



IZSAM G. CAPORALE
TERAMO



Listeria monocytogenes

Laboratorio Nazionale di Riferimento

Produzione di biofilm e genomica dei ceppi di *Listeria monocytogenes*

Francesca Maggio
Patrizia Centorame


“Giornata di studio, Il Laboratorio Nazionale di Riferimento di *Listeria monocytogenes*”
Teramo, 14 Dicembre 2017





IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



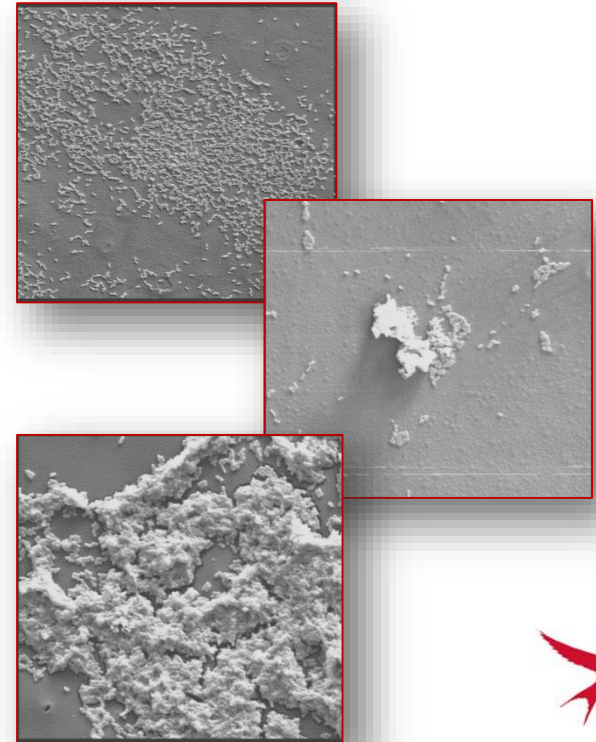
Il seguente lavoro è stato oggetto di una Relazione finale di Tirocino di Tesi Magistrale in Microbiologia alimentare.

E' stato svolto in combinazione tra l'Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Bioscienze e Tecnologie agroalimentari e ambientali e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise, reparto di Igiene degli Alimenti.



Studio dei fattori che influenzano la produzione di biofilm da parte di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati in un'industria di lavorazione di prodotti ittici

- Temperatura,
- Durata del test di laboratorio,
- Caratteristiche fenotipiche e genotipiche del ceppo.



Fasi di formazione del biofilm in *Listeria monocytogenes* (SEM), IZSAM.

Produzione di biofilm

Temperatura	Tempi d'incubazione
12° C	72 ore e 7 giorni
30° e 37° C	24, 48 e 72 ore

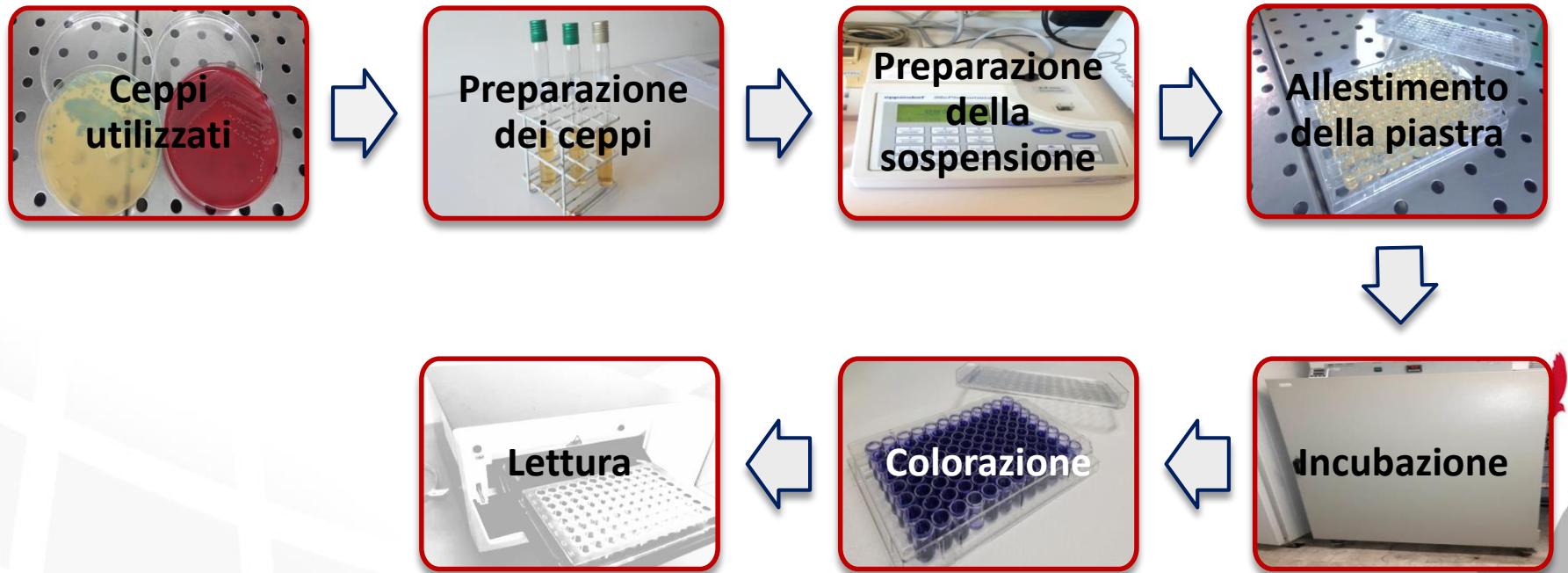
Caratterizzazione fenotipica e genotipica dei ceppi:

- Specie, sierogruppo, presenza del gene *flaA*, sierotipo e pulsotipo,
- Sequenziamento dell'intero genoma di tutti i ceppi (NGS), assemblaggio dei dati, analisi dei profili genetici e ricerca dei geni implicati nella produzione di biofilm,
- Studio delle correlazioni genomiche attraverso il modello filogenetico della matrice di SNPs



Determinazione della capacità di produzione di biofilm in vitro

Procedura di laboratorio



Determinazione della capacità di produzione di biofilm in vitro

Espressione dei risultati

Calcolare la differenza tra OD e OD_c:

- $OD \leq OD_c$: **Ceppo non produttore di biofilm**
- $OD_c < OD \leq (2 \times OD_c)$: **Ceppo debole produttore di biofilm**
- $(2 \times OD_c) < OD \leq (4 \times OD_c)$: **Ceppo moderato produttore di biofilm**
 - $OD > (4 \times OD_c)$: **Ceppo forte produttore di biofilm**

OD = valore medio delle letture ottenute nei pozzetti contenenti la
sospensione batterica

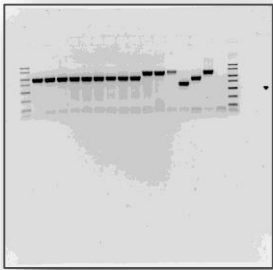
OD_c o valore di cut-off = somma del valore medio + 3 volte la deviazione
standard delle letture ottenute nei pozzetti contenenti il brodo sterile.



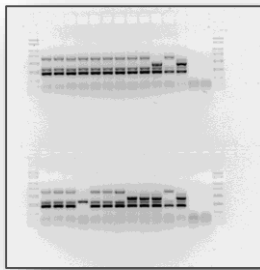
Metodo

PCR

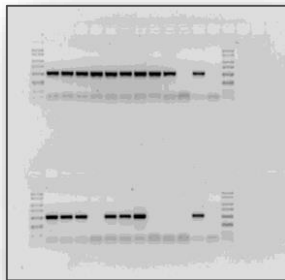
Specie



Sierogruppo

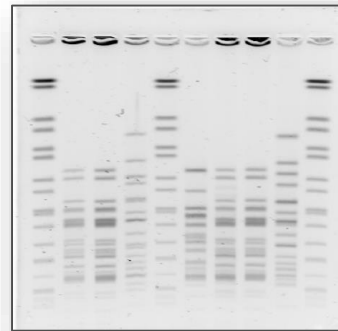


flaA

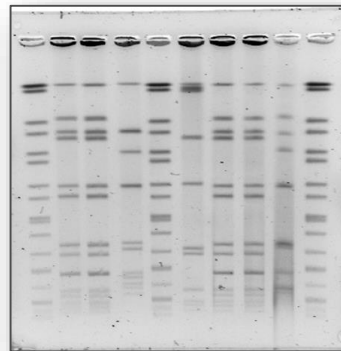


PFGE

Apal



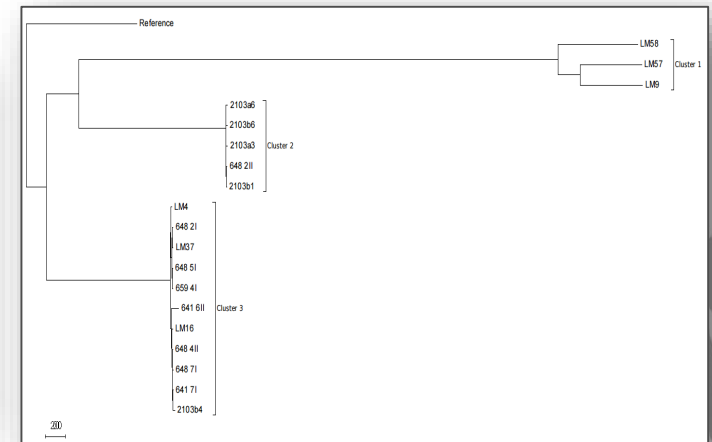
Ascl



Sequenziamento dell'intero genoma (WGS)

- Next generation sequencing (NGS)
- Ricerca dei geni maggiormente incidenti sulla formazione di biofilm

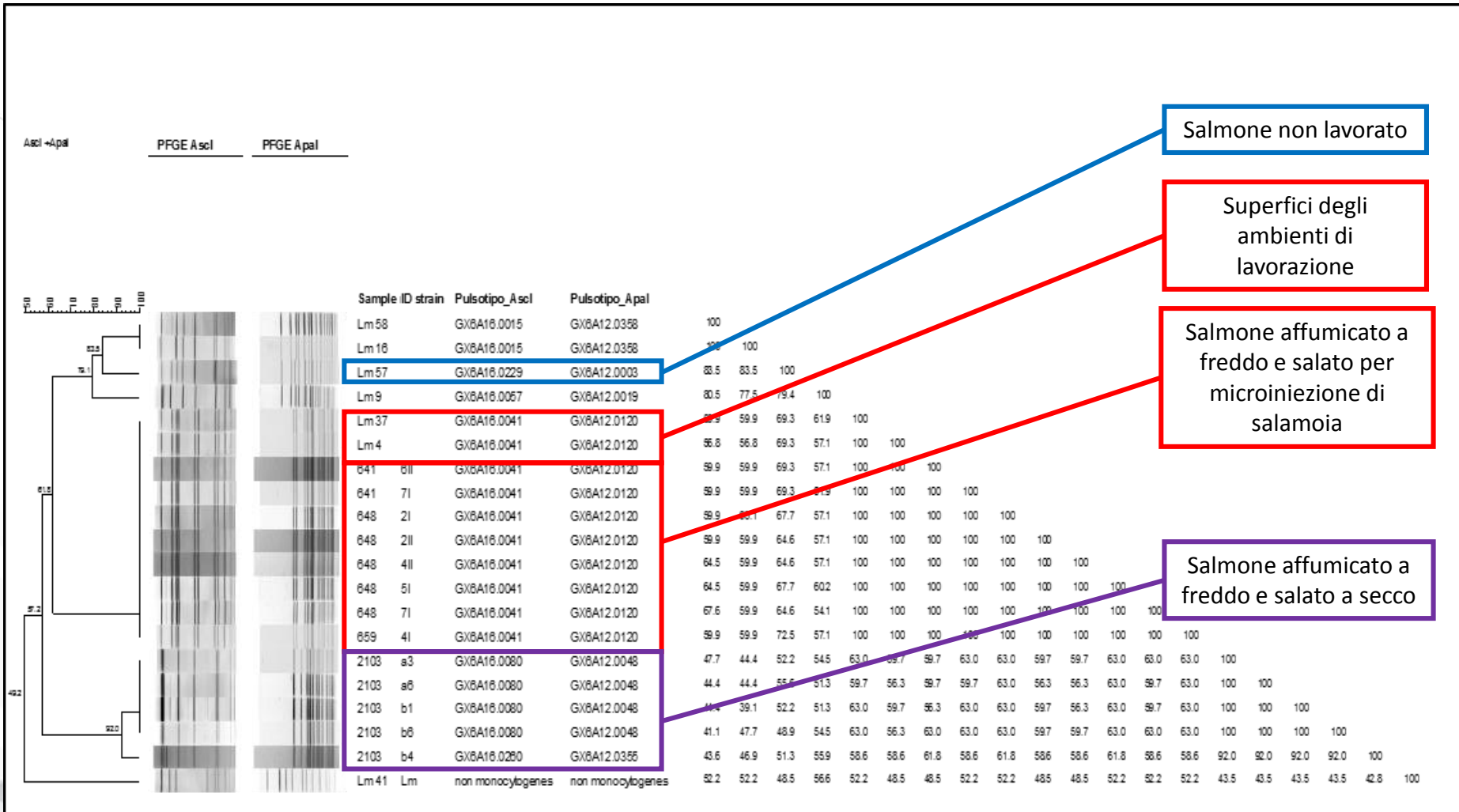
Analisi SNPs



Risultati e Discussione

Campione-	Origine	Specie	Sierogruppo	flaA	Antigene somatico "O"	Antigene flagellare "H"	Sierotipo	Pulsotipo Asc/	Pulsotipo Apa/
LM16	Superfici degli ambienti di lavorazione	<i>Listeria monocytogenes</i>	IIb	-	I/II I+	AB A C	1/2 b	GX6A16.0015	GX6A12.0358
LM58	Salmone affumicato a freddo e salato per microiniezione di salamoia								
LM57	Salmone non lavorato	<i>Listeria monocytogenes</i>	IVb	-	V/VI VI+	AB A C	4 b	GX6A16.0029	GX6A12.003
641/6II	Salmone affumicato a freddo e salato per microiniezione di salamoia	<i>Listeria monocytogenes</i>	IIa	+	I/II I+	AB A	1/2 a	GX6A16.0041	GX6A12.0120
641/7I									
648/2I									
648/2II									
648/4II									
648/5I									
648/7I									
659/4									
LM4	Superfici degli ambienti di lavorazione								
LM37									
LM9	Superfici degli ambienti di lavorazione	<i>Listeria monocytogenes</i>	IVb	-	V/VI VI+	AB A C	4 b	GX6A16.0057	GX6A12.0019
2103a3	Salmone affumicato a freddo e salato a secco	<i>Listeria monocytogenes</i>	IIa	+	I/II I+	AB A	1/2 a	GX6A16.0080	GX6A12.0048
2103a6									
2103b1									
2103b6									
2103b4	Salmone affumicato a freddo e salato a secco	<i>Listeria monocytogenes</i>	IIa	+	I/II I+	AB A	1/2 a	GX6A16.0260	GX6A12.0355
LM41	Salmone non lavorato	<i>Listeria seeligeri</i>	-	-	-	-	-	-	-

Determinazione del pulsotipo attraverso PFGE



Salmone non lavorato

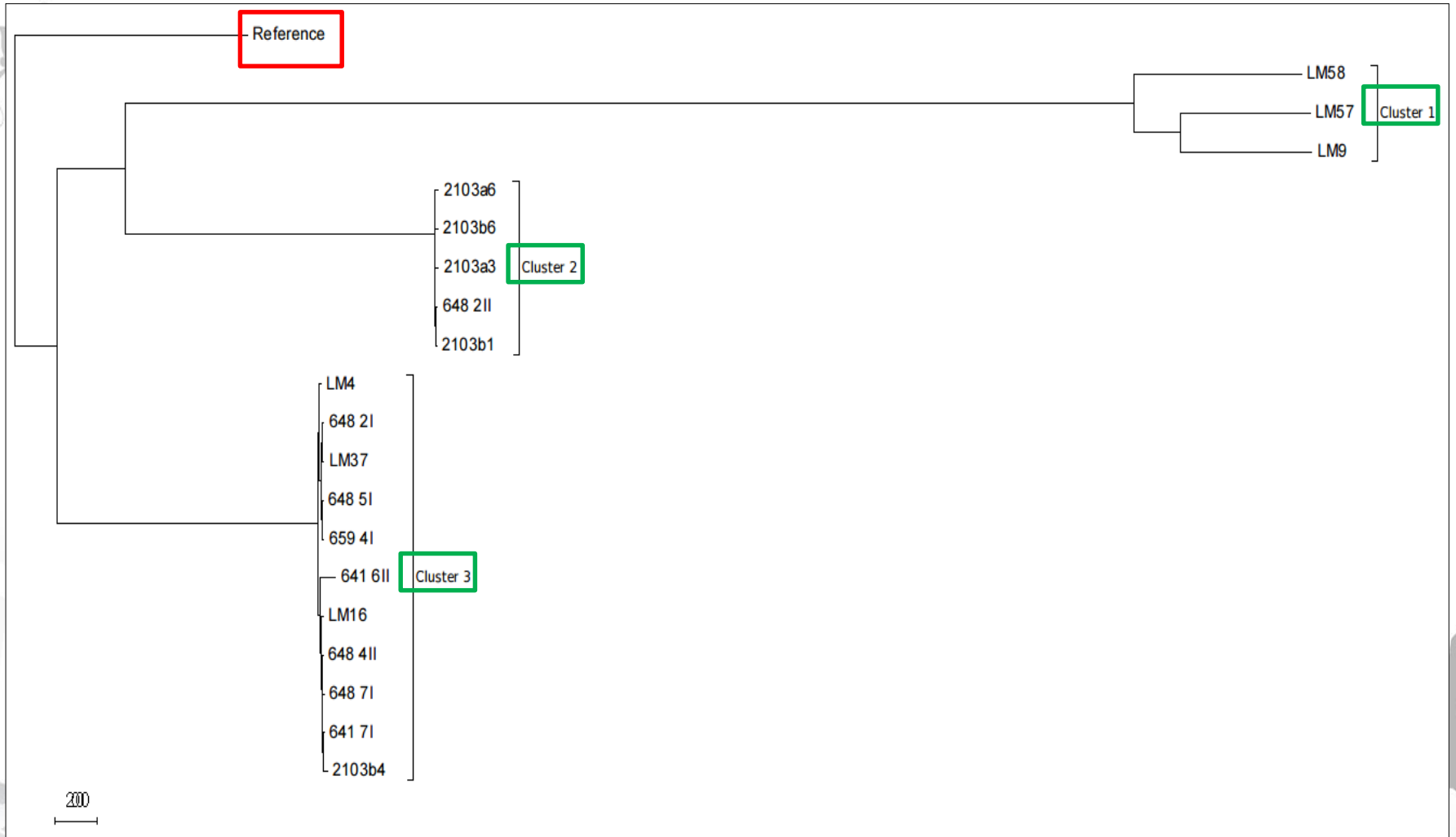
Superfici degli ambienti di lavorazione

Salmone affumicato a freddo e salato per microiniezione di salamoia

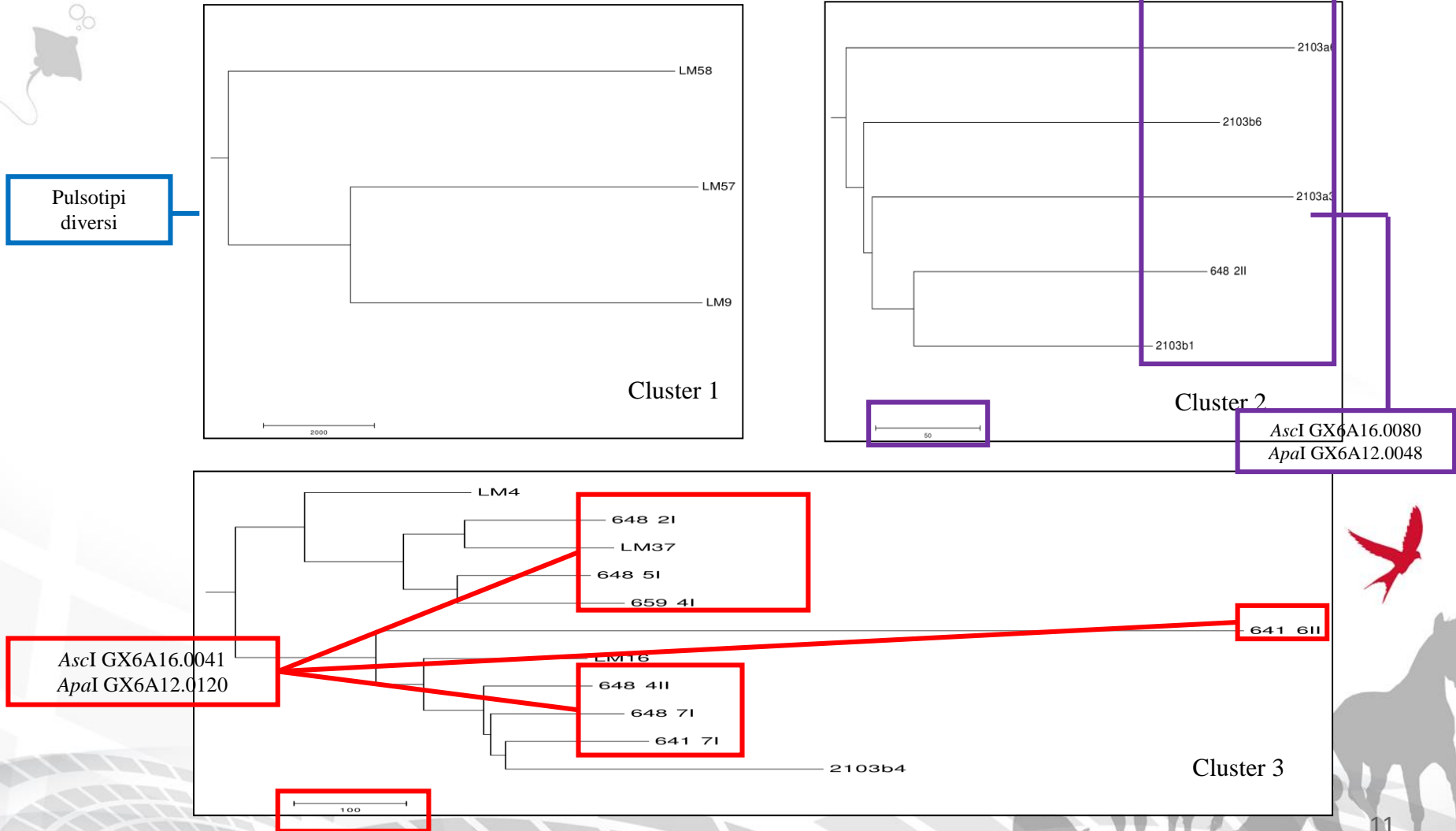
Salmone affumicato a freddo e salato a secco

Risultati e Discussione

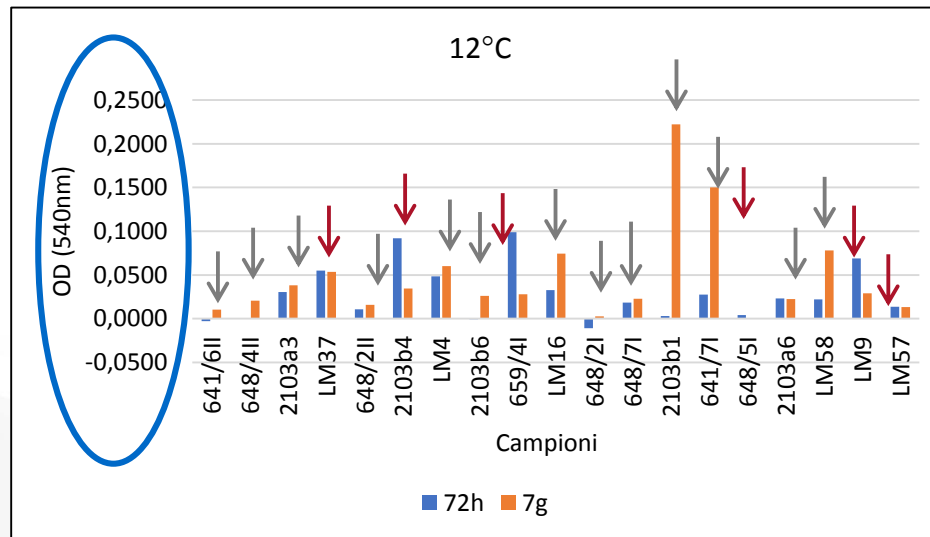
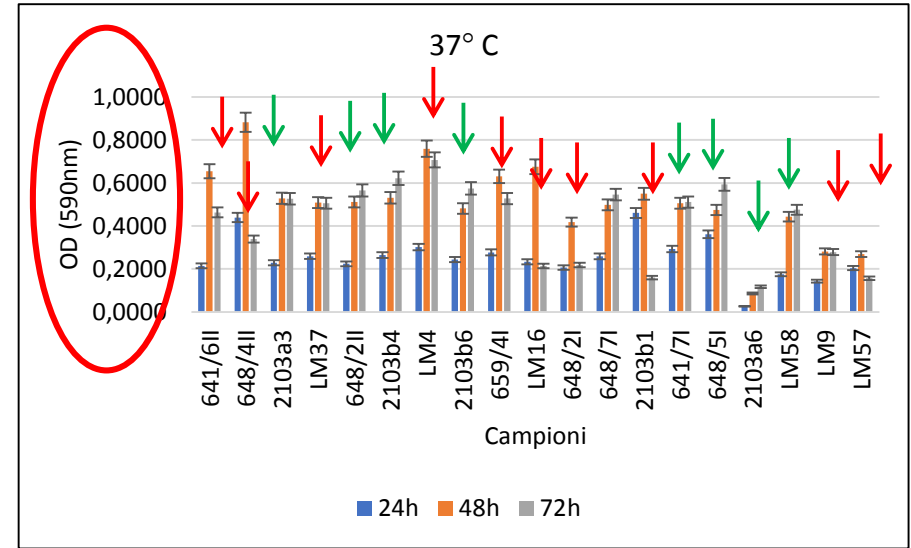
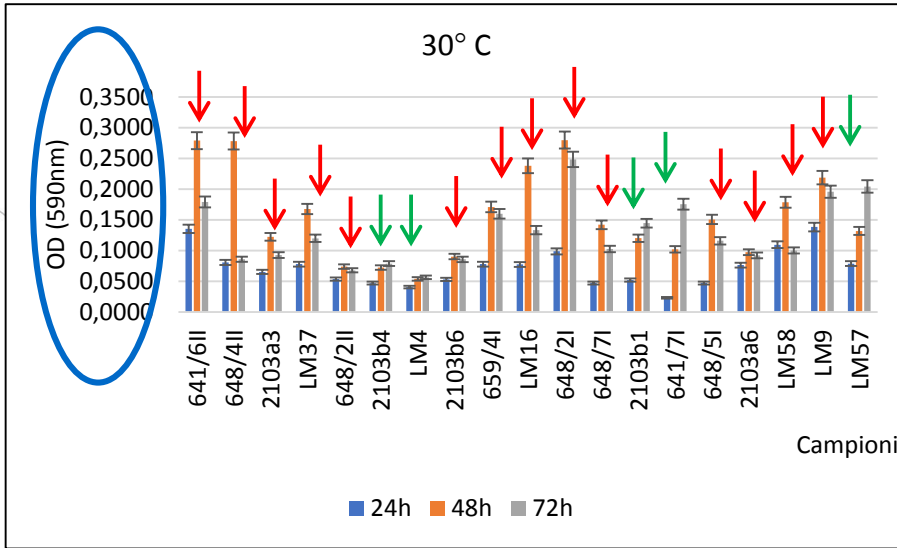
NGS, Neighbor-Joining (NJ), SNPs (Singole Nucleotide Polymorfism)



NGS: SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) analysis Neighbor-Joining (NJ)



Determinazione della capacità di produzione di biofilm in vitro



Risultati e Discussione

Geni coinvolti nella produzione di biofilm



Geni presenti in tutti i ceppi:

- *actA*,
- *lapB*,
- *mpl*,
- *orfZ*,
- *plcA*,
- *plcB*,
- *PrfA*,
- *relA*,
- *hly*,
- *InIA*,
- *InIB*,
- *hpt*,
- *SecA2*,
- *luxS*,
- Agr (BACD).



Geni presenti in alcuni ceppi:

- *bapI*,
- *vip*,
- *ispC*.



Geni determinanti la virulenza e l'invasione primaria dell'ospite.



Legenda:

NP= Ceppo non produttore di biofilm
 D= Ceppo debole produttore di biofilm
 M= Ceppo moderato produttore di biofilm
 F= Ceppo forte produttore di biofilm

Risultati e Discussione

Incidenza dei geni sulla capacità di produzione di biofilm

	641/6II	648/4II	2103a3	LM37	648/2II	2103b4	LM4	2103b6	659/4I	LM16	648/2I	648/7I	2103b1	641/7I	648/5I	2103a6	LM58	LM9	LM57	
<i>bapI</i>	A	A	P	P	P	P	A	P	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A
<i>vip</i>	A	A	P	A	P	A	A	P	A	A	A	A	P	A	A	P	P	P	P	P
<i>ispC</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P	P

Campione	24 h		48 h		72 h		72 h	7 g
	30° C	37° C	30° C	37° C	30° C	37° C	12° C	12° C
641/6II	NP	M	D	F	D	F	NP	NP
648/4II	D	M	M	F	D	F	D	NP
2103a3	D	M	D	F	D	F	D	NP
LM57	D	M	M	F	M	F	D	D
LM37	D	F	D	F	D	F	D	NP
648/2II	D	F	D	F	D	F	D	NP
2103b4	D	M	M	F	D	F	D	D
LM4	D	M	M	F	D	F	NP	NP
2103b6	D	M	D	F	D	F	D	NP
659/4I	D	M	M	F	M	F	NP	D
LM16	D	M	M	F	D	F	NP	NP
648/2I	D	M	D	F	D	F	NP	NP
648/7I	D	F	D	F	M	F	NP	M
2103b1	D	M	D	F	D	F	NP	D
641/7I	D	M	D	F	D	F	D	NP
648/5I	D	D	D	D	D	F	D	D
2103a6	D	M	M	M	M	F	D	NP
LM58	D	M	D	M	D	F	D	NP
LM9	D	F	D	F	M	F	NP	M

Conclusioni

Nella nostra sperimentazione, la capacità di produzione di biofilm è risultata essere fortemente dipendente da temperatura e tempo di incubazione, piuttosto che dalle caratteristiche fenotipiche e genotipiche dei ceppi.


La produzione di biofilm tra 30 ° C e 37 ° C è superiore a 37 ° C, a 12 ° C è maggiore a sette giorni rispetto a 72 h di incubazione.

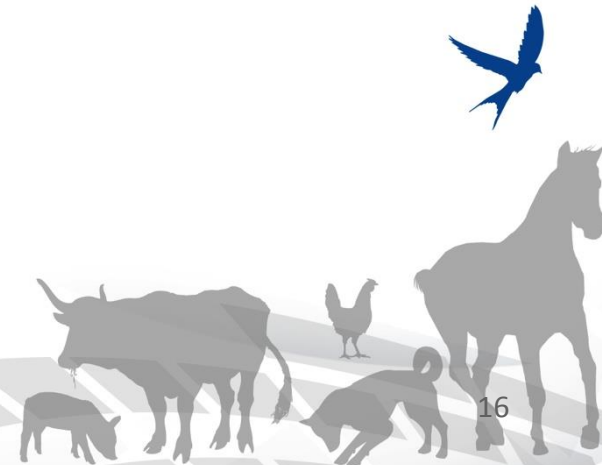
La caratterizzazione dei ceppi mediante PFGE è limitante nella distinzione tra i ceppi, non riesce a definire la reale omologia genomica tra i ceppi (se esistente). Infatti i ceppi di *Listeria monocytogenes* aventi lo stesso pulsotipo combinato, sono distanti >50 SNPs.

In generale negli ambienti di lavorazione, le superfici costituiscono la causa principale di contaminazione del prodotto finito da parte di *Listeria monocytogenes*, nonostante sia inevitabile l'ingresso in azienda di ceppi di *Listeria monocytogenes* tramite le materie prime.



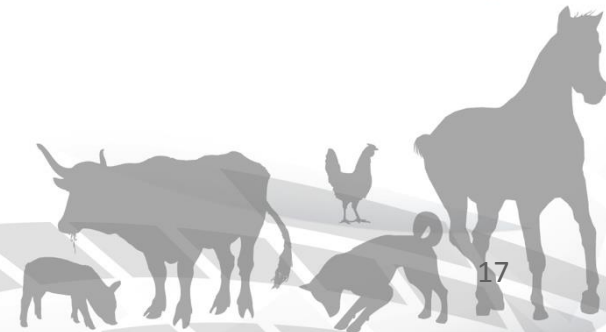
Prospettive future

- 
- Validare il metodo di colorazione del biofilm e valutare l'effetto della concentrazione di Cristal Violetto per la definizione dei ceppi quali non produttori, deboli, medi e forti produttori
 - Studiare le interazioni inter- e intra-specie sulla formazione di biofilm in vitro
 - Verificare l'efficacia di nuove sostanze (biocidi naturali, oli essenziali, batteriocine batteriche) nella produzione di biofilm sulle superfici di lavorazione degli alimenti
 - Valutare l'influenza che il corredo genico ha sulla capacità di *Listeria monocytogenes* di produrre biofilm



Ringrazio il **Prof. Antonello Paparella**
e la **Dott.ssa Annalisa Serio**, la
Direzione e il personale del reparto
di Igiene degli alimenti del
Laboratorio Nazionale di Riferimento
per *Listeria monocytogenes*
dell'IZSAM per avermi dato la
possibilità di svolgere le attività
sperimentali della mia tesi:
**Dott. Francesco Pomilio, Dott.ssa
Anna Ruolo, Dott.ssa Patrizia
Centorame, Dott. Massimiliano
Orsini, Dott.ssa Vicdalia Acciari,
Dott.ssa Marina Torresi, Dott.ssa
Gabriella Centorotola, Dott.ssa
Silvia Scattolini e Dott. Romolo
Salini.**

Ringraziamenti



Infine...

