



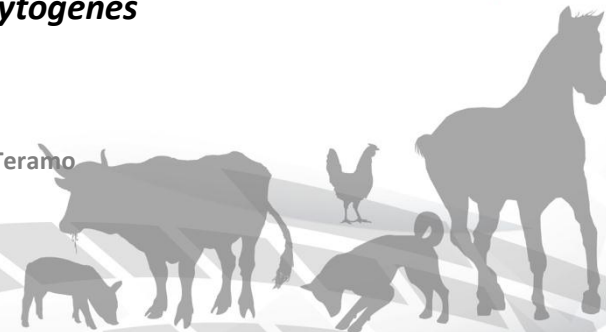
**IZSAM G. CAPORALE  
TERAMO**

**Valutazione del comportamento di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da alimenti, ambienti ed uomo in relazione alla patogenicità**


**Laboratorio Nazionale di Riferimento *Listeria monocytogenes***

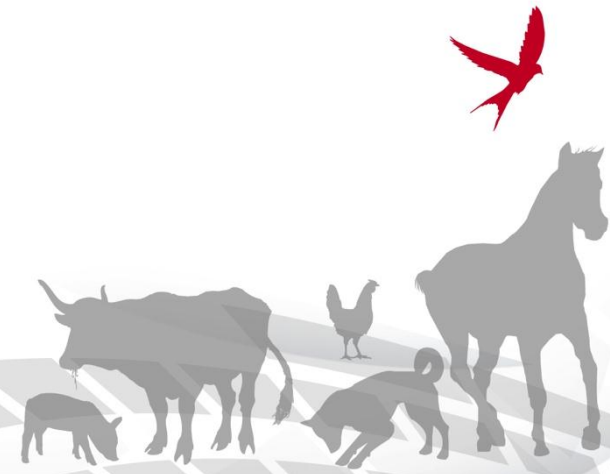
Patrizia Centorame

Workshop LNR per *Listeria monocytogenes*, 12-13 Dicembre 2013, Teramo



# Indice della presentazione

- 
- Premessa
  - Obiettivo
  - Materiali e metodi
  - Risultati
  - Discussioni
  - Conclusioni



# PREMESSA

- *Listeria monocytogenes* è l'agente patogeno responsabile della listeriosi.
- Nel **95%** dei casi di Listeriosi il patogeno è veicolato da alimenti quali:
  - Prodotti a base di carne
  - Latte crudo
  - Formaggi molli
  - Vegetali
  - Pesce (Salmone)



# PREMESSA

- Grazie alle sue capacità di sopravvivere a temperature di refrigerazione e di persistere sulle superfici di produzione e trasformazione alimentare in forma di biofilm, gli alimenti maggiormente contaminati e di maggior rischio per il consumatore sono quelli pronti al consumo (RTE).



- 
- *Listeria monocytogenes* colpisce soprattutto:

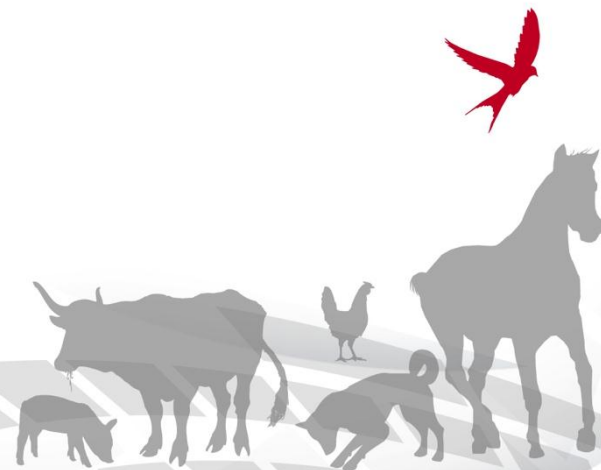
- Soggetti immunocompromessi
- Anziani
- Bambini
- Donne in gravidanza
- Feti


*ma anche, seppure in basse percentuali, soggetti immunocompetenti.*



# PREMESSA

- Nonostante numerosi studi a riguardo, la virulenza di *L. monocytogenes* e la sua potenziale patogenicità rimane poco conosciuta, in quanto dati di tipizzazione molecolare sino ad ora disponibili, non riescono a prevedere la probabilità che un dato ceppo causerà la malattia.





**Sulla base della potenziale patogenicità di alcuni ceppi isolati nel corso degli ultimi anni coinvolti direttamente o indirettamente in casi di listeriosi e di ceppi con profili molecolari simili:**

- Indagare sui fattori di virulenza ed i fattori implicati nella produzione di biofilm e nella motilità.
- Valutare il differente comportamento (fenotipico) nella loro capacità nel produrre biofilm e nella loro diversa motilità



## DESCRIZIONE DEGLI ESPERIMENTI



### 1° Fase

Selezione di 11 ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati, negli ultimi anni, da ambienti, uomo ed alimenti implicati direttamente in casi di listeriosi o con profili molecolari identici ad essi.

- ### 2° Fase

Analisi dei genomi batterici mediante sequenziamento di geni coinvolti direttamente nella virulenza, nella formazione dei biofilm e nella motilità.

- ### 3° Fase

Valutazione del grado di produzione di biofilm e motilità di ciascuno di questi ceppi di *Listeria monocytogenes* in studio.





## Selezione di ceppi di *L. monocytogenes*



ID ceppo	Sierotipo	Tipo di matrice	Anno di isolamento
ID1	1/2a	Alimento	2012
ID2	1/2a	Ambiente	2012
ID3	1/2a	Ambiente	2012
ID4	1/2a	Ambiente	2012
ID5	4b	Alimento	2010
ID6	4b	Uomo	2009
ID7	1/2c	Alimento	2011
ID8	4b	Alimento	2011
ID9	4b	Alimento	2010
ID10	4b	Alimento	2006
ID12	1/2c	Alimento	2011

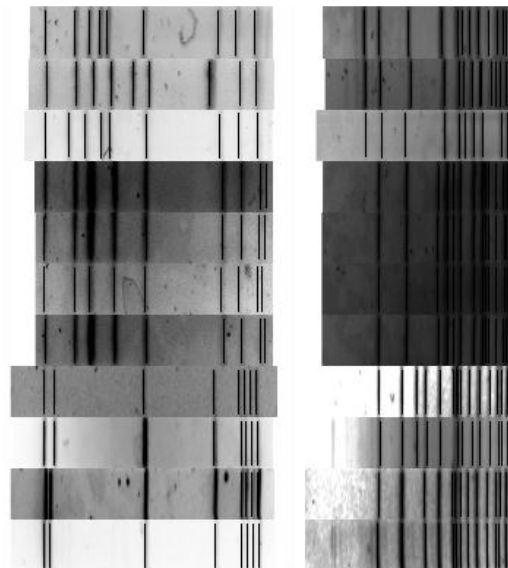
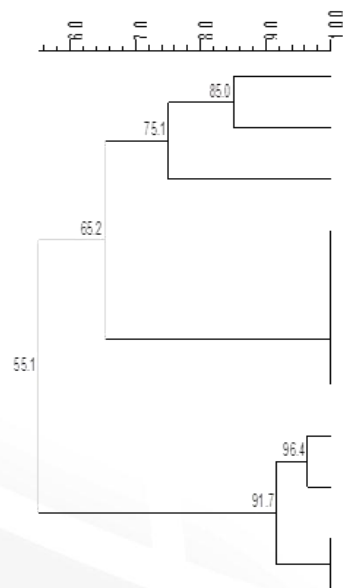


## PFGE-DENDOGRAMMA dei ceppi presi in esame

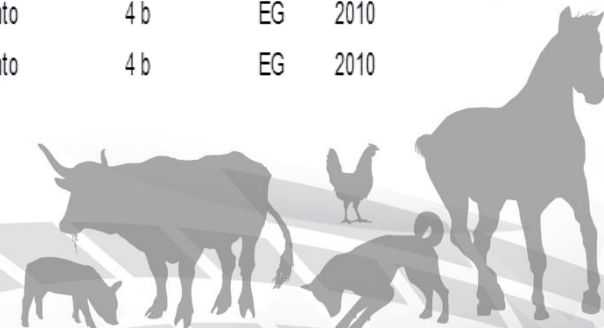
Ascl + Apal

PFGE Ascl


PFGE Apal




ID 7	Alimento	1/2 c	AA	2011
ID 8	Alimento	4 b	BB	2011
ID 12	Alimento	1/2 c	CC	2011
ID 1	Ambiente	1/2 a	DD	2012
ID 3	Ambiente	1/2 a	DD	2012
ID 2	Ambiente	1/2 a	DD	2012
ID 4	Alimento	1/2 a	DD	2012
ID 10	Alimento	4 b	EE	2006
ID 6	Uomo	4 b	EF	2009
ID 9	Alimento	4 b	EG	2010
ID 5	Alimento	4 b	EG	2010




## SEQUENZIAMENTO




Per l'analisi in sequenziamento sono stati selezionati determinati geni coinvolti nella virulenza e nella formazione di biofilm di *Listeria monocytogenes*



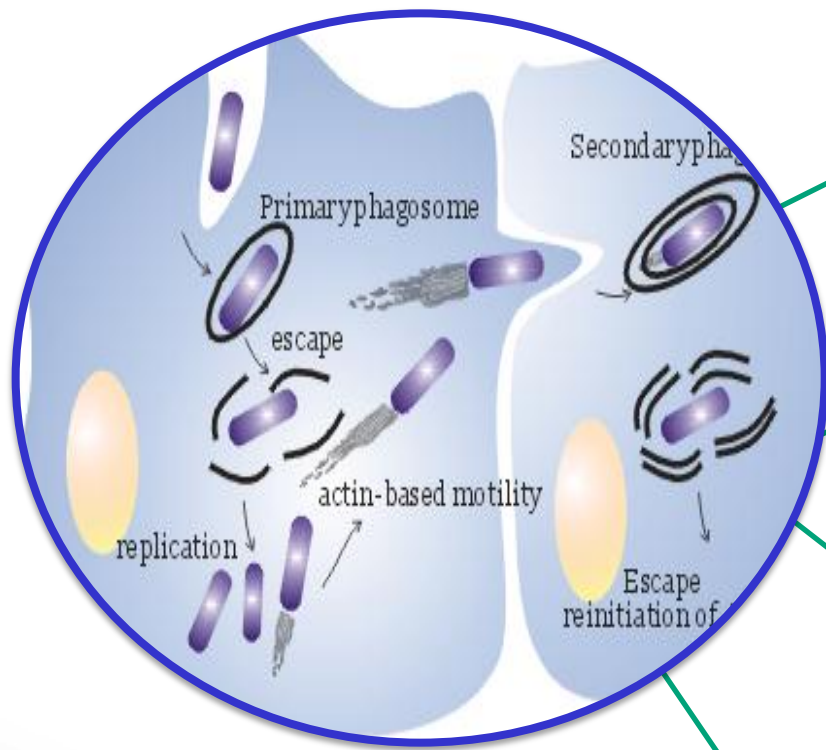
Sequenziamento completo dei genomi degli 11 ceppi  
mediante tecnica ILLUMINA



Ricerca e selezione mediante Tools in piattaforma Galaxy  
dei geni coinvolti nella virulenza e formazione biofilm ed  
Allineamento attraverso Biedit software



## Geni selezionati coinvolti nella virulenza di *Listeria monocytogenes*



invasione

- *inIA*
- *inIB*
- *lap (p60)*

Regolatore trascrizionale

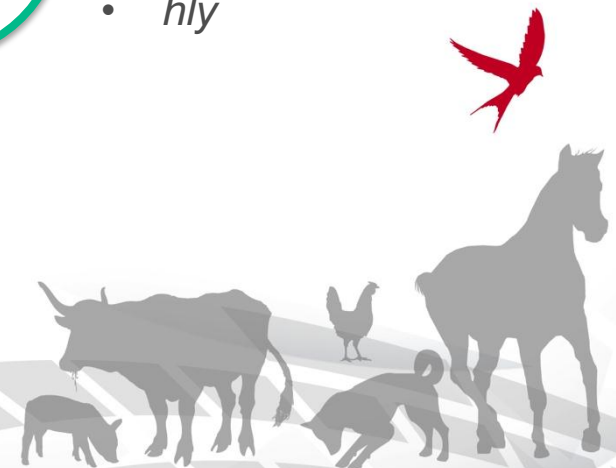
- *prfA*

Fosfolipasi, metallo proteasi, emolisina

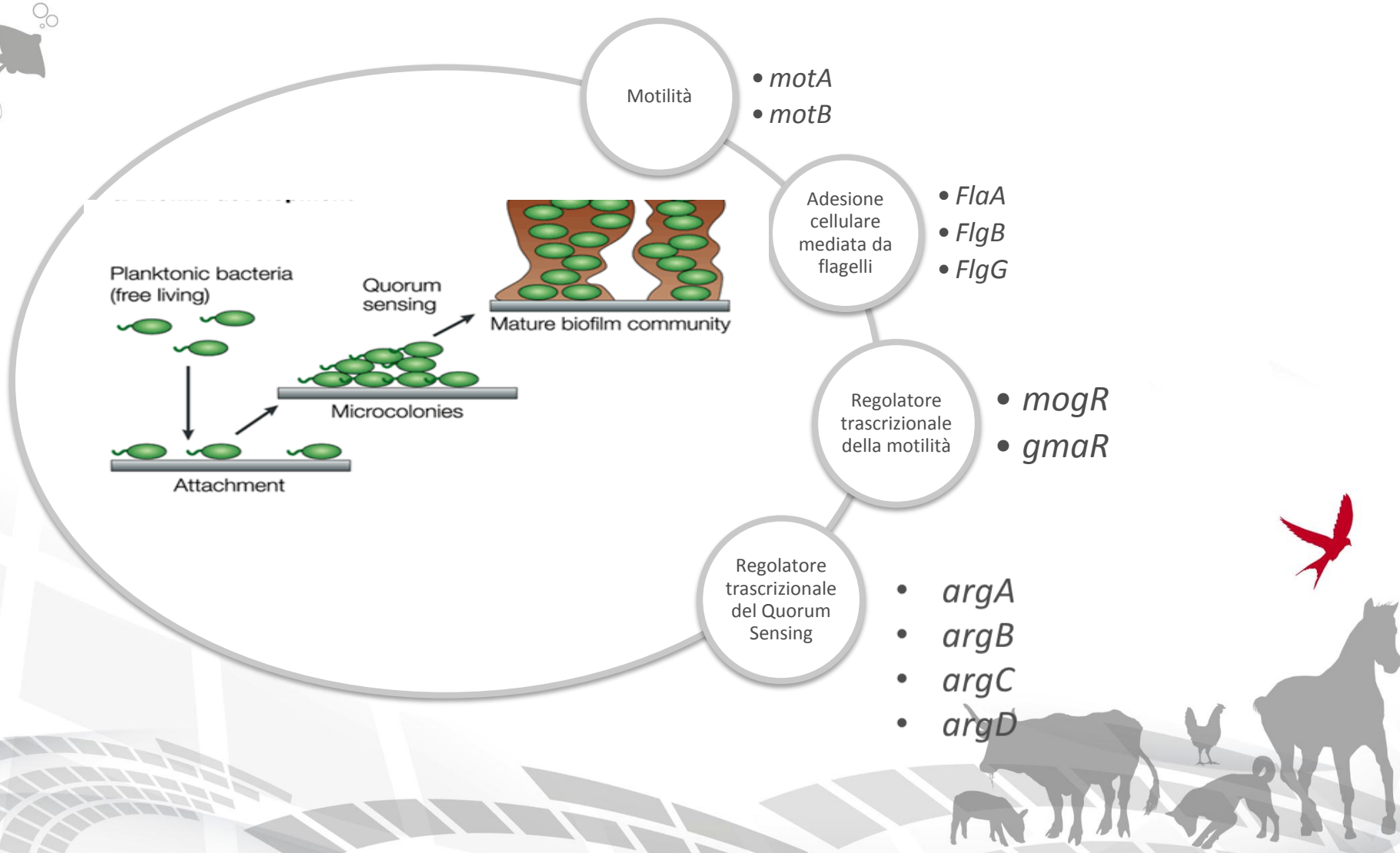
- *plcA*
- *plcB*
- *Mpl*
- *hly*

Motilità

- *actA*



## Geni selezionati coinvolti nella formazione del biofilm di *L. monocytogenes*:

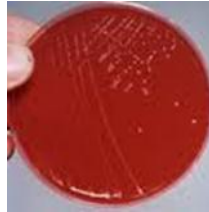


# MATERIALI E METODI

## BIOFILM



Agar sangue per 24h a 37° C



TSA per 24h a 37° C



Crescita in TSB (Tryptic soy broth) e misurazione OD<sub>600</sub>

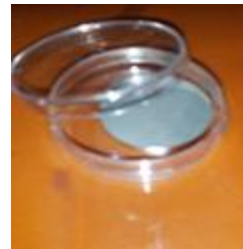
12° C



37° C



Incubazione per 96h a 37° C e 7 g a 12° C nel substrato acciaio



BIOFILM

SEM





**Biofilm** 

↓

**Fissaggio dei dischetti a  
60° C per 1h**

↓

**Colorazione con cristalvioletto al 0,1%**

↓

**Lettura della densità ottica a 492 nm**

 **SEM**

↓

**Fissaggio con fissativo  
di Karnovsky**

↓

**Copertura con oro metallico**

↓

**Esame in SEM a 3000X**  
(ZEISS Mod. DSM 940 A)



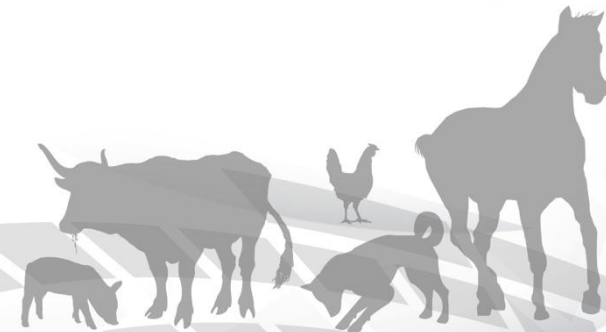
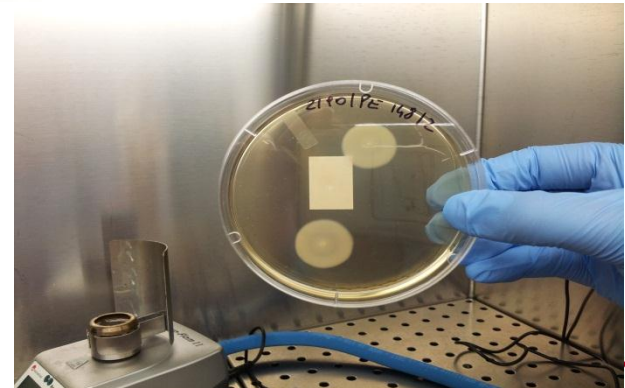
TSA



BHI 0,3% per 48h a  
24° C



Misura dei diametri





# Sequenziamento dei geni coinvolti nella virulenza

ID Campione	<i>prfA</i>	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>actA</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>LisR</i>	<i>mpl</i>	<i>hly</i>
ID1 1/2a	100%	98,5%	99,5%	99,3%	99,8%	99,8%	100%	99,8%	99,8%
ID2 1/2a	100%	98,5%	99,5%	99,2%	99,8%	99,8%	100%	99,8%	99,8%
ID3 1/2a	100%	98,5%	99,5%	99,1%	99,8%	99,8%	100%	99,8%	99,8%
ID4 1/2a	100%	98,5%	99,5%	99,2%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%
ID5 4b	100%	98,8%	99,5%	ND	99,6%	99,7%	100%	99,7%	99,8%
ID6 4b		98,8%	99,5%	ND	99,6%	99,7%	100%	99,7%	99,8%
ID7 1/2c	100%	100%	100%	100%	99,8%	100%	100%	99,9%	99,9%
ID8 4b	100%	98,8%	99,5%	ND	100%	99,7%	99,5%	99,4%	99,8%
ID9 4b	100%	99,5%	99,5%	ND	99,6%	99,5%	100%	99,7%	99,7%
ID10 4b	100%	97,2%	99,5%	ND	99,6%	99,7%	100%	99,7%	99,8%
ID12 1/2c	100%	100%	100%	100%	99,8%	100%	100%	100%	100%

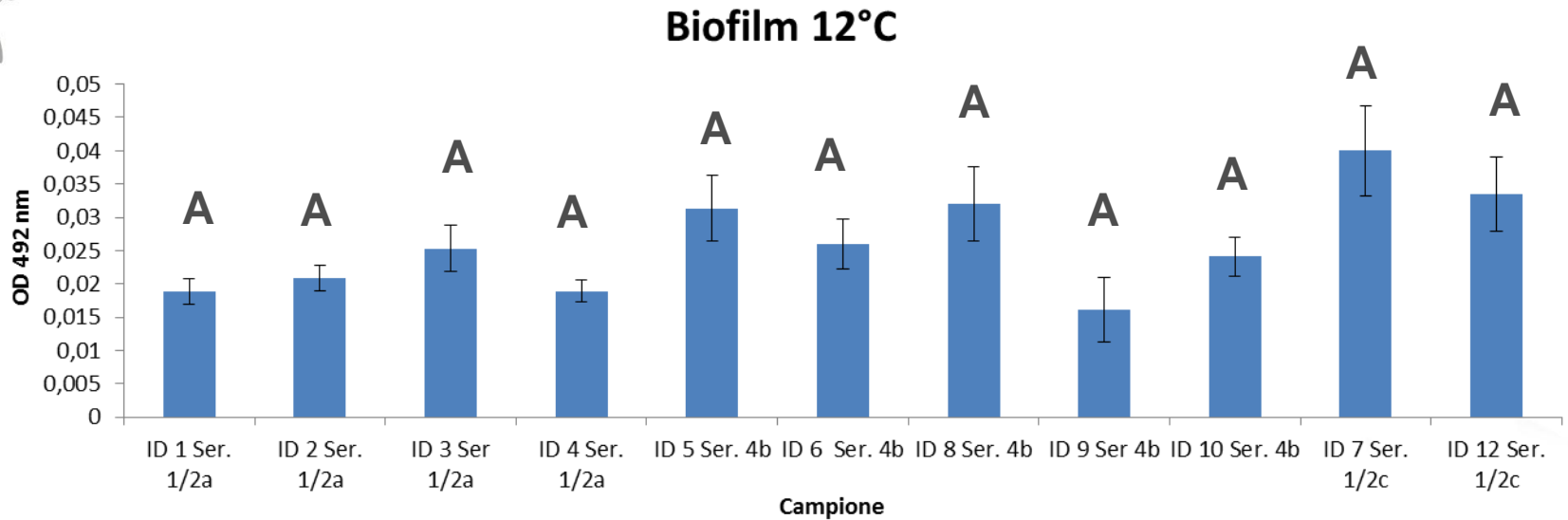
In rosso le percentuali di identità derivanti da allineati di ogni singolo gene con la sequenza di riferimento *Listeria monocytogenes* (serovar 1/2a) EGD-e, in blu con la sequenza di riferimento (serovar 4b) L312 ed in verde con la (serovar 1/2c) SLCC2372.



## Sequenziamento geni coinvolti nella formazione del biofilm

ID Campione	<i>argA</i>	<i>argB</i>	<i>argC</i>	<i>argD</i>	<i>MotA</i>	<i>MotB</i>	<i>FlaA</i>	<i>FlgB</i>	<i>FlgG</i>
ID1 1/2a	100%	99,8%	100%	98,8%	100%	100%	100%	100%	98,8%
ID2 1/2a	100%	99,8%	100%	98,8%	100%	100%	100%	100%	98,8%
ID3 1/2a	100%	99,8%	100%	98,8%	100%	100%	100%	100%	98,8%
ID4 1/2a	100%	100%	100%	98,8%	100%	100%	100%	100%	98,8%
ID5 4b	98,8%	100%	93,3%	98,8%	97,7%	98,8%	100%	98,8%	98,8%
ID6 4b	98,8%	100%	93,3%	98,8%	97,7%	98,8%	100%	98,8%	98,8%
ID7 1/2c	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
ID8 4b	98,8%	100%	93,3%	98,8%	97,7%	98,8%	100%	98,8%	98,8%
ID9 4b	98,8%	100%	93,3%	98,8%	97,7%	98,8%	100%	98,8%	98,8%
ID10 4b	98,8%	100%	93,3%	98,8%	97,7%	98,8%	100%	98,8%	98,8%
ID12 1/2c	100%	100%	100%	100%	94,8%	100%	100%	100%	100%

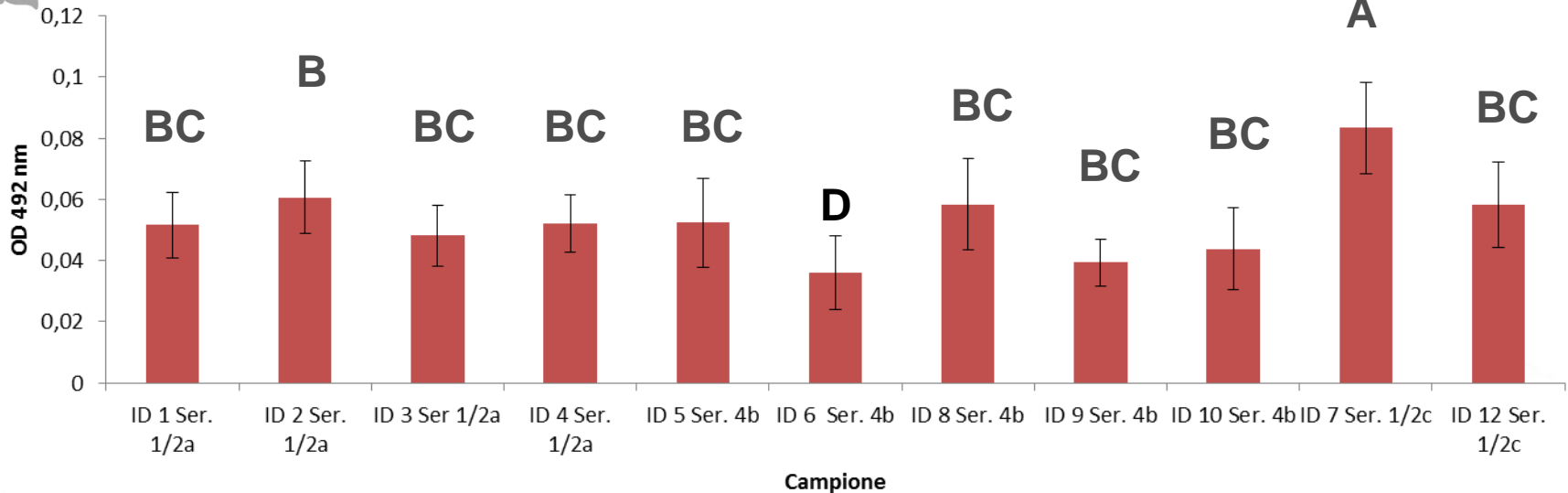
In rosso le percentuali di identità derivanti da allineati di ogni singolo gene con la sequenza di riferimento *Listeria monocytogenes* (serovar 1/2a) EGD-e, in blu con la sequenza di riferimento (serovar 4b) L312 ed in verde con la (serovar 1/2c) SLCC2372.



I risultati sono stati analizzati attraverso il test ANOVA (limite di significatività  $P < 0,05$ )




## Biofilm 37°C



I risultati sono stati analizzati attraverso il test ANOVA (limite di significatività  $P < 0,05$ )






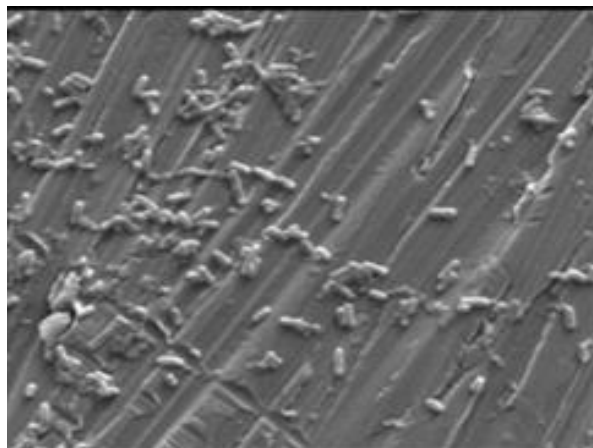
ID campione	Acciaio 12 ° C	Acciaio 37 ° C
ID06	+/-	+/-
ID01	+/-	++

**++** CRESCITA ALTA      **+/-** CRESCITA BASSA      **+** CRESCITA MEDIA

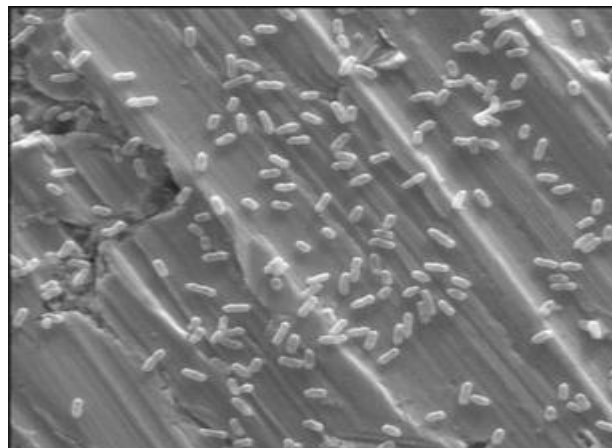




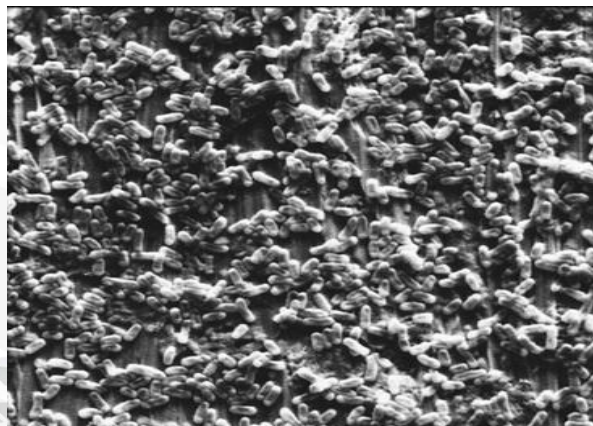
**Ceppo ID 01 12° C 7g**



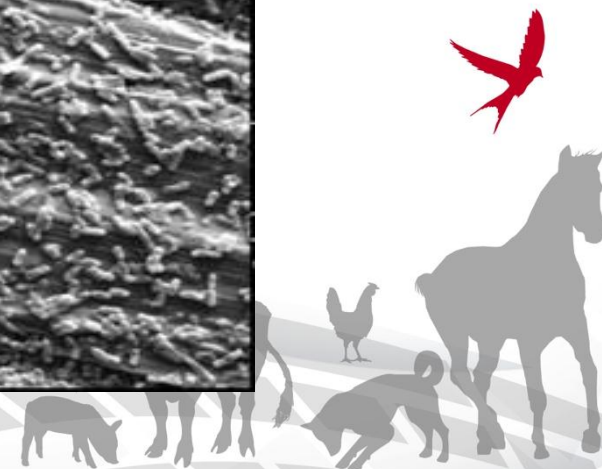
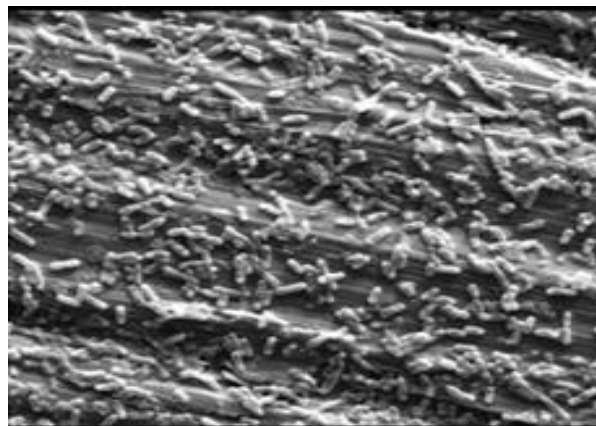
**Ceppo ID 06 12° C 7g**

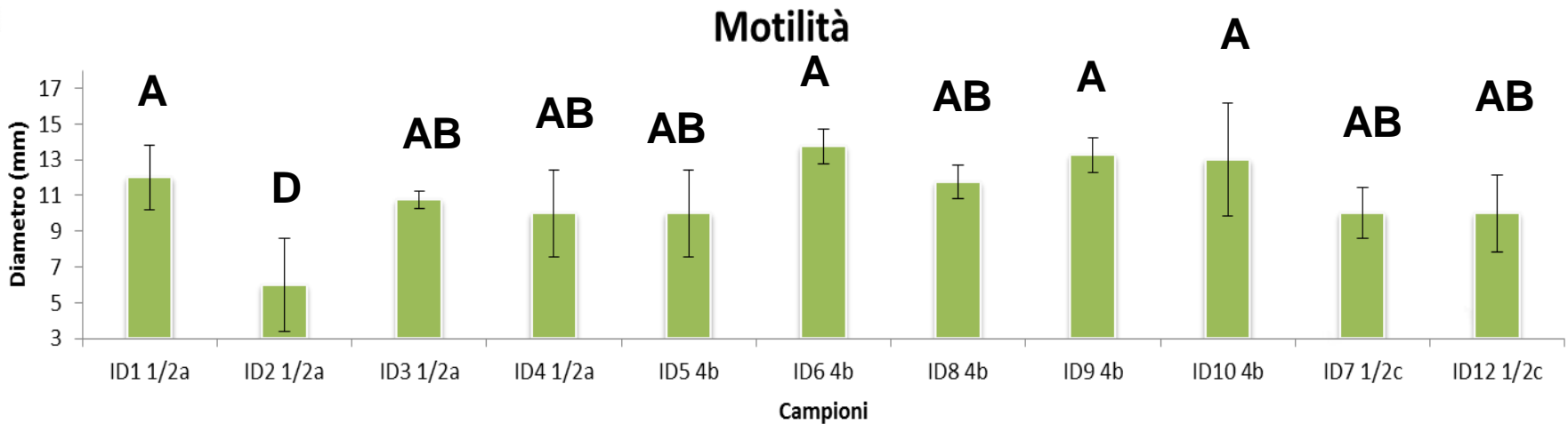


**Ceppo ID 01 37° C 96h**



**Ceppo ID 06 37° C 96h**





I risultati sono stati analizzati attraverso il test ANOVA (limite di significatività  $P < 0,05$ )



# DISCUSSIONE

- Molti fattori di virulenza e molti fattori implicati nella motilità e nella formazione del biofilm risultano avere una identità riferibile al sierotipo di appartenenza.
- L'analisi dei profili in PFGE raggruppa l'ID8 sierotipo 4b con altri ceppi sierotipo 1/2c, l'analisi dei geni individua differenze sufficienti a distinguere sierotipi.
- I geni dei ceppi paragonati non mostrano avere delezioni ma alcuni di essi presentano mutazioni puntiformi sulla base dei quali possono essere considerati diversi.







## Produzione di biofilm:

- Il grado di identità molecolare (PFGE, sequenziamento) non è correlato alla capacità di produzione di biofilm.
- L'appartenenza allo stesso sierotipo non caratterizza l'identità di produzione, non presentando alcuna correlazione con il sierotipo, se non per il sierotipo 1/2a.
- Il ceppo umano sicuramente patogeno è risultato il meno produttore di biofilm.






## • MOTILITA'

- Il grado di identità molecolare (PFGE, sequenziamento) non è correlato alla motilità.
- L'appartenenza allo stesso sierotipo non caratterizza sempre l'identità di motilità, in quanto per alcuni sierotipi mostra una particolare omogeneità es. 4b, mentre, per altri sierotipi è evidente una forte eterogeneità di comportamento es. 1/2a.




# CONCLUSIONI

- 
- Una maggiore patogenicità sembra non essere correlabile ad una maggiore capacità di produrre biofilm.
  - Ceppi con profili molecolari apparentemente identici mostrano diverse capacità in termini produzione di biofilm e di motilità e la correlazione tra motilità e biofilm non è significativa.



# CONCLUSIONI

- 
- Pertanto da questi studi emergono che i fattori genetici e fenotipici esaminati non sono predittivi della patogenicità del ceppo.
  - Al fine di individuare un set di geni «predittivi» della patogenicità occorrerà studiare un più ampio set di geni.
  - Il valore biologico reale delle variabilità genetiche riscontrate dovrà essere confermato attraverso lo studio delle sequenze proteiche sintetizzate da tali geni e della loro funzionalità biologica.





# **GRAZIE A TUTTI PER L'ATTENZIONE**

**Dott.re Massimiliano Orsini  
(Csr4)**  
*Sequenziamento*

**Dott.ssa Anna Rita D'angelo  
(Microb . Diagn., IZS AM)**  
**SEM**

**Dott.sse Marina Torresi,  
Vidalia Acciari (LNR AM)**  
**PFGE**

**Laureanda  
Rosanna Di Orio**

**E... tutti il personale del reparto di Igiene e  
Tecnologie degli Alimenti e del laboratorio LNR AM**