



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-

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.

SINTESI DEL PROGETTO DI RICERCA IN FATTORI DI PATOGENICITA' DI CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATI DA MATRICI ALIMENTARI E DA AMBIENTI DI PRODUZIONE: CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA E SIEROLOGICA

Obiettivo del progetto di ricerca: 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 (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). 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 e l'internalina B sono necessarie per l'invasione intracellulare; Act A è necessaria per la motilità e la diffusione cellulare; l'emolisina e la fosfolipasi sono responsabili della distruzione della membrana fagosomiale con conseguente liberazione del microrganismo all'interno del citoplasma della cellula ospite (Gaillard *et al.*, 1987; Jaradat *et al.*, 2003; Vasquez-Boland *et al.*, 2001). 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 epidemici di listeriosi e il sierotipo 4b è quello più frequentemente isolato da casi di malattia nell'uomo (Jacquet *et al.*, 2002; Doumith *et al.*, 2004). Infine, considerando che la valutazione del ruolo delle differenze nella virulenza dei ceppi nella malattia umana può avere importanti implicazioni per la prevenzione di questa malattia e per lo studio di misure sanitarie, è desiderabile sviluppare un test rapido di laboratorio che possa determinare quali siano i fattori di virulenza in modo rapido ed affidabile. L'applicazione di tecniche molecolari e, in particolare, della reazione polimerasica a catena (PCR) fornisce un notevole potenziale da questo punto di vista (Aznar e Alarcon, 2002; Gasanov *et al.*, 2005). Mediante tecnica della ribotipizzazione, inoltre, verranno identificati i vari ribotipi di *L. monocytogenes*.

Metodologie: Per questo studio verranno considerati ceppi di *L. monocytogenes* isolati da matrici alimentari e da ambienti di produzione. Per testare le PCR verranno presi in considerazione anche ceppi di *L. innocua*, *L. grayi* e *L. seeligeri*. Tutti i ceppi di *Listeria* spp. verranno isolati ed identificati con la metodica UNI EN ISO 11290-1 e con il sistema Vitek2 (bioMérieux Italia, Roma, Italy) ed in seguito i ceppi assegnati alla specie *L. monocytogenes* verranno sottoposti al test di sierotipizzazione usando Listeria Antisera "SEIKEN" (Denka Seiken, Tokyo, Japan) in accordo con le istruzioni fornite dal produttore. I ceppi di *Listeria* spp. verranno coltivati in tryptic soy broth (TSB) a 37°C. Il DNA genomico verrà estratto mediante il kit "High Pure PCR Template

Preparation Kit” (Roche) seguendo le istruzioni del produttore. In seguito verranno messe a punto tre multiplex PCR per il rilevamento dei geni *rrn* (16S rRNA), *hlyA* (listeriolosina) e *actA* (actina);

inlA (internalina A), *inlB* (internalina B) e *iap* (proteina p60); *plcA* (fosfolipasi C fosfatidil-inositolo specifica) e *plcB* (fosfolipasi C fosfatidilcolina specifica), modificando le PCR di Border *et al.*, 1990 e Jaradat *et al.*, 2002. Tutte le amplificazioni verranno eseguite in un volume di 50µl contenente buffer 1X (10mM Tris/HCl pH 8.3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl), 200µM dNTP mix, 1µM ciascun primer, 2,5U di Taq polimerasi (5U nel caso di *plcA* e *plcB*) e 2µl di DNA. La prima amplificazione verrà eseguita allo scopo di rilevare i geni *rrn*, *hlyA* e *actA*, contenenti i primer U1, LI1, LM1, LM2, actAF, actAR. I cicli di reazione saranno: 24 cicli di 94°C per 80 sec, 55°C 90 sec e 72°C per 120 sec, seguiti da 72°C per 10 minuti. La seconda amplificazione per il rilevamento di *inlA*, *inlB* e *iap*, conterrà i primer inlAF, inlAR, inlBF, inlBR, iap1, iap2, mentre la terza amplificazione per il rilevamento di *plcA* e *plcB*, conterrà i primer plcAF, plcAR, plcBF e plcBR. In entrambe queste amplificazioni i cicli di reazione saranno: 94°C per 180 sec, seguiti da 35 cicli di 94°C per 60 sec, 55°C per 120 sec e 72°C per 60 sec, seguiti da 72°C per 5 minuti. I prodotti di PCR saranno visualizzati in gel di agarosio all'1,5% previa colorazione in bromuro di etidio. L'analisi statistica sarà effettuata mediante SPSS ver. 13.0 (Chicago, Illinois). Inoltre, tutti i ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati saranno sottoposti a ribotipizzazione, secondo i protocolli del RiboPrinter® Microbial Characterization System (DuPont-Qualicon, Wilmington, DE). I profili di restrizione, ottenuti mediante l'utilizzo dell'enzima *EcoRI*, saranno analizzati e messi a confronto, ai fini dell'identificazione, con quelli (circa 1.000) presenti nella “DuPont Identification library”, considerando una similarità >86%. I profili generati dal RiboPrinter® saranno sottoposti ad analisi di clusterizzazione, utilizzando una soglia di similarità ≥ 95% (Finger Printing II, Bio-Rad, Hercules, CA). Il dendrogramma sarà ottenuto attraverso il metodo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Analysis).

Risultati attesi: Verranno messe a punto 3 multiplex PCR per identificare le specie appartenenti al genere *Listeria*, alla specie *L. monocytogenes* e per valutare la presenza dei principali geni responsabili della virulenza. La prima permetterà di identificare i ceppi appartenenti al genere *Listeria*, quelli appartenenti alla specie *L. monocytogenes* e contemporaneamente di rilevare la presenza di *actA*, uno dei principali geni responsabili della virulenza e della motilità tra le cellule (Vasquez-Boland *et al.*, 2001). Le altre multiplex permetteranno di studiare la presenza degli altri importanti geni responsabili della virulenza (*inlA* e *inlB* e *iap*, per la seconda e *plcA*, *plcB* per la terza). La presenza o l'assenza di questi geni verrà correlata con il sierotipo di appartenenza e con i risultati della ribotipizzazione.

Bibliografia:

- Aznar R., Aaron B. 2002. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: a comparison of published primers. *Systematic and Applied Microbiology* 25, 109-119.

- Border PM, Howard JJ, Plastow GS, Siggins KW (1990). Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology* 11. 158-162.
- 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.
- Gasanov U., Hughes D., Hansbro P.M. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. And *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Review* 2005, 851-75.
- 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.
- 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.
- 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., Papedis K. (2004): *Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the prfa virulence gene cluster of Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, p. 4994-5002.

Teramo 04/05/07