

Listeria monocytogenes Pulsed Field Gel Electrophoresis: protocolli a confronto

Acciari V.A., Torresi M., Pompei A., Centorame P., Pomilio F. e Migliorati G.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale",
Laboratorio Nazionale di Riferimento per Listeria monocytogenes, Teramo, Italy

Keywords

Listeria monocytogenes, protocollo PFGE.

Introduzione

La listeriosi nonostante la sua bassa incidenza, è un'infezione alimentare di grande impatto per la salute pubblica in Europa. Per individuare rapidamente i focolai epidemici, risulta cruciale la comunicazione tra i laboratori incaricati della tipizzazione dei ceppi circolanti provenienti sia da alimenti che da casi clinici.

Ad oggi la PFGE è ancora considerata la metodica "gold standard" nonostante nuove tecniche di tipizzazione dell'intero genoma risultino molto promettenti.

La messa a punto di un protocollo standardizzato di tipizzazione di *Listeria monocytogenes* fu pubblicato inizialmente dall'US Center for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta) nel 2001 (2) ed è stato poi ottimizzato negli anni al fine di migliorare la qualità dei risultati e le performance del metodo (3).

Il Laboratorio di Riferimento dell'Unione Europea per *Listeria monocytogenes* (EURLm) coordina una rete di 35 laboratori nazionali di riferimento (LNR) responsabili della tipizzazione di ceppi isolati da alimenti ed ha sviluppato un protocollo basato sul PulseNet PFGE standardizzato e condiviso con i LNR (1) incoraggiandone l'uso.

Lo scopo di questo lavoro è valutare le performance di entrambe le metodiche e confermare i risultati di compatibilità già ottenuti dall'EURLm (4) al fine di facilitare anche a livello italiano gli scambi tra i laboratori operanti nella tipizzazione di ceppi isolati da alimenti e da casi clinici.

Materiali e metodi

Pannello di ceppi

Per la comparazione dei due protocolli sono stati utilizzati 11 ceppi di *Listeria monocytogenes* inviati dall'EURLm nell'ambito del *Fourth Listeria monocytogenes typing proficiency testing trial 2014*. I ceppi appartenevano a 5 diversi sierotipi corrispondenti ai più comuni normalmente riscontrati tra i ceppi isolati da alimenti e da casi clinici.

Protocolli PFGE

I ceppi di *Listeria monocytogenes* sono stati caratterizzati mediante PFGE secondo i protocolli adottati dal network PulseNet (5) e dall'EURLm (1, 6), che prevedevano entrambi l'utilizzo degli enzimi di restrizione *Ascl* e *Apal* e il ceppo *Salmonella* Braenderup H9812 come standard. Inoltre, come previsto nel protocollo EURLm, il ceppo *Listeria monocytogenes* H2446 è stato utilizzato come controllo di estrazione.

Entrambi i protocolli sono stati eseguiti da due operatori diversi al fine di valutarne la riproducibilità.

Analisi dei profili

L'analisi dei profili di PFGE generati con entrambe le metodiche è stata eseguita mediante software BioNumerics versione 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) con il metodo *Unweight Pair Group Method Using Arithmetic Averages* (UPGMA) e coefficiente di correlazione Dice.

Risultati e Discussione

Comparazione dei protocolli

I due protocolli di PFGE presentano numerose differenze che riguardano più fasi della metodica. In particolare: preparazione della sospensione cellulare, preparazione del blocchetto, digestione enzimatica, caricamento dei blocchetti e corsa elettroforetica. Inoltre ulteriori differenze sono emerse per quanto riguarda costi e tempi dell'analisi. In **Tabella 1** sono riportate in dettaglio le differenze tra i due protocolli.

Comparazione dei profili

Gli 11 ceppi analizzati in doppio con entrambe le metodiche hanno prodotto dei profili *Ascl* e *Apal* indistinguibili. Questo dimostra che attraverso i due protocolli si ottengono risultati sovrapponibili e che, entrambe le metodiche, presentano un'ottima riproducibilità all'interno del laboratorio.

Il dendrogramma ottenuto dall'analisi dei profili di macrorestrizione è illustrato in **Figura 1**.

I risultati ottenuti hanno evidenziato vantaggi e svantaggi in entrambi i protocolli. La metodica dell'EURLm risulta molto più economica rispetto al protocollo americano, di contro i tempi di analisi sono più lunghi di circa 6 ore. Il forte abbattimento dei costi è da attribuire ad una quantità minore di enzima di restrizione utilizzato.

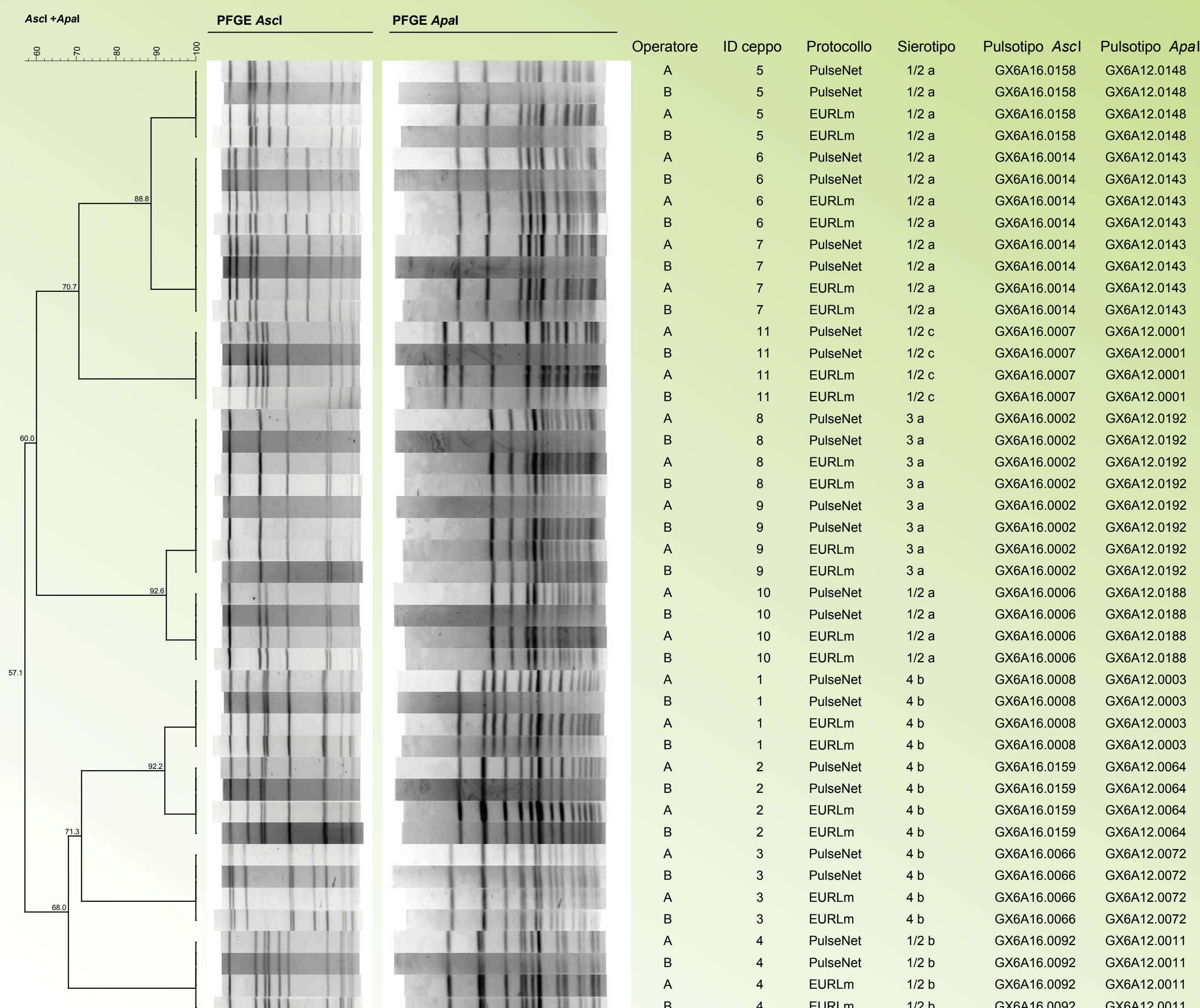
L'uso dei blocchetti stretti permette inoltre di analizzare un numero maggiore di ceppi per ogni corsa elettroforetica, ma nel contempo la maneggiabilità di fettine molto piccole risulta più difficoltosa e rende problematica l'eliminazione di eventuali spot in fase di analisi al software Bionumerics.

In conclusione, il lavoro svolto conferma i risultati ottenuti dall'EURLm (4) evidenziando che entrambi i protocolli di PFGE forniscono risultati indistinguibili e comparabili. Questi risultati confermano inoltre la robustezza del metodo PFGE e rendono più semplice la comunicazione tra laboratori operanti nel settore degli alimenti e nel settore clinico al fine di stabilire una rete di sorveglianza in grado di intervenire tempestivamente in caso di focolai in atto o prevenirne lo sviluppo.

Tabella 1. Procedure a confronto nelle diverse fasi.

EURL SOP		2013 PULSENET
	PREPARAZIONE SOSPENSIONE BATTERICA	
18-48h	TEMPO DI INCUBAZIONE PIASTRA	14-18h
1.6-1.8 OD600	CONCENTRAZIONE BATTERICA	1.0 OD610
	PREPARAZIONE BLOCCHETTI	
2 mg/ml	CONCENTRAZIONE DI LISOZIMA	0.95 mg/ml
37° per 10 min	CONCENTRAZIONE DI INCUBAZIONE DI LISOZIMA	55-60° per 10-20 min
1.2%	CONCENTRAZIONE AGAROSIO	1%
0.1 mg/ml	CONCENTRAZIONE PROTEINASI K	0.48 mg/ml
Blocchetti stretti	TIPOLOGIA DI SUPPORTO	Blocchetti larghi
	LISI CELLULARE	
0.15 mg/ml	CONCENTRAZIONE PROTEINASI K	0.10 mg/ml
37/50	TEMPERATURA DI LISILAVAGGI	54/55
	DIGESTIONE ENZIMATICA	
Richiesta (BSA inclusa)	PRE-RESTRIZIONE	Fortemente raccomandata
100 µl	VOLUME DI RESTRIZIONE	200 µl
5/10	<i>Ascl</i> / <i>Apal</i> (UNITÀ/CAMPIONE)	25/25
37° C per 4h / 37° C per 4h	CONDIZIONE DI INCUBAZIONE (<i>Ascl</i> / <i>Apal</i>)	37° C per 2h / 25-30° C per 2h
	BLOCCHETTI CARICATI (PER GEL)	
06-12	NUMERO DI CEPPI TIPIZZATI (<i>Ascl</i> / <i>Apal</i>) (GEL PICCOLO-GEL GRANDE)	3.5-5.5
1	CONTROLLO DI ESTRAZIONE (<i>Listeria monocytogenes</i> H2446)	0
3-5	NUMERO DI CONTROLLI (<i>Salmonella</i> ser. Braenderup)	3-4
	COSTI (€) (PER CEPPO)	
6.25	GEL PICCOLO	23.30
5.76	GEL GRANDE	20.93
	TEMPO DI ANALISI (h)	
50-70		44-45

Figura 1. Dendrogramma di 11 ceppi analizzati con entrambe le procedure (Pulsenet, EURLm) da due operatori diversi (A, B).



Bibliografia

- Félix B., Brisabois A., Dao T.T., Lombard B., Asséré A., Roussel S. 2012. The use of Pulsed Field Gel Electrophoresis in *Listeria monocytogenes* sub-typing: harmonization at the European Union level. In *Gel Electrophoresis: Principles and Basics*. Volume 1. (Magdeldin S., ed). 14, 241-254. In Tech (accessibile su <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/35100.pdf>, consultato il 18/07/2015).
- Graves L.M., Swaminathan B. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, feed and animal: state of play and standard operating procedures for pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol*, **65** (1-2), 55-62.
- Halpin J.L., Garrett N.M., Ribot E.M., Graves L.M., Cooper K.L. 2010. Re-evaluation, optimization, and multilaboratory validation of the PulseNet-standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog Dis*, **7** (3), 293-298.
- Michelon D., Félix B., Vingadassalon N., Mariet J.F., Larsson J.T., Møller-Nielsen E., Roussel S. 2015. PFGE standard operating procedures for *Listeria monocytogenes*: harmonizing the typing of food and clinical strains in Europe. *Foodborne Pathog Dis*, **12** (3), 244-252.
- PulseNet-International. 2013. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes* (accessibile su <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/listeria-pfge-protocol-508c.pdf>, consultato il 18/07/2015).
- Roussel S., Michelon D., Lombard B., Lailler R. 2014. Molecular typing of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, feed and animals: state of play and standard operating procedures for pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing, profile interpretation and curation. EFSA supporting publication 2014, EN-702, 81 pp. (accessibile su <http://www.efsa.europa.eu/it/supporting/doc/702e.pdf>, consultato il 20/07/2015).