IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Listeria monocytogenes
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Variabilità genetica di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da animali selvatici

Giornata di studio: Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes*

Teramo, 4 luglio 2019

Violeta Di Marzio-Marina Torresi

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Progetto ListAdapt

Gennaio 2018 - Gennaio 2021

23 partner da 18 paesi

One HEALTH EJP

4000 genomi

- Ambiente/suolo
- Animali
- Alimenti
- Casi clinici

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Progetto ListAdapt

Identificare animali selvatici quali serbatoio di *Listeria monocytogenes* al fine di chiarire quali geni e meccanismi molecolari sono alla base dell'adattamento di questo microrganismo all'habitat dal quale viene isolato.

Cervo

Cinghiale

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes
National Reference Laboratory

Progetto ListAdapt

Scoiattolo

Tasso

Lupo

Campioni analizzati

Campioni analizzati **453**

MATERIALE ANALIZZATO	N° CAMPIONI	SPECIE
Crostacei	1	Gambero turco
Feci	281	Bovino, cane, capriolo, cervo, cinghiale, fagiano, faina, gracchio corallino, istrice, lince, lupo, martora, orso, poiana, riccio, scoiattolo, suino, tasso, volpe
Molluschi	42	Cozze, vongole, lumache, moscardini
Tamponi rettali	104	Cane, gatto, serpenti
Mangimi zootecnici	9	
Latte di massa	16	Bovino

Materiali e metodi

- Tutti i campioni sono stati analizzati per la ricerca di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. seguendo la **ISO 11290:2017**

1° arricchimento: Brodo Demi Fraser + citrato ferrico

30°C x 24h

2° arricchimento:
- Brodo Fraser + citrato ferrico
- Semina su ALOA e OXFORD Agar.

37°C x 24h per *L. monocytogenes*
37°C x 48h per *Listeria* spp.

Isolamento colonie tipiche sospette

37°C x 24h

Emolisi, catalasi, identificazione biochimica (VITEK)

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

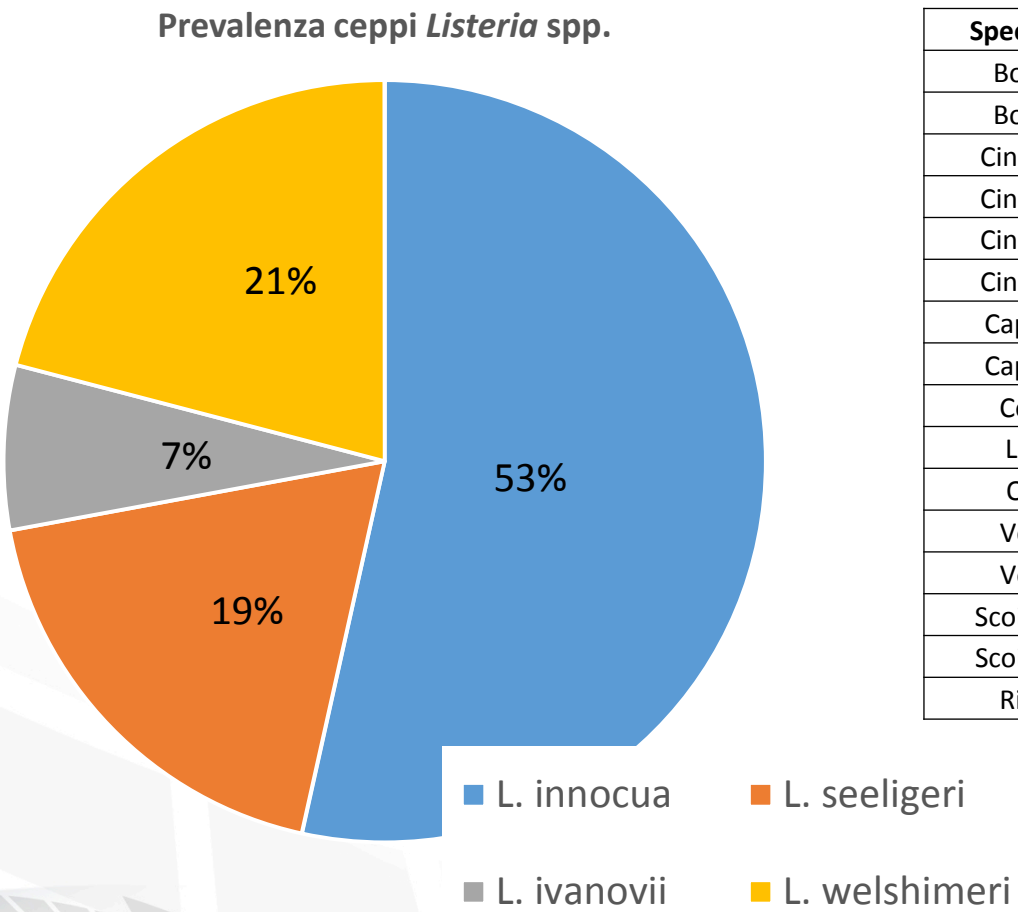
Risultati

51 Campioni positivi per *Listeria* spp.:

- 3 Mangimi zootecnici (*L. innocua*)
- 2 Lumache dalle quali sono stati isolati 2 ceppi di *L. seeligeri* e 1 ceppo di *L. ivanovii*
- 1 Moscardino (*L. seeligeri*)
- 2 Tamponi cloacali serpente (1 *L. innocua;* 1 *L. seeligeri*)

Risultati

43 campioni di feci positivi per *Listeria* spp.

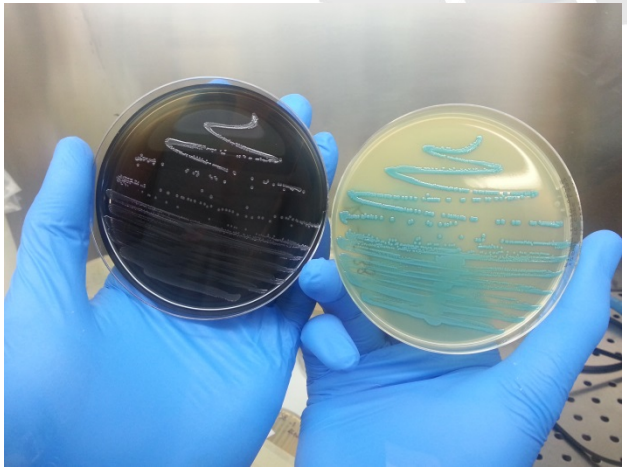


Specie feci	N° positivi	Ceppo isolato
Bovino	18	*L.innocua*
Bovino	1	*L. welshimeri*
Cinghiale	1	*L.innocua*
Cinghiale	6	*L. welshimeri*
Cinghiale	1	*L. ivanovii*
Cinghiale	1	*L. seeligeri*
Capriolo	1	*L. welshimeri*
Capriolo	5	*L. seeligeri*
Cervo	1	*L. seeligeri*
Lupo	1	*L.innocua*
Orso	1	*L.innocua*
Volpe	1	*L.innocua*
Volpe	2	*L. ivanovii*
Scoiattolo	1	*L. welshimeri*
Scoiattolo	1	*L. seeligeri*
Riccio	1	*L.innocua*

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes
National Reference Laboratory

Risultati



Campioni positivi per *Listeria monocytogenes:*

16 ceppi isolati da latte di massa (specie bovina)

24 ceppi isolati da feci:

- 4 bovino
- 4 capriolo
- 2 cinghiale
- 3 lupo
- 1 orso
- 2 tasso
- 5 volpe

1 ceppo isolato da lumaca

Istituto Zooprofilattico G.Caporale - TE

Cliente bioMerieux:
N. sistema:

Lab report

Stampato 26-giu-2019 08:43 CEST
Stampato da: batteriologia1

Gruppo di isolati: [redacted]

Tipo di card: GP Test dello strumento: 00000EBB56E9 (2249)

Bionumero: 342200200733621
Quantità organismo:

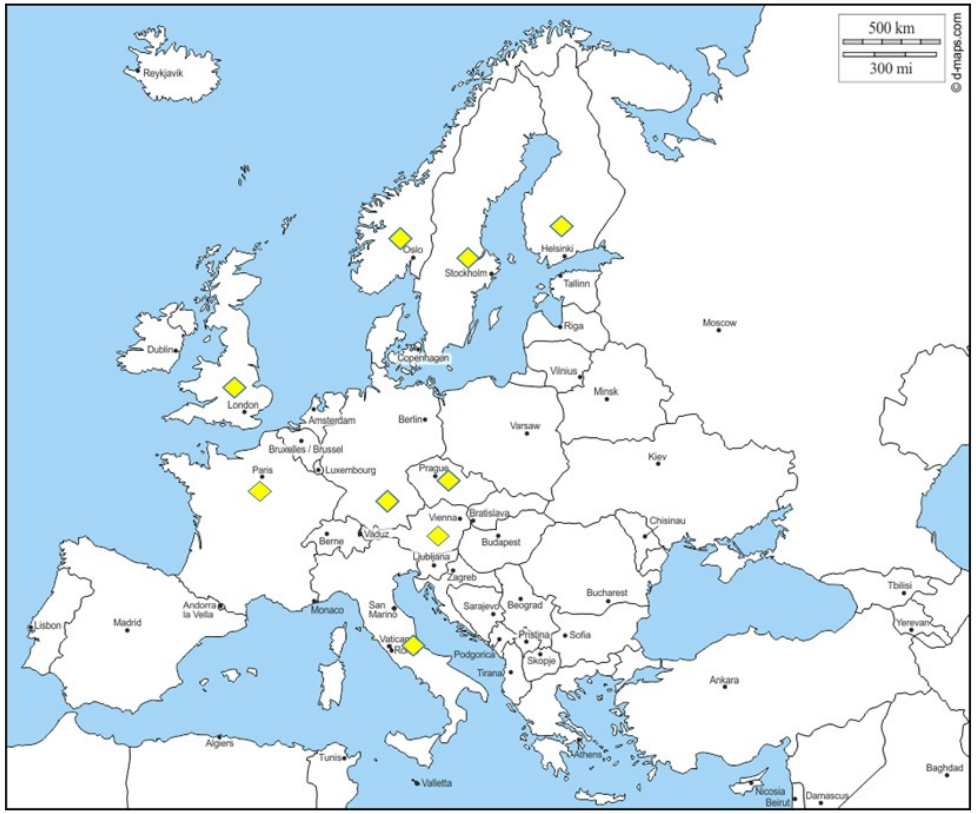
Commenti:	

Informazioni sull'identificazione	Card:	GP	Numero di lotto:	2420938203	Scade:	21-giu-2020 13:00 CEST
	Completato:	25-giu-2019 19:51 CEST	Stato:	Finale	Tempo di analisi:	7,00 ore
Microrganismo selezionato	Probabilità 99%		Listeria monocytogenes			
	Bionumero:	342200200733621			Affidabilità:	Identificazione eccellente

Ceppi da animali (wild)

161 ceppi da 8 paesi europei e 18 diverse specie di animali

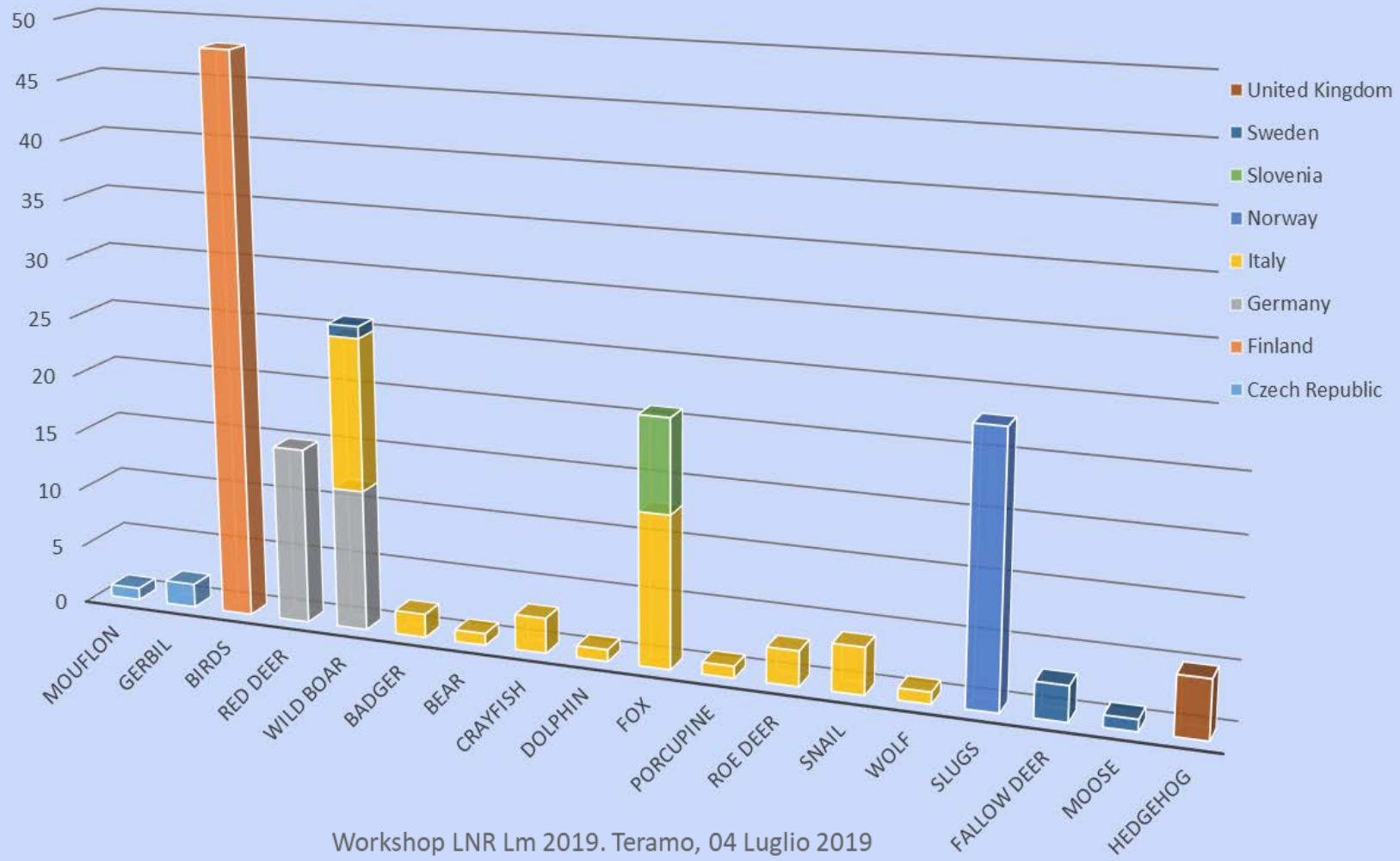
NGS per determinare CC e cgMLST



IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes
National Reference Laboratory

Distribuzione dei ceppi in base alla specie animale di origine e paese di provenienza

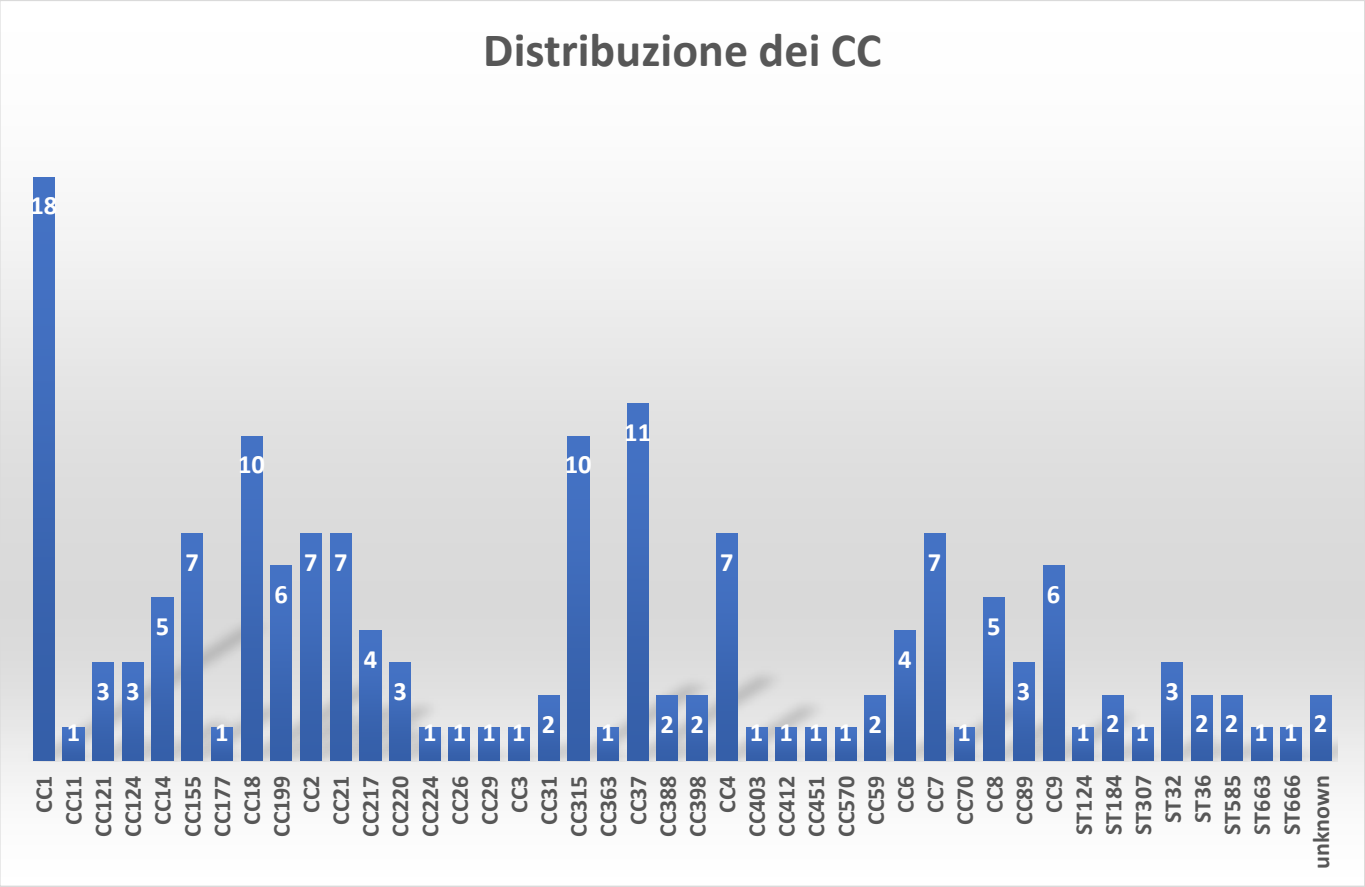


IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Risultati di caratterizzazione: CC

- 35 CC: 90.7 % dei ceppi (n=146)
- 8 singleton: 8.07% dei ceppi (n=13)
- due non determinati: 1.24% dei ceppi (n=2)
- CC prevalenti: CC1: 11.2% (n=18), CC37: 6.83% (n=11), CC315 e CC18: 6.21% (n=10)

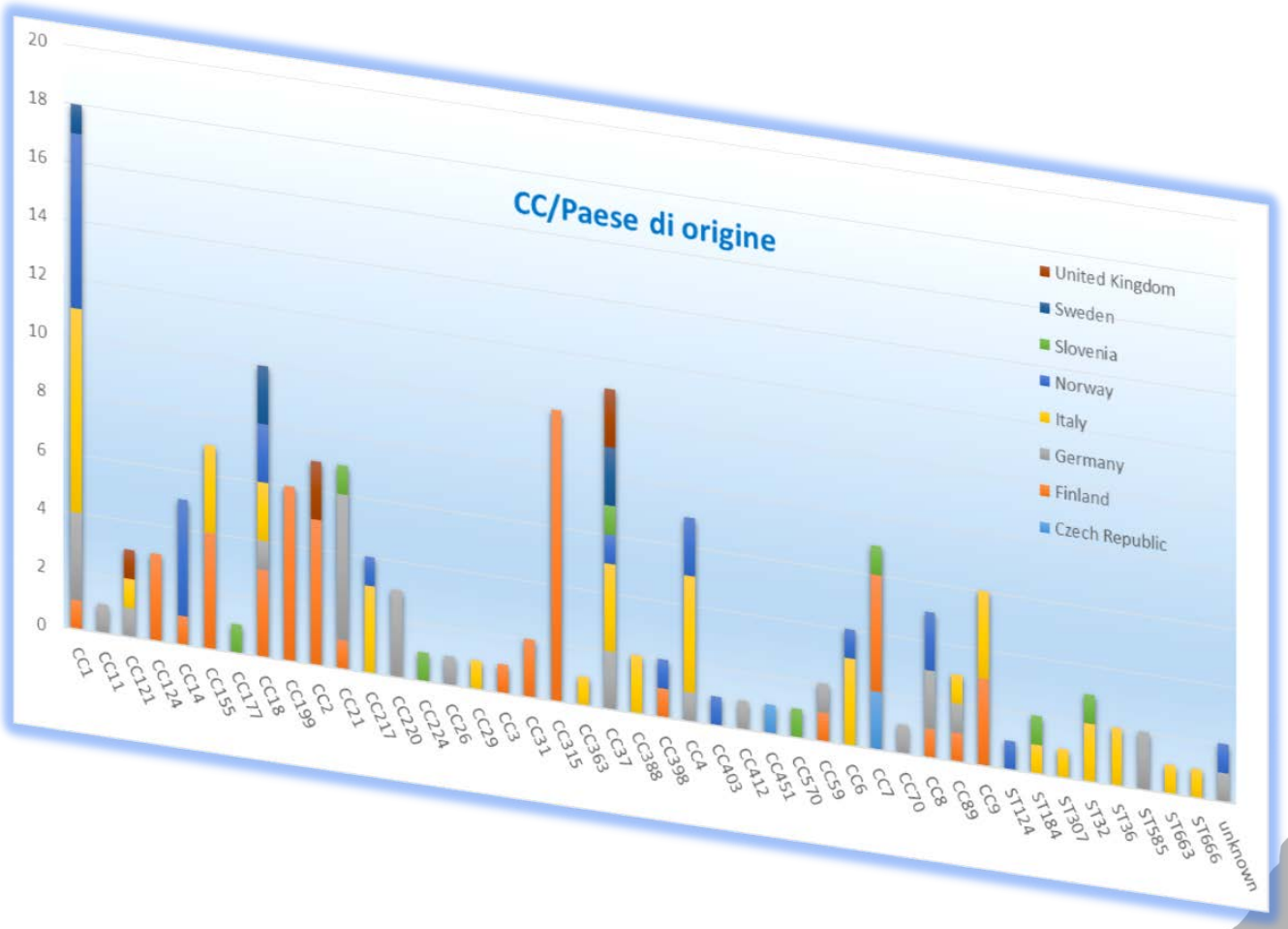


IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Risultati : CC versus paese di origine

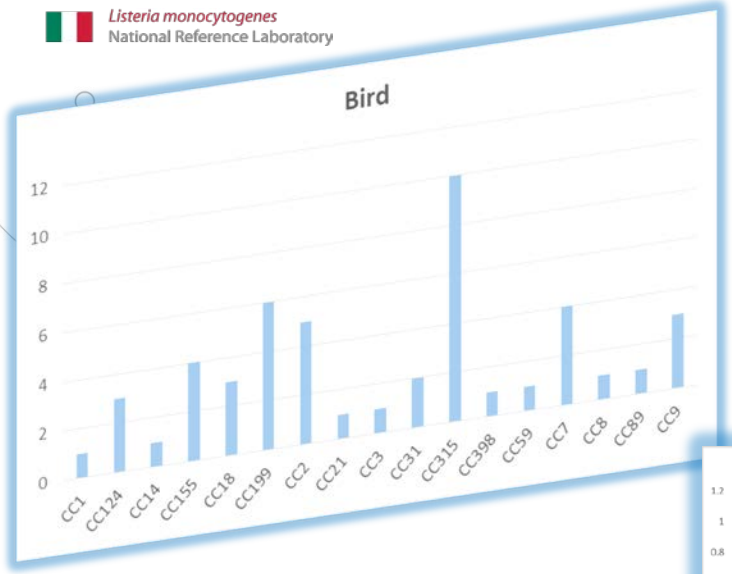
- Italia: 19 CC da 10 specie animali
- Finlandia: 17 CC da 1 specie animale (uccelli)
- Germania: 16 CC da 2 specie animali
- Norvegia: 12 CC da 1 specie animale (lumaca)
- Svezia: 8 CC da 3 specie animali
- Slovenia e Regno Unito: 3 CC da 1 specie animale (Volpe e Riccio rispettivamente)
- Repubblica Ceca: : 2 CC da 2 specie animali

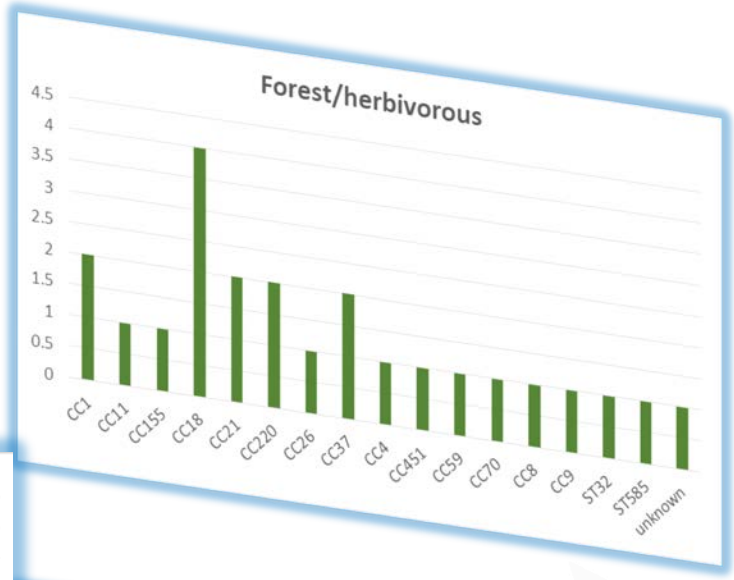


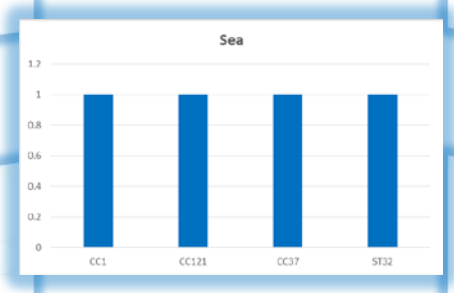
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

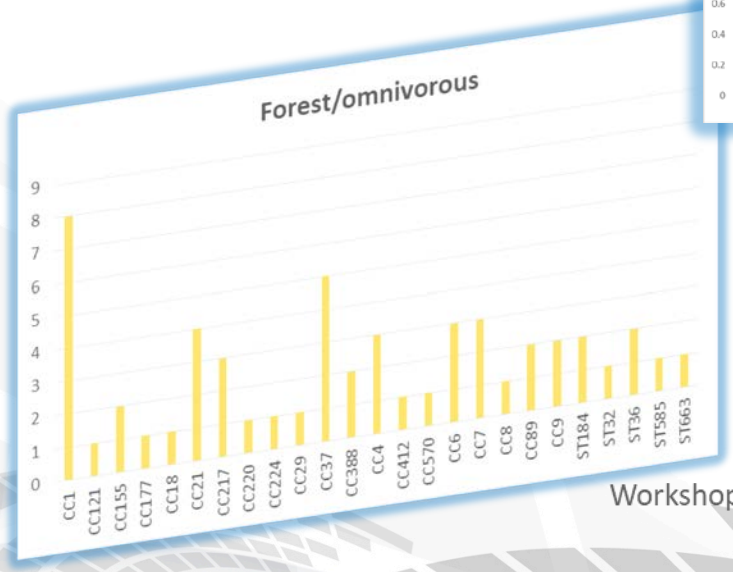
Listeria monocytogenes
National Reference Laboratory

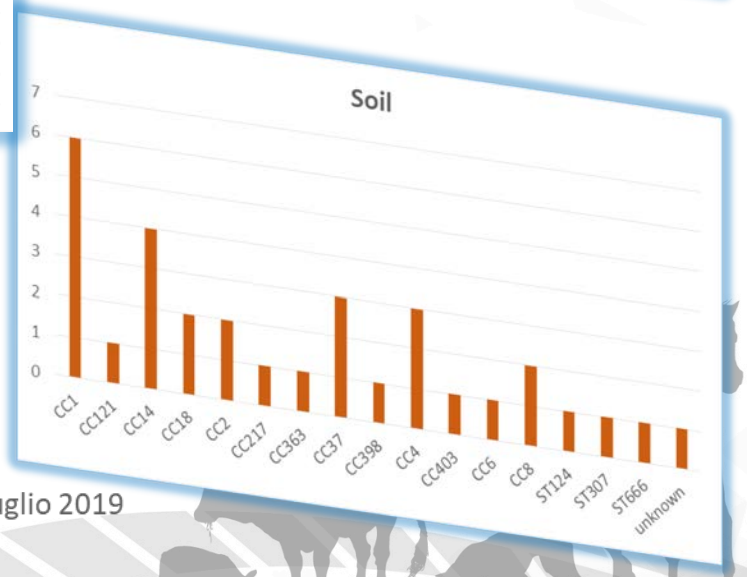
Risultati : CC versus specie









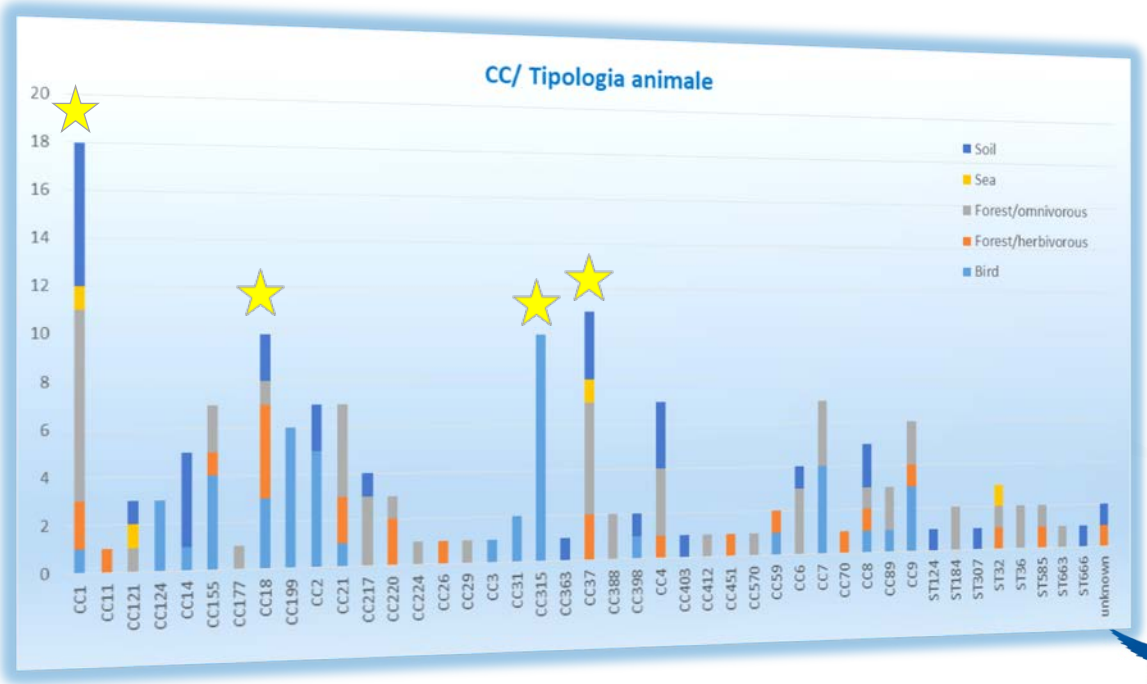


IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes
National Reference Laboratory

Risultati : CC versus specie

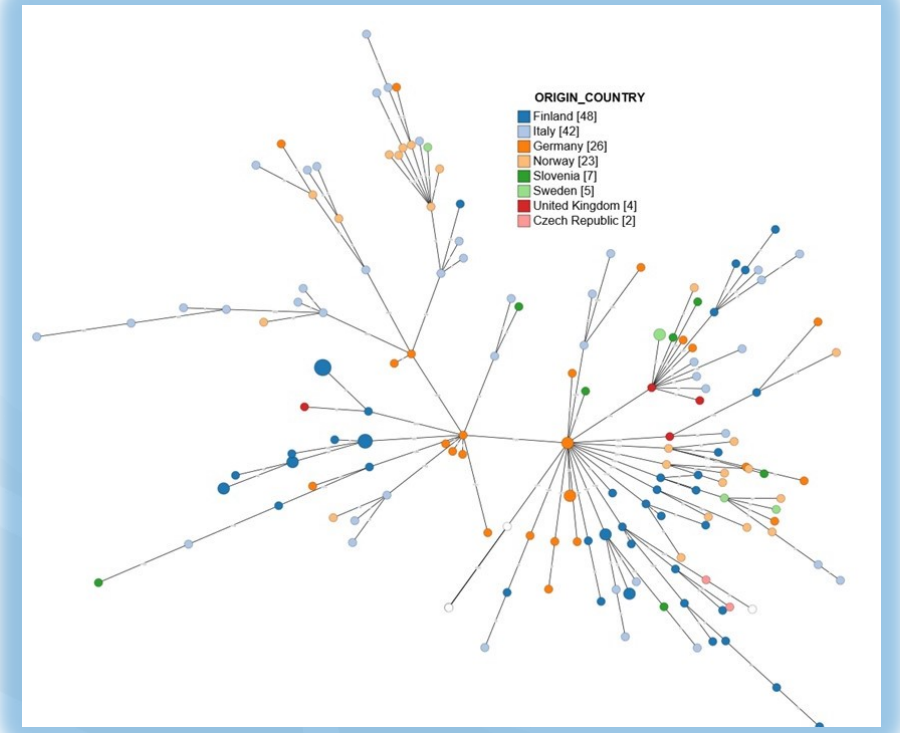
- CC1: Cervo, Cinghiale, Daino, Gambero, Lumaca, Volpe, Uccelli. In cinque diversi paesi Europei: Finlandia, Germania, Italia, Norvegia, Svezia.
- CC37: Cervo, Cinghiale, Daino, Gambero, Lumaca, Riccio, Tasso, Volpe. In sei diversi paesi Europei: Germania, Italia, Norvegia, Regno Unito, Slovenia, Svezia.
- CC315: Uccelli, Finlandia
- CC18: Alce, Cervo, Daino, Lumaca, Volpe, Uccelli. In cinque diversi paesi Europei: Finlandia Germania, Italia, Norvegia, Svezia.

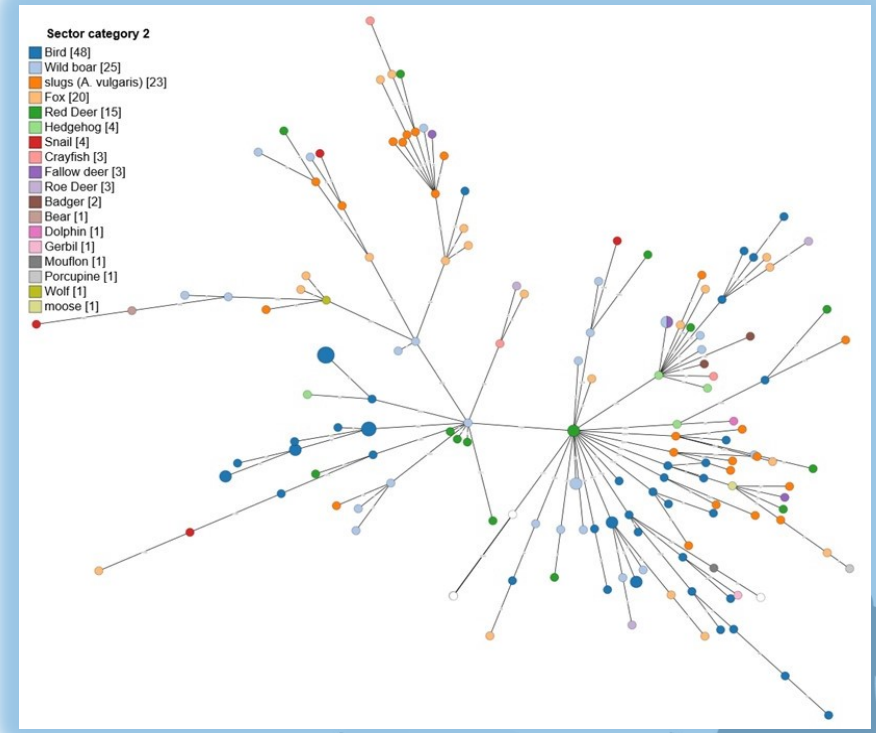


IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes
National Reference Laboratory

Risultati : cgMLST/paese/specie origine





IZSAM G.CAPORALE TERAMO

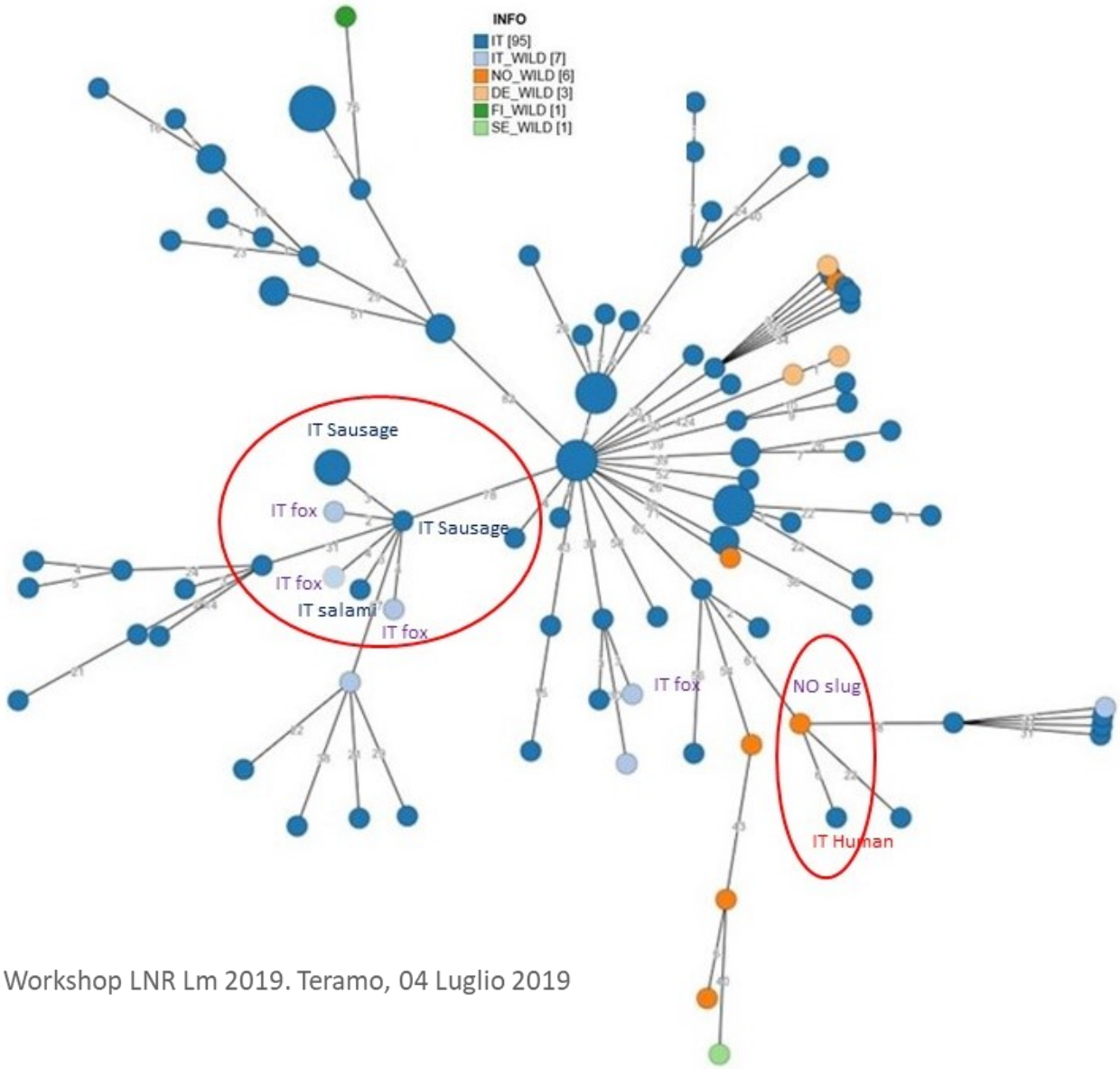
Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Risultati : cgMLST CC1

L'analisi cgMLST ha evidenziato:

- una distanza allelica inferiore o uguale a 4 alleli tra ceppi isolati da volpe in Italia e da prodotti a base di carne
- una distanza allelica pari a 6 alleli tra ceppi isolati da lumaca in Norvegia e da un caso clinico in Italia

Ceppi con una distanza allelica inferiore a 7 alleli vengono solitamente considerati appartenenti allo stesso "core genome type" e altamente correlati



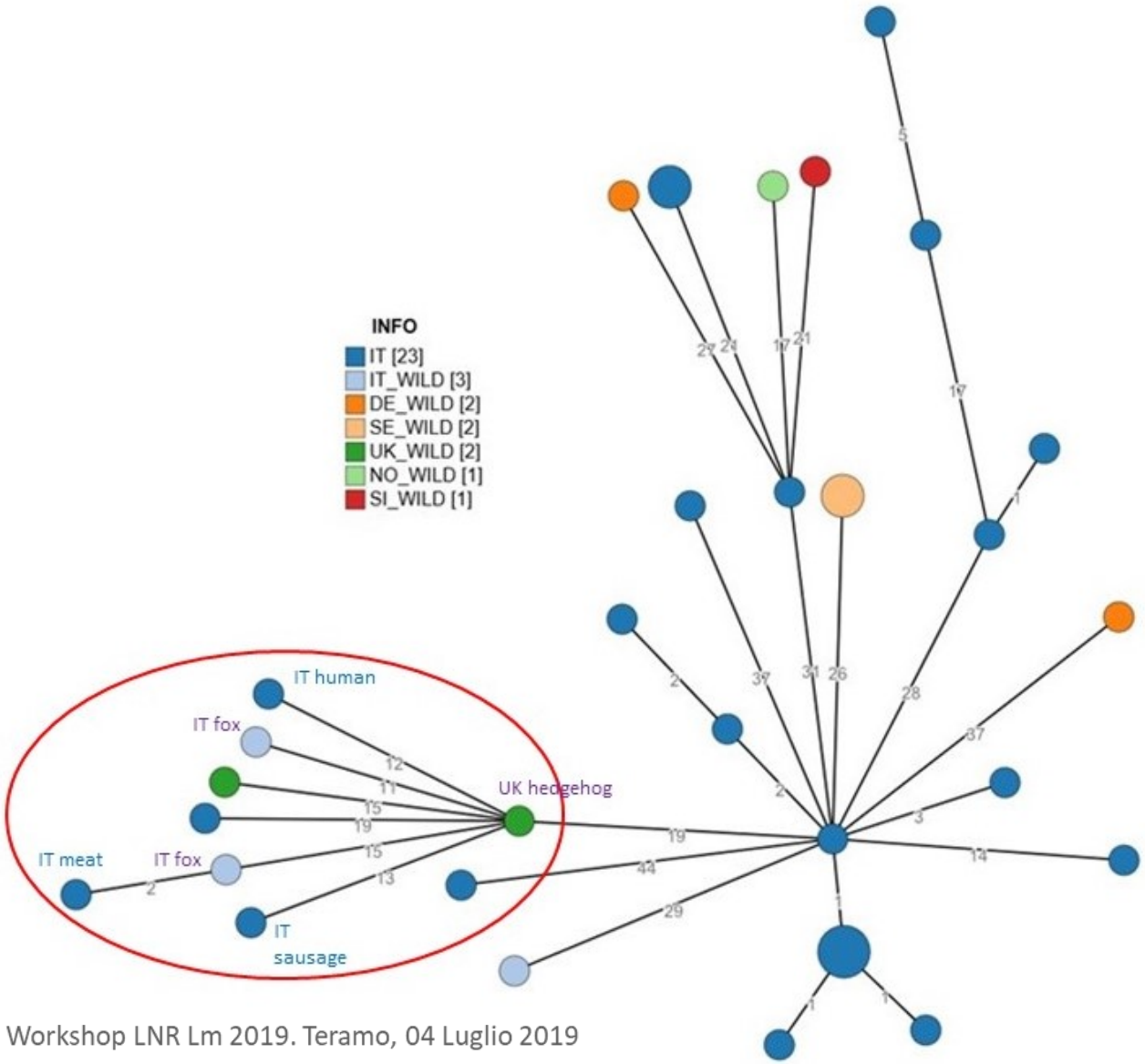
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Risultati : cgMLST CC37

L'analisi cgMLST ha evidenziato:

- distanze alleliche inferiore o uguali a 15 tra ceppi isolati da lumaca in Norvegia e Volpe in Italia e ceppi da prodotti a base di carne o da casi clinici in Italia



IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Conclusioni e prospettive future

- CC1 predominante in Wild, non è stato rilevato un CC tipico del gruppo «animali selvatici». I CCs prevalenti sono compresi nei primi 10 prevalenti in EFSA report (food and clinical)
- Distribuzione dei CCs indipendente da specie animale e paese di provenienza
- Per alcuni ceppi, elevata somiglianza genetica espressa anche in cgMLST a fronte di un' elevata diversità di matrice e luogo di prelievo
- Le caratteristiche genetiche evidenziano adattamento del ceppo a diversi ambienti e specie animale

Importanza dei dati epidemiologici in caso di studi basati sulla genetica.

Necessità di indagare con ulteriori analisi non limitate al cgMLST

Work in progress

a) Analisi dettagliata dei dati epidemiologici
b) Genome-wide association study (GWAS)
c) Pangenome analysis

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Grazie per l'attenzione!

Ringraziamenti

- Colleghi dell'IZSAM e del LNR Lm
- Colleghi del CRN per sequenze genomiche di microorganismi patogeni: banca dati e analisi di bioinformatica
- ANSES
- ListAdapt partners

One HEALTH EJP