



Listeria monocytogenes

Laboratorio Nazionale di Riferimento

**Ceppi di *Listeria monocytogenes* non emolitici,
caratterizzazione e genoma: quando la biologia
infrange le regole.**

**Marina Torresi
Massimiliano Orsini**

“Giornata di studio sulla *Listeria monocytogenes*”, Teramo, 14 Dicembre 2017



Dott. Pomilio Francesco
LNR per *Listeria monocytogenes*
IZS Abruzzo Molise
Campo Boario
TERAMO

Oggetto: Invio ceppi di *Listeria monocytogenes*

Gentile Dr Pomilio F., come da accordi intercorsi si inviano le microbank dei seguenti XX ceppi di *Listeria monocytogenes*.

- Ceppi provenienti dal Piano Alimenti Marche 2017:

ID ceppo (N. conferimento/n. colonia - dettaglio)	Accettazione	N. colonie inviate (identificativo colonie)
CONFIDENTIAL		2 (1, 2)
		1*
		1*
		1*
		1*
		1*

*Colonie non emolitiche ma confermate in PCR per *L. monocytogenes*.

Le informazioni dei ceppi verranno inserite nel SEAP al più presto.

Fermo, 04/04/2017

Dott.ssa Giuliana Blasi
documento informatico firmato digitalmente, ai sensi del
T.U. D.P.R. n. 445/2000, del D.Lgs 82/2005 e norme collegate,
il quale sostituisce il testo cartaceo e la firma autografa



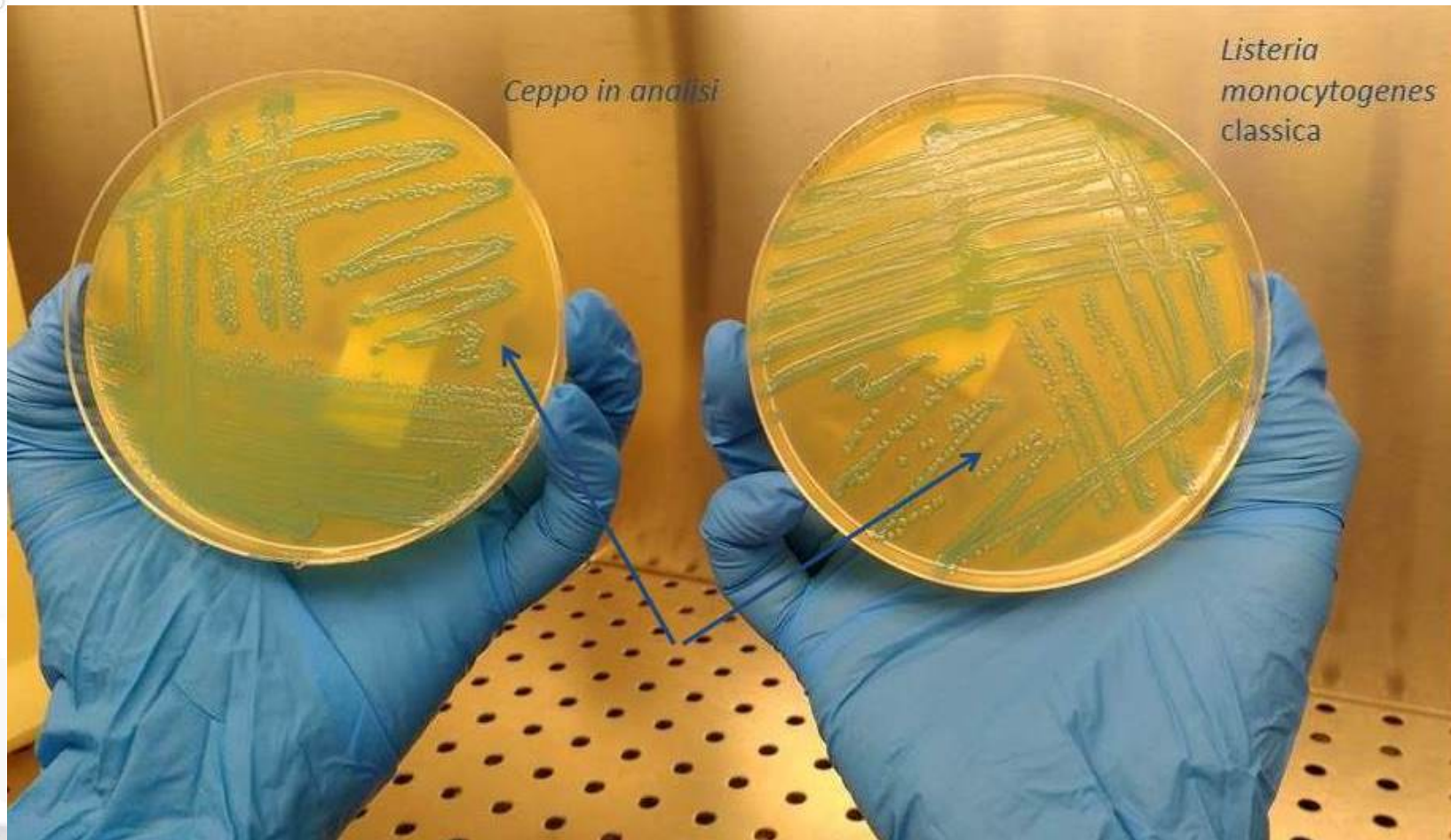
CEPPO BATTERICO - Specie: *Listeria monocytogenes*

Identificativo	Accertamento	Risultato	Tecnica di Prova
1	<i>Listeria monocytogenes</i> : Tipizzazione	Ila flaA+	PCR
1	<i>Listeria monocytogenes</i> : Tipizzazione	GX6A16.0048	PFGE Asc I
1	<i>Listeria monocytogenes</i> : Tipizzazione	GX6A12.0062	PFGE Apa I
1	<i>Listeria monocytogenes</i> : Tipizzazione	1/2 a	Identificazione sierologica
1	<i>Listeria</i> spp: identificazione <i>Listeria innocua</i>	Negativo	PCR
1	<i>Listeria</i> spp: identificazione <i>Listeria ivanovii</i>	Negativo	PCR
1	<i>Listeria</i> spp: identificazione <i>Listeria monocytogenes</i>	Positivo	PCR
1	<i>Listeria</i> spp: identificazione <i>Listeria seeligeri</i>	Negativo	PCR
1	<i>Listeria</i> spp: identificazione <i>Listeria welshimeri</i>	Negativo	PCR

Legenda

Prova	Tecnica di Prova	Procedura	Sede Esecuzione
<i>Listeria monocytogenes</i> : Tipizzazione	Identificazione sierologica	FDA BAM Bacteriological analytical manual 8TH edition (Revisione A) 1998. Serodiagnosis of <i>Listeria monocytogenes</i> , chap. 11, rev. 2001	IZSAM - Sede Centrale Via Campo Boario, 1 TERAMO (TE)
<i>Listeria</i> spp: identificazione	PCR	IZS TE B 3.1.2 SOP066 rev. 1 2010	IZSAM - Sede Centrale Via Campo Boario, 1 TERAMO (TE)
<i>Listeria monocytogenes</i> : Tipizzazione	PCR	IZS TE B3.1.2 SOP080 2016 Rev.0**	IZSAM - Sede Centrale Via Campo Boario, 1 TERAMO (TE)
<i>Listeria monocytogenes</i> : Tipizzazione	PFGE Asc I	US/CDC PNL04 SOP for PulseNet PFGE of <i>Listeria monocytogenes</i> 2013. Standard Operating Procedure for PulseNet Pfgc of <i>Listeria monocytogenes</i>	IZSAM - Sede Centrale Via Campo Boario, 1 TERAMO (TE)
<i>Listeria monocytogenes</i> : Tipizzazione	PFGE Apa I	US/CDC PNL04 SOP for PulseNet PFGE of <i>Listeria monocytogenes</i> 2013. Standard Operating Procedure for PulseNet Pfgc of <i>Listeria monocytogenes</i>	IZSAM - Sede Centrale Via Campo Boario, 1 TERAMO (TE)

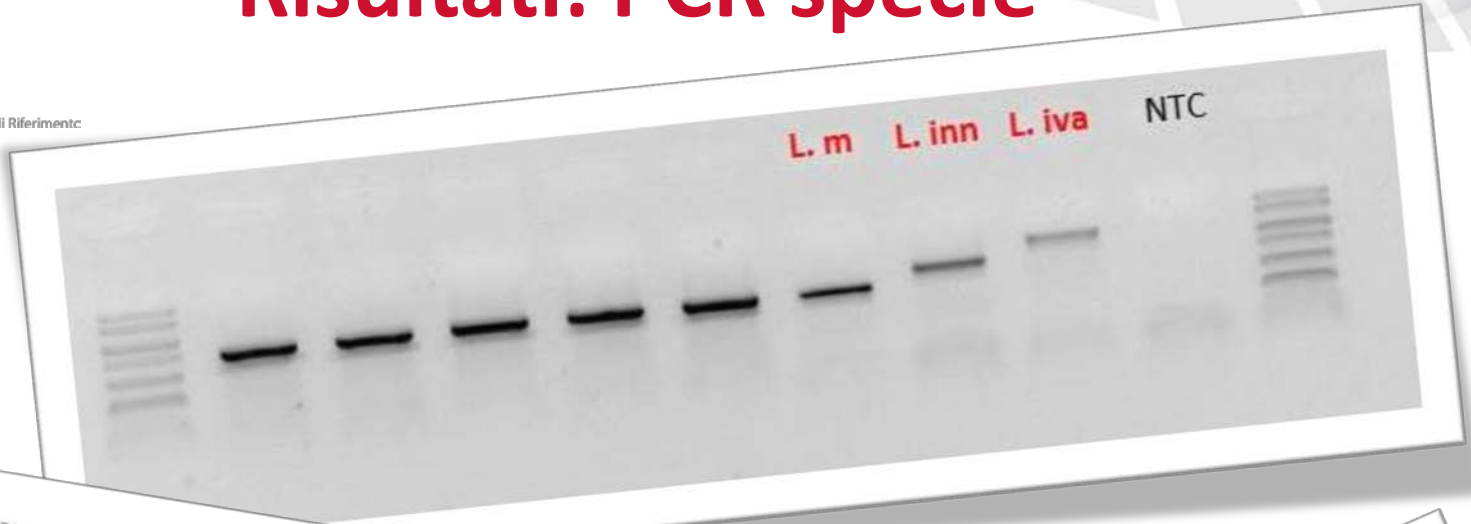
Risultati: Caratteristiche fenotipiche: attività della fosfolipasi su A.L.O.A



Risultati: Caratteristiche fenotipiche: emolisi



Risultati: PCR specie



APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Oct. 1999, p. 4688-4692
0099-2240/99/\$04.00+0
Copyright © 1999, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR

Vol. 65, No. 10

ANDREAS BUBERT,^{1,2*} INGE HEIN,³ MARCUS RAUCH,¹ ANGELIKA LEHNER,³ BYOUNGSU YOON,⁴
WERNER GOEBEL,¹ AND MARTIN WAGNER³
¹Lehrstuhl für Mikrobiologie, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg, 97074 Würzburg, Germany; ²Institut für Milchhygiene und Mikrobiologische Analytik, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany; ³Institut für Milchhygiene und Milchtechnologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Vienna, Austria; ⁴Department of Food Safety and Food Quality, Kyonggi University, Suwon, Kyonggi-Do 442-760, Korea

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 1991, p. 2576-2580
0099-2240/91/092576-05\$02.00/0

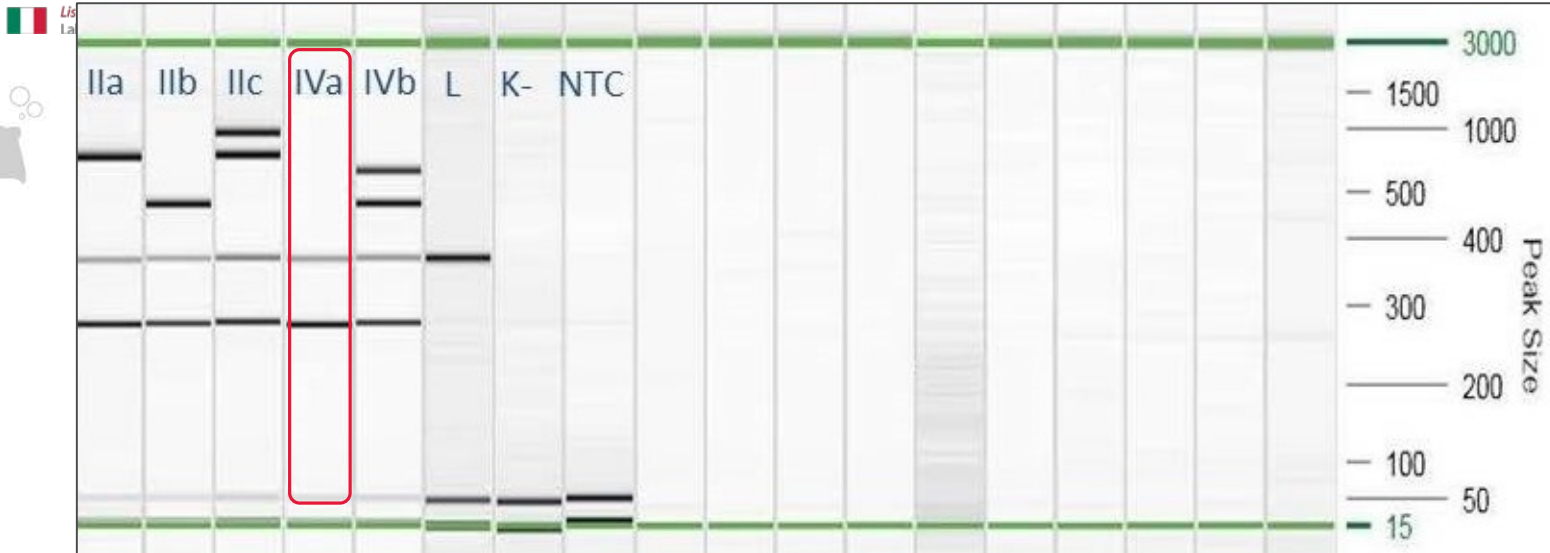
Sensitive and Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Ground Beef with the Polymerase Chain Reaction

Vol. 57, No. 9

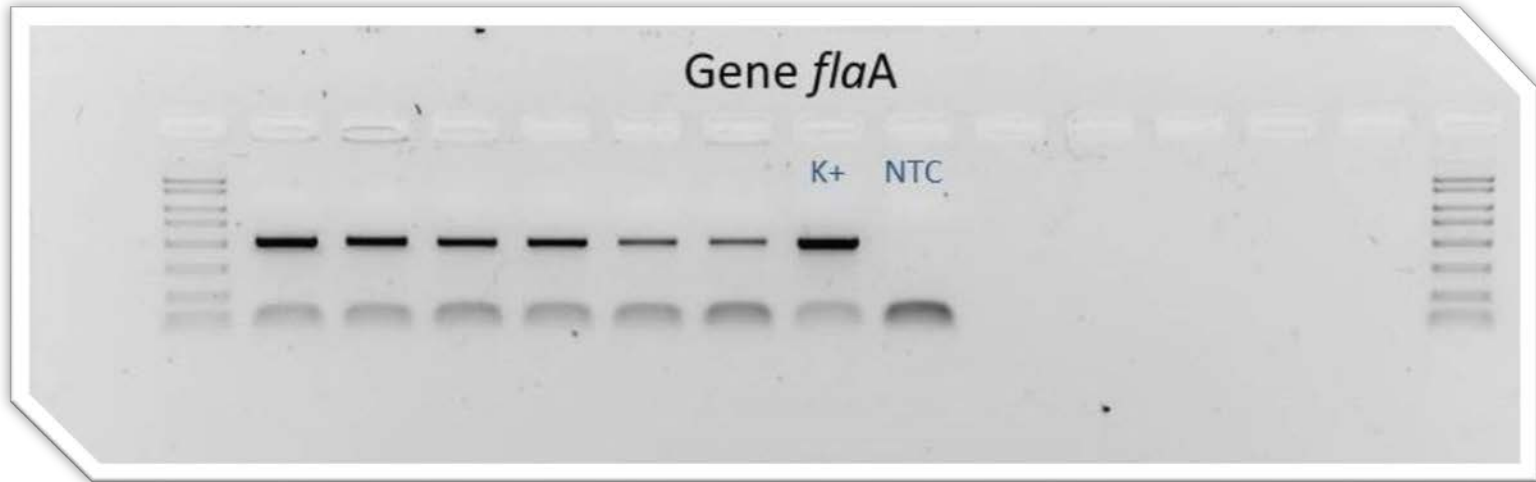
ELIZABETH J. GOLSTEYN THOMAS, ROBIN K. KING, JACK BURCHAK, AND VICTOR P. J. GANNON*
Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada, P.O. Box 640, Lethbridge, Alberta, Canada T1J 3Z4



Risultati: PCR sierograppo



Risultati :PCR sierograppo



LISTERIA MONOCYTOGENES MOLECULAR SEROTYPING,
 DETERMINATION OF THE SEROGROUP

Only the informatic version gives credence

Authors: KEROUANTON Annaëlle
 MARAULT Muriel
 ROUSSEL Sophie
 Translator: FÉLIX Benjamin

Approved by: BRISABOIS Anne

original signed

LISTERIA MONOCYTOGENES MOLECULAR SEROTYPING:
 AMPLIFICATION OF THE GENE *FliA*

Author(s) : KEROUANTON Annaëlle
 MARAULT Muriel
 ROUSSEL Sophie
 Translator: FÉLIX Benjamin

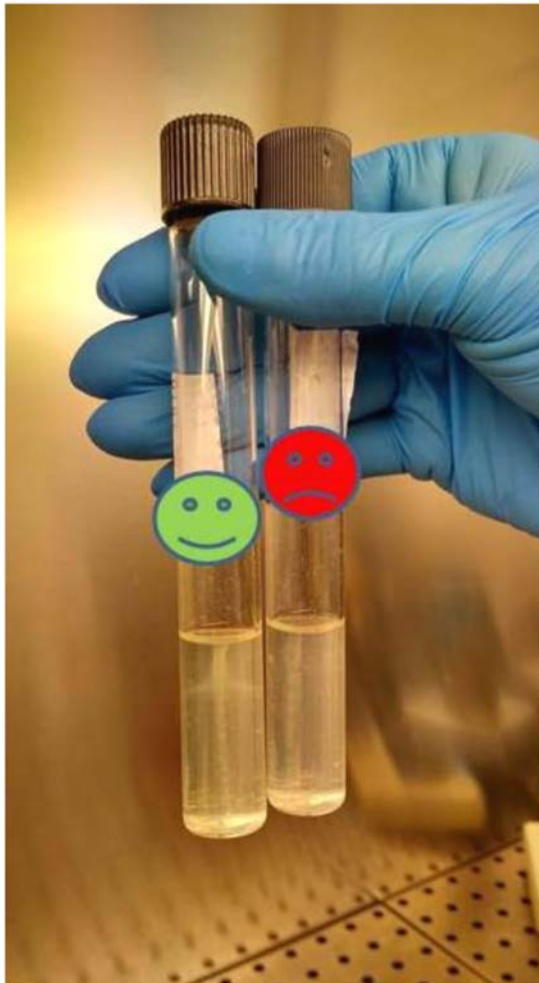
Approved by : BRISABOIS Anne

original signed



Risultati: Identificazione sierologica

Sierotipo	Antigeni O										Antigeni H			
	I/II	I	IV	V/VI	VI	VII	VIII	IX	XII	XIII	AB	A	C	D
1/2 a	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1/2 b	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
1/2 c	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
3 a	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
3 b	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
3 c	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
4 a	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
4 ab	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
4 b	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
4 c	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
4 d	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
4 e	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-





Listeria monocytogenes
Laboratorio Nazionale



OPEN ACCESS Freely available online

Genomic Characterization of Novel *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Variant Strains

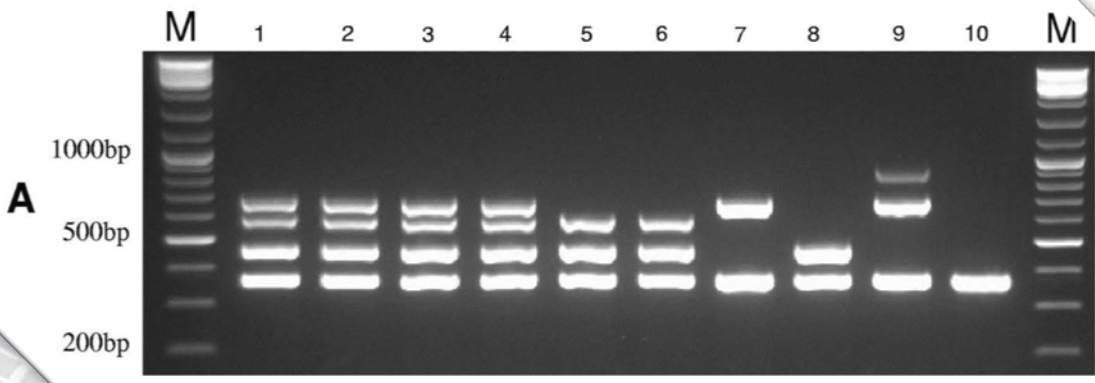
Pongpan Laksanalamai¹, Bixing Huang², Jonathan Sabo³, Laurel S. Burall¹, Shaohua Zhao³, John Bates², Atin R. Datta^{1*}

¹ Center for Food Safety and Applied Nutrition, US Food and Drug Administration, Laurel, Maryland, United States of America, ² Public Health Microbiology Laboratory, Queensland Health Forensic and Scientific Services, Queensland, Australia, ³ Center for Veterinary Medicine, US Food and Drug Administration, Laurel, Maryland, United States of America

Short Communication

Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1
Alexandre Leclercq^{a,*}, Viviane Chenal-Francisque^a, Hélène Dieye^a, Thomas Cantinelli^a, Rezak Drali^b,
Vin Brisse^c, Marc Lecuit^{a,d}

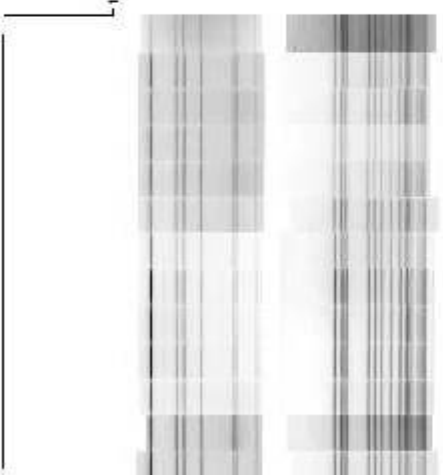
International Journal of Food Microbiology 147 (2011) 74–77
Contents lists available at ScienceDirect
International Journal of Food Microbiology
journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro



Risultati : PFGE

- La PFGE ha confermato l'indistinguibilità con ceppi isolati nel 2014 e 2015 provenienti dalla stessa azienda e da un'altra sempre della regione Marche.
- Il profilo Ascl era già presente nel database mentre l'Apal risultava nuovo.
- Complessivamente risultavano avere quindi un nuovo profilo che clusterizzava con ceppi di sierotipo 1/2a.

A scl +A pal PFGE Ascl PFGE Apal

		Matrice	FBO name	Pulsotipo_AscI	Pulsotipo_Apal	Anno isolamento
		SALAME	Azienda 1	GX6A16.0006	GX6A12.0257	2014
		SALAME	Azienda 1	GX6A16.0006	GX6A12.0257	2014
		SALAME	Azienda 1	GX6A16.0006	GX6A12.0257	2014
		SALAME	Azienda 1	GX6A16.0006	GX6A12.0257	2014
		SALAME	Azienda 1	GX6A16.0006	GX6A12.0257	2014
		SALAME	Azienda 1	GX6A16.0006	GX6A12.0257	2014
		TAMPONE AMBIENTALE	Azienda 2	GX6A16.0006	GX6A12.0257	2017
		TAMPONE AMBIENTALE	Azienda 2	GX6A16.0006	GX6A12.0257	2017
		TAMPONE AMBIENTALE	Azienda 2	GX6A16.0006	GX6A12.0257	2017
		TAMPONE AMBIENTALE	Azienda 2	GX6A16.0006	GX6A12.0257	2017
		SALAME	Azienda 2	GX6A16.0006	GX6A12.0257	2017
		SALAME	Azienda 2	GX6A16.0006	GX6A12.0257	2015
		SALAME	Azienda 2	GX6A16.0006	GX6A12.0257	2015



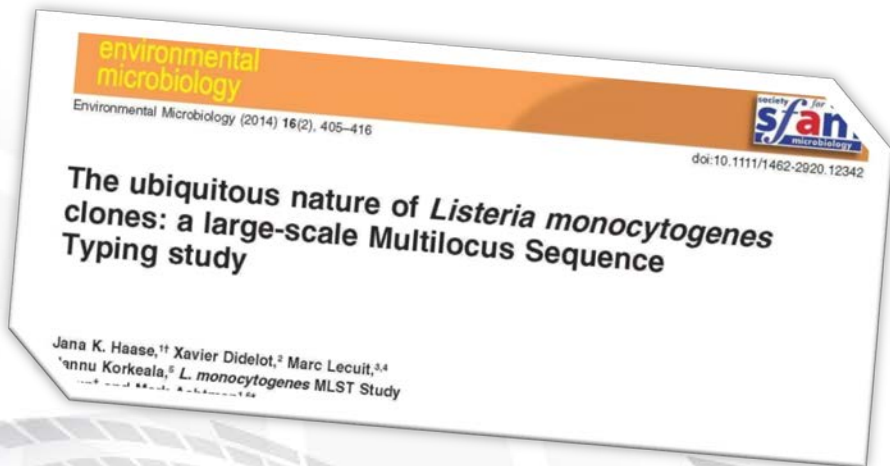
Risultati : MLST

Metodo Sanger:
profilo allelico:
81,-10,6,1,8,1

Abbassamento di 1°C
nella PCR del gene *bgIA*

Nuovo profilo
allelico:
81,5,10,6,1,8,1

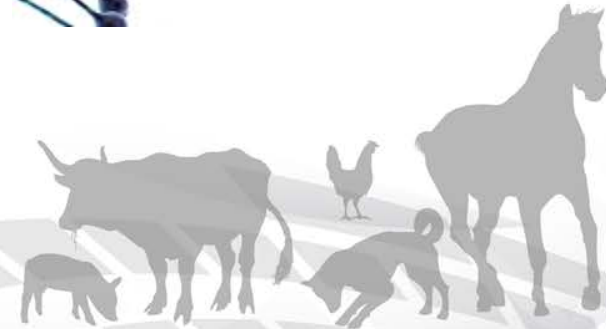
bgIA?



Riassumendo...

- Identificazione specie: *Listeria monocytogenes*
- Identificazione sierologica: I/II+, I+
- Determinazione molecolare del sierogruppo: IVa *flaA*+
- PFGE: *Ascl* profilo noto, *Apal* nuovo profilo
- MLST: 81,5,10,6,1,8,1 variando la procedura

Decisioni intraprese



AllSNP NJ Tree

MLST in silico

Cosa abbiamo
chiesto al
gruppo di
genomica?

Verifica della
presenza di
geni di
interesse

Match con i
primer del
gene *lmo0737*



Risultati NGS : MLST e primers match



MLST in silico

profilo
allelico:
81,-,10,6,1,8,1

Match con i
primer del
gene *lmo0737*

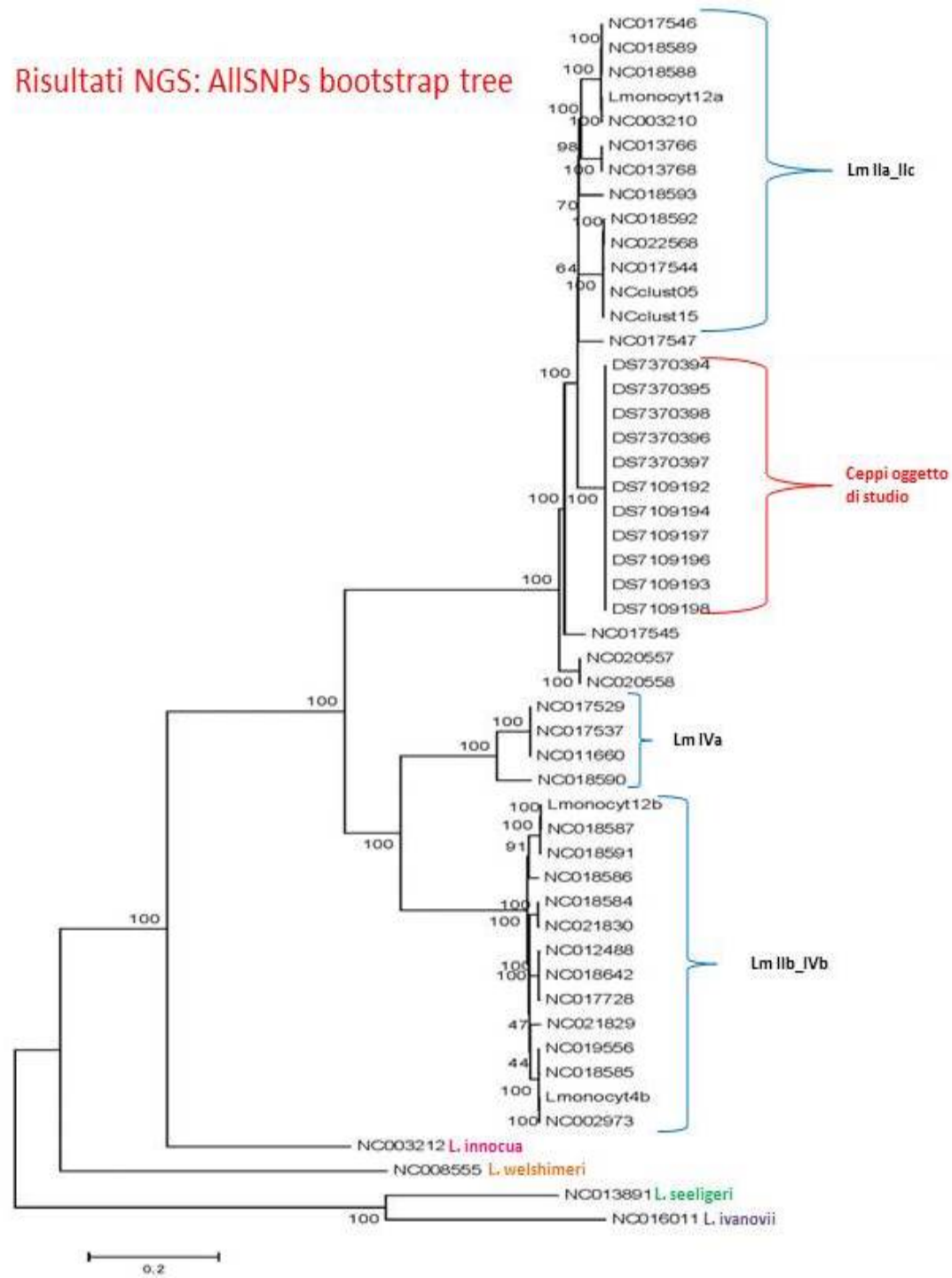
No match





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Risultati NGS: AllSNPs bootstrap tree

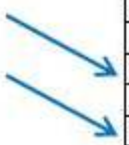
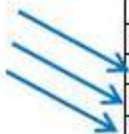


Risultati NGS: Geni di interesse



 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Naz.

Ceppo non emolitico	L.m EG De 1/2a	L.m 4a	L. innocua
	bglA	bglA	bglA
sigB	sigB	sigB	sigB
degU	degU	degU	degU
lmo0685	lmo0685	lmo0685	lmo0685
motB	motB	motB	motB
mogR	mogR	mogR	mogR
cspB	cspB	cspB	cspB
cspD	cspD	cspD	cspD
cspL	cspL	cspL	cspL
flhA	flhA	flhA	flhA
alkD	alkD	alkD	alkD
flaA	flaA	flaA	flaA
lmo0708	lmo0708	lmo0708	lmo0708
fliD	fliD	fliD	fliD
hly	hly	hly	
actA	actA		
ami	ami		
lmo1634	lmo1634	lmo1634	lmo1634
lmo1829	lmo1829	lmo1829	lmo1829
lmo0409	lmo0409		
lmo0265	lmo0265	lmo0265	lmo0265
lmo2821	lmo2821		
inlA	inlA	inlA	
inlB	inlB	inlB	
lmo0394	lmo0394	lmo0394	lmo0394
lmo1076	lmo1076		
lmo0514	lmo0514	lmo0514	lmo0514
prfA	prfA	prfA	
prfA 2	prfA 2	prfA 2	prfA 2
lapB	lapB		
lpeA	lpeA	lpeA	
gtcA	gtcA		gtcA
	vip		
inlE	inlE		
	inlG		
inlH	inlH		
lin0346		lin0344	lin0344
		lin0346	lin0346
	lin0346	lmo0319	lin0346
	lmo0319	lmo0321	lmo0319
	lmo0321		lmo0321



Conclusioni

- I ceppi analizzati risultano appartenere alla specie *Listeria monocytogenes*;
- Il Laboratorio Europeo di Riferimento per *L. monocytogenes* (EURLm) ha confermato i nostri risultati di tipizzazione sierologica con metodo convenzionale e di determinazione molecolare del sierogruppo. Sono in corso ulteriori analisi di tipizzazioni;
- I ceppi risultano non tipizzabili mediante sierologica con metodo convenzionale mentre risultano appartenenti al sierogruppo IVa con metodica di determinazione molecolare del sierogruppo;
- Il sequenziamento ha evidenziato, nei ceppi in analisi, mancanza di match con il primer del gene *Imo0737* tipico dei sierogruppi IIa/IIc;
- Il sequenziamento ha evidenziato, nei ceppi in analisi, la presenza di geni tipici di *L. monocytogenes* normalmente non presenti nel sierogruppo IVa;
- Il risultato ottenuto con metodica di determinazione molecolare del sierogruppo è discordante con la presenza di geni normalmente non presenti nel sierogruppo IVa;
- Il sequenziamento ha evidenziato, nei ceppi in analisi, la presenza di geni responsabili dell'emolisi (*hly*, *prfA*) e coinvolti nella motilità:



 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Prospettive future..

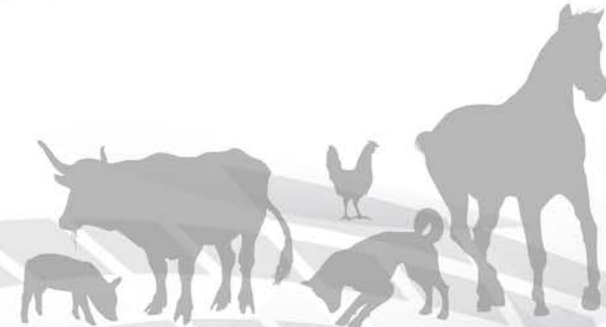
- Attendere ulteriori conferme dall'EURLM relativi a PFGE, Sequence Type e Clonal Complex;
- Analizzare i geni responsabili dell'emolisi valutandone l'integrità o eventuale presenza di mutazioni e/o delezioni;
- Analizzare i geni responsabili della motilità valutandone l'integrità o eventuale presenza di mutazioni e/o delezioni



Spontaneous Loss of Virulence in Natural Populations of *Listeria monocytogenes*

Mylène M. Maury,^{a,b} Viviane Chenal-Francisque,^{a,b*} Hélène Bracq-Dieye,^{a,b} Lei Han,^c Alexandre Leclercq,^{a,b} Guillaume Vales,^{a,b} Alexandra Moura,^{b,d} Edith Gouin,^f Mariela Scortti,^{c,e} Olivier Disson,^{b,d} José A. Vázquez-Boland,^{c,e} Marc Lecuit^{a,b,d,g}

Institut Pasteur, National Reference Centre and WHO Collaborating Centre for Listeria, Paris, France^a; Institut Pasteur, Biology of Infection Unit, Paris, France^b; Microbial Pathogenesis Unit, Medical School (Biomedical Sciences), University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom^c; Inserm U1117, Paris, France^d; Division of Infection and Immunity, The Roslin Institute, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom^e; Institut Pasteur, Bacteria-Cell Interactions Unit, Paris, France^f; Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Necker-Enfants Malades University Hospital, Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, APHP, Paris, France^g



Grazie in particolar modo a...

Anna Ruolo
Antonella Pompei

Vicdalia Acciari

Patrizia Centorame

Gabriella Centorotola

Francesco Pomilio

LNRLm



Massimiliano Orsini

e....



I colleghi del reparto di
Sviluppo e Innovazione



anses
alimentation, environnement, travail

Il Laboratorio Europeo di
Riferimento per Lm