenes* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). CDC, Atlanta, 9 p. Accessibile su http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/pulsenet_listeria_protocol%20.pdf consultato il 20/07/15.

3. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal,* **13** (1), 3991, 162 pp.

4. Haase J.K., Didelot X., Lecuit M., Korkeala H., *L. monocytogenes* MLST Study Group, and Achtman M. 2013. The ubiquitous nature of *Listeria monoytogenes* clones: a large scale Multilocus Sequence Typing study. *Environ Microbiol*, **16** (2), 405-416.

5. Salcedo C., Arreaza L., Alcalá B., de la Fuente L., Vázquez J.A. 2003. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J Clin Microbiol*, **41**, 757-762.

6. Stessl B., Rückerl I., Wagner M. 2014. Multilocus sequence typing (MLST) of *Listeria monocytogenes*. *Methods Mol Biol,* **1157**, 73-83.