Analisi esplorativa dei pattern di virulenza di *Listeria monocytogenes* in isolati umani e alimentari

Russini Valeria[1,2], Palla Luigi[2], Annarita Vestri[2], Sampieri Cinzia[1], Rossi Agnese[1], De Santis Paola[1], Varcasia Bianca Maria[1], Chiaverini Alexandra[3], Gattuso Antonietta[4], Gasperetti Laura[5], Roberto Condoleo[6], De Marchis Maria Laura[1], Bossù Teresa[1]

1- *UOC Microbiologia degli Alimenti, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Roma, Italia*
2- *Scuola di Specializzazione in Statistica Sanitaria e Biometria, Dipartimento di Salute pubblica e malattie infettive, Università Sapienza, Roma, Italia*
3- *Laboratorio Nazionale di Riferimento per Listeria monocytogenes, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale, Teramo, Italia*
4- *Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia*
5- *UOT Toscana Nord, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Pisa, Italia*
6- *UOC Osservatorio Epidemiologico, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Roma, Italia*

Introduzione

Listeria monocytogenes è l'agente eziologico della listeriosi, malattia zoonotica causata dal consumo di alimenti contaminati di origine animale e vegetale. È la zoonosi con la più alta mortalità in EU e colpisce donne in gravidanza, anziani e pazienti immunocompromessi [1]. Il genoma del patogeno è ben caratterizzato ed è disponibile lo schema di riferimento per l'identificazione dei geni fondamentali (ST e cgMLST), di virulenza, di resistenza allo stress, e agli antibiotici [2,3]. Il progetto europeo LiSEQ [4] ha evidenziato come la distribuzione dei complessi clonali e ST isolati dagli alimenti non si sovrappone con la distribuzione degli isolati da casi clinici umani [5]. Questo dato evidenzia come il rischio di listeriosi possa essere differenziato su base genomica. La combinazione dei determinanti di virulenza potrebbe giocare un ruolo importante per favorire l'infezione.

Tra i geni coinvolti nella virulenza di *L. monocytogenes* troviamo quelli associati alla capacità di aderire, invadere e sopravvivere all'interno delle cellule ospite umane, come il gene *inlA* che codifica la proteina internalina A, essenziale per l'adesione del batterio. Uno studio [6] ha evidenziato come la presenza di mutazioni che introducono un codone di stop prematuro nella traduzione della proteina sia molto frequente nei ceppi alimentari e molto rara nei ceppi isolati da casi clinici. Questo dato suggerisce come la presenza di specifici determinanti genetici sia fondamentale, ma non del tutto chiarita, nello sviluppo delle infezioni, e una complessa interazione di diversi fattori genomici che governano l'insorgenza della malattia.

Obiettivi

Gli attuali criteri di sicurezza alimentare (Reg UE 2073/2005) regolano la presenza di *L. monocytogenes* negli alimenti pronti al consumo come assente in 25g o <100 ufc/g in alimenti che costituiscono terreno favorevole o non favorevole alla crescita. La patogenicità del batterio in base alle caratteristiche genotipiche potrebbe portare ad una diversa valutazione del rischio di listeriosi. Questo studio vuole esplorare quali caratteristiche siano peculiari e strettamente correlate agli isolati responsabili di listeriosi. È stata quindi effettuata un'analisi esplorativa delle componenti principali (CP) basata sulla presenza/assenza dei 92 geni di virulenza noti, per identificare similarità e differenze nei pattern ed eventuali relazioni con la virulenza tra ceppi di origine umana e di origine alimentare/ambientale.

Metodi

Il dataset è composto da 646 ceppi isolati da matrici alimentari/ambientali (2011-2023) e da 312 ceppi isolati da pazienti (2018-2023), collezionati presso i laboratori regionali della UOC Microbiologia degli Alimenti (CREP, LRPTAU) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana. I campioni umani e alimentari raccolti solo in pochi casi appartengono allo stesso focolaio.

L'intero genoma dei ceppi è stato sequenziato con metodologia NGS. Il genoma è stato ricostruito (Spades [7]) a partire dalle rawreads filtrate per qualità (Trimmomatic [8]). Il dataset Listeria PasteurMLST è stato usato come riferimento per i 92 geni di virulenza [9,10]. La ricerca dei geni è stata eseguita con il tool Blast [11]. È stata creata una matrice di presenza/assenza (0/1) dei 92 geni. È stata inoltre aggiunta una variabile legata all'integrità del gene *inlA* (1=integro, 0=non integro).

È stata effettuata un'analisi esplorativa delle componenti principali (con matrice di correlazione) con STATA SE 18, seguendo due approcci. Nel primo approccio (I) sono state inizialmente calcolate le componenti principali (CP) considerando solo i campioni di origine umana, poi i campioni umani e alimentari sono stati proiettati sulle componenti così ottenute. Nel secondo approccio (II), la PCA è stata eseguita direttamente sull'intero dataset. Sono state considerate le prime CP secondo la Regola di Kaiser (Eigenvalue ≥ 1) e l'osservazione dello screeplot.

Risultati

(I): le CP estratte sono state 28 su 93 (le CP con varianza 0 sono state eliminate). Le CP con Eigenvalue>1 sono risultate 7 e spiegano circa il 96% della variabilità complessiva della presenza dei geni nei campioni umani. Calcolati gli score di tutti i campioni, gli scoreplot delle maggiori CP non hanno mostrato chiari pattern di separazione dei campioni per origine del ceppo, eccetto la CP3. Nei plot CP3 vs CP1, CP2 e CP4 sono presenti aree di non sovrapposizione tra campioni di origine alimentare (VET) e di origine umana (UM) (Figura 1). Le variabili di maggior peso nella CP3 sono quelle legate al gene *inlD* e all'integrità del gene *inlA* (coefficiente dell'autovettore>0.5).

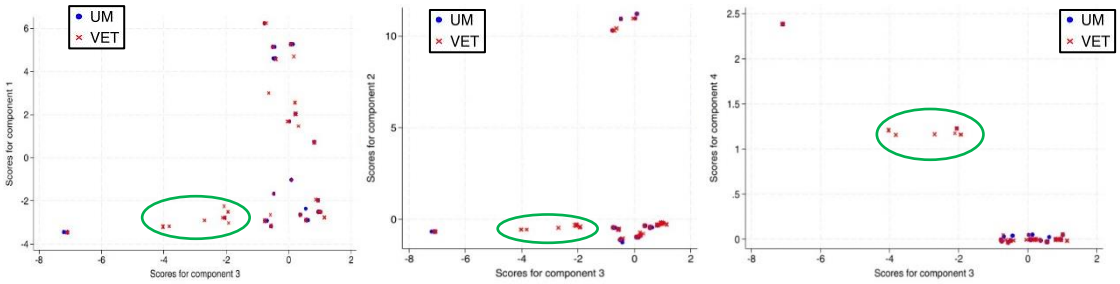

Figura 1. Scoreplot CP3 vs CP1, CP2 e CP4. È evidenziata l'area di non sovrapposizione tra i campioni di diversa origine (UM: origine umana; VET: origine alimentare)

(II): le CP estratte sono state 35 su 93. Le CP con Eigenvalue>1 sono risultate 9, con un totale complessivo di circa il 92% di variabilità spiegata. In questo caso gli scoreplot delle maggiori componenti non hanno evidenziato pattern di separazione tra i ceppi.

La variabile dell'integrità del gene *inlA* ha mostrato un peso maggiore nelle CP3, 4 e 5 (I) e nelle CP 4, 7 e 8 (II) (valore assoluto di coefficiente di autovettore>0,2). I geni appartenenti a due gruppi, LIPI3 e LIPI4, sembrano essere associati tra loro e avere peso elevato nelle CP 1, 2 e 6 (I) e nelle CP1, 2, 4 (II).

Conclusioni

L'analisi ha individuato un gruppo di campioni di origine alimentare con caratteristiche peculiari, non sovrapponibili a quelli di origine umana. La CP discriminante ha evidenziato l'importanza della presenza dei geni *inlD* e *inlA* in versione integra, legati all'adesione e invasione. Sono necessari ulteriori studi per identificare altri fattori implicati nella differente virulenza di *L. monocytogenes*, includendo variabili come il Sequence Type e la matrice di origine.

Bibliografia

1. *European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. EFSA Journal, 2023; 21*
2. *Moura A., Tourdjman M., Leclercq A. et al., Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of Listeria monocytogenes. Emerg Infect Dis, 2017; 23:1462–1470*
3. *Moura A., Criscuolo A., Pouseele H. et al., Whole Genome-Based Population Biology and Epidemiological Surveillance of Listeria monocytogenes. Nat Microbiol, 2016; 2:16185*
4. *Painset A., Björkman J.T., Kiil K. et al., Liseq – Whole-Genome Sequencing of a Cross-Sectional Survey of Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Foods and Human Clinical Cases in Europe. Microb Genom, 2019; 5:e000257*
5. *Nielsen E.M., Björkman J.T., Kiil K. et al., 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, 2017; 14:1151E*
6. *Magagna G., Gori M., Russini V. et al., Evaluation of the Virulence Potential of Listeria monocytogenes through the Characterization of the Truncated Forms of Internalin A. Int J Mol Sci, 2023; 24*
7. *Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al., SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. J Comput Biol, 2012: 19:455–477*
8. *Bolger A.M., Lohse M., Usadel B., Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. Bioinformatics, 2014; 30:2114–2120*
9. *Jolley K.A., Maiden M.C.J., BIGSdb: Scalable Analysis of Bacterial Genome Variation at the Population Level. BMC Bioinformatics, 2010; 11*
10. *Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J., Open-Access Bacterial Population Genomics: BIGSdb Software the PubMLST.Org Website and Their Applications. Wellcome Open Res, 2018; 3*
11. *Camacho C., Coulouris G., Avagyan V. et al., BLAST+: Architecture and Applications. BMC Bioinformatics, 2009; 10:421*