IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

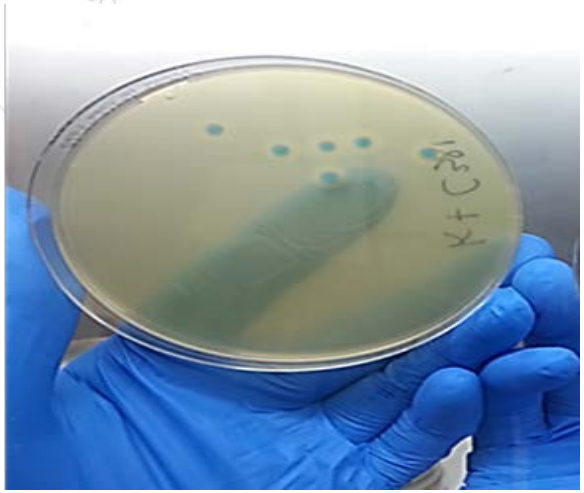
Listeria monocytogenes
Laboratorio Nazionale di Riferimento

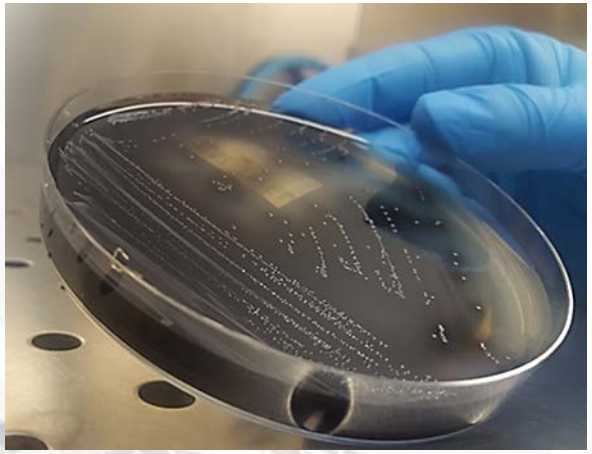
Contaminazione ambientale nelle aziende di produzione in Sardegna: latte e carne. Valutazione dei risultati dopo applicazione della genomica

Gabriella Centorotola - Marina Torresi

Giornata di Studio: Laboratorio Nazionale di Riferimento *Listeria monocytogenes*

Obiettivi

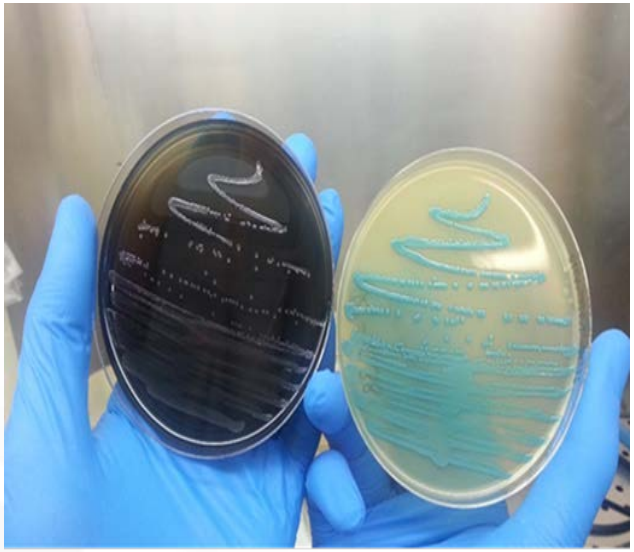




Caratterizzazione genetica di ceppi di *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua,* isolati da prodotti a base di carne e latte e relative aziende di lavorazione, inviati dall'IZS Sardegna nell'ambito del progetto «Ricerca e caratterizzazione di nuove varianti patogene di microrganismi del genere *Salmonella* e *Listeria* in matrici alimentari e ambienti di produzione mediante tecniche di epidemiologia molecolare e studi di microbiologia predittiva» .

Materiali e metodi

Ceppi isolati



- Aziende di lavorazione prodotti a base di carne: 50 ceppi totali, di cui 29 isolati da ambiente di lavorazione e 21 da alimenti.

- Aziende di lavorazione prodotti a base di latte: 82 ceppi totali, di cui 63 isolati da ambiente di lavorazione, 17 da acque reflue e 2 da alimenti.

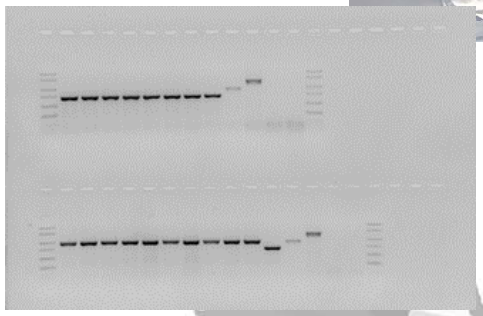
Materiali e metodi

Identificazione e conferma di specie

Su ciascun ceppo sono stati effettuati:

- ✓ **PCR multiplex per la determinazione della specie di *Listeria*** (*L. monocytogenes, L. innocua, L. ivanovii, L. welshimeri* e *L. seeligeri*);

- ✓ **sequenziamento rRNA 16S** per la determinazione di specie non comprese nel protocollo (es *L. grayi*);

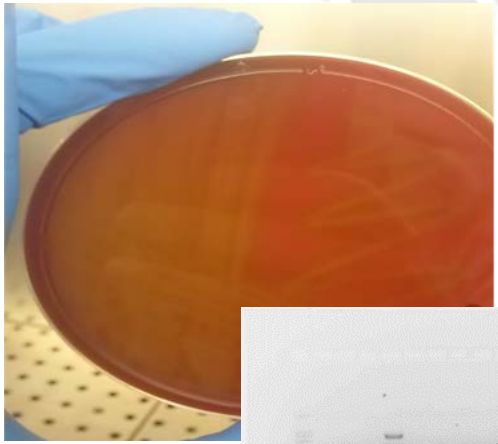


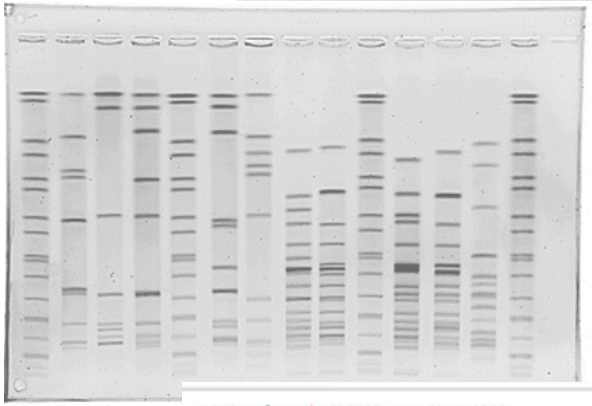
Materiali e metodi

Caratterizzazione dei ceppi

I ceppi risultati essere *L. monocytogenes* sono stati caratterizzati mediante:

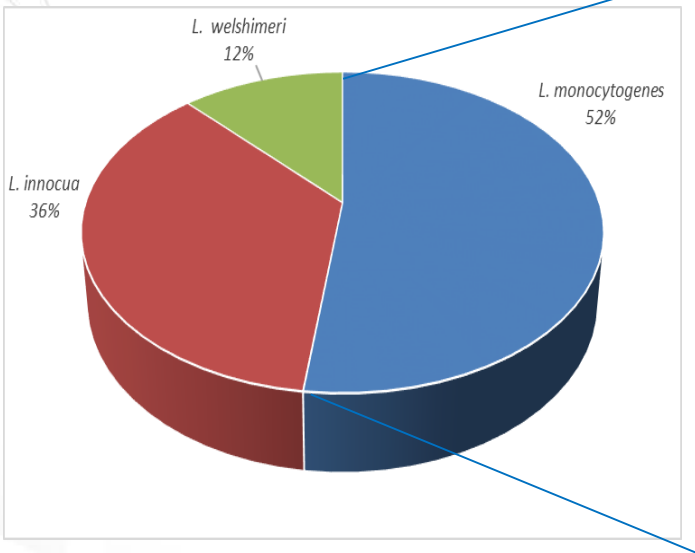
- ✓ **PCR multiplex per la determinazione del sierogruppo**;
- ✓ elettroforesi in campo pulsato (**PFGE**) e successiva analisi dei profili di macrorestrizione in *Apa*I ed *Asc*I per la determinazione del pulsotipo;
- ✓ **sequenziamento del genoma** per la determinazione del Clonal Complex (**CC**) ed analisi **cgMLST**;
- ✓ **sequenziamento di ceppi di *L. innocua* per la ricerca di geni di patogenicità**.

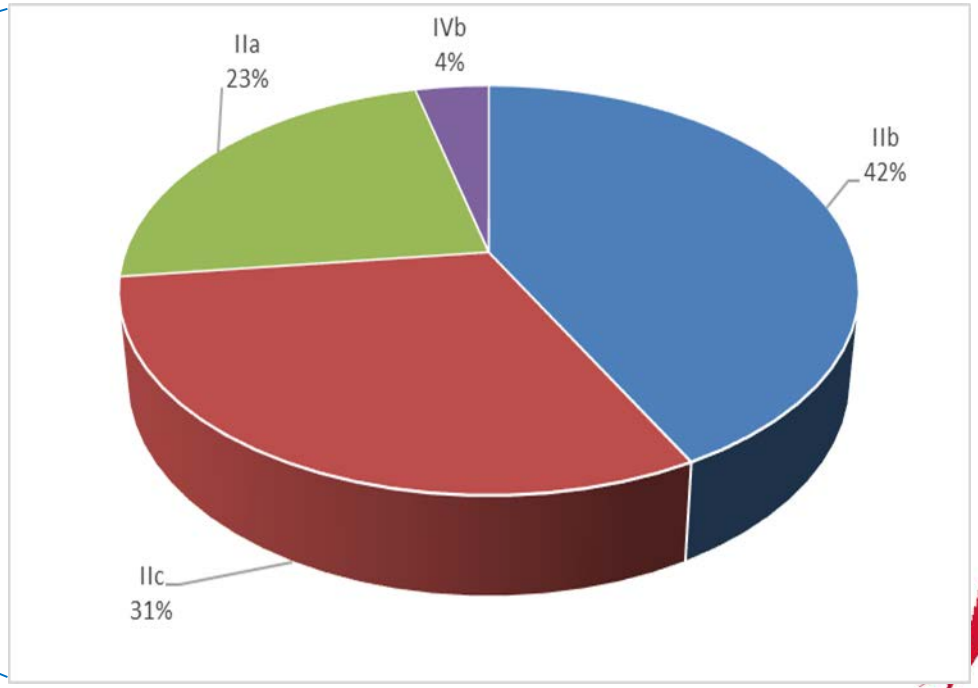




Risultati ceppi carne

Identificazione di specie e sierogruppo

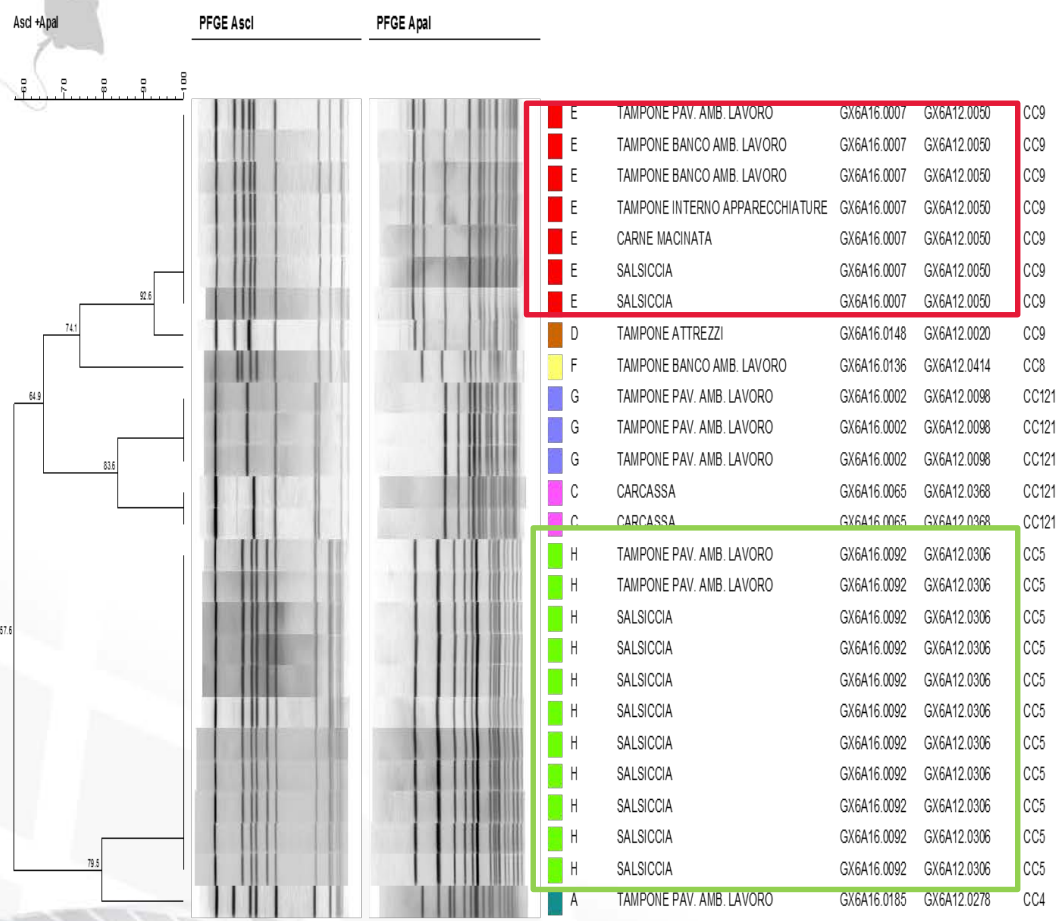




- Le principali specie riscontrate sono state ***L. monocytogenes*** e ***L. innocua***.
- I sierogruppi di *L. monocytogenes* prevalentemente riscontrati sono stati il **IIb** e il **IIc.**

Risultati ceppi carne

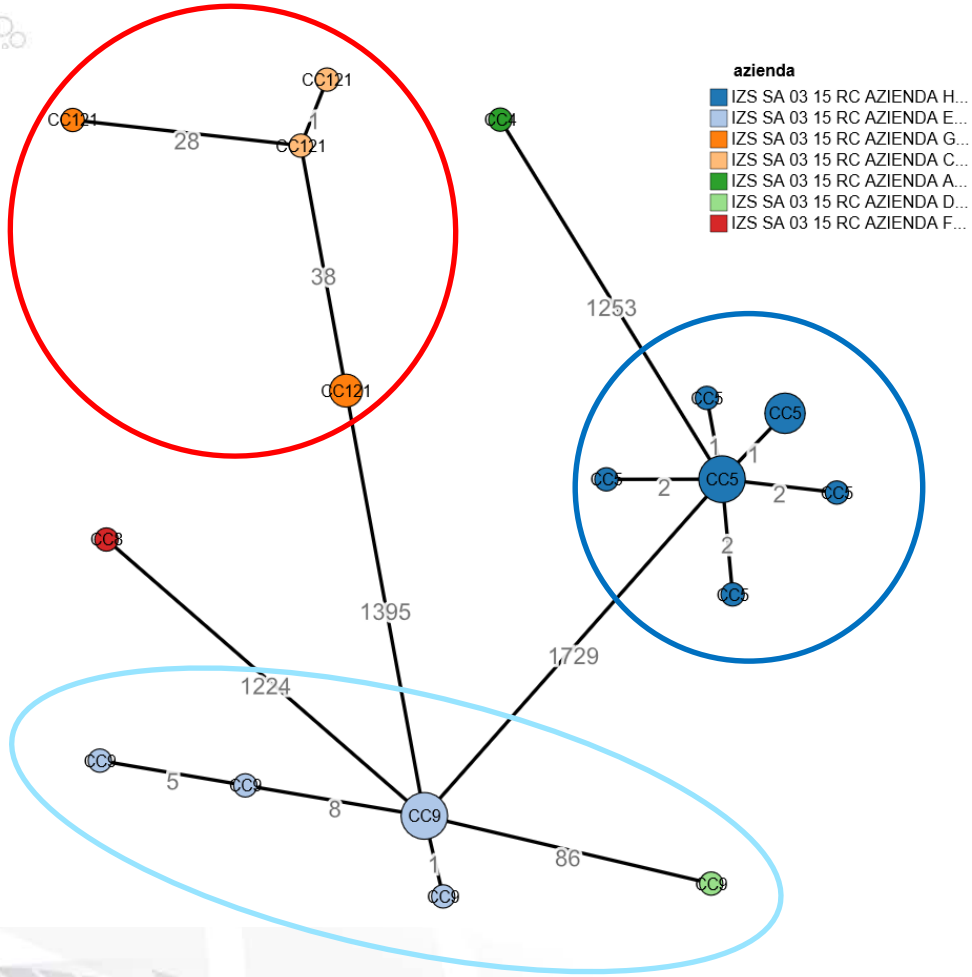
Caratterizzazione dei ceppi



- L'analisi PFGE ha mostrato la presenza di **7 differenti pulsotipi** con entrambi gli enzimi *Asc*I e *Apa*I.
- Stesso pulsotipo ritrovato sia in campioni ambientali sia nei prodotti della stessa azienda.
- L'analisi MLST ha evidenziato la presenza di **5 CC** (potere discriminante inferiore rispetto alla PFGE).
- I CC predominanti sono stati: **CC5** (42%), **CC9** (31%) e **CC121** (19%).

Risultati ceppi carne

Caratterizzazione dei ceppi

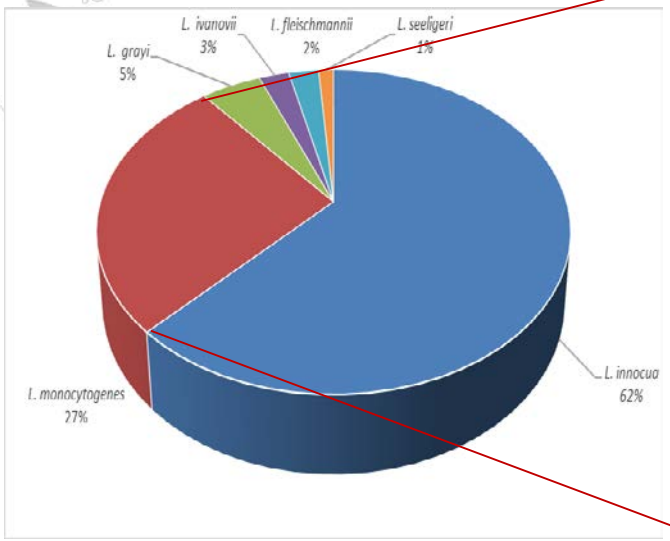


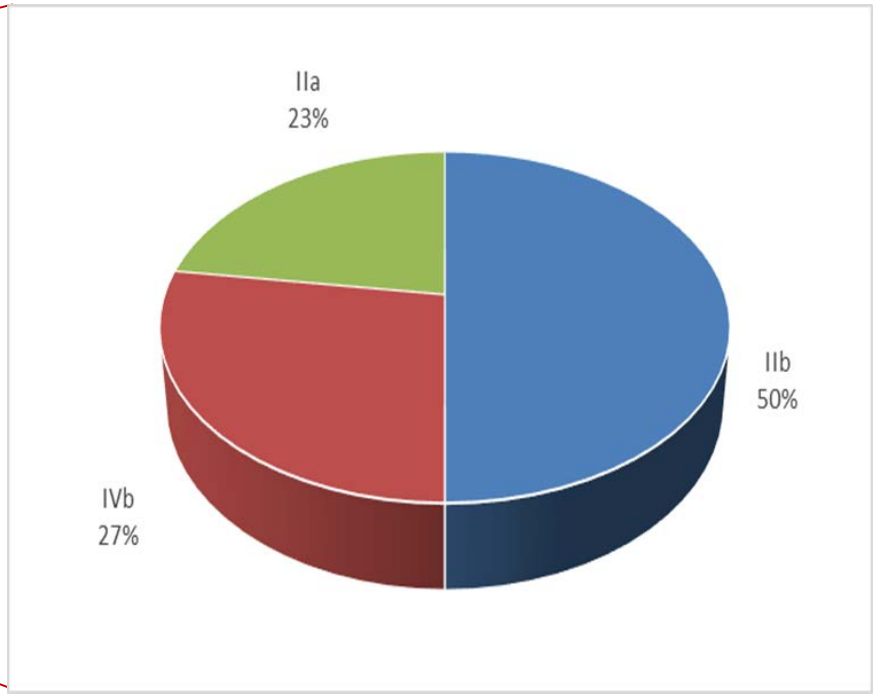
- L'analisi cgMLST ha evidenziato che i ceppi **CC5**, isolati nella stessa azienda da tamponi ambientali e da prodotti, differiscono tra loro di 1 o 2 alleli.

- Ceppi CC9 e CC121 sono stati isolati in due aziende diverse.

Risultati ceppi latte

Identificazione di specie e sierogruppo

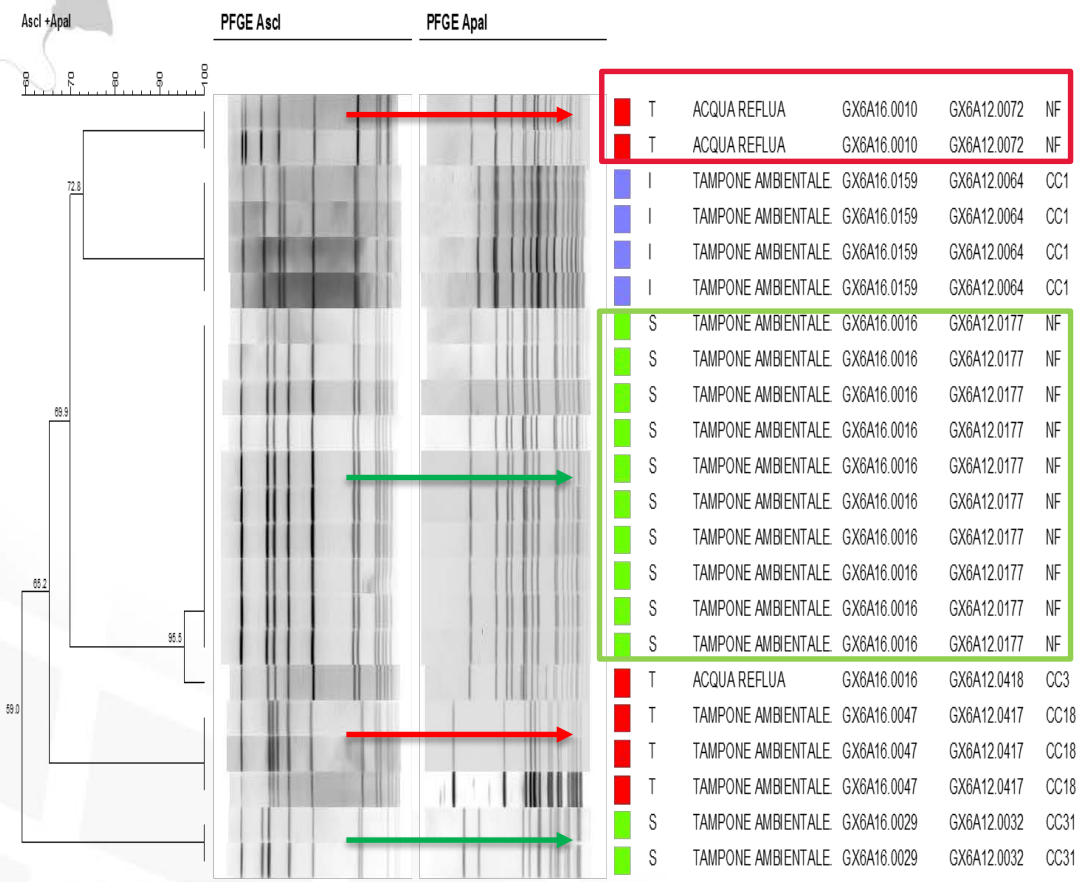




- Le principali specie riscontrate sono state ***L. innocua*** e ***L. monocytogenes***.
- Il sequenziamento rRNA 16S ha rilevato la presenza di ***L. gray*** e ***L. fleischmannii***, specie non determinabili con protocollo di PCR multiplex.
- I sierogruppi di *L. monocytogenes* prevalentemente riscontrati sono stati il **IIb**, **IIa** e **IVb**.

Risultati ceppi latte

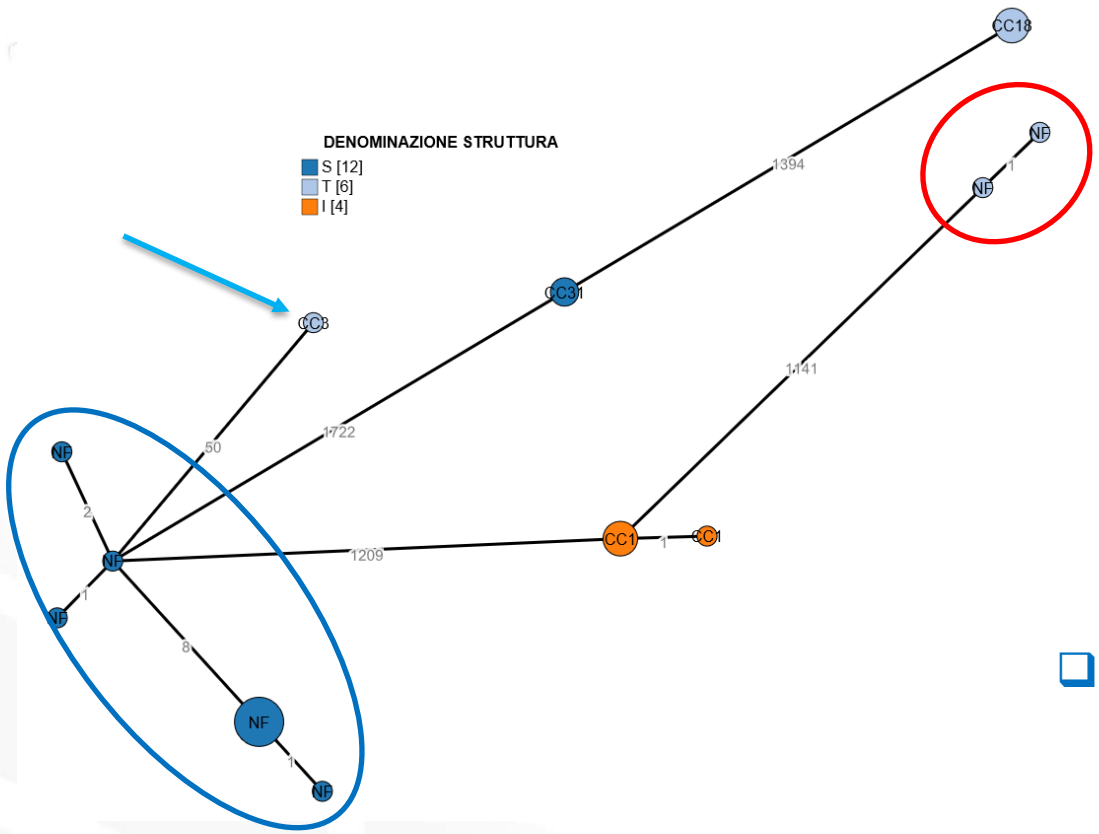
Caratterizzazione dei ceppi



- L'analisi PFGE ha mostrato la presenza di **6 differenti pulsotipi** con entrambi gli enzimi *Asc*I e *Apa*I.
- Pulsotipi diversi ritrovati nella stessa azienda.
- L'analisi MLST ha evidenziato la presenza di 4 CC, tra cui il **CC1**.
- Per 12 ceppi, a causa di un locus, non è stato possibile determinare il CC (**NF**).

Risultati ceppi latte

Caratterizzazione dei ceppi



- L'analisi cgMLST ha evidenziato che alcuni ceppi NF (**gene dat non assegnato**), isolati da tamponi in punti di prelievo diversi, sono esclusivi di una azienda e sono **vicini al CC3** (50 alleli di differenza).

- I restanti ceppi NF (**gene dapE non assegnato**) sono stati isolati in un'unica azienda e **sembrerebbero vicini al CC2**.

geni di patogenicità *L. innocua*

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes
Laboratorio Nazionale di Riferimento

- *L. innocua* e *L. monocytogenes* sono le due specie geneticamente più vicine, legate da un punto di vista evolutivo ad un antenato comune.
- Esistono vari casi di *L. innocua* atipiche con geni di patogenicità tipici di *L. monocytogenes*.
- Isole di patogenicità in comune tra le due specie:

  - LIPI-1: implicata nei meccanismi di replicazione intracellulare e mobilità, codifica per listeriolisina O (LLO). 6 geni (*prf*A, *plc*A, *hly*, *mpl*, *act*A, *plc*B).
  - LIPI-3: codifica per listeriolisina S (LLS), fattore emolitico e citotossico che altera la flora intestinale dell'ospite. 8 geni (*lls*AGHXBYDP).
  - LIPI-4: codifica attività metaboliche ed attività coinvolte nelle infezioni neurali e della placenta. 6 geni (da LM9005581_70009 a LM9005581_70014).

American Society for Microbiology | Infection and Immunity®

MOLECULAR PATHOGENESIS

Check for updates

Atypical Hemolytic *Listeria innocua* Isolates Are Virulent, albeit Less than *Listeria monocytogenes*

Alexandra Moura,[a,b,c] Olivier Disson,[b,c] Morgane Lavina,[b,c] Pierre Thouvenot,[a,b,c] Lei Huang,[b,c,g] Alexandre Leclercq,[a,b,c] Marla Fredriksson-Ahomaa,[d] Athmanya K. Eshwar,[e] Roger Stephan,[e] Marc Lecuit[a,b,c,f]

Clayton *et al. BMC Microbiology* 2014, **14**:58
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/58

BMC Microbiology

RESEARCH ARTICLE — Open Access

Atypical *Listeria innocua* strains possess an intact LIPI-3

Evelyn M Clayton[1†], Karen M Daly[1†], Caitriona M Guinane[3], Colin Hill[1,2*], Paul D Cotter[2,3*] and Paul R Ross[2,3]

Applied and Environmental Microbiology, July 2004, p. 4256–4266 — Vol. 70, No. 7
0099-2240/04/$08.00+0 DOI: 10.1128/AEM.70.7.4256–4266.2004
Copyright © 2004, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Natural Atypical *Listeria innocua* Strains with *Listeria monocytogenes* Pathogenicity Island 1 Genes

J. Johnson,[1] K. Jinneman,[1] G. Stelma,[2] B. G. Smith,[2] D. Lye,[2] J. Messer,[2] J. Ulaszek,[3] L. Evsen,[4] S. Gendel,[5] R. W. Bennett,[5] B. Swaminathan,[6] J. Pruckler,[6] A. Steigerwalt,[6] S. Kathariou,[7] S. Yildirim,[7] D. Volokhov,[8] A. Rasooly,[5] V. Chizhikov,[8] M. Wiedmann,[9] E. Fortes,[9] R. E. Duvall,[5*] and A. D. Hitchins[5*]

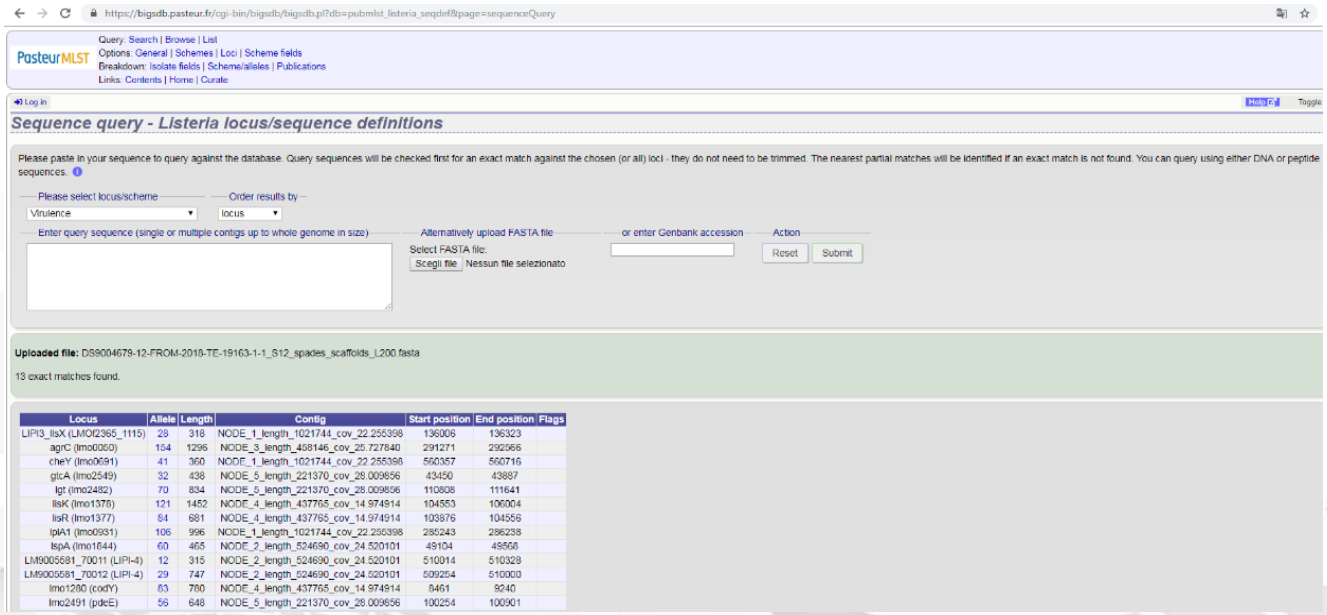
geni di patogenicità *L. innocua*

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes
Laboratorio Nazionale di Riferimento

I file fasta dei ceppi di *L. innocua* sequenziati sono stati caricati online nel sito dell'Istituto Pasteur (database con 85 loci totali).

```
>NODE_1_length_696095_cov_62.110763
ATATATAATAGTAAATCTTATCAAAAAAAGATTACGCAAACTAAGTCGTAATCTTTTTTT
GATTATATTAGATAGTTTTTCTTGTAACTAAATGATTTATTTTCCGGGTTAAGTTGAAAA
ACATTTTACCATATAGTGCAACAAGAATAAGAAAAATAATAAAGATGAATGTAGTAATTC
CAATATTGTTTTCCATTTGAAACACGATTAACAATTCAATAAGTAAAAACAAACTCACTA
TCGCACCAAAAATCGTCCAACGTTTGCGGATATTTTTGTAAAGTTGAATTAGGGAAGTCT
CGTCAGTGAAAATAGCTTCCTCTGTTTCTCCAGGAGCTACGGCTTTGCGGAAATACATCC
AATTGCCATTTAATACTGGATAGCTAAAAACAGTCTCCCAGCCAGCATCTTCGAAAAGTG
TTTTGTAGGCATCTTCGTCTCCTTCATTTTCTTTGAAATCAATCGCATAGCTGTATTTCG
CAGGCTCTCCCTGTTTGAAATGATATCTAAAAGATTTATATTTTTGAAAGAACCAACCAT
TTTGTGCCATTTCATTTAAATAGGCTTCTTCTTTCTCCATATTGTCCACGGTAAAAAACT
TAACGACTTTTTTCTCCATTATTAGACCTCCCTTGAGTTTCTATACAATTCTTCGATGCG
CGCTTTTTCTAATTGCAAAATATCTGTGCCAATTTCAGTAATTTGATAGATTTTCCGATT
ACTCTCTTCTTGAATAATTTGGATCAAATTATCTTTGTTCATTTTGGATAAGCTTCCGTA
AATAGTCCCGGGACCAAGCTTGATTCGATCATCTGTCATCTTTGCGACGTTTTCGATAAT
CGCGTAACCGTGCCTTGGTTTGACGAGCGATAGTAATATGTAAAAAGCGGTTTCGGTCAT
TGGAAGATAGGCTTTCCGTAATTTTCCATTCATAACTATATCGCACCTCGATGTATTTGA
TGCTTATAATATATCACGGCTCGATATAATTTGCAATACCCCATTTTTTATTTCTTGAAA
TACCGTTTTTTCTTTGATAATTAGCCATTTTGTTGGATTTTGGGCCATTTTTCTAGCAAT
TAGTGGTTTTGTTCGTTGGTCAAATAAATCGTCCCAATAAAACATTTTCTTTAACATGTT
GAACCGAATTGGGTAATGCGCTGCTTCTAATCGTAGTAATTGTTTAATTTGGCGCTTAAT
AATTTGGGAGCGGATTTGTTTTTTAGGTAAATCAAGAAAAATAACCACGTCCGCTTGGTT
AATGCTCTCGTCCACCCATGCTTCCAAATGAACGCCTTCAATAATCCAGTTTTCTTGTTG
AAGAATCTTATTCAATACAGCTATTTTTTCATTGTCGGTTCGTCTTACCTCTGTTTCTTC
TCGTTTCCAGACAATGCGATCTGTTTCAAAATAATCGATTTGTTGCCACTCGGAAAGCTT
TTTTGCTAGAGTGGTTTTGCCGCTTCCGACGGATCCGATAATACGAATTTTCATAAAAAA
ACCTCGCTTTAAATTAAATACTATCTTTTTACCCCGCTTTTATTTTATAATTATCTCATT
GTGATAAAAGGGAGGGAAATTTTTGATTATATTATTTATTGTATCAGGTTTGTTAGCTGG
GATGGTATTACCAGTTCAAACGGCCATCAATACGCGACTTAGTACATATACGAAATCACC
GTTTTTAGCTTCGTGGGTTTCTTTTATGGTAGGGACAACTGTTTTACTTATCGTTTGTTT
ATTTACACAAAAATCATGGCCAATATCTTCAGAAATGATTGCCTCAAATCCTTGGTATAT
ATGGGTTGGTGGTGGAACATTAGGCGTTATTTTCTTAACGGCCAATATTTTACTTTTACC
TCGACTTGGTTCGGCACTTCTTGTGATGATTACGGTTTGTGGACAAATGATTATGGCGAT
TATTATTGATAACTTTGGTTTATTTCAAGTACCAATGCATGAGATTAATATCGAACGTCT
ACTTGGCGTTATCTTAATGTTCGGCGGCATTTACTTGATGCAACGCTTTTAAAAGGAGGA
GAAAACATGACAAAAAGATCATCCAAATCATTATTACTATTTATGGCAATGGGACTTGTT
```

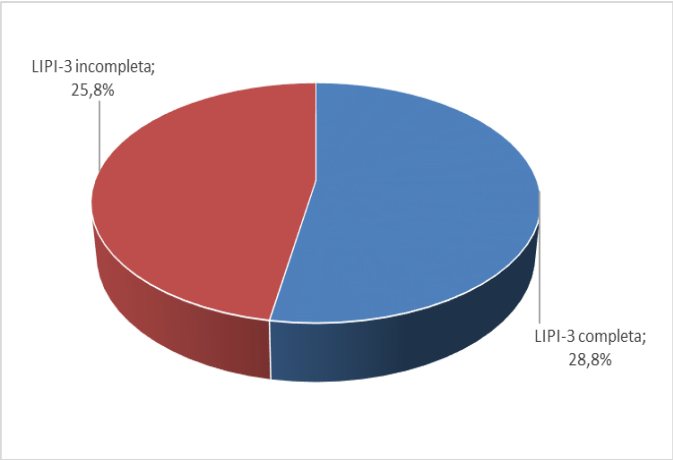


Locus	Allele	Length	Contig	Start position	End position	Flags
LIPI3_lisX (LMOf2365_1115)	28	318	NODE_1_length_1021744_cov_22.255398	136006	136323	
agrC (lmo0060)	154	1296	NODE_3_length_458146_cov_25.727840	291271	292566	
cheY (lmo0691)	41	360	NODE_1_length_1021744_cov_22.255398	560357	560716	
gtcA (lmo2549)	32	438	NODE_5_length_221370_cov_28.009856	43450	43887	
lgt (lmo2482)	70	834	NODE_5_length_221370_cov_28.009856	110808	111641	
lisK (lmo1378)	121	1452	NODE_4_length_437765_cov_14.974914	104553	106004	
lisR (lmo1377)	84	681	NODE_4_length_437765_cov_14.974914	103876	104556	
lplA1 (lmo0931)	106	996	NODE_1_length_1021744_cov_22.255398	285243	286238	
lspA (lmo1644)	60	465	NODE_2_length_524690_cov_24.520101	49104	49568	
LM9005581_70011 (LIPI-4)	12	315	NODE_2_length_524690_cov_24.520101	510014	510328	
LM9005581_70012 (LIPI-4)	29	747	NODE_2_length_524690_cov_24.520101	509254	510000	
lmo1280 (codY)	83	780	NODE_4_length_437765_cov_14.974914	8461	9240	
lmo2491 (pdcE)	56	648	NODE_5_length_221370_cov_28.009856	100254	100901	

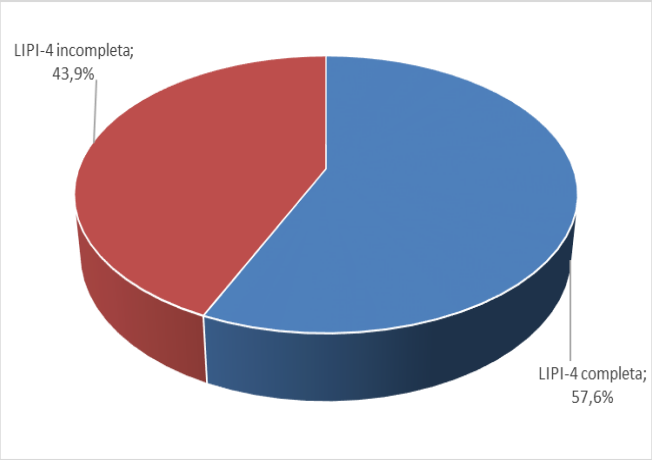
Risultati: geni di patogenicità *L. innocua*

- LIPI-1: in alcun ceppo di *L. innocua* sono stati riscontrati geni collegati a LIPI-1.

- LIPI-3



- LIPI-4



- Il 25,7% dei ceppi di *L. innocua* è caratterizzato dalla presenza di entrambe le LIPI-3 e LIPI-4 complete (ceppi isolati da tamponi ambientali e da acque reflue).

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Conclusioni

- ✓ Per le aziende di lavorazione prodotti a base di carne:
  - ➢ presenza di **CC9** e **CC121** associati frequentemente a prodotti a base di carne;
  - ➢ **stessi ceppi di *L. monocytogenes* riscontrati in tamponi ambientali e in prodotti**;
  - ➢ sarebbe opportuno per le aziende migliorare le procedure di sanificazione.

- ✓ Per le aziende di lavorazione prodotti a base di latte:
  - ➢ l'**assenza di ceppi di *L. monocytogenes* isolati da prodotti** sottolineerebbe un corretto utilizzo delle procedure di sanificazione da parte delle aziende;
  - ➢ **presenza di CC1** isolati in tamponi ambientali: è classificato come iper-virulento, spesso associato a casi clinici e frequentemente presente nelle aziende e nei prodotti lattiero-caseari;
  - ➢ ad oggi, per alcuni ceppi esclusivi di determinate aziende, non è stato possibile assegnare il relativo CC (**NF**).

- ✓ Alcuni **ceppi di *L. innocua* isolati da tamponi ambientali e da acque reflue** presentano geni di patogenicità riferibili a **LIPI-3** e **LIPI-4**.

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE
https://doi.org/10.1038/s41467-019-10380-0 OPEN

Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products

Mylène M. Maury[1,2,3], Hélène Bracq-Dieye[1,2], Lei Huang[1,4], Guillaume Vales[1,2], Morgane Lavina[1], Pierre Thouvenot[1,2], Olivier Disson[1], Alexandre Leclercq[1,2], Sylvain Brisse[3,6] & Marc Lecuit[1,2,5]

Listeria monocytogenes (Lm) is a major human and animal foodborne pathogen. Here we show that hypervirulent *Lm* clones, particularly CC1, are strongly associated with dairy products, whereas hypovirulent clones, CC9 and CC121, are associated with meat products. Clone adaptation to distinct ecological niches and/or different food products contamination routes may account for this uneven distribution. Indeed, hypervirulent clones colonize better the intestinal lumen and invade more intestinal tissues than hypovirulent ones, reflecting their adaption to host environment. Conversely, hypovirulent clones are adapted to food processing environments, with a higher prevalence of stress resistance and benzalkonium chloride tolerance genes and a higher survival and biofilm formation capacity in presence of sub-lethal benzalkonium chloride concentrations. *Lm* virulence heterogeneity therefore reflects the diversity of the ecological niches in which it evolves. These results also have important public health implications and may help in reducing food contamination and improving food consumption recommendations to at-risk populations.

Europe PMC Funders Group
Author Manuscript
Nat Genet. Author manuscript; available in PMC 2016 September 01.

Published in final edited form as:
Nat Genet. 2016 March ; 48(3): 308–313. doi:10.1038/ng.3501.

Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity

Mylène M. Maury[#1,2,3], Yu-Huan Tsai[#4,5], Caroline Charlier[4,5,6,7,8], Marie Touchon[1,2], Viviane Chenal-Francisque[4,6,7], Alexandre Leclercq[4,6,7], Alexis Criscuolo[9], Charlotte Gaultier[4,5], Sophie Roussel[10], Anne Brisabois[10], Olivier Disson[4,5], Eduardo P. C. Rocha[1,2], Sylvain Brisse[1,2,*], and Marc Lecuit[4,5,6,7,8,*]

GRAZIE A TUTTI

PER

L'ATTENZIONE!

Un ringraziamento a:

I colleghi dell'IZS Sardegna

I colleghi del CRN per Sequenze Genomiche di microrganismi patogeni: banca dati e analisi di bioinformatica

I colleghi dell'IZSAM e del LNR*Lm*