



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI TERAMO

**P.O.R. ABRUZZO – OBIETTIVO 3 PER IL 2000/2006**  
**PROTOCOLLO DI INTESA TRA REGIONE ABRUZZO,**  
**COMITATO DI COORDINAMENTO REGIONALE DELLE UNIVERSITÀ ABRUZZESI**  
**E**  
**UFFICIO SCOLASTICO REGIONALE**  
**PER L'ATTUAZIONE DEL MACROPROGETTO**  
**INNOVAZIONE, COMPETITIVITÀ, GOVERNANCE**  
**(PROGETTO REGIONALE FORMAZIONE TECNICO SCIENTIFICA**  
**E**  
**PROGETTO IN\_CO: AZIONI INTEGRATE PER LO SVILUPPO DI**  
**“INTERMEDIARI DELLA CONOSCENZA TECNOLOGICA, ORGANIZZATIVA E GESTIONALE”)**  
**“ASSEGNI REGIONALI PER ATTIVITÀ DI RICERCA E ALTA FORMAZIONE “ IN MATERIE TECNICO**  
**SCIENTIFICHE, INTERVENTO IC4E – SOTTO - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO-**

**Relazione Attività periodo Gennaio- Giugno 2007**

**ASSEGNISTA DI RICERCA**

Vincenzo D'Orio.

**TUTOR / RESPONSABILE SCIENTIFICO:**

Prof ssa Giovanna Suzzi

**NOMINATIVO DELLA ISTITUZIONE ITALIANA A CUI AFFERISCE IL  
LABORATORIO OSPITANTE:**

Università degli Studi di Parma – Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti – Sezione Sicurezza degli Alimenti. Laboratorio ospitante certificato EFSA (European Food Safety Authority).

**Nome e qualifica del responsabile del laboratorio ospitante:**

Adriana Ianieri – Professore Ordinario. (S.S.D. Vet/04 “Ispezione degli Alimenti di Origine Animale”)

**DURATA DEL SOGGIORNO NEL LABORATORIO OSPITANTE:**

Annuale.

**Fattori di patogenicità di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolata da matrici alimentari e da ambienti di produzione: caratterizzazione genotipica e sierologia  
(Relazione in itinere)**

- Periodo: Gennaio – Giugno 2007
- Nominativo del candidato: Vincenzo D’Orio.
- Nominativo della istituzione italiana a cui afferisce il laboratorio ospitante: Università degli Studi di Parma – Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti – Sezione Sicurezza degli Alimenti. Laboratorio ospitante certificato EFSA (European Food Safety Authority).
- Nominativo e qualifica del responsabile del laboratorio ospitante: Adriana Ianieri – Professore Ordinario. (S.S.D. Vet/04 “Ispezione degli Alimenti di Origine Animale”)
- **INTRODUZIONE.** In questi ultimi anni *Listeria monocytogenes* si è configurata come un importante problema di salute pubblica che riconosce tra i potenziali serbatoi di contagio per l’uomo, gli alimenti d’origine animale. Molti alimenti di origine animale, infatti, sono risultati coinvolti sia in focolai epidemici sia in casi sporadici di patologia conclamata (Roche *et al.*, 2001; Gray *et al.*, 2004; Milohanic *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2004). L’incidenza della listeriosi nell’uomo è bassa, tuttavia, la grande attenzione rivolta nei confronti di questo microrganismo è giustificata dalla gravità della malattia caratterizzata da un elevato tasso di mortalità che oscilla intorno al 20-30% (Jacquet *et al.*, 2002; Doumith *et al.*, 2004). Allo stato attuale delle conoscenze è importante sottolineare che la potenziale valenza patologica di *Listeria monocytogenes* non è univoca ma varia da ceppo a ceppo in funzione della presenza di specifici fattori di virulenza. La virulenza di *L. monocytogenes* è correlata alla sua capacità di aderire, invadere e moltiplicare all’interno della cellula ospite e specifiche proteine di superficie sono implicate in questo processo. L’Ami, l’adesina legante la fibronectina e la LAP sono responsabili dell’adesione; l’internalina A, l’internalina B e la proteina p60 sono necessarie per l’invasione intracellulare; Act A è necessaria per la motilità e la diffusione cellulare; l’emolisina, la fosfolipasi A e la fosfolipasi B sono responsabili della distruzione della membrana fagosomiale con conseguente liberazione del microrganismo all’interno del citoplasma della cellula ospite (Gaillard *et al.*, 1987; Vasquez-Boland *et al.*, 2001; Jaradat *et al.*, 2003). La comprensione della patogenesi di questo microrganismo richiede, quindi, il rilevamento e l’identificazione dei geni che codificano per queste proteine. Inoltre, questi dati dovrebbero essere visti alla luce di altre caratteristiche dei ceppi quali ad esempio il sierotipo di appartenenza. Dei tredici sierotipi identificati, infatti, solo 3 (1/2a, 1/2b e 4b) sono associati con la maggior parte dei casi clinici nell’uomo, mentre il sierotipo 4b è quello più frequentemente isolato da focolai epidemici (Jacquet *et al.*, 2002; Doumith *et al.*, 2004). L’applicazione di tecniche molecolari e, in particolare, della reazione polimerasica a catena (PCR) permette di ottenere questi dati in tempi rapidi e riduce i costi delle analisi (Gasnov *et al.*, 2005). Nella prima fase del progetto di ricerca sono stati isolati ed identificati ceppi di *Listeria monocytogenes* da varie matrici alimentari e dagli ambienti di lavorazione di tali alimenti. Si è proceduto, quindi, alla sierotipizzazione e all’estrazione del DNA dai suddetti ceppi.
- **MATERIALI E METODI.** Sono stati condotti sopralluoghi in 26 industrie alimentari per la lavorazione e trasformazione di prodotti carnei carnei (carne bovina, suina ed avicola) ed ittici (salmone, orata). Sono stati effettuati prelievi sia dalle matrici alimentari a diverso stadio di

lavorazione (materia prima, semilavorato e prodotto finito) che dalle superfici, utensili ed attrezzature utilizzate per la lavorazione degli alimenti, per un totale di 741 campioni.

**Isolamento ed identificazione.** I campioni sono stati sottoposti ad analisi microbiologica per la ricerca di *Listeria monocytogenes* secondo la metodica UNI EN ISO 11290-1.

45 ceppi sono stati identificati come *Listeria monocytogenes*, 28 isolati da matrici carnee e dai relativi ambienti di lavorazione, 17 isolati da prodotti ittici e dai relativi ambienti. Sono stati, inoltre, saggiati 6 ceppi di riferimento (ATCC 7644, 15313, 19111, 19114, 19115 e NCTC 11994) per un totale di 51 ceppi.

**Sierotipizzazione.** I ceppi sono stati sierotipizzati utilizzando il Kit Listeria Antisera "SEIKEN" (Denka Seiken, Tokyo, Japan) in accordo con le istruzioni fornite dal produttore.

**Estrazione DNA genomico.** Il DNA genomico è stato estratto mediante il kit "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche) seguendo le istruzioni fornite dal produttore e conservato a -20 °C.

- **RISULTATI.** In totale, escludendo i ceppi di riferimento, sono stati sierotipizzati 45 ceppi e sono stati rilevati 4 sierotipi distinti, il 43,2% apparteneva al sierotipo 1/2a, il 27% al sierotipo 1/2b, il 18,9% al sierotipo 1/2c e il 10,8% al sierotipo 4b. La maggioranza (75,0%) dei ceppi appartenenti al sierotipo 1/2a e il 100% dei ceppi appartenenti al sierotipo 4b sono stati isolati da prodotti ittici o dai relativi ambienti di lavorazione, mentre la maggioranza (90,0%) dei ceppi del sierotipo 1/2b e il 100% dei ceppi del sierotipo 1/2c sono stati isolati da carni e dai relativi ambienti di lavorazione.
- **DISCUSSIONE.** L'analisi delle corrispondenze multiple (MCA) ha permesso di rilevare una correlazione tra il sierotipo e la matrice. In questo studio, infatti, emerge la netta predominanza del sierotipo 1/2a, che nella maggioranza dei casi viene isolato da ambienti e prodotti ittici e, meno frequentemente, dalle carni e dai relativi ambienti di lavorazione. Il sierotipo 4b, sebbene sia quello meno frequente, è stato isolato esclusivamente da ambienti e prodotti ittici. Infine, è netta l'associazione tra i sierotipo 1/2b, 1/2c, le carni e i relativi ambienti di lavorazione. Questi dati sono in accordo con quanto riportato da altri autori (Jay *et al.*, 1996; Gianfranceschi *et al.*, 2003; Thévenot *et al.*, 2006).  
Risulta evidente la correlazione tra la matrice da cui il ceppo viene isolato ed il sierotipo. In particolare emerge che i sierotipo 1/2a e 4b sono legati soprattutto all'ambiente ittico, mentre è maggiore l'associazione tra i sierotipo 1/2b e 1/2c con le carni e i relativi ambienti di lavorazione.
- **BIBLIOGRAFIA.**
  - Doumith M., Cazalet C., Simoes N., Frangeul L., Jacquet C., Kunst F., Martin P., Cossart P., Glaser P., Buchrieser C. (2004). New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infection and Immunity* 72, 1072-83.
  - Gaillard J. L., Berche P., Mounier J., Richard S., Sansonetti P. (1987): In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infection and Immunity*, p. 2822-2829.

- Gianfranceschi M., Gattuso A., Tartaro S., Aureli P. (2003). Incidence of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples in Italy between 1990 and 1999: serotype distribution in food, environmental and clinical samples. *European Journal of Epidemiology* 18, 1001-6.
- Gray M. J., Zadoks R. N., Fortes E.D., Dogan B., Cai S., Chen Y., Scott V. N., Gombas D. E., Boor K. J., Wiedmann M. (2004). *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, p. 5833-5841.
- Jacquet C., Gouin E., Jeannel D., Cossart P., Rocourt J. (2002). Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 616-22.
- Jay M. J. (1996). Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. *Food Control* 7, 209-14.
- Jaradat Z.W., Schutze G.E., Bhunia A.K. 2002. Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping, and PCR analysis of virulence genes. *International Journal of Food Microbiology* 76, 1-10.
- Milohanic E., Jonquieres R., Glaser P., Dehoux P., Jacquet C., Berche P., Cossart P., Gaillard J.L. (2004): *Sequence and binding activity of the autolysin-adhesin Ami from epidemic Listeria monocytogenes 4b*. *Infect and Immunity*, p. 4401-4409
- Roche S. M., Velge P., Bottreau E., Durier C., Van Der Mee N. M., Pardon P. (2001): *Assessment of the virulence of Listeria monocytogenes: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice*. *Int. J. Food Microbiol.*, 68, p. 33-44.
- Thévenot D., Dernburg A., Vernozy-Rozand C. 2006. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1-17.
- Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 584-640.
- Ward T. J., Gorski L., Borucki M. K., Mandrell R. E., Hutchins J., Pupedis K. (2004): *Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the prfa virulence gene cluster of Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, p. 4994-5002.

**PARTECIPAZIONE A SEMINARI E WORKSHOP  
(Gennaio-Giugno 2007)**

- Giornata di formazione sull'applicazione dei Regolamenti di Sicurezza Alimentare in base alle linee guida della Regione Abruzzo. I.P.S.S.A.R. "G. Marchitelli" Villa S. Maria (CH) - Giovedì 1 Febbraio 2007.
- "Valutazione della sanità e della conservabilità dei prodotti dell'itticoltura marina in relazione alle caratteristiche di filiera". Workshop conclusivo PRIN 2003/2006. Giulianova Lido (TE) – Venerdì 22 Giugno 2007.

## **PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE**

### **(Gennaio-Giugno 2007)**

- Conter M., Di Ciccio P., Zanardi E., **D'Orio V.**, Ghidini S., Vergara A., Ianieri A. (2007). Caratterizzazione genotipica e sierologia di *Listeria monocytogenes* isolata da alimenti e ambienti di lavorazione. Atti XVII Convegno Nazionale A.I.V.I., p. 313-317. Cesenatico, 14 – 15 –16 Giugno 2007.
- **D'Orio V.**, Di Ciccio P., Conter M., Palucci O., Vergara A., Ianieri A. (2007). Studio del potere patogeno di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da alimenti e da ambienti di lavorazione. In fase di pubblicazione sugli Atti del LXI Convegno Nazionale S.I.S.Vet.
- **V. D'Orio**, D. Paludi, M. Conter, A. Vergara, A. Ianieri (2007). Biofilm formation by environmental strains of *Listeria monocytogenes*: relationship with hydrophobicity, motility and scanning electron microscopy analysis. In fase di pubblicazione presso European Federation of Food Science and Technology (EFFoST) Conference 2007 – New options for the food industry.