UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

BIOLOGIA MOLECOLARE ED APPLICATA

TESI DI LAUREA

ANALISI RETROSPETTIVA DI CEPPI DI L. *MONOCYTOGENES* ISOLATI NELLA REGIONE MARCHE MEDIANTE L'UTILIZZO DEL SEQUENZIAMENTO DELL'INTERO GENOMA (WGS)

Relatore

Prof.ssa Elena Rocchegiani

Laureanda

Serena Bosica

Correlatori

Dott. Francesco Pomilio

Dott.ssa Anna Duranti

Sessione autunnale

Anno Accademico 2019/2020

Sommario

1. Listeria monocytogenes 4
2. RILEVAMENTO DI *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* 5
3. ANALISI PER LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI *L. monocytogenes* 5
3.1. PCR-SIEROGRUPPO 6
3.2. PFGE 7
3.3. Sequenziamento dell'intero genoma 9
4. SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA 12
5. IMPATTO SULLA SALUTE UMANA 12
6. AMBIENTE E FONTI 14
6.1. Crescita e fattori di virulenza 15
6.2. Resistenza e persistenza 17
6.3. Biofilm 18
7. SCOPO 19
8. MATERIALI E METODI 20
8.1. Collezione degli isolati 20
8.2. Analisi di laboratorio 20
8.2.1. Metodo analitico di ricerca del microrganismo 20
8.3. NGS 20
8.3.1. Multi Locus Sequence Typing 22
8.3.2. cgMLST e SNP 22
8.3.3. Multi- Virulence-Locus-Sequence- Typing 23
8.3.4. Virulenza 23
8.3.5. Geni di resistenza e persistenza 24
9. RISULTATI 24
9.1. Clonal complexes 24
9.2. Analisi dei maggiori Clonal Complexes 28
9.2.1. CC1 29
9.2.2. CC2 38
9.2.3. CC8 43
9.2.4. CC155 48
9.3. MVLST e geni di virulenza 54
9.4. Resistenza 55
10. DISCUSSIONE 57
11. CONCLUSIONI 62

12. BIBLIOGRAFIA 63

1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (L. monocytogenes) è un importante patogeno di origine alimentare il quale causa un'ampia gamma di manifestazioni cliniche che vanno da una lieve diarrea ad un'infezione severa ed invasiva (listeriosi) la quale include batteriemia, meningite, encefaliti e aborti.

Generalmente la listeriosi si manifesta più frequentemente in neonati, anziani ed immunocompromessi ed inoltre *L. monocytogenes* ha un elevato tropismo per il feto e gli annessi fetali.

La listeriosi è una malattia relativamente rara, ma presenta un tasso di mortalità intorno al 20-30% e la maggior parte dei casi sembra essere sporadica, anche se i focolai non sono rari (Møller Nielsen et al., 2017).

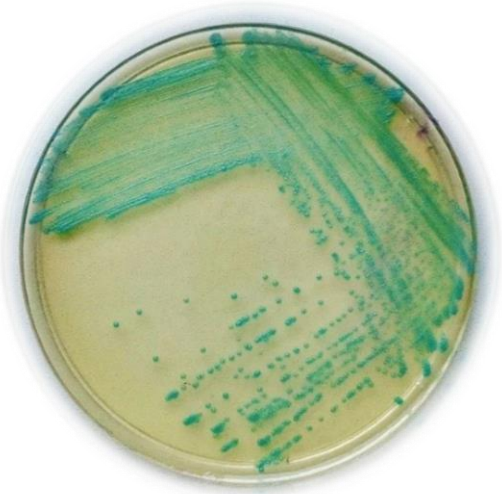
La listeriosi è una malattia trasmessa quasi esclusivamente attraverso il consumo di cibo contaminato, gli alimenti più di frequente riscontrati contaminati sono gli alimenti pronti al consumo (Ready-To-Eat" - RTE) a base di carne, di pesce e formaggi, soprattutto i semi-molli. La contaminazione dei cibi è dovuta principalmente alla capacità di *L. monocytogenes* di sopravvivere in condizioni di stress (basse temperature, alte concentrazioni di sale). Presenta, inoltre, la capacità di persistere negli ambienti di trasformazione alimentare anche per anni. (Møller Nielsen et al., 2017).

Il genere *Listeria* comprende dei piccoli bacilli Gram positivi (0.5-2 μm x 0.5 μm), asporigeni, appartenenti al phylum dei Firmicutes, i quali possono presentarsi isolati o raggruppati in piccole catene. Sono mobili a 20-25 °C con una caratteristica crescita ad ombrello e sono immobili a 37 °C. Sono aerobi-anaerobi facoltativi, catalasi positivi e ossidasi negativi e hanno la capacità di idrolizzare l'esculina. Inoltre, fermentano i carboidrati senza produrre gas e, come riportato nel "Handbook of Microbial Bioresources" (Gupta et al., 2016), tra tutte le specie del genere, L. *monocytogenes* è positiva al test di Christie Atkins Munch-Peterson (CAMP) e mostra una zona aumentata di emolisi sulle piastre di agar sangue di pecora.

L. monocytogenes è molto diffusa in natura e, come riportato da Zhang et al. (2019), è presente nel suolo, nei fiumi, nella vegetazione in decomposizione, negli effluenti da trattamenti fognari, negli intestini di animali selvatici e nelle feci di animali domestici. La presenza in questi ambienti è dovuta alla sua capacità di sopravvivere in condizioni sfavorevoli come alta salinità, basso pH e bassa temperatura.

Il genere Listeria include 20 specie (*L. monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria marthii*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia*, and *Listeria booriae*) ma solo L. monocytogenes e L. ivanovii sono patogene (Orsi, 2016). Tuttavia, solo *L. monocytogenes* rappresenta un problema per la salute umana in quanto *L. ivanovii* infetta maggiormente gli animali, soprattutto i ruminanti. (Guillet et al., 2010; Leclercq et al., 2014)

2. RILEVAMENTO DI *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*



Al fine di rilevare *Listeria* spp e *L. monocytogenes* il campione viene addizionato al brodo Fraser-Demi, il quale consente l'arricchimento selettivo di Listeria. Dopo 24-26 h di incubazione a 30° C si effettua un arricchimento secondario in brodo Fraser per 24 h a 37 ° C. Poi si procede col seminare un'ansata di brodocoltura su ALOA agar, un terreno di isolamento primario, il quale va incubato a 37 °C per 24-48 h. Se presente, le colonie di *L. monocytogenes* appariranno di colore verde-blu a causa dell'idrolisi del substrato cromogeno, rappresentato dal 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucopyranoside, attuata da parte dell'enzima β-D-glicosidasi comune a tutte le specie di *Listeria* e circondate da un alone opaco dovuto all'attività sul substrato PIPLC:phosphatidyl inositol phospholipase C della fosfolipasi C, la quale si ritrova solamente nelle specie patogene *L. monocytogenes* ed in alcuni ceppi di *L. ivanovii*. Dunque, con l'azione combinata dei due substrati è possibile differenziare le seguenti colonie: *L. monocytogenes* si presenterà con colonie verde-blu circondate da un alone opaco, mentre *Listeria* spp. apparirà con colonie verde-blu senza alone opaco.

Si prosegue poi con un isolamento secondario su Palcam agar dove le colonie di L. *monocytogenes* appariranno di colore grigio-verde circondate da un alone nero.

Dopodiché si prelevano 5 colonie presuntive di *L. monocytogenes* e si seminano su terreni non selettivi (agar-nutritivo, agar-sangue) al fine di poter avere delle colonie isolate.

Infine, si effettuano dei test di conferma, come la colorazione di Gram e la successiva osservazione al microscopio, test di emolisi e fermentazione degli zuccheri. Ad esempio, *L. monocytogenes* fermenta il ramnosio ma non lo xilosio (Handbook, 2008).

Attraverso questa procedura è possibile affermare se *L. monocytogenes* è presente o meno nel campione, ma a livello epidemiologico è importante andare a caratterizzare il ceppo responsabile della contaminazione.

3. ANALISI PER LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI *L. monocytogenes*

Le analisi che possono essere effettuate al fine di caratterizzare un isolato sono essenzialmente di due tipi: analisi fenotipiche e analisi genotipiche.

Per quanto riguarda le tecniche di caratterizzazione fenotipica vi sono la sierotipizzazione, la tipizzazione mediante l'utilizzo di batteriocine e la tipizzazione fagica. Queste tecniche di biotipizzazione, però, presentano dei limiti in quanto esse si basano sul presupposto che il fenotipo sia espressione del genotipo, ma sappiamo che l'espressione genica può essere influenzata dall' ambiente ed inoltre i target della biotipizzazione (le proteine) sono meno stabili rispetto al DNA. Un altro problema legato all'utilizzo di queste tecniche fenotipiche è che richiedono una certa specificità di reagenti (sieri, fagi, batteriocine, etc.) e sono dei metodi difficilmente standardizzabili. In particolare, la sierotipizzazione si avvale dell'uso di antisieri contenenti anticorpi monoclonali o policlonali diretti contro l'antigene somatico (O) e l'antigene flagellare (H). Ci sono 15 sottotipi dell'antigene somatico "O" (I-XV), mentre l'antigene flagellare "H" comprende 4 sottotipi (A-D) (Seeliger & Hohne, 1979; Seeliger & Jones, 1986). In base alla combinazione di questi antigeni, tramite la reazione di agglutinazione, sono stati identificati quindici sierotipi per L. *monocytogenes*, ovvero 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4, 5, 6a, 6b and 7, in seguito classificati in lineage I (1/2b, 3b, 4b, 4d, and 4e), II ((1/2a, 1/2c, 3a, and 3c), III (4a and 4c) e IV (4a, 4c e un sierotipo atipico 4b) (Borucki et al., 2003).

Negli ultimi anni alla tipizzazione fenotipica si è affiancata una tipizzazione molecolare, la quale è basata sullo studio e la caratterizzazione del DNA. I metodi molecolari presentano dei vantaggi: sono aspecifici, in quanto non richiedono l'utilizzo di reagenti specifici ed inoltre sono in grado di rilevare i polimorfismi a livello degli acidi nucleici. In particolare, dato che gli acidi nucleici sono intrinsecamente più stabili delle proteine e meno inclini alle influenze di fattori esterni, le tecniche molecolari risultano più precise e meno variabili rispetto ai metodi fenotipici (Liu, 2008).

L'obiettivo della tipizzazione microbica è valutare le relazioni tra gli isolati microbici. Infatti, comprendere la correlazione clonale tra i ceppi è essenziale per determinare l'origine e le vie di infezione, nonché per confermare o escludere focolai, tracciare la trasmissione incrociata di agenti patogeni associati all'assistenza sanitaria, riconoscere ceppi particolarmente virulenti e valutare l'efficacia delle misure di controllo (Tenover et al., 1997; Maccannell, 2013; Pérez-Losada et al., 2013). Vi sono diverse tecniche di tipizzazione molecolare o di fingerprinting genetico: PCR sierogruppo, PFGE, WGS.

È utile combinare le tecniche di tipizzazione fenotipica e molecolare per poter definire il clone epidemico, individuarne la fonte e, di conseguenza, seguirne la circolazione.

3.1. PCR-SIEROGRUPPO

Il sierogruppo viene determinato utilizzando il protocollo descritto da Doumith et al.(2004) basato sull'amplificazione di una regione sierogruppo-specifica, che porta all'identificazione di 5 diversi sierogruppi: IIa, IIb, IIc, IVb, IVa.

Per l'amplificazione è stata preparata una miscela con volume finale pari a 25 µl, contenente 12,5 µl di QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Quiagen®, Hilden, Germania), 0,4 µM per i primer Imo0737, Orf2819, Orf2110, 0,8 µM per il primer Imo1118, 0,1 µM per i primer prs, 0,2 µM per i primer LIP e un volume di DNA equivalente a circa 100 ng.

La reazione di amplificazione è stata condotta in un Thermal Cycler GeneAmp® PCR systems 9700 (Applied Biosystem®, Carlsbad, CA, USA). Le condizioni di PCR sono: denaturazione iniziale di 3 minuti a 94°C; 35 cicli di denaturazione a 94°C per 30s, annealing a 53°C per 40s, estensione a 72°C per 90s e estensione finale a 72°C per 7 minuti.

L'amplificato è stato sottoposto ad elettroforesi capillare mediante lo strumento QIAxel. Sono stati utilizzate le cartucce QX DNA Screening Cartridge, il QX DNA alignment marker 15bp-3 kb e il QX DNA size marker 50 bp-1.5 kb. In alternativa all'elettroforesi capillare è possibile ricorrere all'elettroforesi classica in un gel di agarosio al 2%.

L'assegnazione del sierogruppo è specificata nella tabella sotto riportata:

	Gene Target (Dimensioni banda attesa)						
Sierotipo	lmo1118 (906 bp)	lmo 0737 (691 bp)	ORF 2110 (597 bp)	ORF 2819 (471 bp)	Prs (370 bp)	prfA (274 bp)	Sierogruppo
1/2a, 3a	-	+	-	-	+	+	IIa
1/2b, 3b	-	-	-	+	+	+	IIb
1/2c, 3c	+	+	-	-	+	+	IIc
4ab. 4b, 4d, 4e	-	-	+	+	+	+	IVb
4a, 4c	-	-	-	-	+	+	IVa
Listeria non monocytogenes	-	-	-	-	+	-	L

Il riconoscimento dei batteri appartenenti al genere *Listeria* spp. viene effettuato con il rilevamento del gene prs

3.2. PFGE

La PFGE era considerata la tecnica "gold standard" dei metodi di tipizzazione molecolare per agenti patogeni di origine batterica come *Salmonella* spp, *E. coli*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Vibrio* e *Listeria* (Félix et al., 2012) e rappresenta un'evoluzione rispetto alla RFLP. Tale tecnica è basata sull'utilizzo di enzimi di restrizione che tagliano infrequentemente il genoma in modo da generare 5-20 frammenti di circa 10-800 kb. Le differenze nei profili di restrizione vengono utilizzate per effettuare confronti genetici tra gli isolati (Félix et al., 2012). Si tratta di una macrorestrizione in campo pulsato.

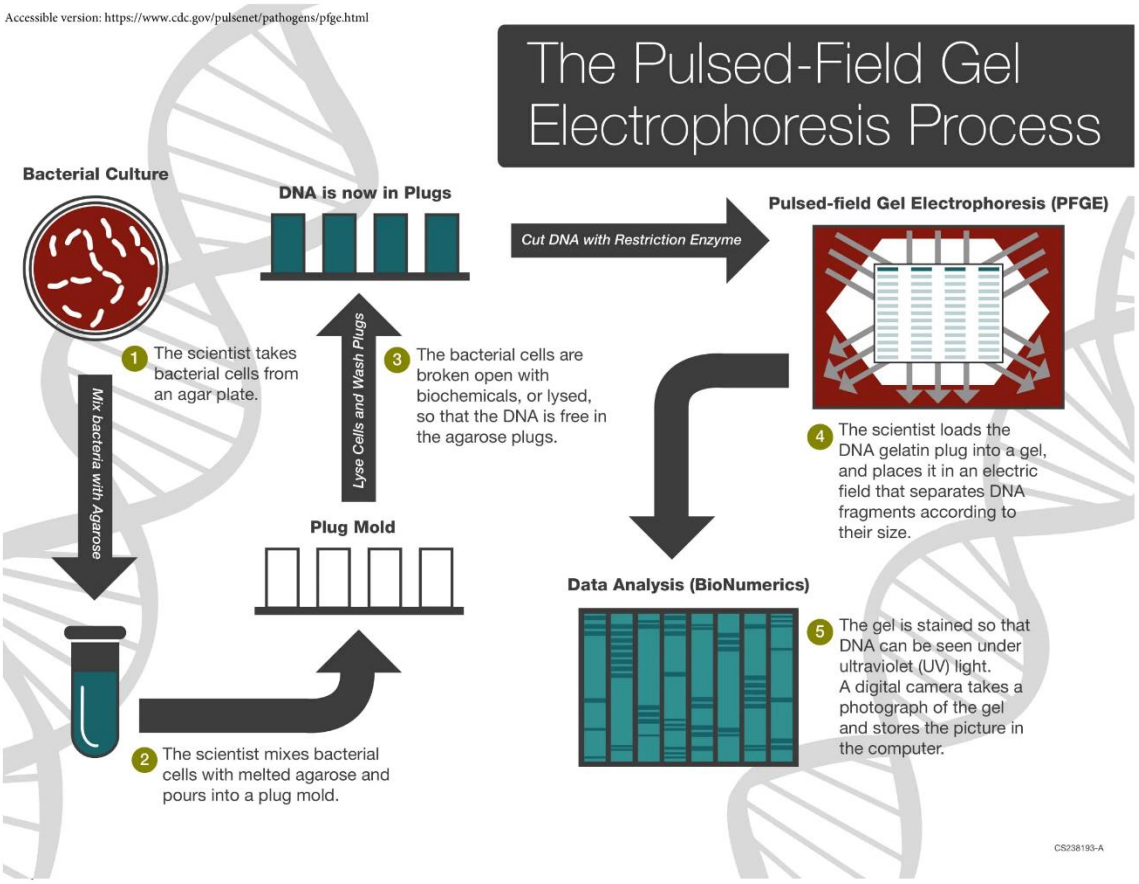
La tecnica della PFGE prevede le fasi di seguito elencate.

1. prelevare sterilmente della pasta batterica e stemperarla in provette contenenti tampone tris HCl-EDTA;
2. leggere la densità ottica delle provette allo spettrofotometro, il cui valore dovrà essere pari a 1.000, in modo da avere una adeguata quantità di DNA per poter condurre le indagini;

3. trasferire il contenuto delle provette nelle Eppendorf (© 2020 Eppendorf AG) all'interno delle quali si andrà ad aggiungere il lisozima, al fine di causare la rottura della parete cellulare;
4. inserire nelle Eppendorf dell'agarosio, che permette di formare dei blocchetti per ogni campione; l'aggiunta dell'agarosio ha lo scopo di prevenire la spontanea rottura del DNA;
5. si procede, poi, con la lisi batterica andando ad inserire i blocchetti in tubi contenenti i buffer di lisi: questa mira a liberare il DNA dalle componenti cellulari;
6. viene, quindi, rimosso il buffer dai tubi e i blocchetti sono sottoposti a diversi lavaggi in acqua e tampone;
7. si procede poi con la macrorestrizione, andando ad inserire i blocchetti in due mix di reazioni differenti, una contenente l'enzima di restrizione ApaI e l'altra AscI. Si utilizzano due mix differenti poiché ogni enzima ha bisogno di uno specifico buffer di reazione e lavora ad una determinata temperatura. Le combinazioni di profili generati dai due enzimi sono utilizzate per caratterizzare i ceppi. L'analisi può essere rafforzata attraverso l'impiego di un terzo enzima di restrizione, ovvero SmaI (Carrière et al. 1991).
8. avvenuta la restrizione si procede con la rimozione della mix di digestione e si effettuano dei lavaggi;
9. l'utilizzo di enzimi "rare-cutter" genera frammenti troppo grandi per poter essere separati mediante una comune elettroforesi, dunque si utilizza una elettroforesi in campo pulsato dove l'orientamento del campo elettrico viene periodicamente cambiato per permettere la migrazione dei frammenti;
10. avvenuta la corsa elettroforetica si procede alla colorazione del gel e alla visualizzazione delle bande mediante un transilluminatore UV; lo strumento dispone di una fotocamera che permette di acquisire l'immagine che verrà poi esaminata al computer. I frammenti generati possono essere analizzati e confrontati per mezzo dell'utilizzo di software dedicati (quali Bionumerics e gelcompare, applied maths), che permettono di riconoscere le posizioni delle bande e di calcolarne il peso molecolare, usando una matrice matematica che analizza le somiglianze dei profili.

Il Center for Disease Control (CDC) ha sviluppato un protocollo standardizzato per la PFGE consultabile al seguente sito: https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/listeria-pfge-protocol-508c.pdf.

Secondo Barrett et al., (2006) per *L. monocytogenes*, è sufficiente una sola banda di differenza tra due patterns per affermare che si è in presenza di due ceppi diversi. Bisogna, però, considerare che nel corso di un'epidemia potrebbero verificarsi degli eventi genetici casuali (mutazioni puntiformi, delezioni ed inserzioni di DNA) che potrebbero portare alla comparsa o alla perdita di siti di restrizione e, conseguentemente, determinare differenze nel numero e nelle dimensioni dei frammenti ottenuti. Pertanto, negli ultimi anni, oltre alla PFGE si eseguono delle analisi basate sulle Next Generation Sequencing (NGS)



https://microbeonline.com/pulsed-field-gel-electrophoresis-pfge/

3.3. Sequenziamento dell'intero genoma

Il sequenziamento dell'intero genoma di *L. monocytogenes* permette di evidenziare eventuali polimorfismi presenti nell'intera sequenza del DNA, non solo a livello dei siti di restrizione come nella PFGE.

La prima metodica di sequenziamento, elaborata nel 1976 da Allan Maxam e da Walter Gilbert, prevedeva la marcatura delle estremità 3' del DNA con ^{32}P, il taglio del DNA e la separazione dei due filamenti identici marcati ad un'estremità. Questa tecnica prevedeva la suddivisione della miscela in quattro parti, ciascuna delle quali viene sottoposta ad un diverso trattamento chimico per metilare o rimuovere specificamente una o due basi. In questo modo si producono frammenti marcati, che vengono fatti correre mediante un'elettroforesi in gel di poliacrilammide. Al termine della corsa è possibile determinare l'ordine dei nucleotidi e, quindi, la sequenza. Questo metodo veniva molto impiegato in passato, ora invece è poco utilizzato, poiché non è adatto al sequenziamento automatico e utilizza composti chimici dannosi alla salute.

Il 1977 segna l'avvento del metodo Sanger, definito anche "metodo a terminazione di catena". Per il sequenziamento con il metodo Sanger, si preparano in quattro provette le mix costituite da:

1. il campione di DNA che si vuole sequenziare a singolo filamento;

2. la DNA polimerasi;
3. un primer marcato con estremità 3’OH libera;
4. i quattro tipi di deossinucleotidi trifosfato normali (dNTP) marcati radioattivamente o con fluorofori;

In ogni provetta viene poi aggiunto uno specifico tipo di dideossinucleotide trifosfato (ddNTP), in una provetta ddA, in un’altra ddG, in un’altra ddC ed in un’altra ddT, Si verifica che il primer si appaia con il filamento stampo, per poi essere esteso dalla DNA polimerasi. Questa infatti aggiunge all’estremità libera del primer i nucleotidi complementari al filamento stampo, cioè i dNTP, invece di aggiungere un dNTP di tanto in tanto, può accadere che aggiunge un ddNTP.

Con l’incorporazione del ddNTP, la sintesi del filamento complementare si ferma poiché i ddNTP non permettono la formazione del legame con il successivo nucleotide trifosfato. I dNTP hanno un 3’OH nello zucchero desossiribosio che consente l’aggiunta di nucleotidi, mentre i ddNTP hanno un 3’-H che non ne consente l’aggiunta, per questo motivo la sintesi del DNA termina.

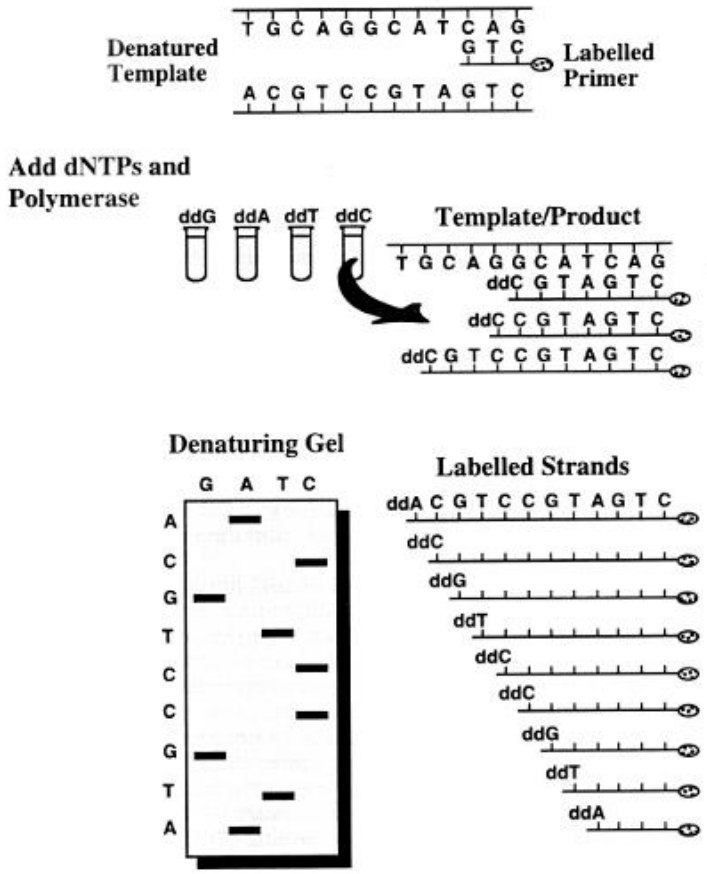
La stessa cosa accade per tutti i frammenti di ciascuna provetta, ovvero si ha la sintesi del filamento complementare fino a che non viene incorporato un ddNTP. Si ottengono in questo modo frammenti di DNA di diversa lunghezza, che differiscono da provetta a provetta per il tipo di ddNTP con il quale terminano.

I campioni marcati contenuti nelle quattro mix vengono poi denaturati al calore e caricati, in quattro pozzetti diversi, in un gel di poliacrilammide. L’elettroforesi viene realizzata a circa 70°C in presenza di urea in modo da impedire la rinaturazione del DNA. Con l’elettroforesi i frammenti migrano in base alla dimensione e al termine di questa, mediante autoradiografia, è possibile risalire alla sequenza.

Dopo anni in cui il metodo Sanger ha rappresentato il “gold standard” per il sequenziamento, le tecniche di nuova generazione (Next Generation Sequencing – NGS,) hanno preso il sopravvento. Le tecniche NGS vengono anche chiamate high-throughput sequencing (sequenziamento ad alta resa) perché, a differenza del sequenziamento tradizionale col metodo Sanger, consentono di sequenziare moltissimi frammenti in parallelo. Mediante l’utilizzo di queste nuove tecniche è possibile leggere la sequenza di interi genomi. Infatti, questi metodi consentono di sequenziare in un unico esperimento una vasta libreria costituita da migliaia o milioni di frammenti di DNA, che spesso rappresentano un intero genoma. Inoltre, a differenza delle tecniche precedenti, i dati generati dalle NGS sono digitali (Kulski, 2016)

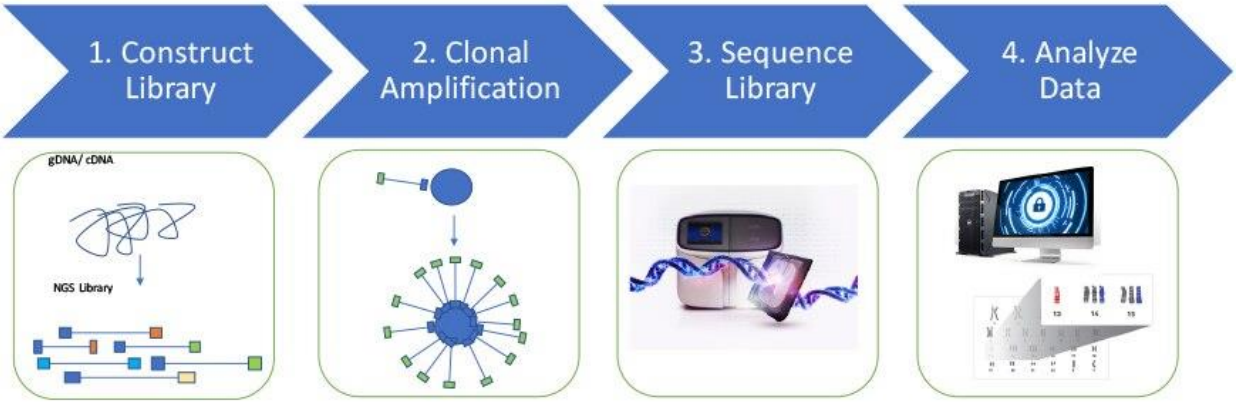
Il sequenziamento NGS consta di 4 fasi fondamentali:

1. Costruzione di una libreria: si inizia con la frammentazione del DNA o cDNA ed i frammenti di DNA risultanti vengono, quindi, legati a sequenze adattatrici specifiche, formando una libreria di frammenti.
2. Amplificazione clonale: la libreria di DNA deve essere attaccata ad una superficie solida ed amplificata clonalmente per aumentarne il segnale: in questo processo ogni molecola di DNA viene amplificata mediante PCR.
3. Sequenziamento: tutto il DNA nella libreria viene sequenziato contemporaneamente usando uno strumento di sequenziamento.
4. Analisi dei dati: ogni esperimento NGS genera grandi quantità di dati complessi costituiti da corte reads di DNA.



https://www.cliccascienze.it/biotecnologie-microbiche/metodo-di-sanger/

In parallelo allo sviluppo delle nuove tecniche di sequenziamento, per poter gestire, analizzare ed interpretare l'enorme quantità di dati provenienti dai sequenziatori NGS, si è realizzato anche un notevole sviluppo e miglioramento della bioinformatica.



https://www.thermofisher.com/it/en/home/life-science/sequencing/sequencing-education/next-generation-sequencing-basics/what-is-next-generation-sequencing.html

Negli ultimi anni si è assistito allo sviluppo di tecnologie di sequenziamento di terza generazione, le quali consentono l'eliminazione della tappa di amplificazione clonale, al fine di ridurre eventuali errori legati a questa fase.

4. SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA

La determinazione della correlazione genetica attraverso l'analisi dei cluster tra diversi ceppi batterici è importante per identificare la relazione epidemiologica tra i ceppi.

Più in dettaglio, l'analisi dei cluster è necessaria per identificare le vie di trasmissione del ceppo fonte rispetto agli altri ceppi presenti. Questo aspetto è particolarmente importante perché le relazioni genetiche identificate con metodi di sottotipizzazione molecolare possono rilevare vie di trasmissione che non vengono generalmente identificate dall' epidemiologia convenzionale. L'analisi filogenetica degli isolati batterici è importante per la rilevazione dei focolai e per il tracciamento della fonte (Liu, Handbook of L. *monocytogenes*, 2008).

Vi sono due principali approcci per effettuare l'analisi di correlazione dei ceppi: approcci fenetici e cladistici (Riley, 2004).

Gli approcci fenetici non prendono in esame il processo evolutivo generale e gli isolati vengono raggruppati in base a somiglianze globali, cui sono attribuiti valori numerici usando formule matematiche.

Gli approcci fenetici principali sono due: il metodo del gruppo di coppie non ponderato che utilizza le medie aritmetiche (UPGMA) e il metodo del Neighbor Joining (NJ). Questi ultimi convertono i dati di sequenza del DNA o i modelli di bande di gel in valori numerici di distanza genetica. Il metodo più semplice per calcolare la divergenza tra due microrganismi usa il numero di nucleotidi diversi.

Il NJ è uno dei metodi più frequentemente utilizzato per la costruzione degli alberi filogenetici (Nei, and Kumar, 2000). Il suo algoritmo è efficiente ed in breve tempo può essere valutata una grande quantità di dati.

L'altro approccio è quello cladistico in cui la somiglianza di diversi taxa è determinata da un modello o da una teoria evolutiva, anziché da valori matematici. I due approcci tipici sono Maximum Likelihood (ML) e Maximum Parsimony (MP). L'approccio della massima parsimonia (MP) costruisce un albero usando il minor numero di transizioni dello stato del carattere (cioè sostituzione di nucleotidi o cambiamenti nella resistenza agli antibiotici) per spiegare l'intero processo evolutivo. Il metodo della massima somiglianza (ML) è un altro metodo popolare usato per fare inferenze sui parametri della distribuzione di probabilità sottostante a un dato set di dati.

5. IMPATTO SULLA SALUTE UMANA

Nell'uomo la listeriosi può manifestarsi mediante due forme: invasiva e gastroenterica. "La listeriosi può essere definita clinicamente come la presenza dell'organismo nel flusso sanguigno, nel liquido cerebrospinale o in un sito del corpo normalmente sterile. Le manifestazioni cliniche predominanti della listeriosi umana sono diarrea, meningite, encefalite e setticemia. Oltre a queste manifestazioni, sono state documentate anche endocardite, pericardite e ascessi piogenici. La maggior parte delle infezioni umane coinvolge il sistema nervoso centrale mentre raramente si verifica l'encefalite,

caratterizzata da ascessi multipli nel tronco encefalico. I pazienti immunocompromessi, i neonati e le donne in gravidanza sono più sensibili alla listeriosi. Tuttavia, la malattia può anche svilupparsi in individui apparentemente sani. L. *monocytogenes* ha sviluppato una gamma esclusiva di meccanismi che gli consentono di sfruttare l'ospite: attaccare e invadere le cellule ospiti, fuggire dal vacuolo delle cellule ospiti, diffondersi da una cellula all'altra, attraversare le barriere ed eludere il sistema immunitario umorale dell'ospite." (The Handbook of Microbial Bioresources, Chapter: 12, 2016)

Attraverso la contaminazione del cibo, *L. monocytogenes* può essere trasmessa all'uomo, passando da batterio saprofita a patogeno intracellulare. Gli alimenti implicati nella listeriosi di origine alimentare sono generalmente alimenti altamente trasformati con una lunga shelf-life, che supporta la crescita del batterio. (ILSI Research Foundation, 2005).

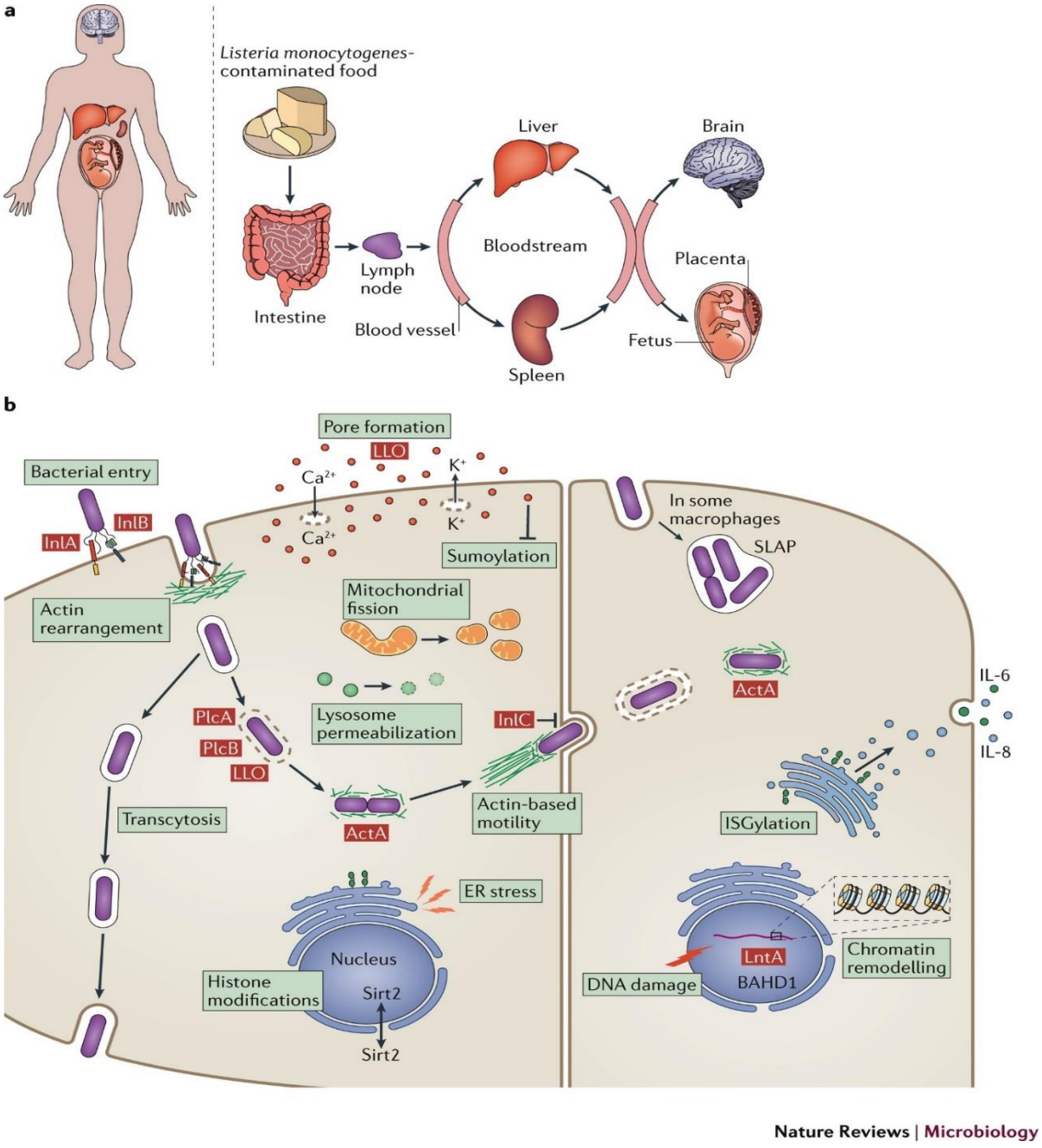
L'infezione di *L. monocytogenes* prevede i seguenti passaggi:

- entrata dei batteri nell'ospite;
- lisi fagosomiale del vacuolo;
- moltiplicazione batterica a livello del cytosol;
- diffusione da cellula a cellula attraverso la motilità mediata dai filamenti di actina.

Tali passaggi avvengono grazie all' espressione di vari fattori di virulenza. In particolare, è stato osservato che i principali geni di virulenza si trovano in un cluster di geni in due diversi loci del DNA e che questi sono influenzati dalla proteina prfA (fattore regolatorio positivo) (The Handbook of Microbial Bioresources, 2016)

È stato osservato che le donne in gravidanza sono più suscettibili all'infezione da listeria. Infatti, si è visto che il rischio di listeriosi nelle donne gravide è 17 volte superiore a quello della popolazione normale. (Khan et al., 2016) e questo è dovuto al fatto che *L. monocytogenes* ha un elevato tropismo per la placenta e, avendo la capacità di attraversarla, può causare l'aborto del feto.

La prevenzione e l'informazione delle persone a rischio sono passaggi fondamentali per diminuire l'incidenza della listeriosi. Il CDC informa sui cibi che dovrebbero essere evitati soprattutto da persone anziane, immunocompromessi e donne in gravidanza. Tra questi i formaggi molli, soprattutto se sono stati prodotti con latte non pastorizzato, i germogli crudi o leggermente cotti, il pesce affumicato a freddo, a meno che non sia in scatola o in un piatto cotto. Inoltre, rappresenta un importante rischio per la salute umana l'abuso di temperatura nelle vendite al dettaglio, nel trasporto o nella conservazione domestica e il consumo di alimenti poco cotti. (Haneklaus et al., 2011; Pérez-Rodríguez et al., 2014).



6. AMBIENTE E FONTI

L. monocytogenes è un patogeno di origine alimentare che ha la capacità di sopravvivere, crescere e, infine, persistere in diversi ambienti. In natura si ritrova come saprofita nel suolo, nell'acqua, negli effluenti, negli alimenti, nella fauna selvatica e negli animali domestici, in insilati, liquami, piante e nella vegetazione in generale. Il suolo è una nicchia ambientale molto importante per la trasmissione di questo batterio a piante e animali: infatti, gli agroecosistemi possono partecipare alla trasmissione di agenti patogeni nella catena alimentare attraverso la produzione di prodotti grezzi contaminati (Vivant et al.,2013). Inoltre, *L. monocytogenes* può essere trasmessa da saliva, feci, secrezione nasale, materiale abortito da animali infetti (Brugere-Picoux, 2008).

I cibi RTE, ovvero carne, prodotti lattiero- caseari e di origine ittica che vengono consumati senza un preventivo trattamento termico rappresentano la principale fonte di contagio (Even Heir, 2019). È stato osservato che, tra tutti i cibi RTE, quello più a rischio sembra essere il salmone affumicato in quanto è sempre più comune il trattamento di affumicatura a freddo. Un sondaggio a livello europeo del 2010/ 2011 ha, infatti, rivelato che il 17,4% di 599 campioni di pesce affumicato a freddo è risultato contaminato da *L. monocytogenes* al momento del campionamento (EFSA, 2013).

Un'altra fonte di contaminazione si rinviene negli stabilimenti di trasformazione alimentare dove *L. monocytogenes* può trovare tutti i nutrienti per sopravvivere e crescere. In questi luoghi, i batteri aderiscono alle superfici di banchi, macchinari e pavimenti desinati alla lavorazione degli alimenti e successivamente si trasformano in matrice di biofilm acquisendo maggiore resistenza alle condizioni avverse (Blackmann et al., 1996).

6.1. Crescita e fattori di virulenza

La crescita di *L. monocytogenes* negli alimenti è influenzata da vari fattori, quali temperatura, pH, attività dell'acqua (a_W), sale e presenza di conservanti. E, come riportato da Lado e Yousef, 2007, *L. monocytogenes* cresce in un ampio intervallo di temperatura, che va da -1,5 e 45 °C, e mostra un optimum di crescita tra i 30-37 ° C. Di conseguenza, gli alimenti RTE che hanno una lunga shelf-life a temperature di refrigerazione sono a rischio. Temperature superiori a 50 ° C risultano letali, mentre il congelamento può anche portare a una riduzione del numero di *L. monocytogenes.*

Rosso e al. (1996) hanno dimostrato un marcato aumento di *L. monocytogenes* in prodotti lattiero-caseari, carne macinata e salmone affumicato conservati a 4 ° C rispetto alla conservazione a 8 °C. Questo studio, insieme ad altri (Pelroy et al., 1994; Francis e O'Beirne, 2001), sottolinea l'importanza di mantenere una temperatura di conservazione del prodotto corretta, anche se la cinetica di crescita di l. monocytogenes è influenzata anche dalla microflora contaminante l'alimento.

Per quanto riguarda il pH, *L. monocytogenes* è in grado di crescere in un ampio range che va da 4,0 e 9,6 (Lado e Yousef 2007). L'a_W ottimale è di 0.97, anche se è stato dimostrato da Johnson et al. (1988) che L. *monocytogenes* può sopravvivere per lunghi periodi di tempo con un valore di aW pari a 0,81.

Si è osservato, inoltre, che *L. monocytogenes* mostra una buona tolleranza al sale. Infatti, Farber et al. (1992) hanno dimostrato che riesce a crescere anche con percentuali di NaCl pari al 13-14% anche se Lado e Yousef (2007) hanno poi visto che la sopravvivenza di *Listeria* in presenza di concentrazioni saline risulta essere influenzata dalla temperatura e, più nello specifico, questi studi hanno indicato che nelle soluzioni saline concentrate il tasso di sopravvivenza di L. *monocytogenes* è maggiore quando la temperatura è più bassa.

La sopravvivenza e la crescita di *L. monocytogenes* in condizioni non ottimali è favorita dalla presenza di una Isola di Sopravvivenza allo Stress (SSI-1) costituita da 5 geni (lmo0444 - lmo0448). (Ryan et al., 2010).

Per quanto riguarda l'effetto dei conservanti sulla crescita di *L. monocytogenes*, risulta che è influenzata dalla combinazione di temperatura, pH, contenuto di sale e attività dell'acqua. Ad esempio, sorbati e parabeni sono più efficaci nel prevenire la crescita di *L. monocytogenes* a temperature di conservazione e pH più bassi. (Lado e Yousef 2007). Infine, con specifico rifermento

all’atmosfera, si è visto che *Listeria* può crescere sia in presenza che in assenza di ossigeno, essendo un batterio anaerobio facoltativo (EURL, 2014). A tal proposito, Andersen et al (2007) hanno dimostrato che facendo crescere le listerie in vitro, in ambiente con ossigeno è limitato, queste mostrano un incremento del potenziale infettivo, risultando più invasive rispetto alle listerie coltivate senza restrizione di ossigeno.

I principali fattori di virulenza che governano il meccanismo infettivo di *L. monocytogenes* sono: inlA, inlB, Hly, PI-PLC, PC-PLC, actA, Mpl, Prfa, proteina p60, clpP. Prfa è il regolatore trascrizionale dei geni di virulenza di *L. monocytogenes.*

In vari studi è stato dimostrato che i codoni di stop prematuri (PMSC) nei geni chiave di virulenza, come inlA e prfA, nonché la produzione di proteine troncate di InlA e PrfA, presentano una virulenza attenuata (Nightingale et al., 2005; Van Stelten et al., 2011; Cruz et al., 2014; Kanki et al., 2015).

La sopravvivenza di *L. monocytogenes* dipende dalla fuoriuscita dal vacuolo. La listeriolisina O (LLO), una tossina batterica poroformante, è essenziale per lisare la membrana vacuolare, permettendo a *L. monocytogenes* di fuggire nel citoplasma della cellula. Infatti, mutanti di *L. monocytogenes* che non la producono riescono a sopravvivere all'interno di vacuoli di fagociti non professionisti per poco tempo, ma non riescono a moltiplicarsi e, di conseguenza, continuare a infettare altre cellule perché non hanno la capacità di evadere dai vacuoli (Ellin Doyle, 2001).

L’Internalina A è un fattore che permette l’ingresso di *L. monocytogenes* all’interno di cellule non fagocitiche come le cellule epiteliali (Gaillard et al., 1991). Inoltre, Gaillard et al hanno dimostrato che, introducendo il gene InlA in una specie di listeria non invasiva, *L. innocua*, essa acquisiva la capacità di entrare nelle cellule. L’inlA, presente sulla superficie della listeria, si lega ad una proteina di superficie presente sulle cellule epiteliali, ovvero l’E-caderina e l’interazione tra queste due proteine promuove l’internalizzazione di *L. monocytogenes* (Kuhn e Goebel, 1999).

PI-PLC promuove l’evasione dal primo vacuolo, mentre PC-PLC è attivo durante la diffusione dei batteri da una cellula all’altra (Smith et al., 1995).

La ClpC ATPase è una proteina che aiuta la distruzione della membrana vacuolare e la sopravvivenza intracellulare ed in *L. monocytogenes* viene prodotta quando il batterio si trova in condizioni di stress ed è stato dimostrato che le listerie mutanti per questa proteina, diventano estremamente suscettibili alle condizioni di stress riprodotte in vitro (Rouquette et al., 1998) Quindi, ClpP svolge un ruolo importante nella risposta adattativa rapida ai cambiamenti ambientali (Gaillot et al., 2000)

La proteina actA interagisce con l’actina determinandone la polimerizzazione promuovendo quindi l’invasione delle cellule adiacenti e, come riportato da Travier e Lecuit (2014), la proteina actA media l'aggregazione di *Lm* e la formazione di biofilm sia in vitro che in vivo e la colonizzazione a lungo termine del lume intestinale.

Per quanto riguarda la virulenza, il genere Listeria presenta anche delle isole di patogenicità, le cosiddette LIPI (1-4). Nello specifico, LIPI-1, chiamata anche cluster genico di virulenza dipendente da Prfa, comprende 6 geni (prfA, plcA, hly, mpl, actA, plcB) i cui prodotti sono richiesti per la vita intracellulare del batterio. Questa LIPI-1 è presente sia in *L. monocytogenes* che in *L. ivanovii* ed essendo una isola di patogenicità antica (PAI) ha perso la sua mobilità. (Vazquez-Boland JA, et al., 2001). LIPI-2 invece, è specificamente presente in *L. ivanovii* ed è composta da internaline che sono sotto il controllo di Prfa e dal gene smcL codificante per una sfingomielinasi. (DomÃ-nguez-Bernal G. et al., 2006). LIPI-3 è un cluster genico confinato agli isolati di *L. monocytogenes* appartenenti al

Lineage I (Clayton EM, et al., 2014) che codifica per la Listeriolisina S (LLS), un fattore di virulenza espresso da *L. monocytogenes* nel tratto gastrointestinale durante le infezioni in vivo (R. de Melo Tavares et al., 2020). Infine, le listerie potrebbero presentare la LIPI-4, la quale è un cluster di 6 geni coinvolto nell'infezione neuronale e placentare come riportato da Maury et al. (2016).

In *L. monocytoenes* la biosintesi dei flagelli è dipendente dalla temperatura. Infatti, alla temperatura fisiologica dell'ospite mammifero (circa 37 °C), molti ceppi non producono i flagelli e, di conseguenza sono immobili (Peel et al.,1988). Questa repressione dell'espressione dei flagelli è dovuta all'azione di MogR, un repressore trascrizionale richiesto per la virulenza (Grundling et al., 2004).

6.2. Resistenza e persistenza

L. monocytogenes riesce a sopravvivere negli impianti di trasformazione alimentare per lunghi periodi grazie alla sua abilità di resistere a svariati stress (Moorhead and Dykes, 2004; Zhang et al., 2011) ed anche grazie alla sua capacità di formare biofilm. *L. monocytogenes* riesce a sopravvivere anche in caso di adeguate procedure di disinfezione (Malley et al.,2015). Infatti, gli strati multipli di cellule e la matrice extracellulare costituiscono una complessa e compatta struttura all'interno della quale gli agenti antimicrobici non riescono a penetrare e a raggiungere gli strati interni, ostacolandone così l'efficacia (Bridier et al., 2011).

Vi sono dei meccanismi che promuovono la sopravvivenza di questo batterio a livello delle industrie alimentari, quali la produzione di biofilm, l'acquisizione di resistenza antimicrobica e una maggiore resistenza alle condizioni di stress.

Il biofilm contiene al suo interno delle cellule chiamate persistenti, le quali mostrano tolleranza agli agenti battericidi (Lewis, 2005). Ma il grande problema del biofilm è che questo può sfaldarsi da un momento all'altro e causare il distacco delle cellule batteriche planctoniche le quali vanno a contaminare le superfici di lavoro e gli alimenti (Reis-Teixeira et al., 2017).

Come riportato da Carpentier (2011), la parola resistenza viene utilizzata per descrivere la situazione in cui l'entità dell'uccisione determinata da un disinfettante applicato a una concentrazione battericida è inferiore a quanto previsto. Mentre il termine "tolleranza", come suggerito da Lear et al., 2002, AFSSA, 2007; SCENIHR, 2009 e Cerf et al. (2010), è utilizzato per descrivere l'adattamento, ovvero la situazione in cui un ceppo batterico è in grado di crescere in presenza di concentrazioni sub-letali crescenti di un disinfettante.

I ceppi persistenti (anche chiamati permanenti, residenti, ricorrenti) e quelli sporadici (definiti anche transitori, non persistenti o presunti non persistenti), vengono distinti utilizzando metodi di tipizzazione molecolare. Se i ceppi che vengono isolati più volte in diverse visite nello stesso impianto di lavorazione presentano le stesse caratteristiche molecolari, si presume che siano clonali (Carpentier, 2011)

Inoltre, è importante considerare il ruolo delle nicchie o dei siti di rifugio o dei luoghi difficili da raggiungere. Infatti, questi luoghi vengono raggiunti in maniera naturale dalle cellule stesse oppure vengono spinte lì attraverso l'azione meccanica praticata durante le operazioni di pulizia ed è proprio in questi luoghi che i batteri si nascondono e persistono (Carpentier, 2011).

6.3. Biofilm

“La formazione di biofilm costituisce uno stile di vita alternativo in cui i microrganismi adottano un comportamento multicellulare che facilita e/o prolunga la sopravvivenza in diverse nicchie ambientali” (Maria Kostakioti et al.,2013).

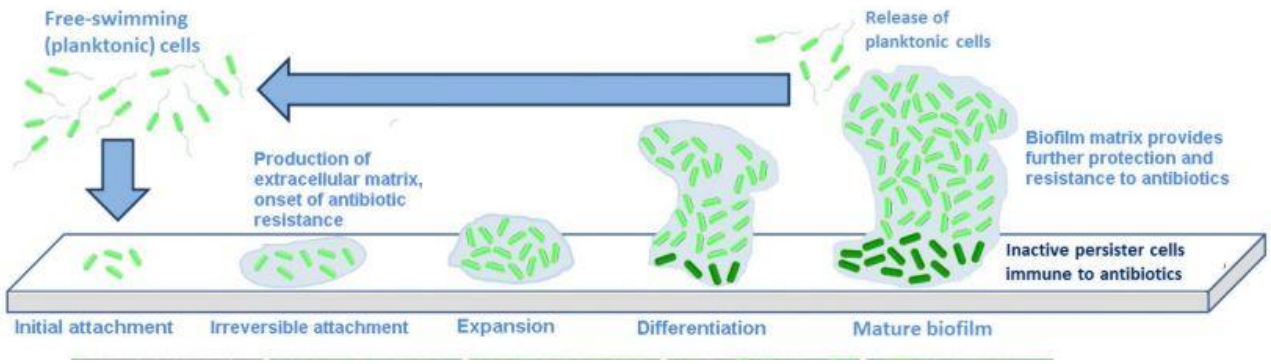
Listeria ha la capacità di sopravvivere e persistere in condizioni ed ambienti avversi grazie alla sua capacità di aderire a diverse superfici mediante la formazione di biofilm, il quale è una comunità sessile di cellule batteriche racchiuse e tenute insieme da una matrice extracellulare, da loro prodotta, la quale include proteine, polisaccaridi e DNA extracellulare (Lee et al., 2017). Secondo recenti studi la composizione della matrice extracellulare del biofilm di L. *monocytogenes* è dominata dagli acidi teicoici (Brauge et al., 2016; Colagiorgi et al., 2016) I biofilm sono spesso costituiti da più specie e le interazioni con altri batteri possono favorire la formazione di biofilm da parte di *L. monocytogenes* (Giaouris et al., 2015). Inoltre, i biofilm misti mostrano una maggiore resistenza ai disinfettanti come i composti di ammonio quaternario e altri biocidi (Meyer, 2015)

Lemon et al. (2007) hanno dimostrato che la motilità flagellare è fondamentale sia per l'adesione superficiale iniziale che per la successiva formazione del biofilm. I geni che codificano per questo sono fliQ, flaA, fli1, motA, così come il gene regolatore phoR (dall'operone di rilevamento del fosfato) e i geni coinvolti nell'incorporazione della D-alanina nell'acido lipoteicoico (Alonso et al., 2014).

Il processo di formazione del biofilm è caratterizzato da 5 passaggi:

I. le cellule si attaccano alle superfici in modo reversibile. In questa fase i batteri usano flagelli, fimbrie e proteine della membrana esterna per rilevare ed attaccarsi alle superfici (Bullitt e Makowski,1995; Renner e Weibel, 2011);
II. successivamente passano all’adesione irreversibile alle superfici ed alla secrezione di una sostanza extracellulare polimerica (EPS), che media l’adesione alle superfici e forma una rete polimerica tridimensionale coesa che interconnette e immobilizza temporaneamente le cellule del biofilm (Flemming and Wingender, 2010);
III. le cellule adese sulle superfici crescono ed iniziano a replicarsi;
IV. la comunità si trasforma in una struttura tridimensionale e, di conseguenza in un biofilm maturo;
V. infine, alcune cellule si staccano dal biofilm e si disperdono; dopodiché possono aderire ad altre superfici e formare biofilm in nuove nicchie.

Il Quorum Sensing (QS) svolge un ruolo importante nello sviluppo dei biofilm (Li et al., 2012). Il QS è un processo di comunicazione cellula-cellula batterica che coinvolge la produzione, il rilevamento e la risposta a molecole di segnalazione extracellulari chiamate autoinduttori (IA) (Rutherford e Bassler, 2012) Attraverso il QS i batteri si comportano come un organismo multicellulare. L’inibizione del QS, ovvero il Quorum Quenching (QQ) può essere una strategia per eliminare i biofilm.



Come riportato da Zhao et al. (2017), vi sono vari metodi per eliminare i biofilm:

- Trattamenti fisici → shock termico, stress da taglio e ultrasuoni, ma è stato dimostrato che tali trattamenti a volte non sono sufficienti nell' eradicare i biofilm e quindi è consigliato usare una combinazione di trattamenti fisici e di sostanze chimiche anti-biofilm. I trattamenti fisici sono però raccomandati per evitare l'iniziale attaccamento e formazione del biofilm.
- Trattamenti chimici → utilizzo di enzimi come proteasi e nucleasi i quali attaccano l'EPS in combinazione con agenti battericidi
- Trattamenti biologici → attraverso l'utilizzo di batteriofagi i quali sono in grado di attaccare direttamente i batteri all'interno dei biofilm, senza la necessità di dover dissolvere l'EPS

7. SCOPO

Le recenti innovazioni tecnologiche dei metodi di laboratorio permettono oggi di ottenere a costi relativamente bassi il genoma completo dei batteri, l'utilizzo delle tecnologie genomiche ha rivoluzionato nell'ultimo decennio la sorveglianza epidemiologica della malattie infettive, incluse quelle trasmissibili dagli alimenti all'uomo.

Le tecnologie omiche permettono di confrontare il genoma ottenuto da batteri con una accuratezza che era impensabile qualche anno fa e permettono di migliorare le tecnologie diagnostiche, permettendo di ottenere risultati robusti e facilmente scambiabili tra i laboratori. I concetti di "One health" bene si confanno a questo nuovo approccio genomico e permettono di mettere in atto sistemi di sorveglianza efficienti, efficaci e relativamente economici, coinvolgendo la medicina umana e quella non umana.

Il principale obiettivo di questa tesi è stato quello di verificare in maniera retrospettiva la similitudine genomica di ceppi di *L. monocytogenes* isolati nella regione Marche dal 2013 al 2019. Lo studio è di tipo retrospettivo, a posteriori, e dovrebbe fornire tutti gli elementi per migliorare i sistemi di sorveglianza della listeriosi umana, al fine di individuare in tempo reale, una volta a regime, la presenza di eventuali correlazioni tra ceppi di *L. monocytogenes* isolati in pazienti clinici e negli alimenti o negli ambienti di produzione. I ceppi utilizzati nello studio sono stati isolati nel corso delle attività di sorveglianza effettuate dall'Autorità Sanitaria Competente del settore della prevenzione (alimenti destinati al consumo umano e ambienti di produzione alimentare) e ceppi isolati da casi clinici registrati nel medesimo territorio regionale. In parallelo sugli stessi ceppi sono stati effettuati

studi per la ricerca di geni di virulenza, inclusi i geni che permettono di sopravvivere e resistere negli ambienti di produzione e/o trasformazione alimentare. Nei genomi sono stati ricercati anche i geni di antibiotico resistenza. Tutto lo studio è stato effettuato mediante analisi in silico dei dati ottenuti mediante sequenziamento dell'intero genoma batterico (WGS).

8. MATERIALI E METODI

8.1. Collezione degli isolati

Un totale di 201 ceppi di *L. monocytogenes*, provenienti dalla regione Marche sono stati inclusi in questo studio. Di cui 59 provenienti da pazienti affetti da listeriosi, 76 da diverse fonti alimentari e 66 da ambienti di produzione alimentare. I ceppi sono stati raccolti dal 2013 al 2019. In questo studio non sono stati presi in esame tutti i ceppi ceppi appartenenti al CC7, causa del focolaio di listeriosi registrato nel 2015-2016 nelle Marche.

Gli isolati sono stati collezionati nella sezione di Fermo dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM) e sequenziati presso la sede centrale di Teramo dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale d'Abruzzo e Molise "G. Caporale" (IZSAM) che è il laboratorio nazionale di riferimento per *L. monocytogenes* per il settore veterinario (LNR Lm).

8.2. Analisi di laboratorio

Le analisi di laboratorio sono state condotte nelle varie sedi dell'IZSUM, i ceppi isolati sono stati inviati alla Sezione di fermo dell'IZSUM e da questi inviati al LNR Lm.

8.2.1. Metodo analitico di ricerca del microrganismo

I campioni sono stati testati con il metodo "Detection of *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-1-2017). Questo metodo (standard) è applicabile per l'analisi di prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali, nonché campioni ambientali provenienti da aree di produzione e manipolazione degli alimenti. (https://www.iso.org/).

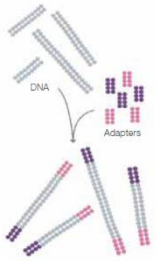
8.3. NGS

L'intero genoma batterico è stato sequenziato (Whole-Genome Sequencing-WGS) mediante la tecnologia Solexa-Illumina, utilizzando il Nextera® DNA Library Preparation kit (per la preparazione delle librerie e il NextSeq® 500 Illumina® come sistema di sequenziamento.

Il flusso di lavoro Illumina prevede 4 fasi:

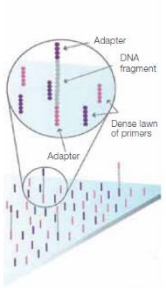
1. Preparazione delle librerie
2. Generazione dei cluster
3. Sequenziamento
4. Analisi dei dati

Figure 2: Prepare Genomic DNA Sample



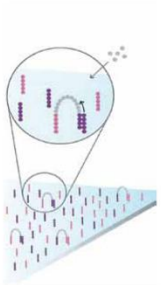
Randomly fragment genomic DNA and ligate adapters to both ends of the fragments.

Figure 3: Attach DNA to Surface



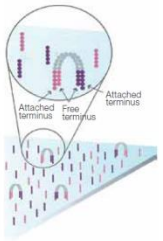
Bind single-stranded fragments randomly to the inside surface of the flow cell channels.

Figure 4: Bridge Amplification



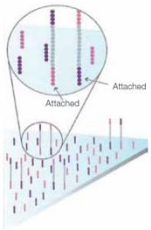
Add unlabeled nucleotides and enzyme to initiate solid-phase bridge amplification.

Figure 5: Fragments Become Double Stranded



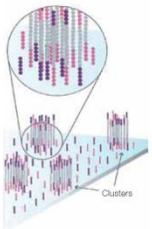
The enzyme incorporates nucleotides to build double-stranded bridges on the solid-phase substrate.

Figure 6: Denature the Double-Standed Molecules



Denaturation leaves single-stranded templates anchored to the substrate.

Figure 7: Complete Amplification

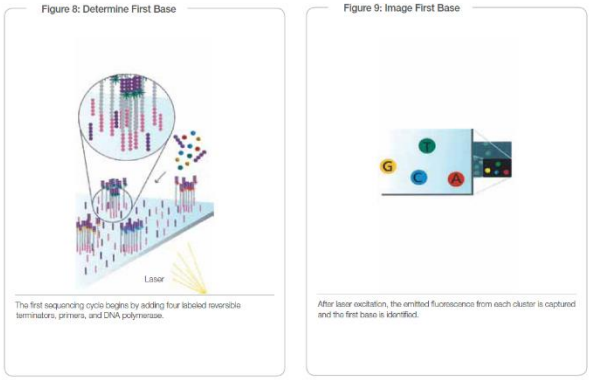


Several million dense clusters of double-stranded DNA are generated in each channel of the flow cell.

La procedura di preparazione delle librerie viene solitamente divisa nelle seguenti fasi:

- Quantificazione dell'input genomico
- Frammentazione e aggiunta di adattatori, mediante una ligasi, ad entrambe le estremità.
- Quantificazione finale delle librerie

La generazione dei cluster avviene sulla cella a flusso la quale è un vetrino dotato di corsie nelle quali avviene la chimica di sequenziamento. La superficie della cella a flusso è ricoperta di oligonucleotidi ed una volta dotati degli adattatori su entrambe le estremità, i frammenti vengono denaturati in molecole di DNA a singola elica e fissati sulla cella a flusso grazie alla complementarietà tra gli



oligonucleotidi fissati e gli adattatori legati ai frammenti. La generazione dei cluster è il processo in base al quale ciascun frammento in una libreria viene clonato in migliaia di copie identiche. È sempre bene eseguire la quantificazione delle librerie prima del sequenziamento per poter ottenere la densità dei cluster ottimale.

La tecnologia di sequenziamento illumina è nota come sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS). Il controllo di qualità è stato effettuato mediante FastQC e il trimming è stato condotto mediante Trimmomatic (Bolger et al., 2014). L'assemblaggio è stato effettuato mediante Spades 3.11 (Nurk et al., 2013). Inoltre, il controllo di qualità delle reads, il trimming e l'assemblaggio deNovo delle sequenze genomiche sono stati sono stati effettuati anche sulla piattaforma "Genpat"

8.3.1. Multi Locus Sequence Typing

I dati provenienti dal sequenziamento dell'intero genoma sono stati poi caricati sul sito dell'Istituto Pasteur (https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/) per effettuare l'analisi Multi Locus Sequence Typing (MLST) mediante la ricerca di 7 geni housekeeping specifici di L. *monocytogenes (*abcZ, bglA, cat, dapE,Idh, IhkA*)* al fine di determinare per ogni isolato un Sequence Type (ST) e l'appartenenza ad uno specifico Clonal Complex (CC).

8.3.2. cgMLST e SNP

Come riportato da Møller Nielsen et al. (2016), le sequenze sono state caricate sul sito dell'Istituto Pasteur, dove per ogni ceppo è stato estratto il cgMLST (core genome Multilocus Sequence Type). Il cgMLST è un approccio gene per gene simile al metodo MLST ma, invece di essere basato su 7 loci, il cgMLST è basato su 1748 i quali rappresentano il core genome della specie (Moura et al.,2016). In

seguito, sono stati ottenuti dei Minimum Spanning Tree utilizzando il tool gratuito Grape Tree (https://github.com/achtman-lab/GrapeTree). Per i maggiori Clonal Complex è stato successivamente confrontato il clustering ottenuto con il cgMLST con un cut-off allelico di 30 e il clustering ottenuto con l'analisi degli SNPs.

L'analisi degli SNPs è stata effettuata per verificare se i ceppi isolati negli alimenti e negli ambienti di produzione alimentare fossero circolanti anche nei casi umani, l'analisi permette di comparare i ceppi clinici con quelli ambientali e da fonti alimentari appartenenti allo stesso CC, come eseguito da Nielsen et al. (2016). L'analisi degli SNPs è stata condotta mediante l'utilizzo del tool gratuito CSIPhylogeny https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/ dove sono stati caricati i genomi assemblati e l'analisi è stata eseguita utilizzando un genoma di riferimento per ogni CC (Tab.1), come riportato da Møller Nielsen et al. (2016). Sono stati utilizzati i parametri di default ed è stato creato un Maximum Likelihood Tree utilizzando FastTree. Il risultante file Newick è stato visualizzato utilizzando Figtree v1.4.2, come raccomandato dal sito.

Sequenze utilizzate come reference	
CC	**GenBank Accession**
CC1	CP007461
CC2	CP007459.1
CC8	CP007020.1
CC155	CP007009.1

Tabella 1. Sequenze utilizzate come reference

8.3.3. Multi- Virulence-Locus-Sequence- Typing

Al fine di assegnare a ciascun ceppo uno specifico Virulence-Type è stata condotta, in silico, l'analisi Multi- Virulence-Locus-Sequence- Typing (MVLST), seguendo il metodo sviluppato da Zhang et al., (2004), visionabile al sequente link: https://sites.google.com/site/mvlstdatabase/assignement-of-virulence-types-vts. Il protocollo mira all'assegnazione del VT sulla base di 6 geni di virulenza (prfA, inlB, inlC, dal, clpP, and lisR) i quali sono stati estratti dal sito Pasteur.fr. Una volta ottenute le sequenze alleliche per ciascuno dei 6 geni, queste sono state allineate e trimmate alla lunghezza corretta, utilizzando il programma MEGA facendo riferimento alle sequenze dei sei loci di una tipica *L. monocytogenes* presenti sul suddetto protocollo. Successivamente sono state concatenate manualmente in uno specifico ordine (*clpP, dal, inlB, inlC, lisR*, and *prfA*). Infine, una volta che tutte le sequenze alleliche (di ciascun ceppo) sono state concatenate in un file FASTA, sono state confrontate con i VT precedentemente assegnati costruendo un diagramma a cluster usando il metodo N-J mediante il software MEGA.

8.3.4. Virulenza

Per quanto riguarda la virulenza è stata valutata la presenza delle isole di patogenicità LIPI-1, LIPI-2, LIPI-3 e LIPI-4, dei geni vip, aut, lapB e inlF. Il gene vip interagisce con il recettore Gp96 localizzato sulla superficie delle cellule ospiti durante l'invasione e tale interazione è fondamentale per un'infezione di successo in vivo. (Martins, et al., 2012). Il gene aut è espresso indipendentemente da Prfa e codifica per una proteina di superficie (Auto) la quale è richiesta per l'entrata di *L. monocytogenes* nelle cellule non fagocitiche. (Cabanes, et al., 2004). Il gene lapB, come riportato da Reis O, et al., (2010) è necessario per l'adesione e l'ingresso nelle linee cellulari epiteliali dei mammiferi e per la virulenza nei topi infettati per via endovenosa o orale. Infine, il gene inlF è una proteina di superficie la quale, come riportato da Ghosh et al., (2018), lega la vimentina per mediare l'invasione delle cellule ospiti ed è necessaria per un'ottima colonizzazione del cervello nel topo. L'analisi è stata effettuata sul sito dell'Istituto Pasteur https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/.

8.3.5. Geni di resistenza e persistenza

È stata condotta un'analisi in silico al fine di valutare la presenza di geni che codificano per la resistenza agli antibiotici e ai detergenti ed anche per valutare la presenza delle SSI-1 e SSI-2 le quali conferiscono resistenza in presenza di condizioni ambientali sfavorevoli. Inoltre, lo studio ha preso in esame il gene inlL in quanto è stato dimostrato che InlL è coinvolto nell'adesione batterica iniziale e nello sviluppo sessile in *L. monocytogenes*. InlL è quindi, un nuovo determinante molecolare che contribuisce alla capacità di colonizzazione e formazione di biofilm. (Popowska et al., 2017). L'analisi è stata effettuata sul sito dell'Istituto Pasteur https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/.

9. RISULTATI

Nell'esposizione dei risultati sarà data prima di tutto evidenza all'analisi dei cluster ottenuti mediante l'analisi per singolo clonal complex dei ceppi di provenienza umana e quelli di provenienza alimentare e ambientale. Successivamente verranno esaminate le caratteristiche di virulenza e resistenza rilevate nelle singole sequenze dell'intero genoma ottenuto dai ceppi stessi. La differenza in numero di SNPs è stata rilevata mediante l'elaborazione della matrice di SNPs.

9.1. Clonal complexes

I risultati ottenuti nel corso delle analisi genomiche sono stati descritti aggregando i ceppi in funzione del clonal complex, successivamente sono stati esaminati i clusters all'interno di un singolo clonal complex che presentano una distanza allelica inferiore o uguale a 30 alleli nell'esame di cgMLST. Successivamente i medesimi dati sono stati confrontati con i risultati ottenuti mediante le analisi di SNPs. Le distanze di SNPs che sono generalmente considerate per ritenere correlati i batteri sono di elevata correlazione se la distanza di SNPs è inferiore a 10, moderata fino a 30, successivamente la correlazione è discutibile e deve essere verificata mediante indagine epidemiologica.

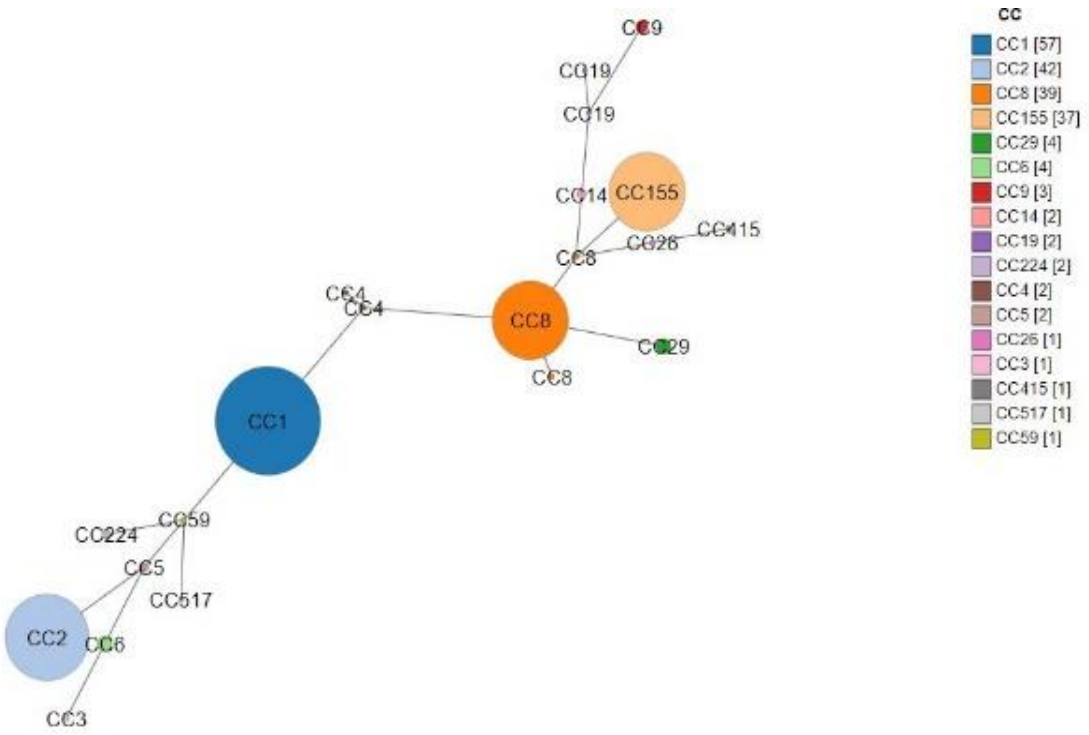


Figura 1. Minimum Spanning Tree raffigurante i vari CC

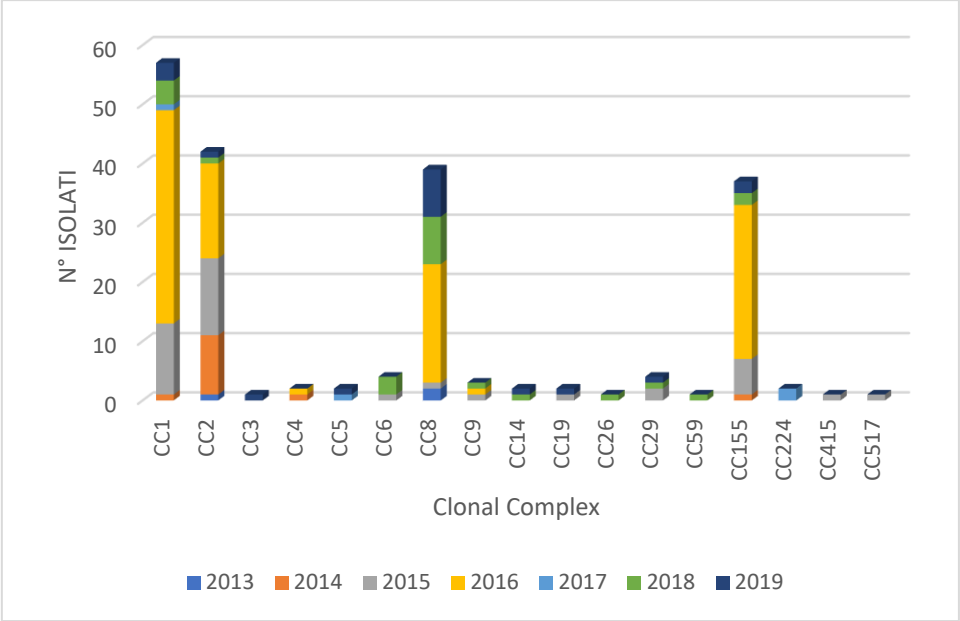


Figura 2. Distribuzione CC negli anni

Nelle figure 1. e 2. sono stati riassunti i diversi clonal complex nei quali sono stati raggruppati i ceppi. È stato riscontrato che i 201 ceppi che sono stati isolati nella regione Marche dal 2013 al 2019 si dividono in 17 CC di cui i maggiori sono il CC1, CC2, CC8 e CC155 e possiamo vedere che la maggior parte dei ceppi è stata isolata nel corso del 2016.

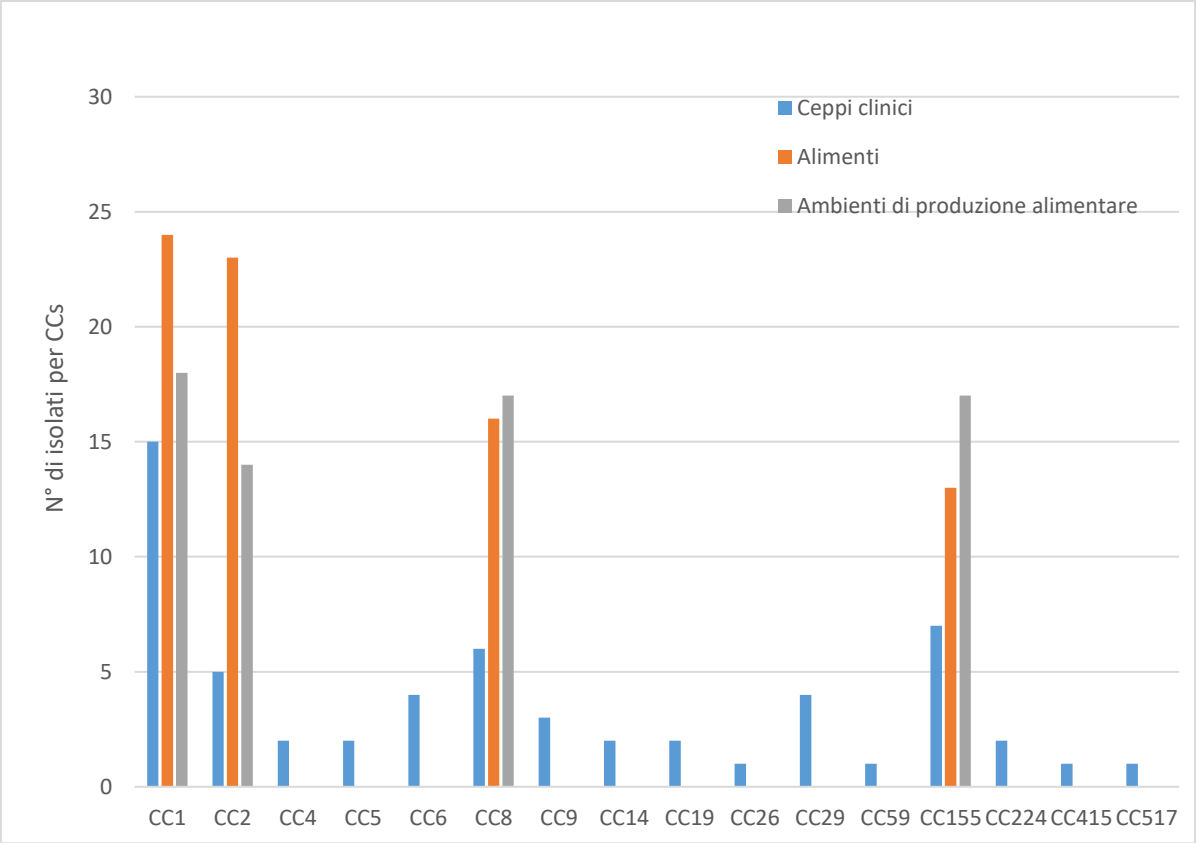


Figura 3. Distribuzione delle fonti nei vari CC

Nella figura 3. Possiamo osservare la distribuzione delle fonti nei 17 Clonal Complex dove nei CC1 e CC2 prevalgono i ceppi isolati da matrici alimentari mentre nel CC8 e CC155 prevalgono quelli isolati da tamponi effettuati in ambienti di produzione alimentare. Inoltre, i restanti CC comprendono solo ceppi isolati da casi clinici di listeriosi.

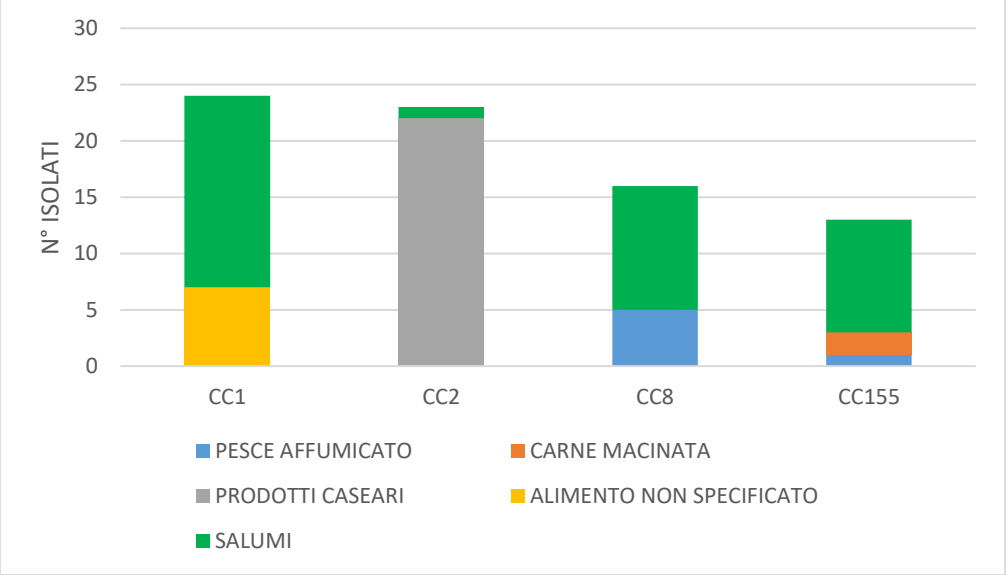


Figura 4. Distribuzione delle fonti alimentari nei vari CC

La figura 4. mostra le fonti alimentari da cui sono stati isolati i ceppi appartenenti ai maggiori CC. Si può notare come le maggiori siano rappresentate da salumi e prodotti caseari

CC	Lineage	Food	Food-chain processing	Clinical cases	Tot.
CC1	I	24	18	15	57
CC2	I	23	14	5	42
CC3	I	0	0	1	1
CC4	I	0	0	2	2
CC5	I	0	0	2	2
CC6	I	0	0	4	4
CC8	II	16	17	6	39
CC9	II	0	0	3	3
CC14	II	0	0	2	2
CC19	II	0	0	2	2
CC26	II	0	0	1	1
CC29	II	0	0	4	4
CC59	I	0	0	1	1
CC155	II	13	17	7	37
CC224	I	0	0	2	2
CC415	II	0	0	1	1
CC517	I	0	0	1	1
Tot.	Lineage I = 9 Lineage II =8	76	66	59	201

Tabella 2. Lista dei CC correlata con il contesto di isolamento

9.2. Analisi dei maggiori Clonal Complexes

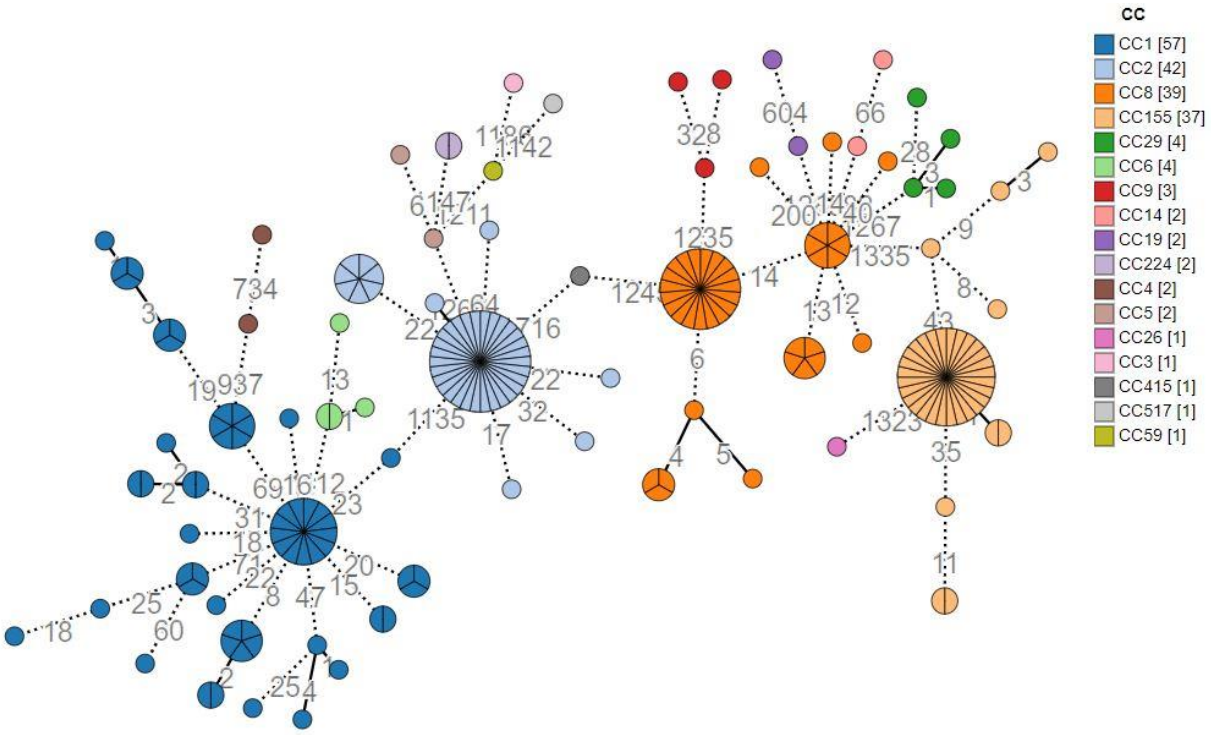


Figura 5. Minimum Spanning Tree del cgMLST dei ceppi appartenenti ai CC

9.2.1.CC1

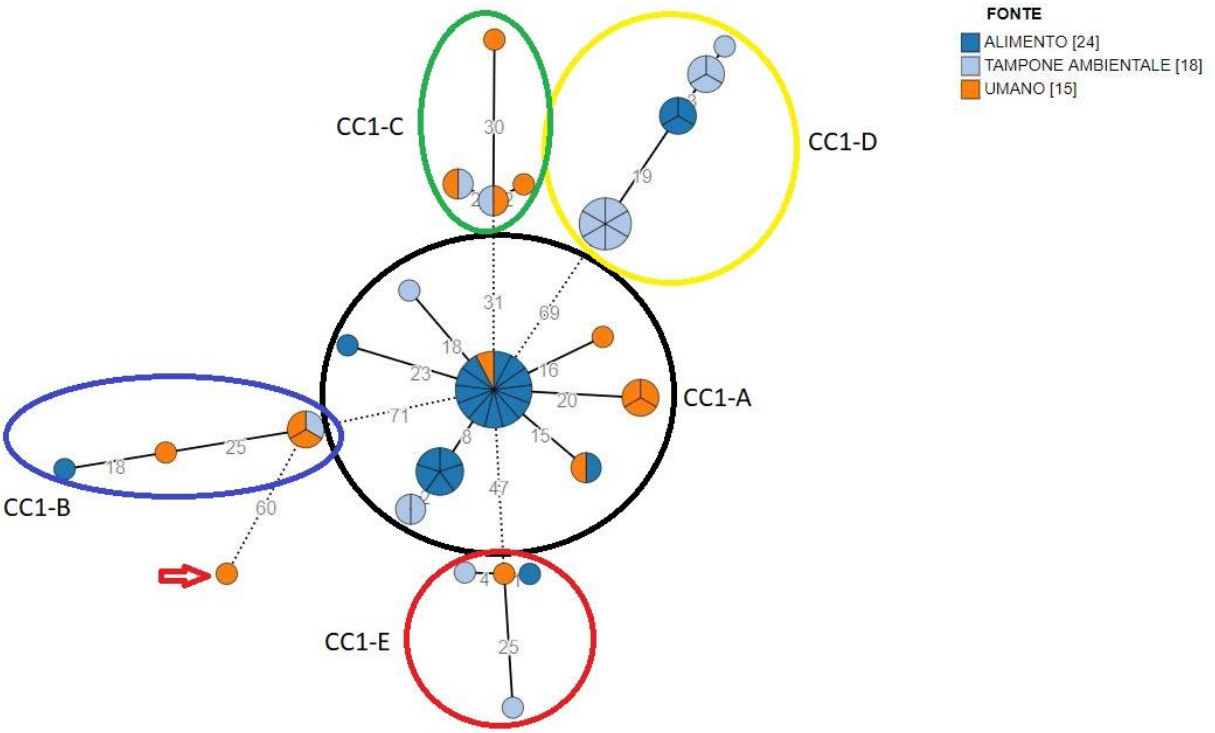


Figura 6. Minimum Spanning Tree del cgMLST dei ceppi appartenenti al CC1

I ceppi appartenenti al CC1 sono il maggior numero di isolati con 57 ceppi, 24 ceppi isolati da alimenti (6 da alimenti non specificati, 1 da preparazione alimentare mista, 5 da salame di suino e 12 da salsiccia di cinghiale), 18 da ambienti di produzione e/o trasformazione alimentare e 15 da casi clinici (Figura 8).

Complessivamente i ceppi del CC1 sono raggruppati in diversi cluster, indicati con le sigle da CC1_A a CC1_E.

Il cluster CC1-A è composto complessivamente da 28 ceppi, tra cui, quelli del gruppo principale, al quale appartengono 12 ceppi isolati nel 2016 da salsicce di cinghiale e 1 ceppo clinico anch'esso isolato nel 2016 che presentano una distanza al cgMLST di zero alleli. A distanze variabili dal gruppo principale ma inferiori a 30 alleli (8-23) sono presenti altri 15 ceppi di cui, uno umano isolato nel 2017 che presenta un profilo di cgMLST identico ad un ceppo isolato nel 2015 da un alimento (posti a 15 alleli di differenza), un altro ceppo umano isolato nel 2018 posto a 16 alleli di differenza, ad una distanza allelica di 20 vi sono 3 ceppi umani (1 isolato nel 2015 e 2 nel 2016) che presentano lo stesso cgMLST , a distanza di 8 alleli vi sono 5 ceppi isolati da alimenti (non specificati) isolati nel 2015 che presentano lo stesso profilo cgMLST i quali sono a loro volta correlati(a distanza di 2 alleli) a 2 ceppi isolati nel 2015 da ambienti di produzione alimentare che presentano anch'essi lo stesso profilo cgMLST, infine, a distanza di 18 e 23 alleli vi sono rispettivamente un ceppo ambientale isolato nel 2016 ed uno alimentare isolato nel 2016. Dalla matrice degli SNPs (Tab.3) si evince che i 12 ceppi isolati dalla salsiccia di cinghiale e il ceppo clinico differiscono per 0-15 SNPs, dove infatti

un ceppo isolato dalla salsiccia presenta 0 SNP di differenza con il ceppo clinico. Mentre i ceppi alimentari si differenziano tra loro per 0-24 SNPs di fatti anche qui due ceppi alimentari sono identici. Il ceppo clinico (2017) che presenta un cgMLST identico ad un ceppo di origine alimentare (2015) presenta 14 SNPs di differenza mentre presentano 75-86 SNPs rispetto al gruppo principale da cui distano per 15 alleli. I 3 ceppi clinici (2015-2016) che hanno un cgMLST indistinguibile si differenziano tra loro per 20-21 SNPs e nello specifico, quelli isolati nello stesso anno presentano 1 solo SNP di differenza, mentre si differenziano dal gruppo principale, posto a 20 alleli di distanza, per 70-87 SNPs. Invece, il ceppo clinico isolato nel 2018 e posto a 16 alleli di differenza, presenta 89-98 SNPs di differenza con i ceppi del gruppo principale indicando che non vi è correlazione. Per quanto riguarda i 5 ceppi isolati da alimenti (2015) aventi lo stesso profilo cgMLST e distanti 8 alleli dal gruppo principale, dall'analisi degli SNPs è emerso che questi si differenziano solamente per 0-2 SNP indicando un'elevata correlazione e questi si differenziano dai 2 ceppi ambientali distanti 2 alleli, per 43-55 SNPs e questi risultati ci dicono che non sono correlati, i due ceppi ambientali si differenziano tra loro per 12 SNPs. Il ceppo ambientale posto a 18 alleli dal gruppo principale ha mostrato 101-110 SNPs. Infine, il ceppo alimentare posto a 23 alleli dal gruppo centrale si differenzia per 60-69 SNPs.

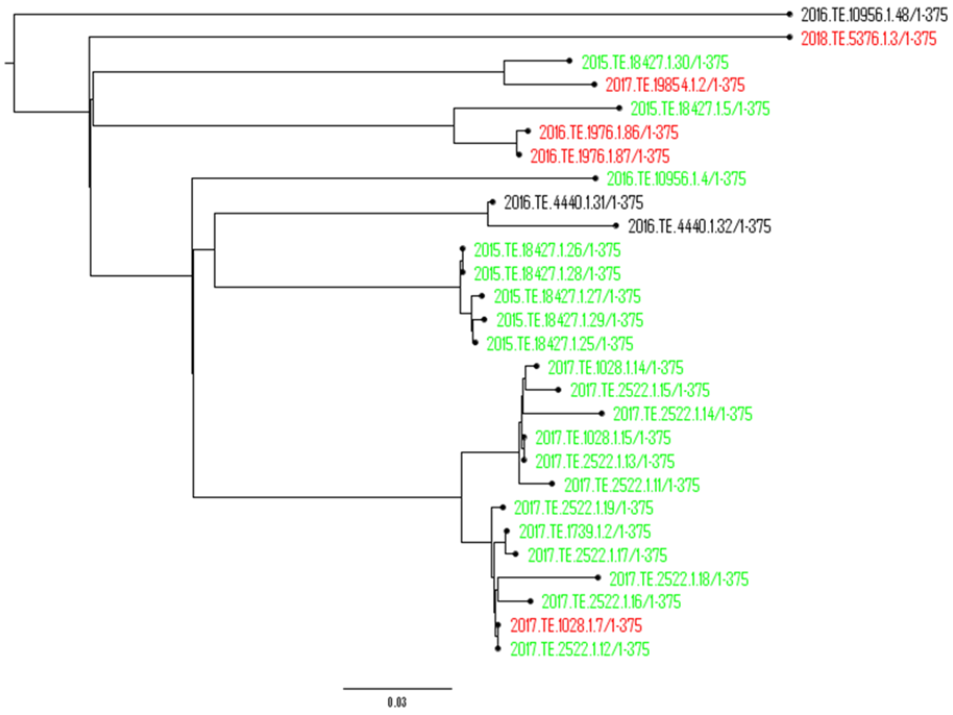


Figura 7. Maximum likelihood tree Analisi degli SNPs tra gli isolati appartenenti al CC1-A. Rosso: ceppi clinici. Verde: ceppi alimentari. Nero: ambienti di produzione alimentare.

	2015.TE.1	2015.TE.1	2015.TE.1	2015.TE.1	2015.TE.1	2015.TE.1	2015.TE.1	2016.TE.1	2016.TE.1	2016.TE.1	2016.TE.1	2016.TE.4	2016.TE.4	2017.TE.1	2017.TE.1	2017.TE.1	2017.TE.1	2017.TE.1	2017.TE.2	2017.TE.2	2017.TE.2	2017.TE.2	2017.TE.2	2017.TE.2	2017.TE.2	2017.TE.2	2017.TE.2	2018.TE.5
2015.TE.18427.1.25	0																											
2015.TE.18427.1.26	1	0																										
2015.TE.18427.1.27	1	2	0																									
2015.TE.18427.1.28	1	0	2	0																								
2015.TE.18427.1.29	1	2	2	2	0																							
2015.TE.18427.1.30	73	72	74	72	74	0																						
2015.TE.18427.1.5	76	75	77	75	77	83	0																					
2016.TE.10956.1.48	99	98	100	98	98	106	109	0																				
2016.TE.10956.1.4	58	57	59	57	59	83	86	109	0																			
2016.TE.1976.1.86	67	68	68	68	68	76	21	102	79	0																		
2016.TE.1976.1.87	68	67	69	67	69	75	20	101	78	1	0																	
2016.TE.4440.1.31	44	43	45	43	45	75	78	101	60	71	70	0																
2016.TE.4440.1.32	54	53	55	53	55	85	88	111	70	81	80	12	0															
2017.TE.1028.1.14	53	52	54	52	54	78	81	104	63	74	73	53	63	0														
2017.TE.1028.1.15	52	51	53	51	53	77	80	103	62	73	72	52	62	1	0													
2017.TE.1028.1.7	50	49	51	49	51	75	78	101	60	71	70	50	60	9	8	0												
2017.TE.1739.1.2	51	50	52	50	52	76	79	102	61	72	71	51	61	10	9	1	0											
2017.TE.19854.1.2	75	74	76	74	76	14	85	108	85	78	77	77	87	80	79	77	78	0										
2017.TE.2522.1.11	55	54	56	54	56	80	83	106	65	76	75	55	65	4	3	11	12	82	0									
2017.TE.2522.1.12	50	49	51	49	51	75	78	101	60	71	70	50	60	9	8	0	1	77	11	0								
2017.TE.2522.1.13	52	51	53	51	53	77	80	103	62	73	72	52	62	1	0	8	9	79	3	8	0							
2017.TE.2522.1.14	59	58	60	58	60	84	87	110	69	80	79	59	69	8	7	15	16	86	10	15	7	0						
2017.TE.2522.1.15	55	54	56	54	56	80	83	106	65	76	75	55	65	4	3	11	12	82	6	11	3	10	0					
2017.TE.2522.1.16	53	52	54	52	54	78	81	104	63	74	73	53	63	12	11	3	4	80	14	3	11	18	14	0				
2017.TE.2522.1.17	52	51	53	51	53	77	80	103	62	73	72	52	62	11	10	2	1	79	13	2	10	17	13	5	0			
2017.TE.2522.1.18	59	58	60	58	60	84	87	110	69	80	79	59	69	18	17	9	10	86	20	9	17	24	20	12	11	0		
2017.TE.2522.1.19	51	50	52	50	52	76	79	102	61	72	71	51	61	10	9	1	2	78	12	1	9	16	12	4	3	10	0	
2018.TE.5376.1.3	89	88	90	88	88	96	99	114	99	92	91	89	99	92	91	89	90	98	94	89	91	98	94	92	91	98	90	0

Tabella 3. Matrice di SNPs del cluster CC1-A dove in verde sono evidenziati i valori di SNP da 0-5, in arancione i valori da 6-15 e in rosso i valori da 16-30 SNPs

Il cluster CC1-B è risultato composto complessivamente da 5 ceppi di cui, due ceppi clinici isolati nel 2015 e un ceppo isolato nel 2016 da un tampone effettuato in un ambiente di produzione alimentare che presentano un identico cgMLST, un altro ceppo clinico isolato nel 2018 distante 25 alleli dai suddetti ceppi il quale, a sua volta è distante 18 alleli da un ceppo isolato da alimenti nel 2018. Dall' albero filogenetico (fig. 8) possiamo vedere che 3 ceppi di questo cluster sono nello stesso gruppo e dalla matrice degli SNPs si evince che i ceppi clinici che in cgMLST presentano zero differenze alleliche con un ceppo ambientale, differiscono da quest'ultimo per 5-7 SNPs, mentre i due ceppi clinici differiscono tra loro per 6 SNPs. Per quanto riguarda l'altro ceppo clinico che nel cgMLST presenta 18 differenze alleliche con un ceppo alimentare e 25 differenze alleliche con gli altri tre ceppi (clinici e ambientale), si è visto che si differenzia da quello alimentare per 81 SNPs, mentre si differenzia dagli altri due ceppi clinici per 93-95 SNPs.

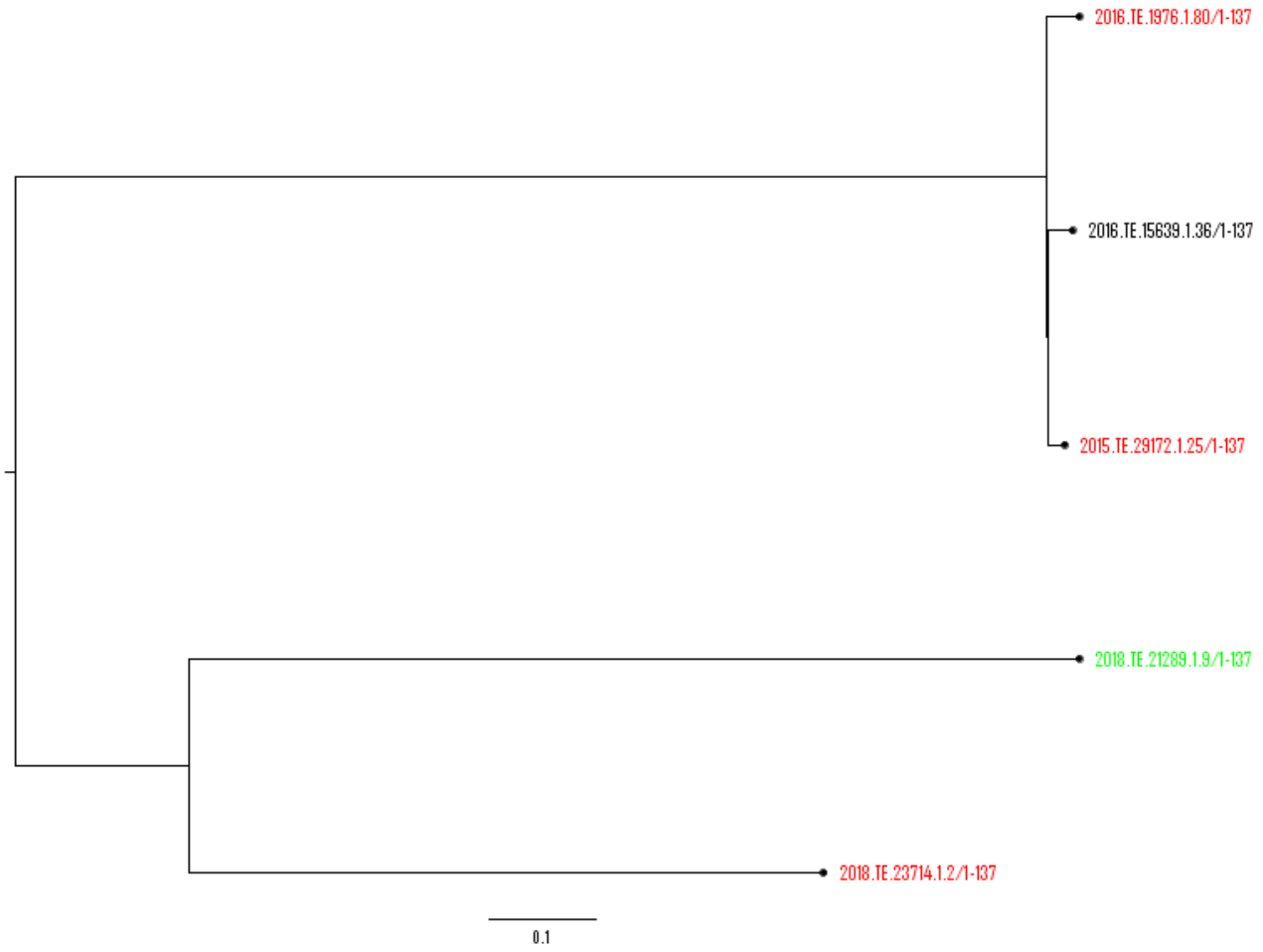


Figura 8. Maximum Likelihood Tree Analisi degli SNPs tra gli isolati appartenenti al CC1-B. in Rosso: ceppi clinici.in Verde: ceppi alimentari.in Nero: ceppi isolati da ambienti di produzione alimentare.

	2016.TE.1976.1.80	2015.TE.29172.1.25	2018.TE.23714.1.2	2016.TE.15639.1.36	2018.TE.21289.1.9
2016.TE.1976.1.80	0				
2015.TE.29172.1.25	6	0			
2018.TE.23714.1.2	88	86	0		
2016.TE.15639.1.36	7	5	87	0	
2018.TE.21289.1.9	95	93	81	94	0

Tabella 4. Matrice SNPs CC1-B dove in verde sono evidenziati i valori di SNP da 0-5, in arancione i valori da 6-15 e in rosso i valori da 16-30 SNPs

Il cluster CC1-C è invece formato complessivamente da 6 ceppi di cui, un ceppo umano isolato nel 2014 e un ceppo ambientale isolato nel 2016 i quali sono caratterizzati da un cgMLST indistinguibile, questi ceppi, poi, distano 2 alleli da altri due ceppi, a loro volta con identico cgMLST, che sono un ceppo clinico isolato nel 2015 e uno isolato da un tampone ambientale nel 2016. Sempre a distanza di 2 alleli dal primo gruppo, è posizionato un ceppo umano isolato nel 2019 e a distanza di 30 alleli è un altro ceppo clinico isolato nel 2018. Dalla figura 9 si evince che il cluster CC1-C è diviso essenzialmente in 2 gruppi e, analizzando la matrice degli SNPs (Tab. 5) si osserva che i 2 ceppi clinici che presentavano 0 differenze alleliche con i due ceppi ambientali risultano fortemente correlati in quanto presentano 5 SNPs di differenza. Mentre il ceppo clinico che presentava 2 alleli di differenza con uno dei ceppi ambientali e uno clinico risulta moderatamente correlato in quanto presenta 18 e19 SNPs di differenza. Mentre, l'altro ceppo clinico che si differenzia per 30 alleli col suddetto gruppo, non risulta correlato in quanto presenta 90 SNPs di differenza con il ceppo ambientale e 91 SNPs di differenza con il ceppo clinico.

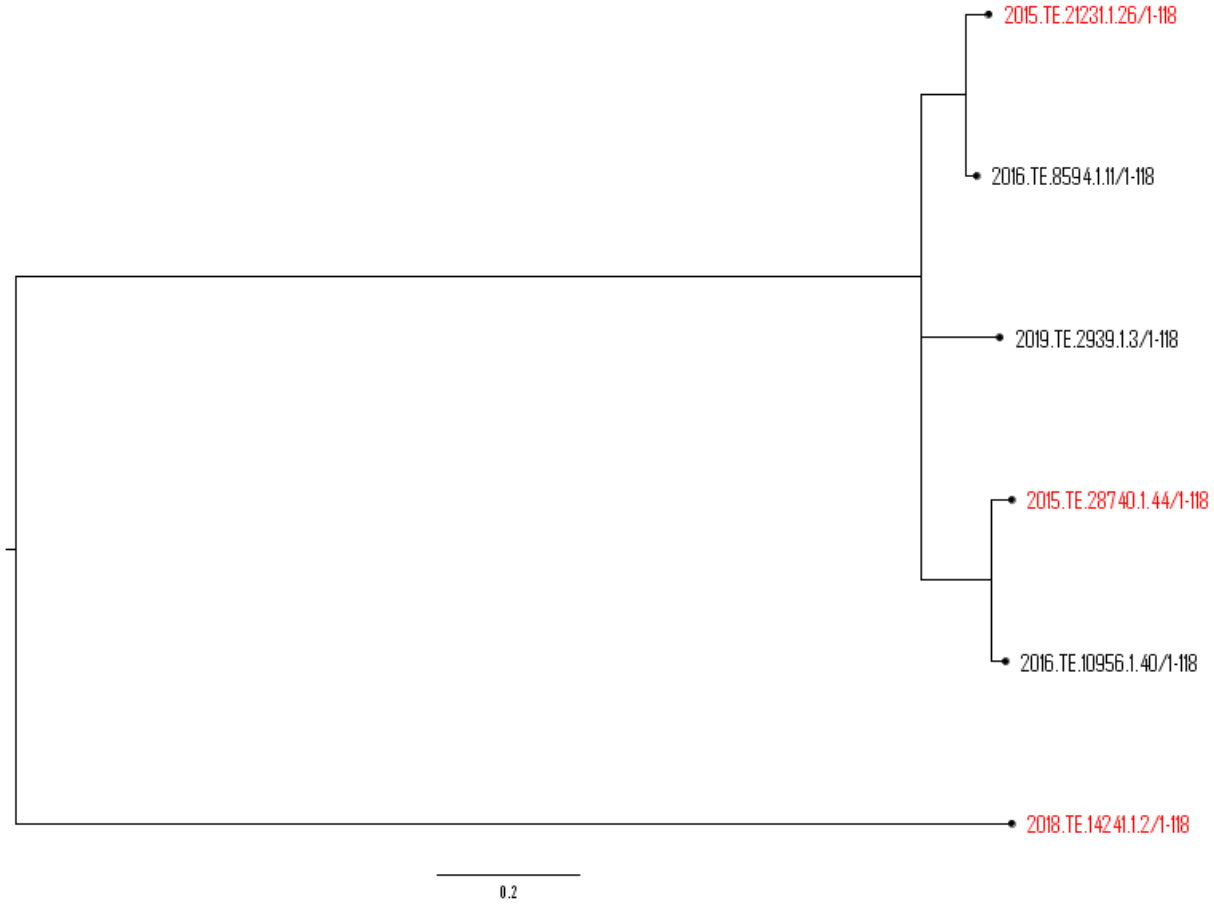


Figura 9. Maximum Likelihood Tree Analisi degli SNPs tra gli isolati appartenenti al CC1-C. in rosso: ceppi clinici, in verde: ceppi alimentari.in nero: ceppi isolati da ambienti di produzione alimentare.

	2015.TE.21231.1.26	2015.TE.28740.1.44	2016.TE.10956.1.40	2016.TE.8594.1.11	2018.TE.14241.1.2	2019.TE.2939.1.3
2015.TE.21231.1.26	0					
2015.TE.28740.1.44	21	0				
2016.TE.10956.1.40	20	5	0			
2016.TE.8594.1.11	5	20	19	0		
2018.TE.14241.1.2	91	96	95	90	0	
2019.TE.2939.1.3	19	22	21	18	94	0

Tabella 5. Matrice SNPs CC1-C dove in verde sono evidenziati i valori di SNP da 0-5, in arancione i valori da 6-15 e in rosso i valori da 16-30 SNPs

Il CC1-D è formato complessivamente da 13 ceppi, non sono presenti ceppi isolati dall'uomo, di questi 13, 6 sono stati isolati nel 2016 da tamponi ambientali e presentano un profilo cgMLST identico, a distanza di 19 alleli da questi c'è un gruppo di 3 ceppi isolati da salame nel 2016, e, a distanza di ulteriori 3 alleli da questi ultimi è presente un altro gruppo di 3 ceppi isolati da tamponi ambientali nel 2016 ed infine, ad una distanza di 1 allele da quest'ultimo gruppo, vi è un ceppo isolato da tampone ambientale nel 2016. Dalla matrice degli SNPs (Tab. 6) si evince che i 6 ceppi isolati da tamponi ambientali che hanno un cgMLST indistinguibile presentano 1-11 SNPs di differenza. I ceppi alimentari con cgMLST identico sono fortemente correlati in quanto presentano 3-4 SNPs di differenza, mentre presentano 60-65 SNPs di differenza nei confronti dei suddetti ceppi ambientali. I 3 ceppi ambientali anch'essi con un cgMLST identico differiscono per 1-8 SNPs. Infine, l'ultimo ceppo ambientale non risulta correlato con gli ultimi 3 ceppi ambientali in quanto differisce da quest'ultimi per 34-41 SNPs.

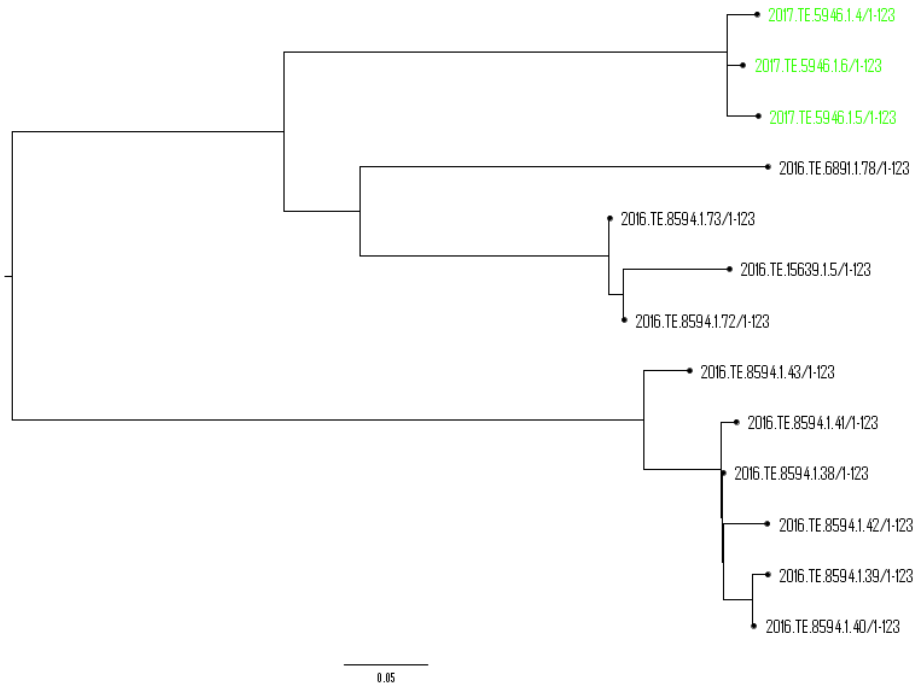


Figura 10. Maximum Likelihood Tree Analisi degli SNPs tra gli isolati appartenenti al CC1-D. in rosso: ceppi clinici, in verde: ceppi alimentari, in nero: ceppi isolati da ambienti di produzione alimentare

	2016.TE.15639.1.5	2016.TE.6891.1.78	2016.TE.8594.1.38	2016.TE.8594.1.39	2016.TE.8594.1.40	2016.TE.8594.1.41	2016.TE.8594.1.42	2016.TE.8594.1.43	2016.TE.8594.1.72	2016.TE.8594.1.73	2017.TE.5946.1.4	2017.TE.5946.1.5	2017.TE.5946.1.6
2016.TE.15639.1.5	0												
2016.TE.6891.1.78	41	0											
2016.TE.8594.1.38	67	66	0										
2016.TE.8594.1.39	70	69	3	0									
2016.TE.8594.1.40	69	68	2	1	0								
2016.TE.8594.1.41	68	67	1	4	3	0							
2016.TE.8594.1.42	70	69	3	6	5	4	0						
2016.TE.8594.1.43	65	64	8	11	10	9	11	0					
2016.TE.8594.1.72	7	34	60	63	62	61	63	58	0				
2016.TE.8594.1.73	8	35	59	62	61	60	62	57	1	0			
2017.TE.5946.1.4	51	50	62	65	64	63	65	60	44	43	0		
2017.TE.5946.1.5	51	50	62	65	64	63	65	60	44	43	4	0	
2017.TE.5946.1.6	50	49	61	64	63	62	64	59	43	42	3	3	0

Tabella 6. Matrice SNPs CC1-D dove in verde sono evidenziati i valori di SNP da 0-5, in arancione i valori da 6-15 e in rosso i valori da 16-30 SNPs

Il CC1-E è risultato formato complessivamente da 4 ceppi, un ceppo clinico isolato nel 2019, un ceppo isolato nel 2016 da salame (ad 1 allele di distanza) e un ceppo ambientale isolato nel 2016 (distante 4 alleli), a 25 alleli di distanza è presente un altro ceppo isolato dall'ambiente di lavorazione degli alimenti. Dalla matrice degli SNPs (Tab.7) si evince che il ceppo clinico non risulta correlato con il ceppo alimentare in quanto vi sono 36 SNPs di differenza e non risulta correlato nemmeno con i ceppi ambientali in quanto vi sono 47-71 SNPs di differenza.

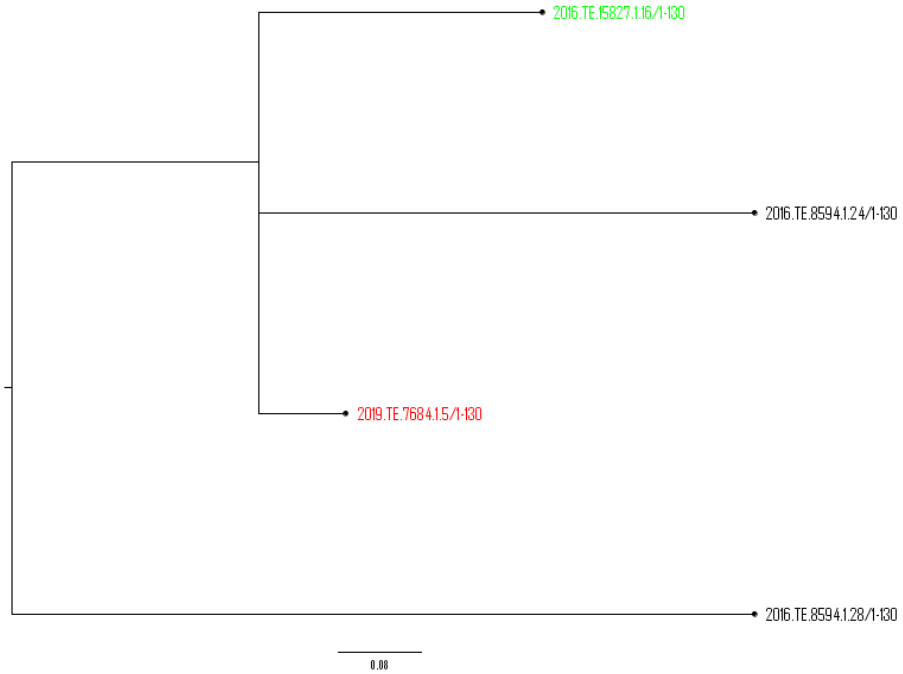


Figura 10. Maximum Likelihood Tree Analisi degli SNPs tra gli isolati appartenenti al CC1-E. in rosso: ceppi clinici, in verde: ceppi alimentari.in nero: ceppi isolati da ambienti di produzione alimentare

	2016.TE.15827.1.16	2016.TE.8594.1.24	2016.TE.8594.1.28	2019.TE.7684.1.5
2016.TE.15827.1.16	0			
2016.TE.8594.1.24	59	0		
2016.TE.8594.1.28	83	94	0	
2019.TE.7684.1.5	36	47	71	0

Tabella 7. Matrice SNPs CC1-E dove in verde sono evidenziati i valori di SNP da 0-5, in arancione i valori da 6-15 e in rosso i valori da 16-30 SNP

Un ultimo ceppo clinico appartenente al CC1 (indicato con la freccia rossa) non ha trovato ceppi correlati nel database del LNR Lm dell'IZSAM.

9.2.2. CC2

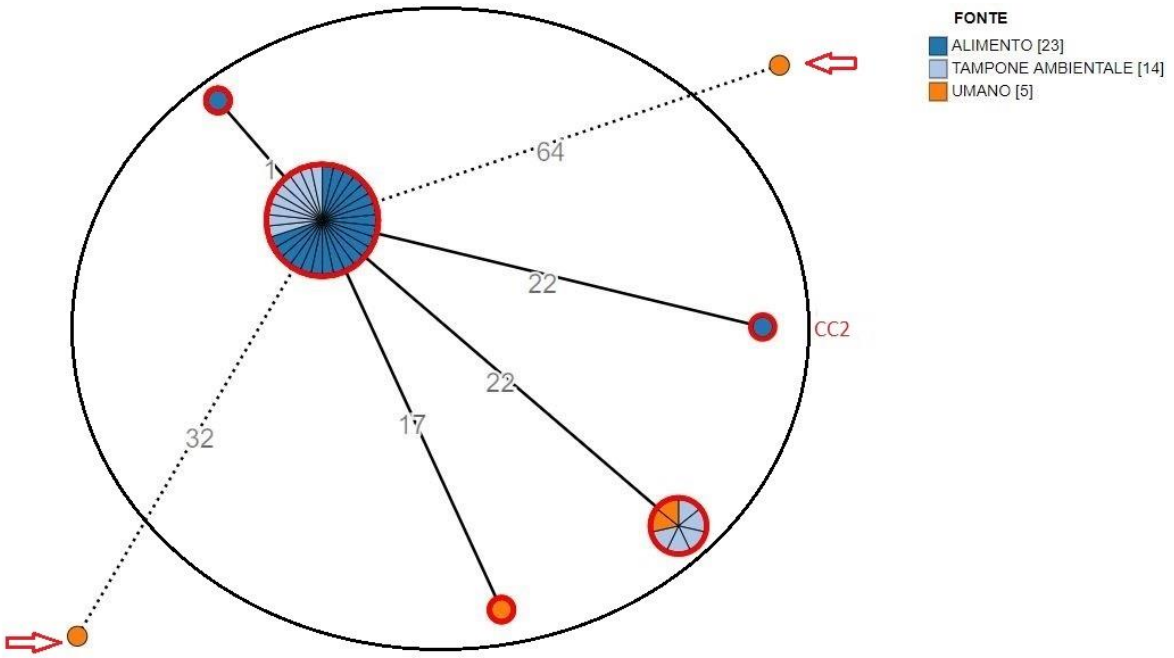


Figura 11. Minimum Spanning Tree cgMLST CC2

I ceppi appartenenti al CC2 sono complessivamente 42 di cui 23 isolati da alimenti (17 da formaggi a pasta filata, 4 da mozzarelle, 1 da prodotto lattiero- caseari non specificato e 1 da un salame), 14 da tamponi effettuati in ambienti di produzione alimentare e 5 da casi di listeriosi umana. Dalla figura 11. si osserva che il cluster CC2 è costituito da un gruppo centrale di 21 ceppi isolati da alimenti (formaggi a pasta filata e mozzarella) dal 2013 al 2016 e 9 ceppi isolati da tamponi effettuati in ambienti di produzione alimentare dal 2014 al 2016, tutti i ceppi presentano un cgMLST indistinguibile e dall'analisi della matrice degli SNPs (Tab.8) si evince che questi 30 ceppi distano da un minimo di 1 a un massimo di 38 SNPs. A distanza di 1 allele da questo gruppo centrale vi è 1 ceppo alimentare isolato nel 2015 sempre in un formaggio a pasta filata che si è visto differenziarsi dai 30 suddetti ceppi per 4-27 SNPs .A distanza di 22 differenze alleliche vi è un secondo gruppo dal cgMLST indistinguibile che comprende 2 ceppi clinici uno isolato nel 2016 e l'altro nel 2018 e 5 ceppi isolati da tamponi ambientali nel 2016 e dall'analisi degli SNPs si è visto si differenziano per 9-22 SNPs e per via degli alti valori di SNPs non risultano correlati con i suddetti 30 ceppi. A distanza di 17 alleli e di 22 alleli dal gruppo dei 30 ceppi sono rispettivamente presenti 1 ceppo clinico isolato nel 2016 e 1 ceppo alimentare isolato dal salame nel 2014 e dall'analisi degli SNPs non risultano correlati per via degli alti valori di SNPs, rispettivamente 89-106 e 83-104. Infine, 2 ceppi isolati nell'uomo nel 2015 e nel 2019 (indicati con le frecce rosse) non trovano ceppi correlati nel database del LNR LM dell'IZSAM.

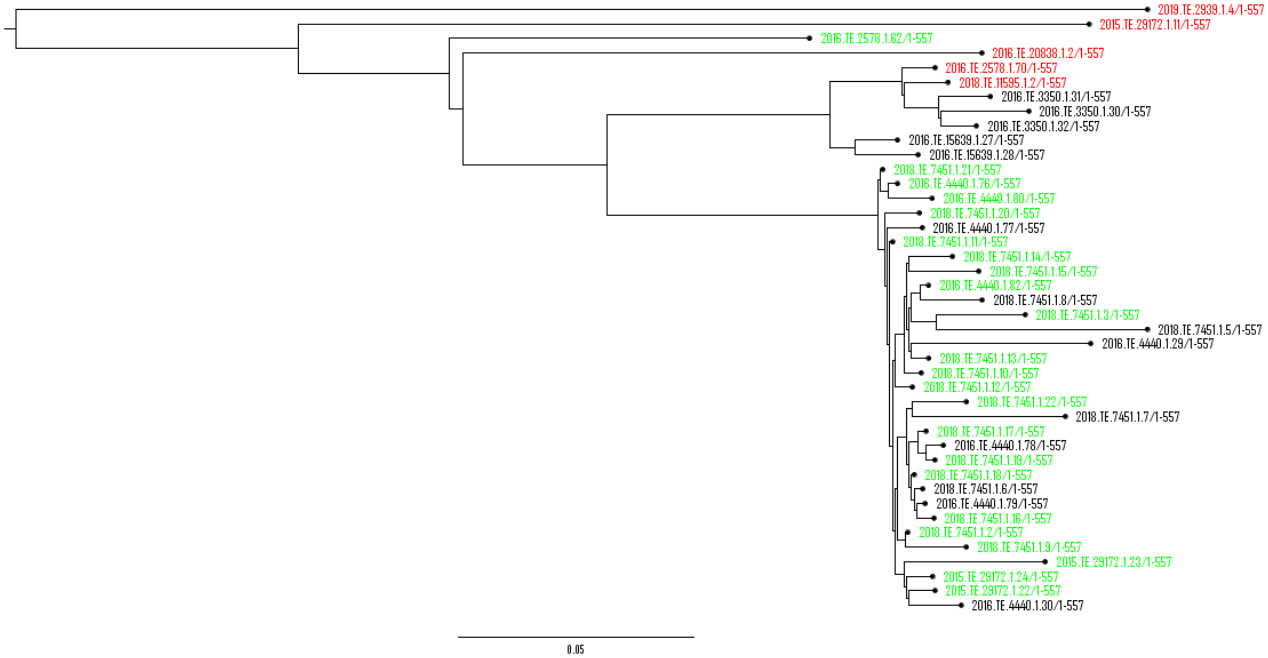


Figura 12. Maximum Likelihood Tree Analisi degli SNPs tra gli isolati appartenenti al CC2. in rosso: ceppi clinici, in verde: ceppi alimentari.in nero: ceppi isolati da ambienti di produzione alimentare

	2016.TE.2578.1.70	2016.TE.20838.1.2	2018.TE.11595.1.2	2015.TE.29172.1.22	2015.TE.29172.1.23	2015.TE.29172.1.24	2018.TE.7451.1.2	2018.TE.7451.1.3	2018.TE.7451.1.9	2018.TE.7451.1.10	2018.TE.7451.1.11	2018.TE.7451.1.12	2018.TE.7451.1.13	2018.TE.7451.1.14	2018.TE.7451.1.15	2018.TE.7451.1.16	2018.TE.7451.1.17	2018.TE.7451.1.18	2018.TE.7451.1.19	2018.TE.7451.1.20	2018.TE.7451.1.21	2018.TE.7451.1.22	2016.TE.4440.1.76	2016.TE.4440.1.80	2016.TE.4440.1.82	2016.TE.2578.1.62	2016.TE.15639.1.27	2016.TE.15639.1.28	2016.TE.3350.1.30	2016.TE.3350.1.31	2016.TE.3350.1.32	2016.TE.4440.1.29	2016.TE.4440.1.30	2016.TE.4440.1.77	2016.TE.4440.1.78	2016.TE.4440.1.79	2018.TE.7451.1.5	2018.TE.7451.1.6	2018.TE.7451.1.7	2018.TE.7451.1.8
2016.TE.2578.1.70	0																																						
2016.TE.20838.1.2	101	0																																					
2018.TE.11595.1.2	9	104	0																																				
2015.TE.29172.1.22	67	92	70	0																																			
2015.TE.29172.1.23	800	105	83	19	0																																		
2015.TE.29172.1.24	67	92	70	6	19	0																																	
2018.TE.7451.1.2	64	89	67	5	16	5	0																																
2018.TE.7451.1.3	750	100	74	16	27	16	11	0																															
2018.TE.7451.1.9	71	96	72	12	23	12	7	16	0																														
2018.TE.7451.1.10	66	89	67	7	20	7	4	13	11	0																													

2018.TE.7451.1.11	63	88	66	4	17	4	1	12	8	3	0																													
2018.TE.7451.1.12	65	90	68	6	19	6	3	14	10	5	2	0																												
2018.TE.7451.1.13	66	91	67	7	20	7	4	13	11	4	3	5	0																											
2018.TE.7451.1.14	69	94	70	10	23	10	7	16	14	7	6	8	7	0																										
2018.TE.7451.1.15	70	95	71	11	24	11	8	17	15	8	7	9	8	11	0																									
2018.TE.7451.1.16	66	91	69	7	20	7	4	13	11	6	3	5	6	9	10	0																								
2018.TE.7451.1.17	66	91	67	7	20	7	4	11	9	6	3	5	6	9	10	4	0																							
2018.TE.7451.1.18	64	89	67	5	18	5	2	11	9	4	1	3	4	7	8	2	2	0																						
2018.TE.7451.1.19	67	92	68	8	21	8	5	10	10	7	4	6	7	10	11	5	3	3	0																					
2018.TE.7451.1.20	67	92	70	8	21	8	5	16	12	7	4	6	7	10	11	7	7	5	8	0																				
2018.TE.7451.1.21	64	89	65	5	18	5	2	11	7	4	1	3	4	7	8	4	2	2	3	5	0																			
2018.TE.7451.1.22	69	94	72	10	21	10	5	14	12	9	6	8	9	12	13	7	7	5	8	10	7	0																		
2016.TE.4440.1.76	66	91	67	7	20	7	4	13	9	6	3	5	6	9	10	6	4	4	5	7	2	9	0																	
2016.TE.4440.1.80	70	95	71	11	24	11	8	17	13	10	7	9	10	13	14	10	8	8	9	11	6	13	6	0																
2016.TE.4440.1.82	66	91	65	7	20	7	4	11	9	4	3	5	4	7	8	6	4	4	5	7	2	9	4	8	0															
2016.TE.2578.1.62	88	90	87	87	98	87	82	89	87	84	83	85	84	87	88	86	84	84	85	87	82	87	84	88	82	0														
2016.TE.15639.1.27	18	97	21	63	74	63	58	69	65	62	59	61	62	65	66	62	62	60	63	63	60	63	62	66	62	82	0													

2016.TE.15639.1.28	22	101	23	67	80	67	64	73	69	66	63	65	66	69	70	66	64	64	65	67	62	69	64	68	64	86	12	0												
2016.TE.3350.1.30	18	113	19	79	92	79	76	85	81	78	75	77	78	81	89	78	66	76	77	79	74	81	76	80	76	98	30	32	0											
2016.TE.3350.1.31	10	105	11	71	84	71	68	77	75	68	67	69	68	71	72	70	76	68	71	71	68	73	70	74	68	90	22	26	14	0										
2016.TE.3350.1.32	11	106	12	72	83	72	67	76	72	71	68	70	71	74	75	71	70	69	70	72	67	72	69	73	69	89	21	25	13	7	0									
2016.TE.4440.1.29	76	101	77	17	30	17	14	23	21	14	13	15	14	17	18	16	16	14	17	17	14	19	16	20	14	94	72	76	88	78	81	0								
2016.TE.4440.1.30	70	95	71	9	22	9	8	17	13	10	7	9	10	13	14	10	8	8	9	11	6	13	8	12	8	88	66	68	80	74	73	20	0							
2016.TE.4440.1.77	64	89	67	5	18	5	2	13	9	4	1	3	4	7	8	4	4	2	5	5	2	7	4	8	4	84	60	64	76	68	69	14	8	0						
2016.TE.4440.1.78	68	93	69	7	20	7	6	11	11	8	5	7	8	11	12	6	4	4	3	9	4	9	6	10	6	86	64	66	78	72	71	18	8	6	0					
2016.TE.4440.1.79	65	90	68	6	19	6	3	12	10	5	2	4	5	8	9	3	3	1	4	6	3	6	5	9	5	85	61	65	77	69	70	15	9	3	5	0				
2018.TE.7451.1.5	86	111	87	27	38	27	24	29	31	24	23	25	24	27	28	26	26	24	27	27	24	29	26	30	24	104	82	86	98	88	91	34	30	24	28	25	0			
2018.TE.7451.1.6	65	90	68	6	19	6	3	12	10	5	2	4	5	8	9	3	3	1	4	6	3	6	5	9	5	85	61	65	77	69	70	15	9	3	5	2	25	0		
2018.TE.7451.1.7	78	103	81	19	30	19	14	23	21	18	15	17	18	21	22	16	16	14	17	19	16	17	18	22	18	96	72	78	90	82	81	28	22	16	18	15	38	15	0	
2018.TE.7451.1.8	72	97	73	13	24	13	8	17	15	10	9	11	10	13	14	12	12	10	13	13	10	13	12	16	8	88	66	72	84	74	75	20	16	10	14	11	30	11	22	0

Tabella 8. Matrice degli SNPs CC2 dove in verde sono evidenziati i valori di SNP da 0-5, in arancione i valori da 6-15 e in rosso i valori da 16-30 SNPs

9.2.3. CC8

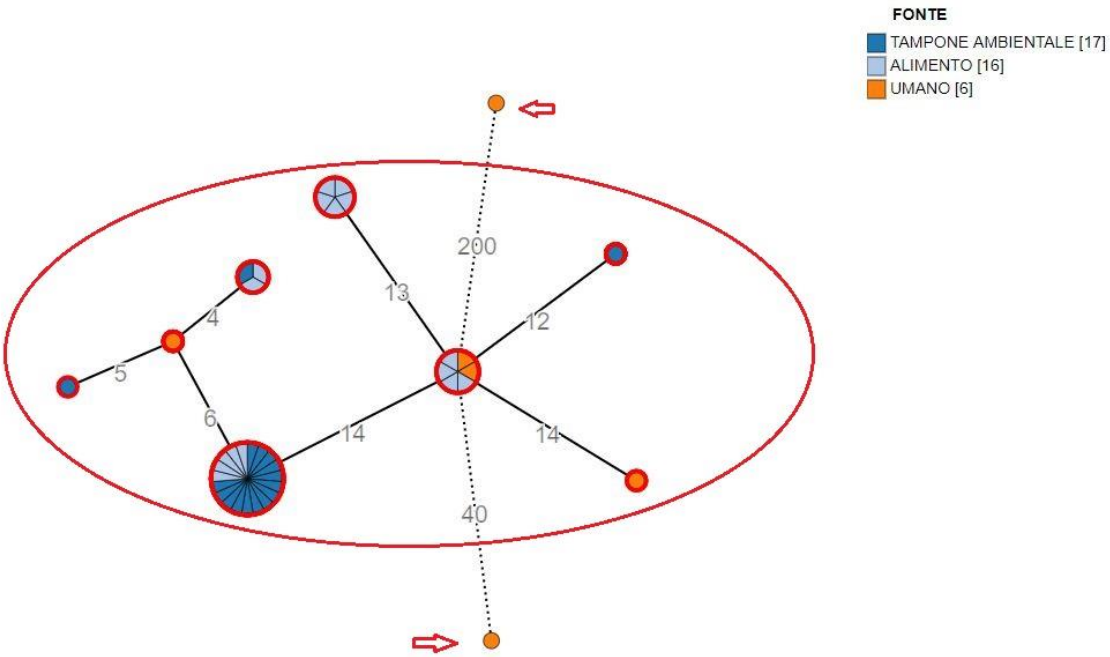


Figura 13. Minimum Spanning Tree cgMLST CC8

Il CC8 comprende un totale di 39 ceppi di cui 16 isolati da alimenti (3 dalla coppa, 2 dalla lonza, 4 da prosciutto crudo, 2 da un salame, 5 da salmone affumicato), 17 isolati da ambienti di produzione e/o trasformazione alimentare e 6 isolati da casi clinici di listeriosi. Nel cgMLST del CC8 (Fig. 13) si osserva che vi è un gruppo più grande costituito da 14 ceppi isolati da ambienti e 5 ceppi isolati da alimenti (3 dalla coppa e 2 dalla lonza) tutti nel 2016 tranne un ceppo isolato nel 2019 da un tampone ambientale, tutti i ceppi citati hanno un cgMLST identico e dall'analisi degli SNPs (Tab. 9) si evince che sono correlati in quanto si differenziano per 1-13 SNPs. Da questo gruppo, ad una distanza di 6 alleli vi è un ceppo umano isolato nel 2018 e dagli SNPs si è visto che questo ceppo dista 38-44 SNPs dal gruppo degli ambientali-alimentari, di conseguenza è improbabile una correlazione. Questo ceppo clinico presenta 4 alleli di differenza con un gruppo formato da 2 ceppi alimentari isolati nel 2013 dal salame e uno ambientale isolato nel 2018, dall'analisi degli SNPs si osserva che questi ceppi non sono correlati in quanto presentano 38-41 SNPs. Inoltre, questo ceppo clinico è distante 5 alleli da un ceppo ambientale isolato nel 2016 e dall' analisi della matrice degli SNPs si evince che anche in questo caso non risulta correlato in quanto vi sono 45 SNPs di differenza. Ad una distanza di 14 alleli dal gruppo più popolato vi è un altro gruppo con cgMLST identico costituito da 4 ceppi alimentari isolati dal prosciutto crudo e 2 ceppi clinici isolati tutti nel 2018 e dall'analisi degli SNP si osserva che questi presentano complessivamente 0-10 SNPs di differenza, infatti 2 ceppi isolati dal prosciutto presentano 0 SNP mentre i ceppi clinici differiscono da quelli alimentare per 5-10 SNPs di differenza Ad una distanza allelica di 12 da quest'ultimo gruppo vi è un ceppo ambientale isolato nel 2016 che presenta 42-50 SNPs di differenza, mentre ad una distanza allelica di 13 vi è un gruppo costituito da 5 ceppi alimentari isolati nel 2019 che presentano un cgMLST identico e dall'analisi della matrice si è visto che sono strettamente correlati in quanto presentano 0-2 SNPs di differenza. Infine, ad una

distanza di 14 alleli vi è anche un ceppo clinico isolato nel 2019 che dall'analisi degli SNPs non risulta essere correlato con il gruppo contenente i 2 ceppi clinici e i 3 ceppi alimentari in quanto presenta valori di SNP di 33-41. Rimangono fuori 2 ceppi clinici (indicati con le frecce rosse) non trovano ceppi correlati nel database del LNR LM dell'IZSAM.

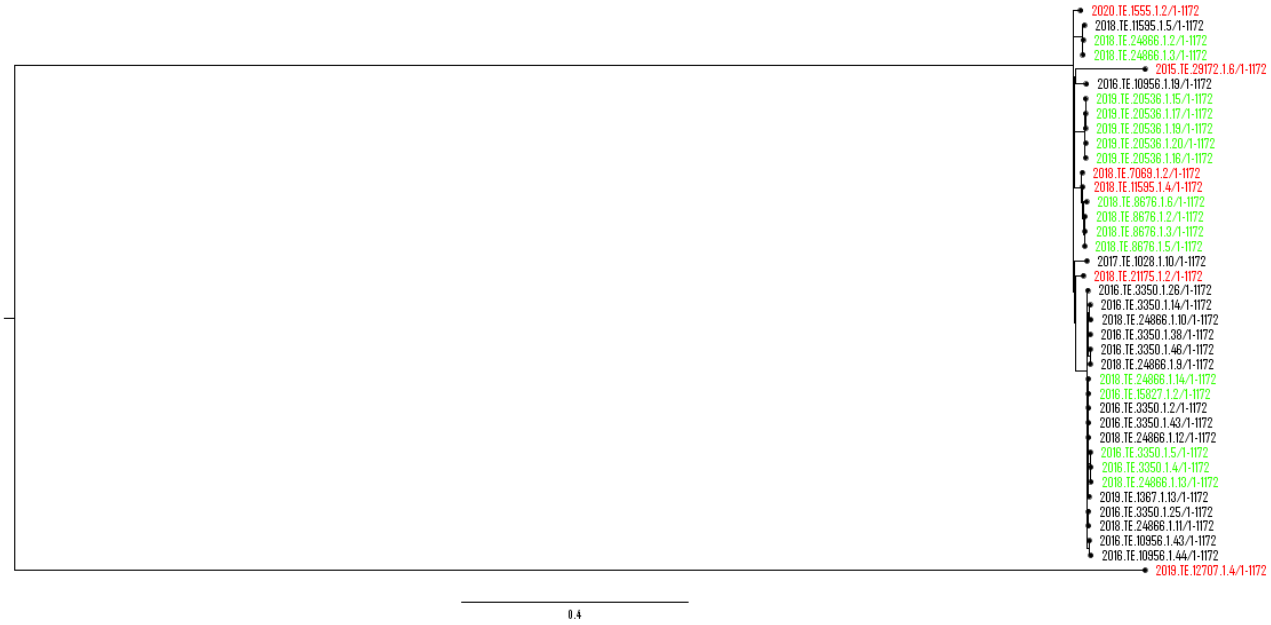


Figura 14. Maximum Likelihood Tree Analisi degli SNPs tra gli isolati appartenenti al CC8. in rosso: ceppi clinici, in verde: ceppi alimentari.in nero: ceppi isolati da ambienti di produzione alimentare

	2018.TE.7069.1.2	2018.TE.11595.1.4	2020.TE.1555.1.2	2018.TE.21175.1.2	2018.TE.8676.1.6	2018.TE.8676.1.2	2018.TE.8676.1.3	2018.TE.8676.1.5	2019.TE.20536.1.15	2019.TE.20536.1.16	2019.TE.20536.1.17	2019.TE.20536.1.19	2019.TE.20536.1.20	2016.TE.3350.1.4	2016.TE.3350.1.5	2018.TE.24866.1.13	2018.TE.24866.1.14	2016.TE.15827.1.2	2018.TE.24866.1.2	2018.TE.24866.1.3	2016.TE.10956.1.19	2016.TE.10956.1.43	2016.TE.10956.1.44	2016.TE.3350.1.25	2016.TE.3350.1.14	2016.TE.3350.1.38	2016.TE.3350.1.46	2016.TE.3350.1.26	2016.TE.3350.1.2	2016.TE.3350.1.43	2018.TE.24866.1.10	2018.TE.24866.1.11	2018.TE.24866.1.9	2018.TE.24866.1.12	2019.TE.1367.1.13	2018.TE.11595.1.5	2017.TE.1028.1.10
2018.TE.7069.1.2	0																																			
2018.TE.11595.1.4	2	0																																		
2020.TE.1555.1.2	33	33	0																																	
2018.TE.21175.1.2	36	36	35	0																																
2018.TE.8676.1.6	10	10	41	44	0																															
2018.TE.8676.1.2	6	6	37	40	6	0																														
2018.TE.8676.1.3	6	6	37	40	6	0	0																													
2018.TE.8676.1.5	5	5	36	39	5	1	1	0																												
2019.TE.20536.1.15	36	36	39	42	44	40	40	39	0																											
2019.TE.20536.1.16	35	35	38	41	43	39	39	38	1	0																										
2019.TE.20536.1.17	36	36	39	42	44	40	40	39	0	1	0																									
2019.TE.20536.1.19	36	36	39	42	44	40	40	39	0	1	0	0																								
2019.TE.20536.1.20	36	36	39	42	44	40	40	39	2	1	2	2	0																							
2016.TE.3350.1.4	48	48	47	42	56	52	52	51	54	53	54	54	54	0																						

2016.TE.3350.1.5	47	47	46	41	55	51	51	50	53	52	53	53	53	1	0																						
2018.TE.24866.1.13	49	49	48	43	57	53	53	52	55	54	55	55	55	1	2	0																					
2018.TE.24866.1.14	45	45	44	39	53	49	49	48	51	50	51	51	51	5	4	6	0																				
2016.TE.15827.1.2	44	44	43	38	52	48	48	47	50	49	50	50	50	4	3	5	1	0																			
2018.TE.24866.1.2	37	37	36	39	45	41	41	40	43	42	43	43	43	51	50	52	48	47	0																		
2018.TE.24866.1.3	36	36	35	38	44	40	40	39	42	41	42	42	42	50	49	51	47	46	1	0																	
2016.TE.10956.1.19	42	42	41	44	50	46	46	45	48	47	48	48	48	56	55	57	53	52	45	44	0																
2016.TE.10956.1.43	46	46	45	40	54	50	50	49	52	51	52	52	52	8	7	9	5	4	49	48	54	0															
2016.TE.10956.1.44	50	50	49	44	58	52	52	53	56	55	56	56	56	12	11	13	9	8	53	52	58	4	0														
2016.TE.3350.1.25	45	45	44	39	53	49	49	48	51	50	51	51	51	7	6	8	4	3	50	47	53	5	9	0													
2016.TE.3350.1.14	47	47	46	41	55	51	51	50	53	52	53	53	53	9	8	10	6	5	48	49	55	7	11	6	0												
2016.TE.3350.1.38	48	48	47	42	56	52	52	51	54	53	54	54	54	10	9	11	7	6	51	50	56	8	12	7	9	0											
2016.TE.3350.1.46	48	48	47	42	56	52	52	51	54	53	54	54	54	10	9	11	7	6	51	50	56	8	12	7	9	8	0										
2016.TE.3350.1.26	45	45	44	39	53	49	49	48	51	50	51	51	51	7	6	8	4	3	48	47	53	5	9	4	6	7	7	0									
2016.TE.3350.1.2	44	44	43	38	52	48	48	47	50	49	50	50	50	4	3	5	1	0	47	46	52	4	8	3	5	6	6	3	0								
2016.TE.3350.1.43	44	44	43	38	52	48	48	47	50	49	50	50	50	4	3	5	1	0	47	46	52	4	8	3	5	6	6	3	3	0							
2018.TE.24866.1.10	49	49	48	43	57	53	53	52	55	54	55	55	55	11	10	12	8	7	52	51	57	9	13	8	2	11	11	8	8	7	0						

2018.TE.24866.1.11	45	45	44	39	53	49	49	48	51	50	51	51	51	7	6	8	4	3	48	47	53	5	9	0	6	7	7	4	0	3	8	0					
2018.TE.24866.1.9	48	48	47	42	56	52	52	51	54	53	54	54	54	10	9	11	7	6	51	50	56	8	12	7	9	8	0	7	7	6	11	7	0				
2018.TE.24866.1.12	44	44	43	38	52	48	48	47	50	49	50	50	50	4	3	5	1	0	47	46	52	4	8	3	5	6	6	3	3	0	7	3	6	0			
2019.TE.1367.1.13	45	45	44	39	53	49	49	48	51	50	51	51	51	5	4	6	2	1	48	47	53	5	9	4	6	7	7	4	4	1	8	4	7	1	0		
2018.TE.11595.1.5	39	39	38	41	47	43	43	42	45	44	45	45	45	53	52	54	50	49	6	5	47	51	55	50	52	53	53	50	50	49	54	50	53	49	50	0	
2017.TE.1028.1.10	43	43	42	45	51	47	47	46	49	48	49	49	49	57	56	58	54	53	46	45	51	55	59	54	56	57	57	54	54	53	58	54	57	53	54	48	0

Tabella 9. Matrice SNPs CC8 dove in verde sono evidenziati i valori di SNP da 0-5, in arancione i valori da 6-15 e in rosso i valori da 16-30 SNPs

9.2.4. CC155

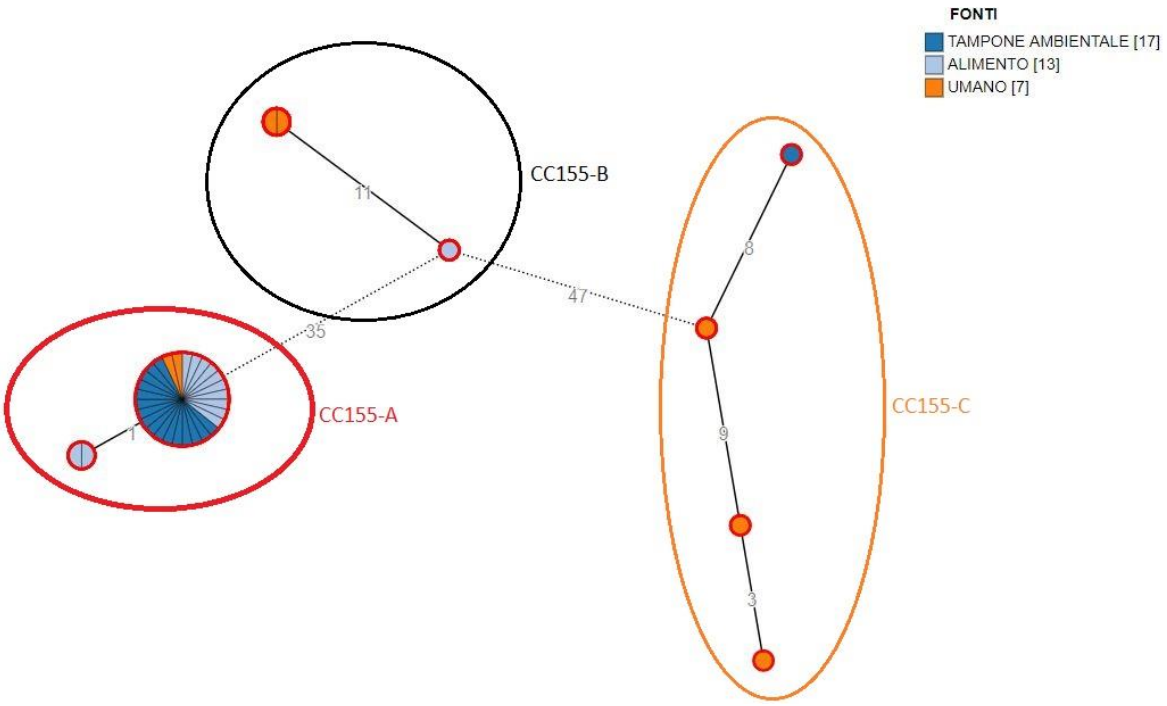


Figura 15. Minimum Spanning Tree cgMLST CC155

Il CC155 comprende 37 ceppi totali di cui 17 isolati da tamponi effettuati in ambienti di produzione alimentare, 13 isolati da alimenti (10 da salame, 2 da carne macinata, 1 da salmone affumicato) e 7 isolati da casi di listeriosi umana. L'analisi del cgMLST (Fig.15) eseguita con un cut-off di 30 alleli, mostra la presenza di tre diversi cluster denominati da CC155_A a CC155_D.

Il cluster CC155-A è costituito da un gruppo di 10 ceppi isolati da alimenti nel 2015 e nel 2016, 16 ceppi da tamponi ambientali isolati nel 2016 e 2 ceppi umani isolati nel 2016 che condividono lo stesso cgMLST ma dall'analisi degli SNP (Tab. 10) si è visto che questi sono correlati in maniera diversa, in quanto presentano valori di SNPs che vanno da 7-78 ed in particolare, i ceppi clinici si differenziano da quelli ambientali e alimentari per 11-50 SNPs. A una distanza di 1 allele vi sono 2 ceppi alimentari isolati sempre nel 2016 con lo stesso cgMLST e dall'analisi degli SNP si è visto che questi si differenziano tra loro per 27 SNPs mentre si differenziano dai 28 ceppi per 24-44SNPs

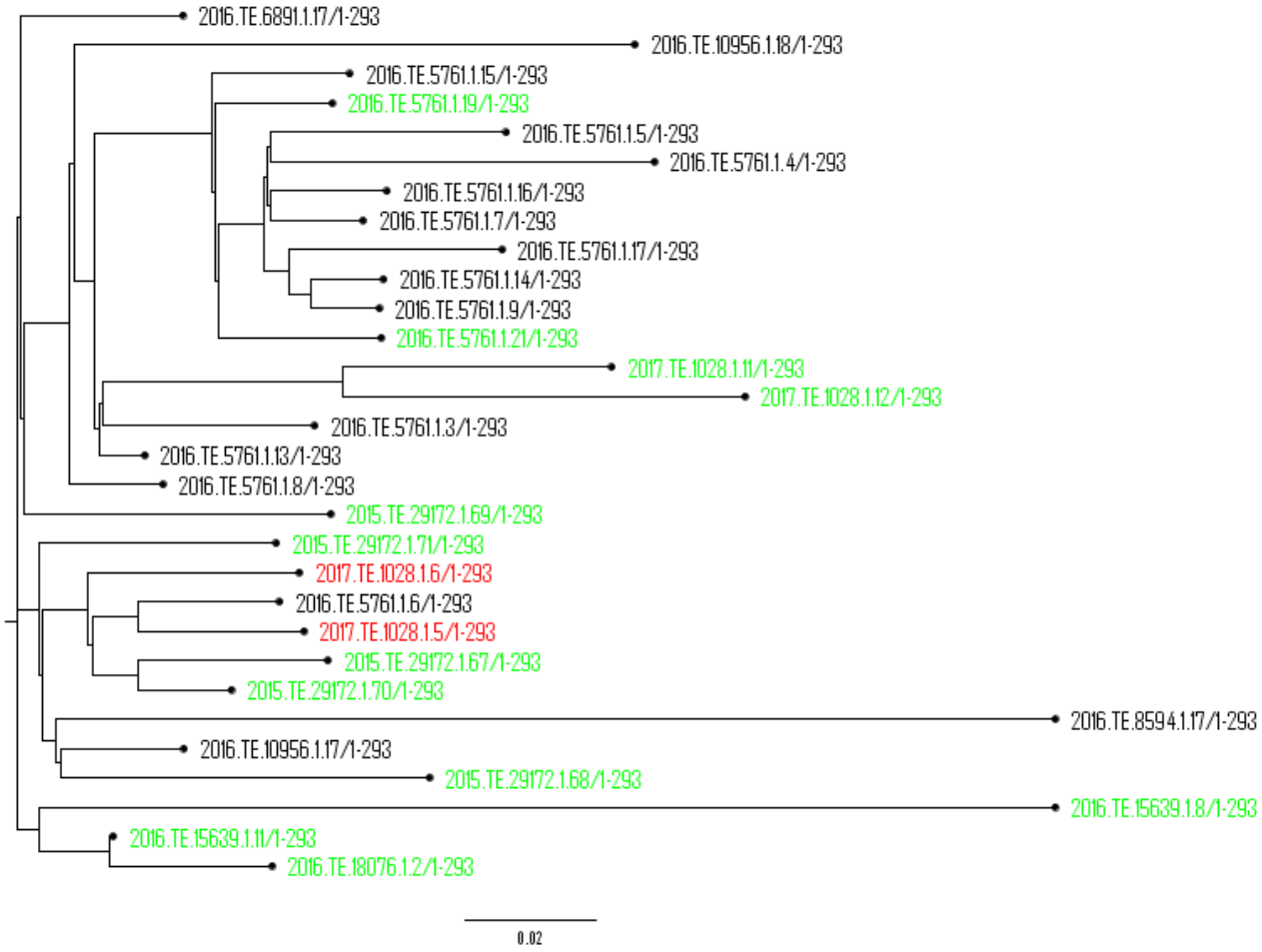


Figura 16. Maximum Likelihood Tree Analisi degli SNPs tra gli isolati appartenenti al CC155-A. in rosso: ceppi clinici, in verde: ceppi alimentari.in nero: ceppi isolati da ambienti di produzione alimentare

	2015.TE.29172.1.67	2015.TE.29172.1.68	2015.TE.29172.1.69	2015.TE.29172.1.70	2015.TE.29172.1.71	2016.TE.10956.1.17	2016.TE.10956.1.18	2016.TE.15639.1.11	2016.TE.15639.1.8	2016.TE.18076.1.2	2016.TE.5761.1.13	2016.TE.5761.1.14	2016.TE.5761.1.15	2016.TE.5761.1.16	2016.TE.5761.1.17	2016.TE.5761.1.19	2016.TE.5761.1.21	2016.TE.5761.1.3	2016.TE.5761.1.4	2016.TE.5761.1.5	2016.TE.5761.1.6	2016.TE.5761.1.7	2016.TE.5761.1.8	2016.TE.5761.1.9	2016.TE.6891.1.17	2016.TE.8594.1.17	2017.TE.1028.1.11	2017.TE.1028.1.12	2017.TE.1028.1.5	2017.TE.1028.1.6
2015.TE.29172.1.67	0																													
2015.TE.29172.1.68	28	0																												
2015.TE.29172.1.69	24	30	0																											
2015.TE.29172.1.70	12	24	20	0																										
2015.TE.29172.1.71	22	26	24	18	0																									
2016.TE.10956.1.17	18	20	20	14	16	0																								
2016.TE.10956.1.18	34	42	38	32	36	32	0																							
2016.TE.15639.1.11	15	21	17	13	15	11	29	0																						
2016.TE.15639.1.8	51	55	53	47	49	45	65	42	0																					
2016.TE.18076.1.2	20	28	24	18	22	18	34	7	49	0																				
2016.TE.5761.1.13	16	20	18	14	16	10	26	9	45	16	0																			
2016.TE.5761.1.14	20	26	22	18	20	16	34	13	49	20	14	0																		
2016.TE.5761.1.15	19	25	21	17	19	15	33	12	48	19	13	7	0																	
2016.TE.5761.1.16	26	30	28	24	26	20	36	19	55	26	14	10	13	0																
2016.TE.5761.1.17	27	31	31	23	27	21	39	20	54	25	19	13	16	15	0															
2016.TE.5761.1.19	24	28	26	22	24	18	34	15	51	22	12	12	11	12	15	0														
2016.TE.5761.1.21	24	30	28	22	26	20	34	19	55	24	14	14	13	14	17	12	0													

2016.TE.5761.1.3	23	27	25	21	23	17	33	16	52	23	11	21	20	21	26	19	21	0													
2016.TE.5761.1.4	37	41	39	35	37	31	47	30	66	37	25	21	24	21	26	23	25	32	0												
2016.TE.5761.1.5	31	35	33	29	31	25	41	24	60	31	19	15	18	15	20	17	19	26	26	0											
2016.TE.5761.1.6	18	24	24	14	20	14	34	13	47	16	14	20	19	24	21	20	22	21	35	29	0										
2016.TE.5761.1.7	23	29	25	21	23	19	33	16	52	23	13	7	10	9	14	11	13	20	20	14	23	0									
2016.TE.5761.1.8	17	21	19	13	15	11	27	10	44	17	7	15	14	17	20	15	17	14	28	22	15	14	0								
2016.TE.5761.1.9	22	24	24	18	20	14	36	15	49	22	14	6	9	10	11	12	14	21	21	15	18	9	15	0							
2016.TE.6891.1.17	18	22	20	16	18	12	32	11	47	18	10	16	15	20	23	18	20	17	31	25	16	19	13	16	0						
2016.TE.8594.1.17	51	53	53	47	49	43	65	44	78	51	43	49	48	53	54	51	53	50	64	58	45	52	44	47	45	0					
2017.TE.1028.1.11	31	39	37	29	35	29	43	24	62	27	23	33	32	33	34	29	31	30	44	38	25	32	26	33	29	56	0				
2017.TE.1028.1.12	40	44	42	38	40	32	50	33	67	40	28	38	37	38	43	36	38	35	49	43	38	37	31	38	34	61	27	0			
2017.TE.1028.1.5	19	27	25	15	21	17	31	14	48	17	13	21	20	23	22	19	21	20	34	28	13	20	12	21	19	50	24	37	0		
2017.TE.1028.1.6	19	27	25	15	21	17	35	16	50	21	17	21	20	27	26	25	25	24	28	32	17	24	16	21	19	50	32	41	18	0	

Tabella 10. Matrice SNPs CC155-A dove in verde sono evidenziati i valori di SNP da 0-5, in arancione i valori da 6-15 e in rosso i valori da 16-30 SNPs.

Il cluster CC155-B è costituito da due ceppi clinici isolati nel 2019 aventi lo stesso cgMLST, e da un ceppo isolato da alimento che dista 11 alleli isolato nel 2018. Dall'analisi degli SNP si è visto che i ceppi umani che presentano un cgMLST indistinguibile, in effetti risultano correlati in quanto presentano solo 5 SNP di differenza. Mentre per quanto riguarda la correlazione di questi ultimi con il ceppo alimentare, la matrice degli SNP indica che sono state rilevate differenze di 36-37 SNP.

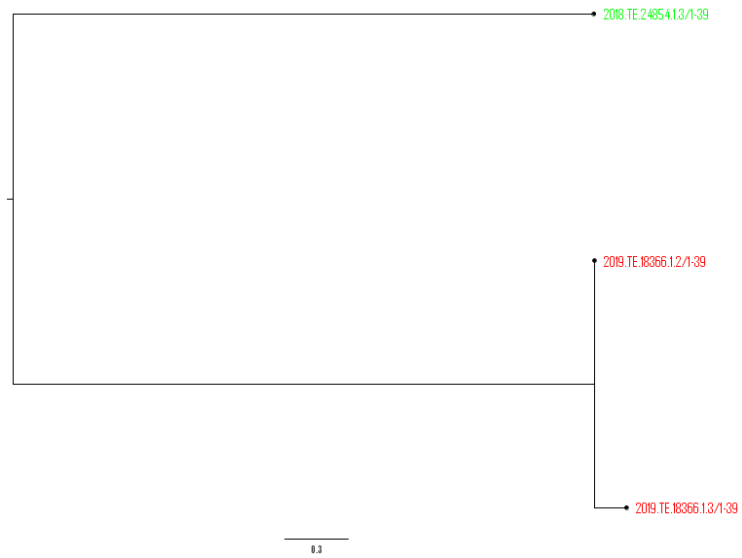


Figura 17. Maximum Likelihood Tree Analisi degli SNPs tra gli isolati appartenenti al CC155-B. in rosso: ceppi clinici, in verde: ceppi alimentari.in nero: ceppi isolati da ambienti di produzione alimentare

	2018.TE.24854.1.3	2019.TE.18366.1.2	2019.TE.18366.1.3
2018.TE.24854.1.3	0		
2019.TE.18366.1.2	36	0	
2019.TE.18366.1.3	37	5	0

Tabella 11. Matrice di SNPs CC155-B dove in verde sono evidenziati i valori di SNP da 0-5, in arancione i valori da 6-15 e in rosso i valori da 16-30 SNPs

Poi vi è il CC155-C dove un ceppo clinico isolato nel 2014 è correlato con un ceppo distante 8 alleli isolato nel 2018 da un tampone ambientale e con 2 ceppi umani, uno isolato nel 2016 e l'altro nel 2015 che hanno una differenza allelica rispettivamente di 9 e 12 rispetto al ceppo clinico isolato nel 2014. Dall'analisi degli SNPs si è visto che il ceppo clinico presenta 27 SNPs di differenza nei confronti del ceppo ambientale e 25 SNPs con il ceppo clinico posto a distanza di 9 alleli, mentre presenta un valore alto di SNPs con il ceppo clinico posto a 12 alleli di distanza.

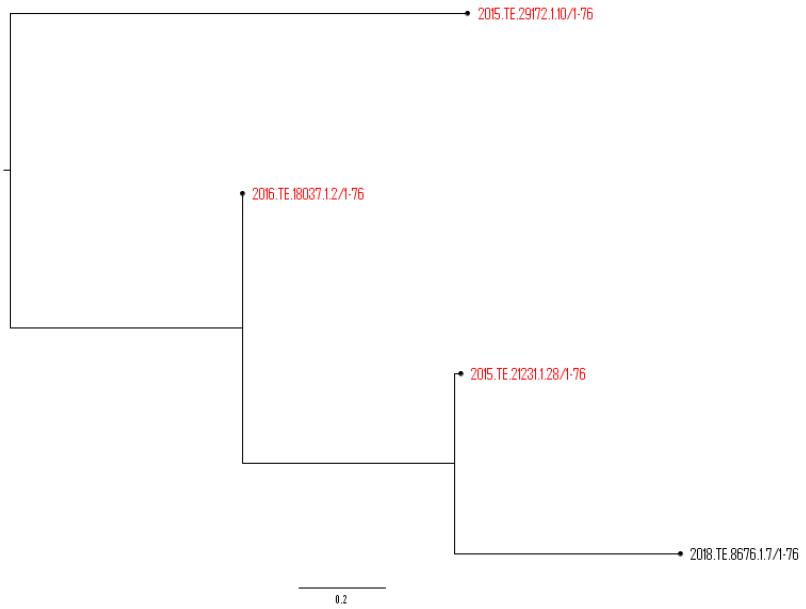


Figura 18. Maximum Likelihood Tree Analisi degli SNPs tra gli isolati appartenenti al CC155-C. in rosso: ceppi clinici, in verde: ceppi alimentari.in nero: ceppi isolati da ambienti di produzione alimentare

	2015.TE.21231.1.28	2015.TE.29172.1.10	2016.TE.18037.1.2	2018.TE.8676.1.7
2015.TE.21231.1.28	0			
2015.TE.29172.1.10	48	0		
2016.TE.18037.1.2	25	41	0	
2018.TE.8676.1.7	27	65	36	0

Tabella 12. Matrice SNP CC155-C dove in verde sono evidenziati i valori di SNP da 0-5, in arancione i valori da 6-15 e in rosso i valori da 16-30 SNPs

9.3. MVLST e geni di virulenza

N° CEPPI	Virulence Type
57	VT136
42	VT179
39	VT91
37	VT45
5	VT74
4	VT163
3	VT162
2	VT192
2	VT63 (ECVI)
2	VT107
1	VT119
1	VT84
1	VT77
1	VT2
1	VT135
1	VT35

Tabella 13 Virulence Type

La tabella 13 si riferisce a 199 ceppi su 201 in quanto 2 ceppi non sono stati assegnati a nessun VT.

Per quanto riguarda i geni di virulenza è stato osservato che la LIPI-1 è integra in 191 isolati su 201 in quanto 10 ceppi sono state riscontrate delle delezioni di nucleotidi a livello del gene actA. La LIPI-3 è stata ritrovata integra in 52/57 ceppi appartenenti al CC1, i restanti 5 ceppi appartenenti a questo CC presentano una LIPI-3 incompleta per la mancanza di uno o due geni. È stata inoltre ritrovata in un ceppo del CC3, in tutti e 4 i ceppi appartenenti al CC6 ed in tutti e 2 i ceppi appartenenti al CC224, infine, sono state riscontrate 2 ulteriori LIPI-3 incomplete appartenenti al CC4.

La LIPI-4 è stata osservata integra solo in un ceppo appartenente al CC517, mentre altri 2 ceppi appartenenti al CC4 presentano delle LIPI-4 incomplete per la mancanza di un gene ciascuno.

Il gene vip è stato maggiormente rilevato nei ceppi appartenenti al CC1 (49/57), al CC2 (41/42), al CC155 (37/37), al CC29 (3/3), al CC4 (2/2), al CC6 (4/4), al CC224 (2/2), al CC3 (1/1), al CC5(2/2), al CC59 (1/1), al CC415 (1/1), al CC14 (2/2), al CC26 (1/1) e al CC19 (1/2). Mentre è stato rilevato solo in 1/39 CC8. Per un totale di 148 ceppi recanti il gene vip su 201 totali.

Il gene inlF è stato riscontrato in 171/201 ceppi esaminati. Nello specifico, è stato osservato in 48 ceppi su 57 appartenenti al CC1, in 27 ceppi su 42 appartenenti al CC2, in 1/1 appartenente al CC3, in 2/2 CC4, in 2/2 CC5, in 2/4 CC6, in tutti i ceppi appartenenti al CC8 (39/39), al CC19 (2/2), al

CC26 (1/1), al CC29 (4/4), al CC59 (1/1), al CC224 (2/2), al CC415 (1/1), al CC517 (1/1) e in 36/37 ceppi appartenenti al CC155 e in 2/3 appartenenti al CC9.

Il gene aut è stato osservato in 92/201 ceppi. In particolare, è stato rilevato in tutti i ceppi appartenenti al CC3 (1/1), al CC5 (2/2), al CC8 (39/39), al CC155 (37/37), al CC9 (3/3), al CC26 (1/1), al CC59 (1/1), al CC224 (2/2), al CC415(1/1), al CC517(1/1) ed al CC19 (2/2), in 1/2 appartenente al CC14, in 1/4 appartenente al CC29

Il gene lapB è stato rilevato in 199/201 ceppi. Nello specifico, non è stato osservato in 2 ceppi appartenenti rispettivamente al CC2 e al CC155.

Infine, è stata osservata la presenza di 3 inlA recanti un PMSC appartenenti a ceppi isolati da casi di listeriosi.

9.4. Resistenza

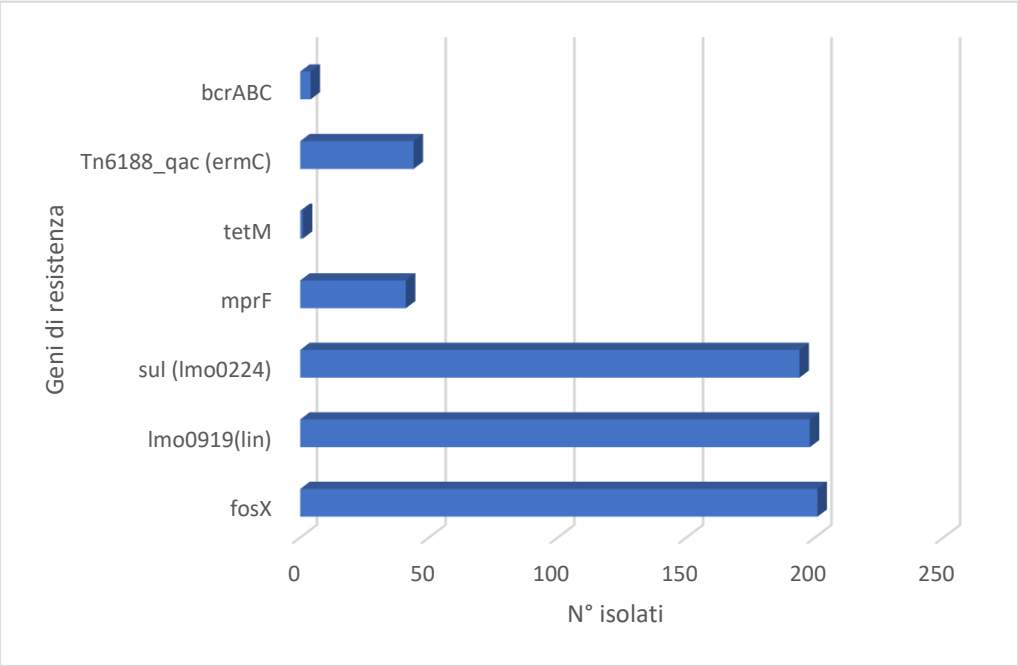


Figura 19 Distribuzione geni di resistenza

Il 100% dei ceppi presenta il gene fosX che conferisce resistenza alla fosfomicina e il gene norB per la resistenza ai chinoloni. Il 98% porta il gene per la resistenza ai lincosamidi. Il 96% è resistente ai sulfamidici. Il 20% porta il gene mprF che conferisce resistenza nei confronti dei peptidi antimicrobici cationici (CAMP).

Infine, un ceppo isolato dal liquor presenta resistenza nei confronti della tetraciclina portando il gene tetM. Il 22% presenta il trasposone Tn6188, mentre solo lo 0.02 % dei ceppi analizzati presenta la cassetta bcrABC responsabili della resistenza al cloruro di benzalconio.

È stata valutata la presenza di Stress Survival Islet-1 (SSI-1) la quale è associata alla crescita di *L. monocytogenes* in condizioni non ottimali, contribuendo alla sopravvivenza delle listerie negli

ambienti di produzione alimentare. La SSI-1 è stata trovata complessivamente in 86 ceppi sui 201 totali. Nello specifico, è stata rilevata in 33/39 ceppi appartenenti al CC8 e in 29/30 ceppi appartenenti al CC155 tutti isolati da alimenti e ambienti. In un isolato appartenente a quest'ultimo CC è stata osservata una SSI-1 incompleta in quanto mancante di un gene. Invece, la SSI-1 non è stata rilevata in nessun ceppo appartenente ai CC1 e CC2. Per quanto riguarda i ceppi isolati da casi clinici, la SSI-1 è stata riscontrata in 22 ceppi su 59. In particolare, di questi 22 ceppi 7 appartengono al CC155, 5 al CC8, 3 al CC9, 2 al CC5, 2 al CC224 ed 1 al CC26, 1 al CC3 e infine 1 al CC517. Anche in questo caso è stata riscontrata la presenza di una SSI-1 incompleta appartenente al CC8. La SSI-2 non è stata rilevata in nessun ceppo. La SSI-2, coinvolta nella risposta allo stress alcalino e ossidativo non è stata riscontrata in nessuno dei 201 ceppi. Inoltre, è stata valutata la presenza del gene inlL, implicato nella formazione del biofilm. Tale gene è stato ritrovato in 48/201 ceppi nello specifico è presente in tutti i ceppi appartenenti al CC155 (37/37), al CC9 (3/3), al CC19 (2/2), al CC26 (1/1), al CC29 (4/4) ed infine è stato anche ritrovato in un ceppo appartenente al CC415 (1/1).

10. DISCUSSIONE

Le analisi effettuate sui 201 ceppi di L. *monocytogenes* isolati nella regione Marche dal 2013 al 2019 hanno rilevato che vi sono 17 CC di cui i maggiori sono il CC1, CC2, CC8 e il CC155, il CC1 è quello maggiormente rappresentato. Al fine di verificare la presenza di correlazioni tra i ceppi isolati da casi clinici e i ceppi isolati da alimenti o ambienti di produzione alimentare e al fine di migliorare la sorveglianza epidemiologica dei casi di listeriosi umana, è stata effettuata un'analisi comparativa dei risultati ottenuti con il cgMLST utilizzando l'analisi degli SNPs, prendendo in esame i CC più rappresentati. Nel cluster CC1-A vi è un ceppo clinico isolato nel 2016 che presenta un identico cgMLST con 12 ceppi isolati da salsicce di cinghiale nello stesso anno ed è stato osservato che questo ceppo clinico presenta 0 SNP di differenza con uno dei 12 ceppi alimentari, questo risultato ci ha quindi permesso di sospettare una attribuzione di sorgente dell'infezione.

Per quanto riguarda gli altri ceppi di quel gruppo è stata rilevata comunque una correlazione con il ceppo clinico con valori di SNPs compresi tra 0 e 24. Infatti, 2 ceppi isolati dalla salsiccia di cinghiale hanno presentano 0 SNPs di differenza. In un altro gruppo di ceppi alimentari distanti 8 alleli dal suddetto gruppo è stata riscontrata anche qui la presenza di 0 SNP tra due ceppi mentre gli altri differiscono per 1-2 SNP e questi differiscono dal gruppo principale per 50-84 SNP confrontati con gli 8 alleli di distanza nel cgMLST.

Sempre in questo cluster abbiamo un ceppo clinico isolato nel 2017 che ha presentato il medesimo cgMLST di un ceppo alimentare isolato nel 2015; in questo caso dall'analisi degli SNP è emerso che il ceppo clinico presentava 14 SNPs di differenza con quello alimentare dunque vi è una correlazione e dovrebbe essere indagata per via del fatto che L. monocytogenes è un batterio che tende a persistere negli ambienti di produzione. Invece, il ceppo clinico che è distante 16 alleli dal gruppo centrale presenta differenze del numero di SNPs che vanno da 89 a 98 e di conseguenza non risultano correlati.

A distanza di 20 alleli dal gruppo centrale vi è un altro gruppo con cgMLST indistinguibile costituito da 3 ceppi clinici, i quali presentano 20-21 SNPs di differenza indicando una moderata correlazione; il numero di SNPs diversi sono elevati rispetto il gruppo principale.

Il cluster CC1-B è costituito da un gruppo di 3 ceppi aventi lo stesso cgMLST di cui 2 umani isolati nel 2015 e 1 ambientale isolato nel 2016, nella matrice degli SNPs i ceppi risultano correlati in quanto presentano 5-7 SNPs di differenza, mentre l'altro ceppo clinico (isolato nel 2018) di questo cluster che nel cgMLST dista 25 alleli dal suddetto gruppo, presenta 18 alleli di differenza con un ceppo isolato nel 2018 da un salame e dall'analisi degli SNPs è emerso che vi sono 81 SNPs di differenza per cui non vi è correlazione.

Per quanto riguarda il CC1-C è stato visto che un ceppo clinico isolato nel 2014 presenta lo stesso profilo cgMLST di un ceppo isolato nel 2016 da un ambiente di produzione alimentare e dalla matrice degli SNPs si è visto che effettivamente sono correlati in quanto si differenziano per soli 5 SNPs, poi il cgMLST ci dice che a distanza di 2 alleli da questi ultimi, vi è un altro ceppo clinico, isolato nel 2019, che dall'analisi degli SNPs presenta 18-19 SNPs di differenza, sempre a 2 alleli distanza vi sono 2 ceppi, uno clinico e l'altro ambientale che presentano lo stesso cgMLST presentano anch'essi 5 SNPs di differenza. Mentre per quanto riguarda il ceppo clinico che dista 30 alleli dal primo gruppo, dall'analisi degli SNPs si è visto che non vi è correlazione in quanto vi sono 90-91 SNPs.

Nel CC1-D abbiamo potuto costatare che vi è un'alta correlazione tra gli isolati che presentano lo stesso cgMLST, mentre per i restanti non vi è correlazione per via degli alti valori di SNPs.

Per quanto riguarda il CC1-E, un ceppo clinico isolato nel 2019 dista 1 allele da un ceppo isolato nel 2016 da un salame e rispettivamente 4 e 25 alleli da 2 ceppi ambientali, isolati sempre nel 2016. Dall'analisi degli SNPs è emerso che il ceppo clinico non risulta correlato con il ceppo di origine alimentare, in quanto si differenziano per 36 SNPs, stesso discorso vale naturalmente anche con i 2 ceppi ambientali dove i valori di SNP sono rispettivamente 47 e 71. Infine, un ceppo clinico appartenente a questo CC1 non ha trovato ceppi correlati nel database del LNR-Lm

Per quanto riguarda il CC2 l'analisi del cgMLST ha interessato 40 ceppi su 42 in quanto 2 ceppi clinici distano dal gruppo centrale, costituito da 21 ceppi alimentari e 9 ambientali aventi lo stesso cgMLST, rispettivamente di 32 e 64 differenze alleliche. I 30 ceppi, isolati dal 2014 al 2016, con cgMLST identico hanno mostrato nell'analisi degli SNPs differenze che vanno da 1-38 SNP, mentre il ceppo alimentare isolato nel 2015 che dista un allele da quest'ultimi ha mostrato 4-27 SNPs di differenza. Il ceppo clinico isolato nel 2016 che nel cgMLST ha mostrato una differenza allelica di 17 con il gruppo dei 30 isolati, nell'analisi di SNPs non è stata rilevata una correlazione per via degli alti valori di SNPs e stessa cosa vale per il ceppo alimentare isolato nel 2014 che dista 22 alleli. Per quanto riguarda invece il gruppo di 7 ceppi con cgMLST identico di cui 2 clinici (uno isolato nel 2016 e l'altro nel 2018) e 7 ambientali (isolati nel 2016), nell'analisi degli SNPs sono stati riscontrati valori che vanno da 10-23.

Per quanto riguarda la clusterizzazione del CC8 effettuata con il cgMLST con un cut-off di 30 alleli vediamo che anche qui ha lasciato fuori 2 ceppi clinici.

Qui vi sono vari gruppi di ceppi che presentano un cgMLST identico, quello più grande è costituito da 14 ceppi ambientali (13 isolati nel 2016 e uno nel 2019) e 5 da alimenti di cui 3 isolati dalla coppa e 2 dalla lonza (tutti isolati nel 2016) e questi presentano complessivamente una correlazione medio-alta (1-13 SNPs). Un ceppo umano (isolato nel 2018) che ha presentato 4 alleli di differenza al cgMLST, con un gruppo di ceppi identico costituito da 2 ceppi isolati nel 2013 da salame e 1 ceppo

isolato da ambiente di produzione nel 2018, nell'analisi degli SNPs non è stata confermata una correlazione genomica. Mediante l'analisi degli SNPs non è stata rilevata correlazione tra il suddetto ceppo clinico e il ceppo ambientale distante di 5 alleli. Mentre per quanto riguarda il gruppo con cgMLST identico costituito da 4 ceppi isolati dal prosciutto crudo e 2 clinici isolati nello stesso anno (2018), si è visto che le differenze di SNPs sono di 5-10 SNPs.

L'analisi del cgMLST ha suddiviso il CC155 in 3 cluster (CC155-A_C) includendo la totalità dei ceppi. Il primo cluster, il CC155-A, è costituito da un gruppo di 28 ceppi di cui 10 (isolati nel 2015 e nel 2016 da salame e carne macinata), 16 ambientali (isolati nel 2016) e 2 clinici (2016) dal profilo cgMLST identico; ad una distanza di 1 allele da questi ultimi vi sono 2 ceppi alimentari che presentano lo stesso profilo allelico.

Dall'analisi degli SNPs è stato osservato che i 28 ceppi presentano vari gradi di correlazione in quanto i valori di SNPs vanno da 7 a 78, in questo caso il rintraccio delle fonti dovrà tenere conto solo dei ceppi più simili. Nello specifico i 2 ceppi clinici si differenziano da quelli alimentari e ambientali per 11-50 SNPs. Una possibile correlazione è stata evidenziata anche con i 2 ceppi alimentari distanti di 1 allele. Nel secondo cluster del CC155_B si osserva una buona correlazione (5 SNPs) tra i 2 ceppi clinici isolati nel 2019 che presentano un cgMLST identico, la correlazione con il ceppo isolato dal salmone affumicato nel 2018, distante 11 alleli da questi ultimi, non è stata confermata in quanto sono stati riscontrati valori di SNPs uguali a 36 e 37.

L'ultimo cluster del CC155_C è costituito da un ceppo clinico centrale isolato nel 2014 che presenta 8 differenze alleliche con un ceppo ambientale isolato nel 2018 e rispettivamente 9 e 12 differenze alleliche con 2 ceppi clinici uno isolato nel 2016 e l'altro nel 2015. L'analisi degli SNPs ha evidenziato una debole correlazione (25 e 27) tra il ceppo clinico centrale e il ceppo ambientale a 8 alleli di distanza e con il ceppo clinico a 9, mentre non è stata evidenziata una correlazione con il ceppo clinico distante 12 alleli.

Tutti i dati ottenuti e appena descritti indicano che l'analisi degli SNPs fornisce elementi di differenziazione maggiori rispetto al cgMLST, in quanto ci permette di confrontare l'intero complesso cromosomico e non solo il core-genome dei ceppi batterici, ci permette quindi di distinguere meglio i clusters e questo punto è di fondamentale importanza per la sorveglianza epidemiologica delle malattie trasmesse dagli alimenti e per la rilevazione precoce di eventuali focolai.

L'analisi MVLST ha rivelato l'esistenza di 16 VT tra cui quello maggiormente rappresentato è il VT136. Per quanto riguarda la virulenza dei 201 ceppi selezionati per il presente lavoro di tesi di laurea abbiamo osservato che la LIPI-3 è presente integralmente in 59 ceppi e di questi, 52 appartengono al CC1; in particolare 24 ceppi sono stati isolati da alimenti RTE, 14 da tamponi

eseguiti in ambienti di produzione alimentare, 9 isolati dal sangue e 5 dal liquido cerebrospinale. al CC6 appartengono 4 ceppi, due isolati da sangue e due dal liquor. Altri due ceppi appartengono al CC224 (uno isolato dal sangue e l'altro dal liquor).

Tutti i ceppi che presentano la LIPI-3 fanno parte di CC che appartengono al Lineage I, infatti, come riportato da Clayton EM et al. (2014), questa isola di patogenicità è presente solo in ceppi di *L. monocytogenes* appartenenti al Lineage I.

La LIPI-4 è presente integralmente solo in un ceppo isolato dal liquor appartenente al CC517. Inoltre, sono state rilevate due LIPI-4 incomplete, per la mancanza di un gene in ciascuna isola, in due ceppi appartenenti al CC4 entrambi isolati dal sangue.

Il gene vip è stato riscontrato nel 91% degli isolati appartenenti al Lineage I e solo nel 52% degli isolati appartenenti al Lineage II, differenza rilevata anche da Nielsen et. Al. (2016).

L'autolisina aut è stata ritrovata nel 95% dei ceppi appartenenti al Lineage II e solo nello 6 % dei ceppi appartenenti al Lineage I, minor presenza riscontrata anche da Møller Nielsen et. al. (2016). Tale risultato è sorprendente dato che il suo ruolo è quello di favorire l'ingresso di L. *monocytogenes* nelle cellule di mammifero non fagocitiche (Cabanes et al., 2004).

Il gene lapB è stato rilevato in 199/201 ceppi, nello specifico non è stato osservato in 2 ceppi appartenenti rispettivamente al CC2 e al CC155 di cui uno isolato da un tampone ambientale e l'atro da un salume.

Il gene inlF è stato rilevato nel 77% di ceppi appartenenti al Lineage I e nell'95% dei ceppi appartenenti al Lineage II, contrariamente a quanto riportato dallo studio effettuato da Møller Nielsen et. Al. (2016) dove inlF non è stato ritrovato in nessun ceppo appartenente al Lineage I.

La presenza di inlA contententi un Premature Stop Codon (PMSC), porta alla produzione di un inlA tronca, che invece di essere ancorata alla parete cellulare batterica, viene secreta. Differenti studi hanno dimostrato che la presenza di inlA recante un PMSC è stata riscontrata maggiormente in ceppi isolati da alimenti rispetto a quelli isolati dall'uomo (Jacquet et al.,2004; Nightingale et al., 2005; Van Stelten and Nightingale, 2008; Van Stelten et al., 2010).

Nel ns studio, sono stati riscontrati tre PMSC in inlA appartenenti solamente a ceppi isolati dal sangue di pazienti affetti da listeriosi di cui solo uno immunocompromesso. Tali ceppi fanno parte del CC9 ed hanno sierotipo 1/2c e questo risultato combacia con quelli ottenuti da (Olier et al., 2003; Jacquet et al., 2004; Kovacevic et al., 2013) i quali hanno osservato che ceppi appartenenti al sierotipo 1/2c sono frequentemente associati con l'inlA troncata. La presenza di un PMSC in inlA è stata correlata ad un'attenuazione della virulenza in uno studio condotto su porcellini d'India (Van Stelten A. et al., 2011) e in una diminuzione dell'invasione in cellule epiteliali intestinali umane Caco-2 (Cruz CD et al., 2014), anche Su et al. (2019) hanno affermato che i ceppi recanti l'inlA con PMSC mostrano una

significativa diminuzione dell'invasione nelle cellule Caco-2 rispetto a ceppi con inlA integra. Inoltre, è stato osservato che 10 ceppi di cui 4 isolati da umani presentano delle delezioni a livello del gene actA.

L'AMR in silico ha evidenziato la presenta di diversi geni codificanti resistenza agli antibiotici e ai detergenti. Il 100% dei ceppi è resistente sia alla fosfomicina sia ai chinoloni e questi dati non sorprendono dato che, come riportato da Morvan A. et al. (2010), le listerie hanno sviluppato una resistenza intrinseca a questi due composti. Il 98% delle listerie isolate presenta il gene di resistenza ai lincosamidi, una classe di antibiotici di cui fanno parte lincomicina e clindamicina.

Il 96% degli isolati presenta resistenza nei confronti dei sulfamidici ed i risultati ottenuti finora combaciano con quelli ottenuti da Kurpas M. et al. (2020) mediante caratterizzazione di ceppi di L. *monocytogenes* isolati da alimenti RTE e da ambienti di produzione alimentare in Polonia.

Inoltre, da questo studio è emerso che il 20% degli isolati presenta il gene di resistenza mprF che conferisce resistenza nei confronti dei CAMP e come riportato da Thedieck K. et al., (2006) i peptidi antimicrobici cationici (CAMP) rappresentano uno dei componenti più efficaci della risposta immunitaria innata dell'ospite e la proteina MprF è necessaria per la lisinilazione dei fosfolipidi nelle membrane delle listerie conferendo resistenza nei confronti dei peptidi antimicrobici cationici (CAMP).

Inoltre, è stato osservato che un ceppo di L. *monocytogenes* isolato da un paziente affetto da listeriosi presenta il gene tetM il quale conferisce resistenza alla tetraciclina. Infine, è stato osservato che il 22% degli isolati presenta il trasposone Tn6188 e che lo 0.02% presenta la cassetta bcrABC i quali conferiscono resistenza nei confronti del cloruro di benzalconio. Nello specifico, il tn6188 è presente in 13/57 ceppi appartenenti al CC1, in 7/42 ceppi appartenenti al CC2 ed in 24/39 ceppi appartenenti al CC8.

Il locus bcrABC è stato riscontrato in 2/37 ceppi appartenenti al CC155 e in 2/3 appartenenti al CC9.

Dall'analisi AMR risulta che i ceppi circolanti nelle Marche dal 2013 al 2019 presentano caratteristiche di multi-resistenti genomica.

Per quanto riguarda la tolleranza allo stress e a condizioni ambientali sfavorevoli è stato osservato che la SSI-1 è presente integralmente nell'88% dei ceppi appartenenti al Lineage II mentre è presente solo nei CC3, CC5, CC224 e CC517 corrispondenti al 5% dei ceppi appartenenti al Lineage I. Questa sovraespressione della SSI-1 nel Lineage II è stata rilevata anche da Møller Nielsen et. Al. (2016). Il gene inlL è stato riscontrato solamente nel 54% dei ceppi appartenenti al Lineage II.

11. CONCLUSIONI

Il sequenziamento dell'intero genoma permette di ottenere una quantità di dati impensabili fino a un decennio fa e rappresenta il metodo di elezione per l'individuazione di cluster tra casi clinici e ceppi isolati nel corso delle attività di sorveglianza da parte delle autorità sanitarie competenti, se utilizzato come strumento di routine per la caratterizzazione dei ceppi di *L. monocytogenes,* es. Real time PCR. Le tecniche di NGS hanno un elevato potere discriminatorio ed è dunque possibile valutare la relazione tra i ceppi batterici isolati, individuare la fonte di contaminazione e seguirne la diffusione.

Probabilmente è un approccio che non può essere utilizzato da solo, in quanto nel corso di una indagine in un focolaio potrebbero essere utili analisi meno costose e più rapide al fine di individuare un sospetto di correlazione tra pazienti e ceppi isolati da alimenti e ambienti di lavorazione. Nel caso di una possibile correlazione potrebbe essere effettuato il sequenziamento che comunque necessita di 5 giorni di lavoro per ottenere una sequenza genomica

Con l'analisi del cgMLST è stato possibile individuare 12 cluster uomo/alimenti/ambienti, 5 nel CC1, 2 nel CC2, 3 nel CC8 e 3 nel CC155; la correlazione tra questi ceppi non è sempre stata confermata dall'analisi del polimorfismo degli SNPs.

Gli aspetti negativi del sequenziamento sono rappresentati dal costo abbastanza elevato delle apparecchiature e dagli elevati costi di esercizio per la manutenzione, anche la disponibilità di fondi per l'esecuzione delle analisi (150 euro per ciascun ceppo) potrebbe essere un fattore limitante. Inoltre, sono necessarie determinate competenze e un'adeguata infrastruttura informatica per lo storage e l'elaborazione dei dati, nonché per l'esecuzione delle analisi bioinformatiche. Per quanto riguarda le criticità riscontrate possiamo dire che la distinzione tra settore medico e veterinario non ha più ragione di essere, è necessario unificare i database per la gestione unica dei risultati delle prove di sequenziamento dell'intero genoma per poter avere accesso a più dati possibili durante le analisi.

L'approccio all'analisi dei genomi non è complicato, si riescono ad utilizzare i dati ottenuti in laboratorio anche non essendo bioinformatici, vi sono diversi tool di bioinformatica che permettono di ricavare svariate informazioni dalle sequenze genomiche, permettendo di caratterizzare al meglio i ceppi batterici, come per esempio la presenza di geni di virulenza o di antibiotico resistenza, oppure se vi sono delle delezioni o dei PMSC, nonché le relazioni filogenetiche tra i vari isolati. I risultati ottenuti permettono di concludere che è possibile definire la similitudine tra ceppi sia con l'analisi del cgMLST che con l'analisi degli SNP, ma quest'ultima è più accurata nell'analizzare le correlazioni tra i ceppi.

La bioinformatica ha preso sempre più piede e molto probabilmente il lavoro dei microbiologi sta già cambiando, ma per migliorare l'efficienza e l'efficacia dei sistemi di sorveglianza epidemiologica è necessario mettere insieme i dati a livello nazionale, europeo o mondiale, per avere più informazioni possibili ed effettuare una sorveglianza epidemiologica più accurata.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Andersen, Jens & Roldgaard, Bent & Christensen, Bjarke & Licht, Tine. (2007). Oxygen restriction increases the infective potential of Listeria monocytogenes in vitro in Caco-2 cells and in vivo in guinea pigs. BMC microbiology. 7. 55. 10.1186/1471-2180-7-55.
2. Barret T.J, Gerner-Smidt P., Swaminathan B. "Interpretation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns in Foodborne Disease Investigations and Surveillance." Foodborne Pathogens and Disease, vol. 3, no. 1, 2006, pp. 20–31., doi:10.1089/fpd.2006.3.20.
3. Benjamin, Felix & Dao, Trinh & Lombard, Bertrand & Asséré, Adrien & Roussel, Sophie. (2012). The Use of Pulsed Field Gel Electrophoresis in Listeria monocytogenes Sub-Typing - Harmonization at the European Union Level. 10.5772/38578.
4. Blackman IC, Frank JF. Growth of Listeria monocytogenes as a Biofilm on Various Food-Processing Surfaces. J Food Prot. 1996 Aug;59(8):827-831. doi: 10.4315/0362-028X-59.8.827. PMID: 31159129.
5. Borucki M. K, Call D.R "Listeria monocytogenes Serotype Identification by PCR." Journal of Clinical Microbiology, vol. 41, no. 12, 2003, pp. 5537–5540, doi:10.1128/jcm.41.12.5537-5540.2003.
6. Bridier A., Briandet R. Thomas & F. Dubois-Brissonnet (2011) Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review, Biofouling, 27:9, 1017-1032, DOI: 10.1080/08927014.2011.626899
7. Brugere-Picoux J., Ovine listeriosis. Small Rumin 2008 https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.12.022
8. Bullitt E., Makowski L. "Structural polymorphism of bacterial adhesion pili", 1995
9. Cabanes, D., Dussurget, O., Dehoux, P., & Cossart, P. (2004). Auto, a surface associated autolysin of Listeria monocytogenes required for entry into eukaryotic cells and virulence. Molecular microbiology, 51(6), 1601–1614. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03945.x
10. Carpentier B, Cerf O. Review--Persistence of Listeria monocytogenes in food industry equipment and premises. Int J Food Microbiol. 2011 Jan 31;145(1):1-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005. Epub 2011 Jan 8. PMID: 21276634.
11. Carriere, C., A. Allardet-Servent, G. Bourg, A. Audurier, M. Ramuz. 1991. DNA polymorphisme in strains of Listeria monocytogenes. J Clin Microbiol 29, 1351-1355.
12. Clayton, E. M., Daly, K. M., Guinane, C. M., Hill, C., Cotter, P. D., & Ross, P. R. (2014). Atypical Listeria innocua strains possess an intact LIPI-3. *BMC microbiology*, *14*, 58. https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-58
13. Cruz CD, Pitman AR, Harrow SA, Fletcher GC. Listeria monocytogenes associated with New Zealand seafood production and clinical cases: unique sequence types, truncated InlA, and attenuated invasiveness. Appl Environ Microbiol. 2014;80:1489–97
14. Cruz, C. D., Pitman, A. R., Harrow, S. A., & Fletcher, G. C. (2014). Listeria monocytogenes associated with New Zealand seafood production and clinical cases: unique sequence types, truncated InlA, and attenuated invasiveness. *Applied and environmental microbiology*, *80*(4), 1489–1497. https://doi.org/10.1128/AEM.03305-13
15. Domínguez-Bernal, G., Müller-Altrock, S., González-Zorn, B., Scortti, M., Herrmann, P., Monzó, H. J., Lacharme, L., Kreft, J., & Vázquez-Boland, J. A. (2006). A spontaneous

genomic deletion in Listeria ivanovii identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins. *Molecular microbiology*, *59*(2), 415–432. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04955.x

16. Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major Listeria monocytogenes serovars by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, *42*(8), 3819–3822. https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004
17. Doyle M. E., " Virulence Characteristics of Listeria monocytogenes, (2001) Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison.
18. Dutta, V., Elhanafi, D., & Kathariou, S. (2013). Conservation and distribution of the benzalkonium chloride resistance cassette bcrABC in Listeria monocytogenes. Applied and environmental microbiology, 79(19), 6067–6074. https://doi.org/10.1128/AEM.01751-13
19. Flemming, Hans-Curt & Wingender, Jost. (2010). The Biofilm Matrix. Nature reviews. Microbiology. 8. 623-33. 10.1038/nrmicro2415.
20. Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., & Cossart, P. (1991). Entry of L. monocytogenes into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*, *65*(7), 1127–1141. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90009-n
21. Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., & Cossart, P. (1991). Entry of L. monocytogenes into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*, *65*(7), 1127–1141. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90009-n
22. Gaillot, Olivier & Pellegrini, Elisabeth & Bregenholt, Søren & Nair, Shamila & Berche, Patrick. (2000). The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of Listeria monocytogenes. Molecular microbiology. 35. 1286-94. 10.1046/j.1365-2958.2000.01773.x.
23. Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G. J., Kačániová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., & Simões, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*, *6*, 841. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841
24. Gründling, A., Burrack, L. S., Bouwer, H. G., & Higgins, D. E. (2004). Listeria monocytogenes regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(33), 12318–12323. https://doi.org/10.1073/pnas.0404924101
25. Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M. F., Bielecka, M. K., Scortti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez-Boland, J., Lortholary, O., & Lecuit, M. (2010). Human listeriosis caused by Listeria ivanovii. *Emerging infectious diseases*, *16*(1), 136–138. https://doi.org/10.3201/eid1601.091155
26. Haneklaus, A.N., Harris, K.B., Cuervo, M.P., Ilhak, O.I., Lucia, L.M., Castillo, A., Hardin, M.D., Osburn, W.N., Savell, J.W., 2011. Evaluation of additional cooking procedures to achieve lethality microbiological performance standards for large, intact meat products. J. Food Prot. 74, 1741–1745
27. Heir E.,Liland K.H, Carlehög M., Holcka A.L. "Reduction and inhibition of Listeria monocytogenes in cold-smoked salmon by Verdad N6, a buffered vinegar fermentate, and UV-C treatments", (2019) https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.026
28. ILSI Research Foundation, & Risk Science Institute (2005). Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis--a risk-based approach. *Journal of food protection*, *68*(9), 1932–1994. https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.9.1932

29. Jacquet C., Doumith M., Gordon J.I., Martin P.M.V., Cossart P., Lecuit M. (2004). A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne Listeria monocytogenes. J. Infect. Dis. 189, 2095-2100.
30. Kanki, Masashi & Naruse, Hisayo & Taguchi, Masumi & Kumeda, Yuko. (2015). Characterization of specific alleles in InlA and PrfA of Listeria monocytogenes isolated from foods in Osaka, Japan and their ability to invade Caco-2 cells. International Journal of Food Microbiology. 211. 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.023.
31. Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., & Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *3*(4), a010306. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010306
32. Kovacevic J., Arguedas-Villa C., Wozniak A., Tasara T., Allen K.J. (2013). Examination of food chain-derived Listeria monocytogenes strains of different serotypes reveals considerable diversity in inlA genotypes, mutability, and adaptation to cold temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 79, 1915-1922.
33. Kuhn and Goebel, 1999. Pathogenesis of L. monocytogenes, p. 97–130. In Ryser ET and Marth EH (eds.), Listeria, Listeriosis, and Food Safety. New York).
34. Kurpas, M., Osek, J., Moura, A., Leclercq, A., Lecuit, M., & Wieczorek, K. (2020). Genomic Characterization of Listeria monocytogenes Isolated From Ready-to-Eat Meat and Meat Processing Environments in Poland. Frontiers in microbiology, 11, 1412. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01412
35. Lado B, Yousef AE (2007) Characteristics of Listeria monocytogenes important to food processors. Ch 6 In: Ryser ET, Marth EH (eds) Listeria, listeriosis and food safety. 3rd ed, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, p. 157–213
36. Leclercq A., Charlier C., Lecuit M. "Global Burden of Listeriosis: The Tip of the Iceberg." The Lancet Infectious Diseases, vol. 14, no. 11, 2014, pp. 1027–1028., doi: 10.1016/s1473-3099(14)70903-x
37. Lee, B. H., Hébraud, M., & Bernardi, T. (2017). Increased Adhesion of Listeria monocytogenes Strains to Abiotic Surfaces under Cold Stress. Frontiers in microbiology, 8, 2221. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02221
38. Lemon, K. P., Higgins, D. E., & Kolter, R. (2007). Flagellar motility is critical for Listeria monocytogenes biofilm formation. *Journal of bacteriology*, *189*(12), 4418–4424. https://doi.org/10.1128/JB.01967-06
39. Lewis K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. Biochemistry. Biokhimiia, 70(2), 267–274. https://doi.org/10.1007/s10541-005-0111-6
40. Li, Y. H., & Tian, X. (2012). Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. Sensors (Basel, Switzerland), 12(3), 2519–2538. https://doi.org/10.3390/s120302519
41. Liu, Dongyou. (2008). Handbook of Listeria Monocytogenes. 10.1201/9781420051414.ch2.
42. Malley, T. J., Butts, J., & Wiedmann, M. (2015). Seek and destroy process: Listeria monocytogenes process controls in the ready-to-eat meat and poultry industry. *Journal of food protection*, *78*(2), 436–445. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-507
43. Manso B., Melero B., Stessl B., Fernandez-Natal I., Jaime, Hernández, M., Wagner M., Rovira J. Rodriguez-Lazaro D. (2019). Characterization of Virulence and Persistence Abilities of Listeria monocytogenes Strains Isolated from Food Processing Premises. Journal of Food Protection. 82. 1922-1930. 10.4315/0362-028X.JFP-19-109.

44. Martins, Mariana & Custódio, Rafael & Camejo, Ana & Almeida, Maria & Cabanes, Didier & Sousa, Sandra. (2012). Listeria monocytogenes Triggers the Cell Surface Expression of Gp96 Protein and Interacts with Its N Terminus to Support Cellular Infection. The Journal of biological chemistry. 287. 10.1074/jbc.M112.422568.
45. Maury, M. M., Tsai, Y. H., Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francisque, V., Leclercq, A., et al. (2016). Uncovering Listeria monocytogenes hypervirulence by harnessing its biodiversity. Nat. Genet. 48, 308–313. doi: 10.1038/ng.3501
46. Møller Nielsen E, Björkman J., Kiil K, Grant K., Dallman T., Painset A, Amar C., Roussel S., Guillier L. Benjamin F., Rotariu, O., Pérez-Reche F., Forbes K., Strachan N.. (2017). Closing gaps for performing a risk assessment on Listeria monocytogenes in ready-to-eat (RTE) foods: activity 3, the comparison of isolates from different compartments along the food chain, and from humans using whole genome sequencing (WGS) analysis. EFSA Supporting Publications. 14. 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1151.
47. Moorhead, S. M., and Dykes, G. A. (2004). Influence of the sigB gene on the cold stress survival and subsequent recovery of two Listeria monocytogenes serotypes. Int. J. Food Microbiol. 91, 63–72. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00332-5
48. Morvan A., Moubareck C., Leclercq A., Herve-Bazin M., Bremont S., Lecuit M., Courvalin P., Le Monnier A. (2010). Antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes strains isolated from humans in France. Antimicrob Agents Chemother, 54: 2728-2731
49. Müller, Anneliese & Rychli, Kathrin & Zaiser, Andreas & Wieser, Cornelia & Wagner, Martin & Schmitz-Esser, Stephan. (2014). The Listeria monocytogenes transposon Tn6188 provides increased tolerance to various quaternary ammonium compounds and ethidium bromide. FEMS Microbiology Letters. 361. 10.1111/1574-6968.12626.
50. Nei, M., Kumar, S., 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press.
51. Nightingale K.K., Windham K., Martin K.E., Yeung M., Wiedmann M. (2005). Select Listeria monocytogenes subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in inlA, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. Appl. Environ. Microbiol. 71, 8764-8772.
52. Nightingale, K. K., Windham, K., Martin, K. E., Yeung, M., & Wiedmann, M. (2005). Select Listeria monocytogenes subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in inlA, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. *Applied and environmental microbiology*, *71*(12), 8764–8772. https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8764-8772.2005
53. Olier M., Piere F., Rousseaux S., Lemaître J.P., Rousset A., Piveteau P., Guzzo J. (2003). Expression of truncated internalin A is involved in impaired internalization of some Listeria monocytogenes isolates carried asymptomatically by humans. Infect. Immun. 71, 1217-1224.
54. Orsi, R.H., Wiedmann, M. Characteristics and distribution of Listeria spp., including Listeria species newly described since 2009. Appl Microbiol Biotechnol 100, 5273–5287 (2016). https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2
55. Pallab Ghosh, Elizabeth M. Halvorsen, Dustin A. Ammendolia, Nirit Mor-Vaknin, Mary X. D. O'Riordan, John H. Brumell, David M. Markovitz, Darren E. 2018 Higgins Invasion of the Brain by Listeria monocytogenes Is Mediated by InlF and Host Cell Vimentin doi: 10.1128/mBio.00160-18
56. Peel, M., W. Donachie, and A. Shaw. 1988. Temperature-dependent expression of flagella of Listeria monocytogenes studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. J. Gen. Microbiol. 134:2171-2178.

57. Popowska, M., Krawczyk-Balska, A., Ostrowski, R., & Desvaux, M. (2017). InlL from Listeria monocytogenes Is Involved in Biofilm Formation and Adhesion to Mucin. Frontiers in microbiology, 8, 660. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00660
58. Reis, O., Sousa, S., Camejo, A., Villiers, V., Gouin, E., Cossart, P., & Cabanes, D. (2010). LapB, a novel Listeria monocytogenes LPXTG surface adhesin, required for entry into eukaryotic cells and virulence. The Journal of infectious diseases, 202(4), 551–562. https://doi.org/10.1086/654880
59. Reis-Teixeira, F., Alves, V. F., & de Martinis, E. (2017). Growth, viability and architecture of biofilms of Listeria monocytogenes formed on abiotic surfaces. Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 48(3), 587–591. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.004
60. Renner, L. D., & Weibel, D. B. (2011). Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS bulletin*, *36*(5), 347–355. https://doi.org/10.1557/mrs.2011.65
61. Riley, L.W., 2004 Molecular epidemiology of infectious diseases: Principles and practices, ASM Press, Washington, D.C.
62. Rouquette, C., de Chastellier, C., Nair, S. & Berche, P. (1998). The ClpC ATPase of Listeria monocytogenes is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. Mol Microbiol 27, 1235-1245.
63. Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2(11), a012427. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427
64. Ryan S., Begley M., Hill C., Gahan C. G.M. (2010) A five-gene stress survival islet (SSI-1) that contributes to the growth of Listeria monocytogenes in suboptimal conditions. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04726.x
65. Seeliger et al. “Chapter II Serotyping of Listeria monocytogenes and Related Species.” Methods in Microbiology, 1979, pp. 31–49., doi:10.1016/s0580-9517(08)70372-6.
66. Smith GA, Marquis H, Jones S, et al. The two distinct phospholipases C of Listeria monocytogenes have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. Infection and Immunity. 1995 Nov;63(11):4231-4237. DOI: 10.1128/iai.63.11.4231-4237.1995
67. Smith, A., Hearn, J., Taylor, C., Wheelhouse, N., Kaczmarek, M., Moorhouse, E., & Singleton, I. (2019). Listeria monocytogenes isolates from ready to eat plant produce are diverse and have virulence potential. *International journal of food microbiology*, *299*, 23–32. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.013
68. Tavares, R. M., Silva, D., Camargo, A. C., Yamatogi, R. S., & Nero, L. A. (2020). Interference of the acid stress on the expression of llsX by Listeria monocytogenes pathogenic island 3 (LIPI-3) variants. Food research international (Ottawa, Ont.), 132, 109063. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109063
69. Thedieck, K., Hain, T., Mohamed, W., Tindall, B. J., Nimtz, M., Chakraborty, T., Wehland, J., & Jänsch, L. (2006). The MprF protein is required for lysinylation of phospholipids in listerial membranes and confers resistance to cationic antimicrobial peptides (CAMPs) on Listeria monocytogenes. Molecular microbiology, 62(5), 1325–1339. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05452.x
70. Travier, L., & Lecuit, M. (2014). Listeria monocytogenes ActA: a new function for a 'classic' virulence factor. *Current opinion in microbiology*, *17*, 53–60. https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.007

71. Van Stelten A, Simpson JM, Chen Y, Scott VN, Whiting RC, Ross WH, Nightingale KK. Signifcant shift in median guinea pig infectious dose shown by an outbreak-associated Listeria monocytogenes epidemic clone strain and a strain carrying a premature stop codon mutation in inlA. Appl Environ Microbiol. 2011; 77:2479–87.
72. Van Stelten A., Nightingale K.K. (2008). Development and implementation of a multiplex single-nucleotide polymorphism genotyping assay for detection of virulence-attenuating mutations in the Listeria monocytogenes virulence-associated gene inlA. Appl. Environ. Microbiol. 74, 7365- 7375.
73. Van Stelten A., Simpson J.M., Ward T.J., Nightingale K.K. (2010). Revelation by single-nucleotide polymorphism genotyping that mutations leading to a premature stop codon in inlA are common among Listeria monocytogenes isolates from ready-to-eat foods but not human listeriosis cases. Appl. Environ. Microbiol. 76, 2783-2790.
74. Van Stelten, A., Simpson, J. M., Ward, T. J., & Nightingale, K. K. (2010). Revelation by single-nucleotide polymorphism genotyping that mutations leading to a premature stop codon in inlA are common among Listeria monocytogenes isolates from ready-to-eat foods but not human listeriosis cases. Applied and environmental microbiology, 76(9), 2783–2790. https://doi.org/10.1128/AEM.02651-09
75. Vázquez-Boland, J. A., Domínguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft, J., & Goebel, W. (2001). Pathogenicity islands and virulence evolution in Listeria. *Microbes and infection*, *3*(7), 571–584. https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01413-7
76. Vijai Kumar Gupta et al., "The Handbook of Microbial Bioresources", 2016
77. Vivant, A. L., Garmyn, D., & Piveteau, P. (2013). Listeria monocytogenes, a down-to-earth pathogen. Frontiers in cellular and infection microbiology, 3, 87. https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00087
78. Xihong Zhao, Fenghuan Zhao, Jun Wangb e Nanjing Zhongc (2017) Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. https://doi.org/10.1039/C7RA02497E
79. Yung-Hua Li, Xiaolin Tian "Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms", 2012
80. Zeng, W., Vorst, K., Brown, W., Marks, B.P., Jeong, S., Perez-Rodríguez, F., et al., 2014. Growth of Escherichia coli O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in packaged fresh-cut romaine mix at fluctuating temperatures during commercial transport, retail storage, and display. Journal of Food Protection, 77, 97-206.
81. Zhang, Q., Feng, Y., Deng, L., Feng, F., Wang, L., Zhou, Q., et al. (2011). SigB plays a major role in Listeria monocytogenes tolerance to bile stress. Int. J. Food Microbiol. 145, 238–243. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.028
82. Zhang, Y., Dong, S., Chen, H., Chen, J., Zhang, J., Zhang, Z., Yang, Y., Xu, Z., Zhan, L., & Mei, L. (2019). Prevalence, Genotypic Characteristics and Antibiotic Resistance of Listeria monocytogenes From Retail Foods in Bulk in Zhejiang Province, China. Frontiers in microbiology, 10, 1710. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01710.