



ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

**Caratterizzazione dei ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati dal gorgonzola e dai tamponi ambientali**

Patrizia Centorame



# Indice della presentazione

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



# PREMESSA

- *I formaggi erborinati sono alimenti “RTE” (read to eat) frequentemente contaminati e associati a casi di listeriosi.*
- *La crescita può essere favorita dall’assenza di fasi di risanamento nel processo produttivo, e dalla presenza nell’ambiente di lavorazione di nicchie favorite dalla capacità di questo microrganismo di formare biofilm che incrementano la resistenza di Lm ai disinfettanti.*



# PREMESSA

- *Il controllo del rischio relativo alla presenza di **Listeria monocytogenes** nelle produzioni alimentari in termini di sicurezza alimentare e tutela della salute dei consumatori richiede, oltre ad una corretta applicazione degli interventi di prevenzione, una conoscenza sempre più approfondita dei fattori di virulenza e dei meccanismi associati all'espressione della patogenicità.*



# OBIETTIVO

## Ulteriore caratterizzazione molecolare dei ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati

- Ottenere un quadro relativo sui pattern genetici di questi ceppi in merito anche alla presenza dei geni codificanti per i fattori di virulenza.
- Valutare la relazione corrispondente al grado di produzione di biofilm.



# STUDIO SPERIMENTALE

- **1° Fase**

Caratterizzazione dei ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati attraverso l'analisi dei genomi batterici mediante la tecnica del DNA microarray per la rilevazione dei geni di patogenicità allo scopo di determinarne il potenziale di virulenza.

- **2° Fase**

Selezione di cinque ceppi di *Listeria monocytogenes* per lo studio in vitro della formazione del biofilm.



# STUDIO SPERIMENTALE

- Il microarray utilizzato è un microbial diagnostic microarray (MDM) disegnato dall' **IZSA&M** e prodotto da **BRI (Biotechnology Research Institute), Montreal, Canada**. I generi di batteri interrogati in questo microarray V4.1 sono 14 per un totale di 194 specie patogene :

- *Mycobacterium*
- *Campylobacter*
- ***Listeria***
- *Mycoplasma*
- *Salmonella*
- *Yersinia*
- *Staphylococcus*
- *Enterococcus*
- *Clostridium*
- ***Altre specie...***



# MATERIALI E METODI - MICROARRAY

## Analisi dei genomi batterici mediante la tecnica dei DNA Microarray

78 ceppi di *Listeria monocytogenes*

48 ceppi isolati direttamente dalla crosta dei prodotti finiti nelle due ditte



30 ceppi isolati dai tamponi ambientali eseguiti nei due distinti stabilimenti di produzione





## Geni specifici per *Listeria monocytogenes*:

- Complessivamente i geni contenuti nel vetrino V4.1 per *Listeria monocytogenes* sono 76
- 18 sono i geni di virulenza interrogati

Fattori di Virulenza	Nome completo
Ldh o Lmidh	lactate dehydrogenase
inlA o lminlA70	internalina A
plcA o lmpcA70	phosphatidylinositol-specific phospholipase C
Hpt o lmhpt70	hexose phosphate transport
Dal o lmdal150	alanine racemase
inlB o lminlB70	internalina B
plcB o lmpcB70	phosphatidylcholine cholinephosphohydrolase
lisR o lmlisR50	DNA-binding response regulator
Prs o lmpRs	phosphoribosyl synthetase
dal(2) o lmda1250	alanine racemase
inlC o lminlC70	internalin C
shpA o lmsvpA70	Heat shock protein involved in bacterial escape from phagosomes
lisR(2) o lmlisR250	DNA-binding response regulator
Hly o lmhly70 o LLO	listeriolisina O
prfA o lmprf70	positive regulatory factor
ldh(2) o lmdh2	lactate dehydrogenase
Iap o lmiap70	invasion associated protein
Mpl o lmmpl70	zinc metalloprotease

# MATERIALI E METODI - MICROARRAY

-80° C



Estrazione del DNA



Amplificazione con random primers ed incorporazione del fluoroforo Cy3



Lettura della purezza e della concentrazione del DNA al Nanodrops



Ibridazione a 42° C per 16h

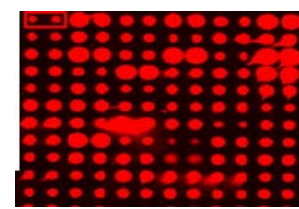


# MATERIALI E METODI - MICROARRAY

Lettura del vetrino mediante ScanArray



Analisi dell'immagine mediante QuantArray



Intensità di fluorescenza di ogni spot



Intensità- Background dei replicati dei geni



Mediana di ogni gene/ Mediana del Background  
(Empty)



Trasformazione in Log<sub>2</sub> del ratio



# MATERIALI E METODI - MICROARRAY

Analisi dei dati



Trasformazione dei dati normalizzati in file txt



Software Cluster 3

L' algoritmo utilizzato per l' elaborazione dell' heat-map  
e Similarity Metric: Uncentred Person correlation  
Complete Linkage



Java treeView



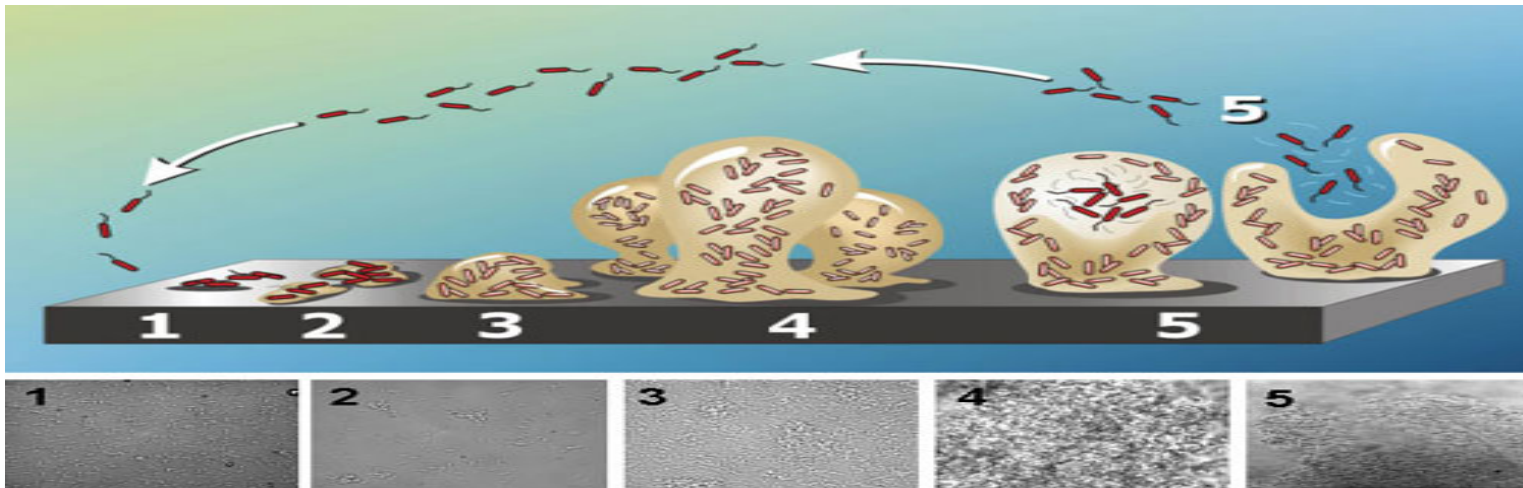
# MATERIALI E METODI - BIOFILM

- Per l'analisi dei biofilm sono stati analizzati cinque ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da tamponi ambientali eseguite a più riprese e in diverse aree di lavorazione:
  - *Salatura*
  - *Stagionatura*
  - *Taglio e confezionamento*
  - *Caseificio*



# CHE COS' E' UN BIOFILM?

Il biofilm è una comunità sessile di batteri adesi ad una superficie abiotica, o biotica, circondata da una matrice di natura polisaccaridica e caratterizzata da un alterato fenotipo ed espressione genica.



1  
Condizionamen  
to superficiale

2  
Adesione  
cellulare

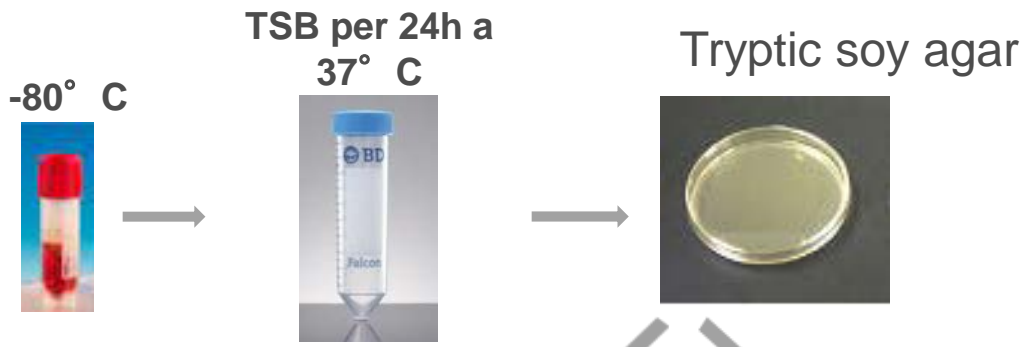
3  
Formazione  
microcolonie

4  
Biofilm  
maturo

5  
Distacco e  
dispersione



# MATERIALI E METODI - BIOFILM E SEM



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

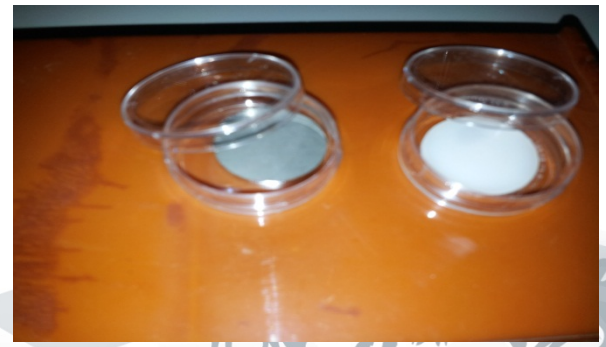


**BIOFILM**



Incubazione per 72h a 37° C e 12° C per entrambi i substrati

**SEM**



# ANALISI BIOFILM E SEM

## Biofilm



## SEM

Lavaggi dei dischetti in PBS



Fissaggio dei dischetti a  
60° C per 1h



Colorazione con cristalvioletto al 0,1%



Lavaggio

Decolorazione con acido acetico  
glaciale al 33% v/v



Trasferimento di 200ul di questa  
soluzione in piastre da microtitolazione



Lettura della densità ottica a 490 nm

Fissaggio con fissativo  
di Karnovsky



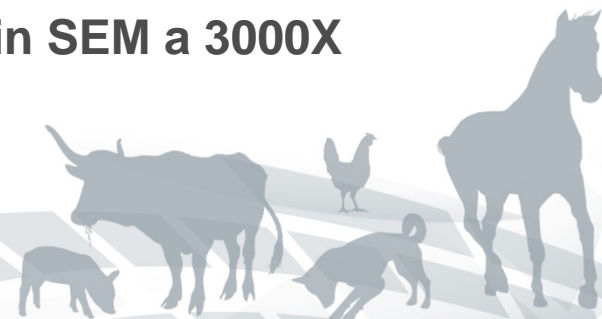
Deidratazione in acetone



Copertura con oro metallico

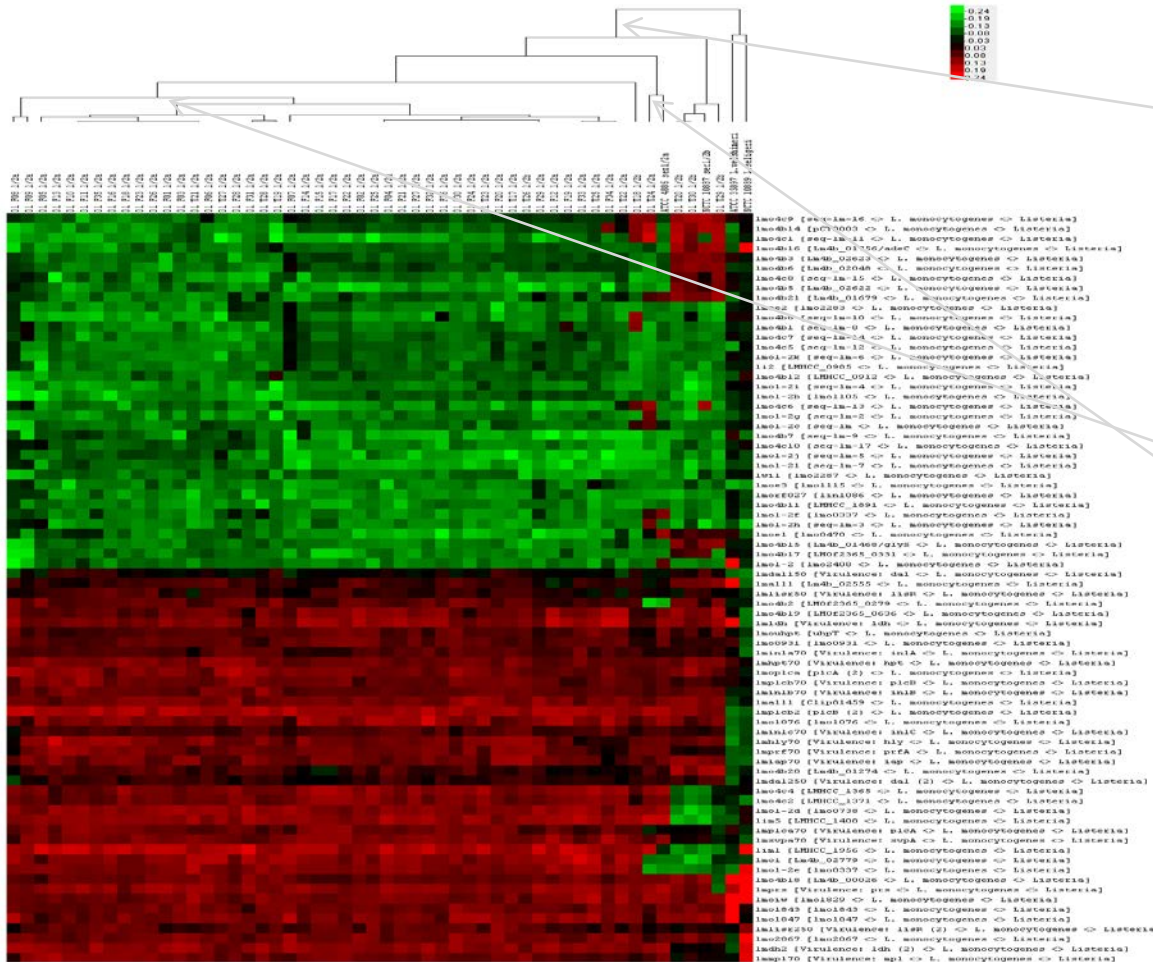


Esame in SEM a 3000X





# RISULTATI: CLUSTER TAMPONI AMBIENTALI E FORMAGGI DITTA1



QUI SI EVIDENZIA PRINCIPALMENTE DUE SOTTOGRUPPI UNO RAPPRESENTATO DAI TAMPONI AMBIENTALI 1/2b E UN GRANDE SOTTOGRUPPO CON SER 1/2A RISCOVTRATI SIA NEI T.A. E SIA NELLE CROSTE .

UN GRANDE SOTTOGRUPPO CON UN I.C .ALTO 0,71 GIA' POTREBBE ESSERE INDICE MENO ETERONEITA' TRA QUESTI CEPPI ANCHE IN QUESTO CLUSTER IL PATTERN GENETICO 1/2a SI ALLONTANANO DA QUELLO DI RIFERIMENTO 1/2a

Geni di virulenza

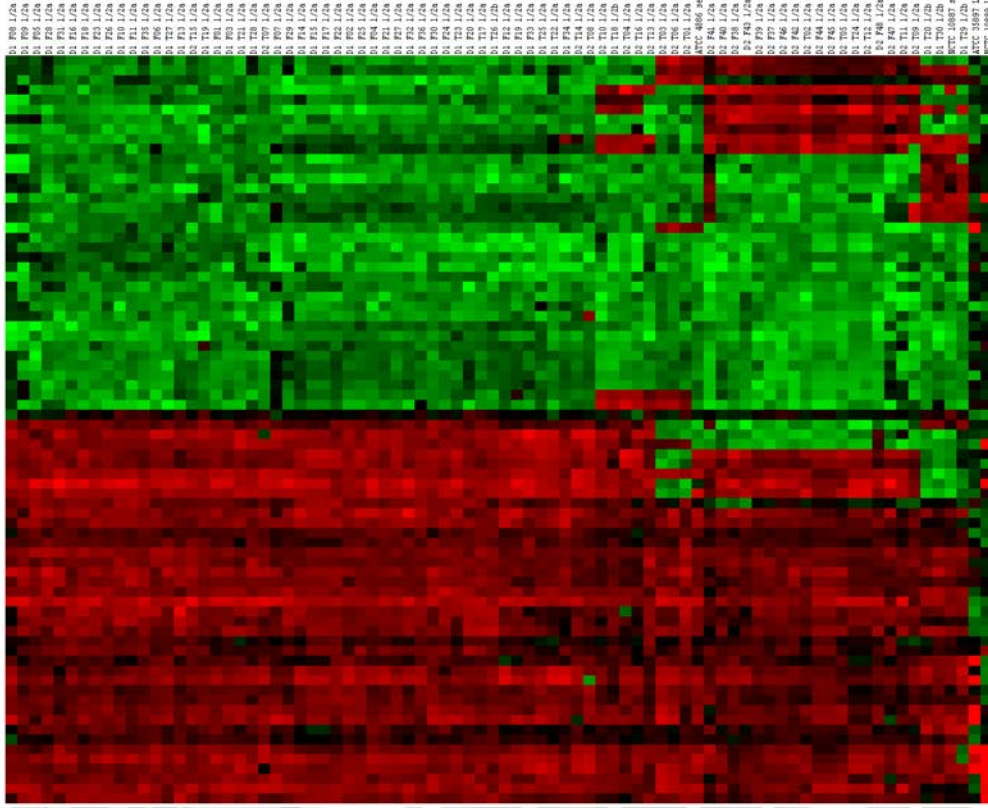


NELLA DITTA 1 SONO STATI ANALIZZATI 36 CEPPI ISOLATI DAI FORMAGGI E 14 DAI TAMPONI AMBIENTALI. I CEPPI ISOLATI DALLE FORME SONO TUTTI 1/2a MENTRE NEI CEPPI AMBIENTALI C' E LA PRESENZA DEL SIEROTIPO 1/2 b.





# RISULTATI: CLUSTER 1, DITTA1 E DITTA2



- lmo1-2f [lmo0337 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2g [lmo0470 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2h [seq-la-13 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2i [seq-la-3 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2j [seq-la-11 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2k [seq-la-2 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2l [pT0003 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2m [seq-la-16 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2n [IM02385\_0331 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2o [lmo\_01460/glyp <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2p [lmo\_02622 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2q [seq-la-15 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2r [lmo\_01754/adc4 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2s [lmo\_02048 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2t [lmo\_02623 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2u [lmo2408 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2v [seq-la-7 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2w [seq-la-5 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2x [seq-la-17 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2y [seq-la-9 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2z [lmo287 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo2 [lmo2383 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo3 [IM0C\_1891 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo3 [lmo1115 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo3 [lmo1096 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2b [lmo1103 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2c [seq-la-4 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2d [IM0C\_0912 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2e [IM0C\_0905 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2f [seq-la-8 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2g [seq-la-12 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2h [seq-la-14 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2i [seq-la-6 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2j [seq-la-10 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2k [IM0E265\_0279 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2l [lmo\_02779 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2m [lmo0337 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2n [IM0C\_1365 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2o [IM0C\_1371 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2p [lmo0738 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2q [IM0C\_1956 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2r [IM0C\_1408 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2s [Virulence: pica <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2t [lmo1076 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2u [Virulence: pva <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2v [Virulence: iadC <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2w [Virulence: ialA <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2x [Virulence: hgt <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2y [Virulence: ialB <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2z [pica (2) <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2a [Virulence: pica <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2b [Ctip81439 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2c [pica (2) <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2d [Virulence: hly <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2e [Virulence: pva <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2f [Virulence: sap <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2g [Virulence: iisR <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2h [Virulence: iisR (2) <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2i [lmo\_02155 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2j [IM0E265\_0636 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2k [Virulence: ldm <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2l [uhpT <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2m [lmo0931 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2n [lmo1847 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2o [lmo1847 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2p [lmo\_01274 <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2q [Virulence: dai (2) <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2r [Virulence: pva <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2s [Virulence: pva <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2t [Virulence: iad (2) <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2u [Virulence: apl <> L. monocytogenes <> Listeria]
- lmo1-2v [Virulence: apl <> L. monocytogenes <> Listeria]

IL CLUSTER GENERATO DAI CEPPI ISOLATI IN ENTRAMBE LE DITTE RIASSUME CIÒ CHE ABBIAMO VISTO NEI DUE CLUSTER PRECEDENTI OSSIA CHE NELLA DITTA 2 CI SONO CEPPI CON PATTERN GENOMICO PIU' ETEROGENEO RISPETTO AI CEPPI ISOLATI NELLA DITTA 1





ISTITUTO NAZIONALE  
TERAPIE

# RISULTATI DENDOGRAMMA TAMPONI AMBIENTALI

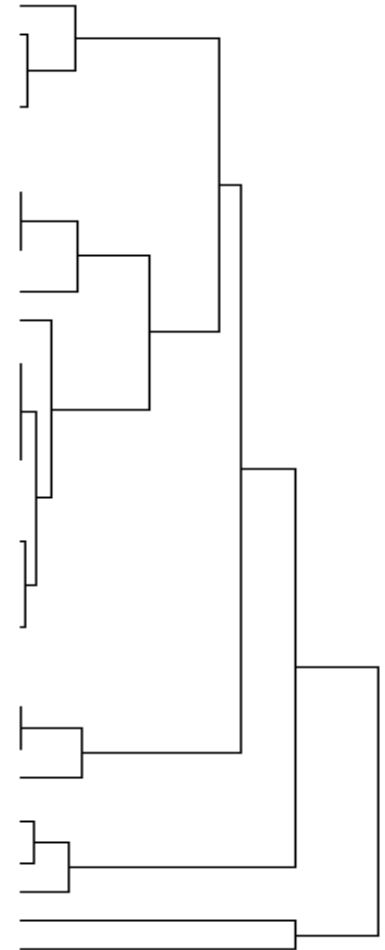
**RAGGRUPPAMENTO CEPPI CON STESSO PATTERN GENOMICO RISCONTRATI MAGGIORMENTE NELLA DITTA 2 NEI DIVERSI CAMPIONAMENTI**

**RAGGRUPPAMENTO CEPPI CON STESSO PATTERN GENOMICO RISCONTRATI IN ENTRAMBE LE DITTE CAMPIONATE E NEI DIVERSI CAMPIONAMENTI**

**CEPPI MAGGIORMENTE CORRELATI AL CEPPO DI RIFERIMENTO**

**CEPPI CON STESSO PATTERN GENOMICO ISOLATI NELLA STESSA FASE DI LAVORAZIONE RISCONTRATI AL 1° E AL 4° CAMPIONAMENTO**

D2 T09 1/2a STAGIONATURA 2° C.  
D2 T11 1/2a TAGLIO E CONFEZIONAMENTO 2° C.  
D1 T24 1/2a STAGIONATURA 2° C.  
D2 T12 1/2a TAGLIO E CONFEZIONAMENTO 2° PRELIEVO  
D2 T02 1/2a SALATURA 1° C.  
D2 T05 1/2a STAGIONATURA 1° C.  
D2 T10 1/2a STAGIONATURA 2° C.  
D1 T18 1/2b SALATURA 1 C.  
D2 T04 1/2a SALATURA 1° C.  
D2 T16 1/2a STAGIONATURA 4° C.  
D2 T13 1/2a STAGIONATURA 3° C.  
D2 T08 1/2a CONFEZIONAMENTO 1° C.  
D1 T22 1/2a CONFEZIONAMENTO 1° C.  
D1 T25 1/2a TAGLIO E CONFEZIONAMENTO 2° C.  
D1 T23 1/2a SALATURA 2° C.  
D1 T17 1/2a CASEIFICIO 1° C.  
D1 T26 1/2b SALATURA 3° C.  
D2 T14 1/2a STAGIONATURA 3° C .  
D1 T21 1/2a STAGIONATURA 1° C.  
D1 T28 1/2a SALATURA 4°C.  
D2 T07 1/2a CONFEZIONAMENTO 1° C.  
D1 T19 1/2a STAGIONATURA 1° C.  
D2 T15 1/2a TAGLIO E CONFEZIONAMENTO 3° C.  
D1 T27 1/2a STAGIONATURA 3° C.  
D2 T03 1/2a SALATURA 1° C.  
D2 T06 1/2a STAGIONATURA 1° C.  
D2 T01 1/2a CASEIFICIO 1° C.  
ATCC 4886 ser1/2a  
D1 T20 1/2b STAGIONATURA 1° C.  
D1 T30 1/2b STAGIONATURA 4° C.  
NCTC 10887 ser1/2b  
D1 T29 1/2b STAGIONATURA 4° C.  
ATCC 35897 L.welshimeri  
NCTC 10889 L.seligeri



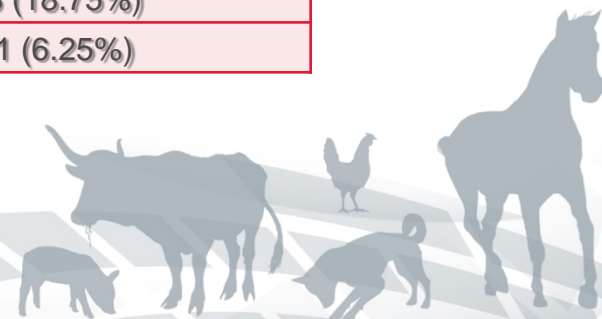
# RISULTATI DELL' ANALISI DEI BIOFILM

- Azienda D1: 14 ceppi di *Listeria monocytogenes*

Pulsotipo	Sierotipo	Numero di campioni
1	1/ 2 a	9 (64.3%)
2	1/ 2 b	5 (35.7%)

- Azienda D2: 16 ceppi di *Listeria monocytogenes*

Pulsotipo	Sierotipo	Numero di campioni totali
1	1/ 2 a	8 (50%)
3	1/ 2 a	4 (25%)
4	1/ 2 a	3 (18.75%)
5	1/ 2 a	1 (6.25%)





# RISULTATI ANALISI BIOFILM

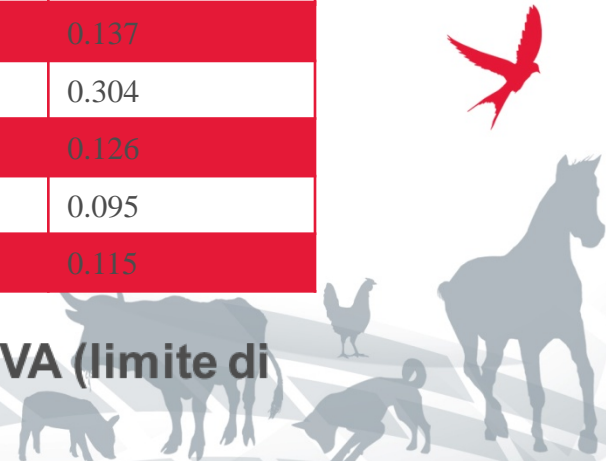
## Teflon

ID campione	Pulsotipo	Sierotipo	Media OD 12 ° C	Media OD 37 ° C
D1 T20	2	1/2b	0.028	0.058
D2 T01	4	1/2a	0.100	0.041
D2 T09	5	1/2a	0.039	0.050
D2 T02	3	1/2a	0.043	0.019
D2 T07	1	1/2a	0.020	0.031

## Acciaio

ID campione	Pulsotipo	Sierotipo	Media OD 12 ° C	Media OD 37 ° C
D1 T20	2	1/2b	0.030	0.137
D2 T01	4	1/2a	0.025	0.304
D2 T09	5	1/2a	0.036	0.126
D2 T02	3	1/2a	0.034	0.095
D2 T07	1	1/2a	0.0	0.115

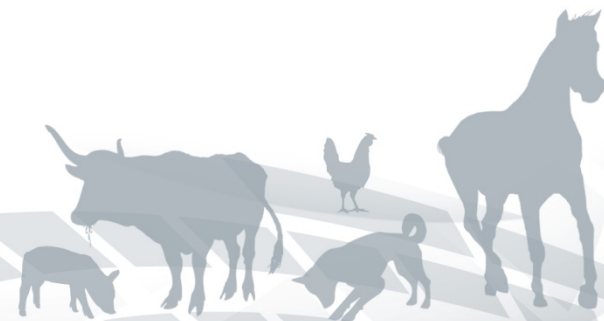
I risultati sono stati analizzati attraverso il test ANOVA (limite di significatività  $P < 0,05$ )



# RISULTATI BIOFILM

Fonte	DF	Somma dei quadrati	Media dei quadrati	F di Fisher	Pr > F
Campione	4	0,005	0,001	1,007	<b>0,418</b>
Temperatura	1	0,020	0,020	16,622	<b>0,000</b>
Materiale	1	0,015	0,015	11,940	<b>0,002</b>

**ANOVA (limite di significatività  $P < 0,05$ )**



# RISULTATI BIOFILM



Grafico d'interazione tra gli fattori Campione e Temp

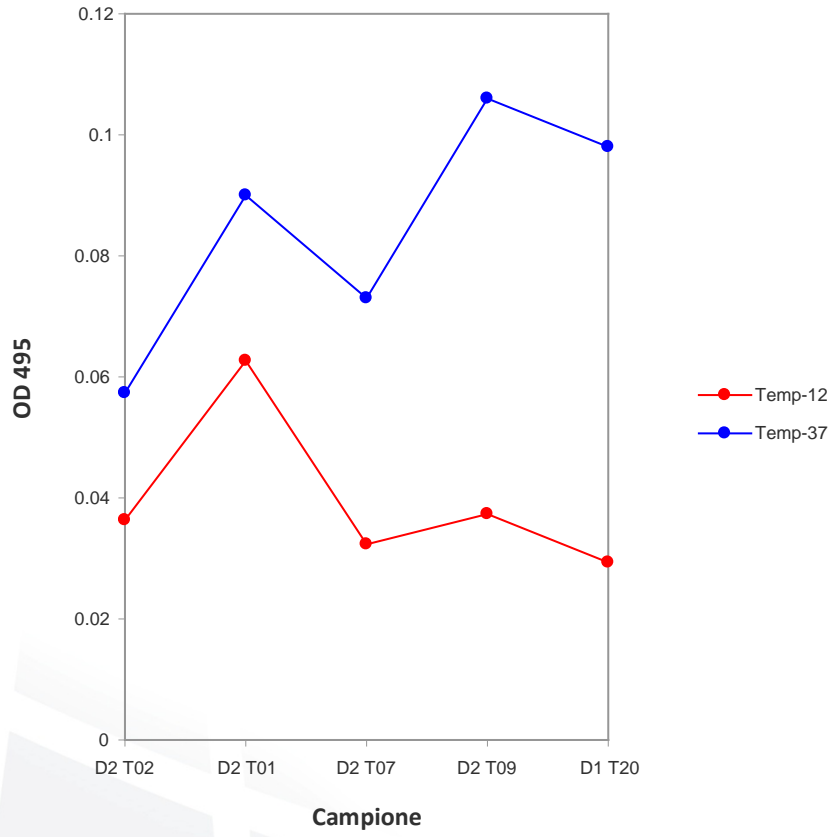
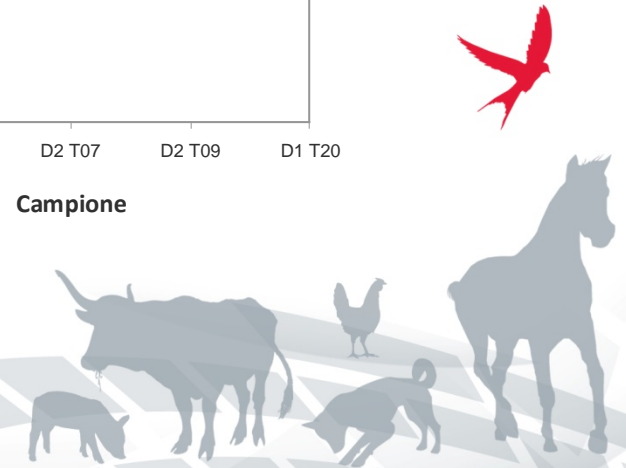
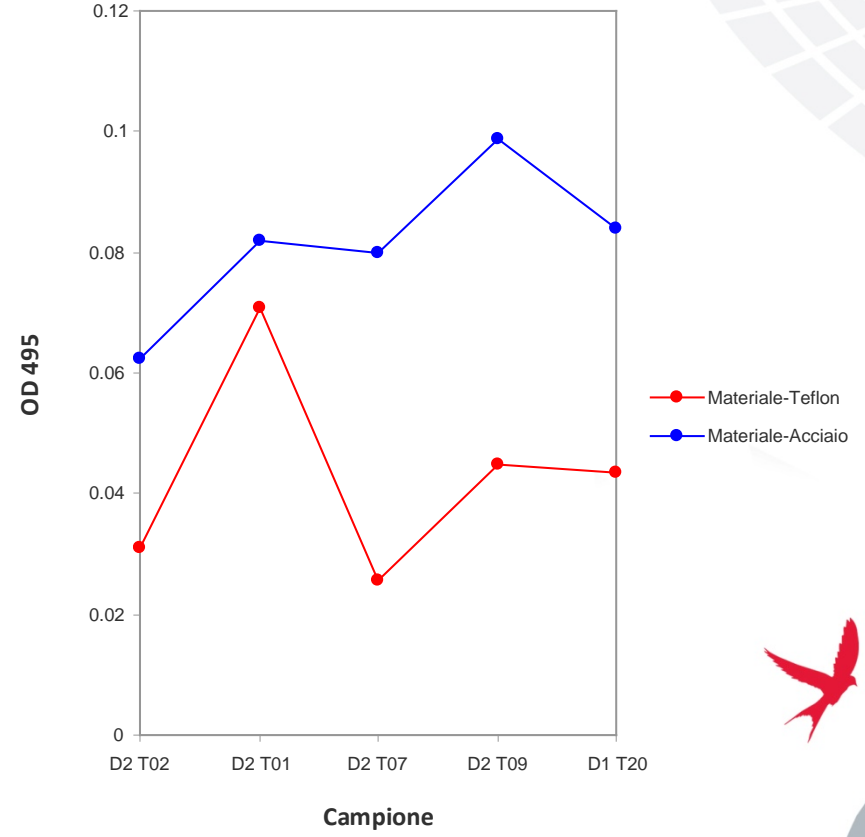


Grafico d'interazione tra gli fattori Campione e Materiale





# RISULTATI DELL' ANALISI AL SEM

ID campione	Teflon 12 ° C	Acciaio 12 ° C	Teflon 37 ° C	Acciaio 37 ° C
D2 T02	+/-	+/-	+/-	+
D2 T01	+	+/-	+/-	++
D2 T07	+/-	+/-	+/-	+
D2 T09	+/-	+/-	+/-	+
D1 T20	+/-	+/-	+/-	+

**+/+** CRESCITA ALTA

**+/-** CRESCITA BASSA

**+** CRESCITA MEDIA



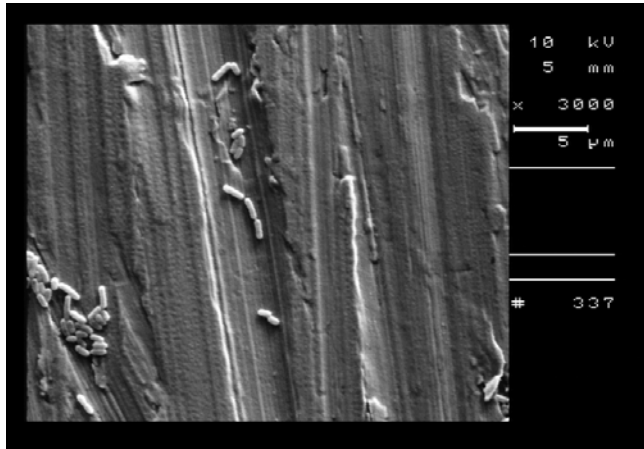


ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

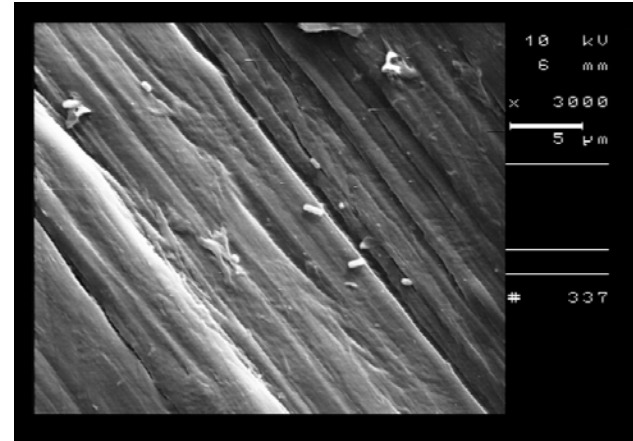
# RISULTATI ALL' ANALISI IN SEM

Campione D2 T09

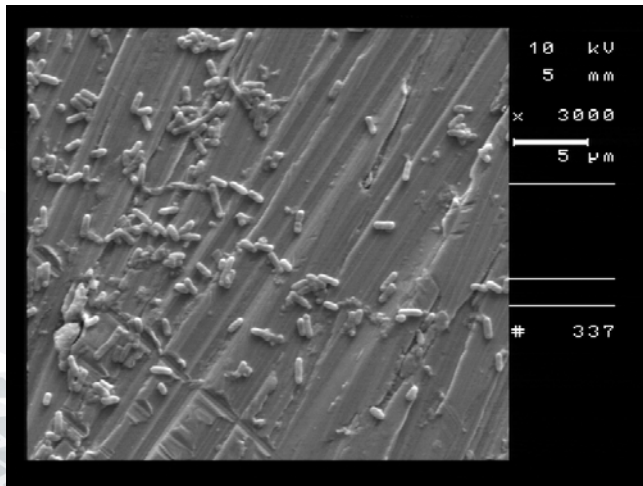
Acciaio 12 ° C



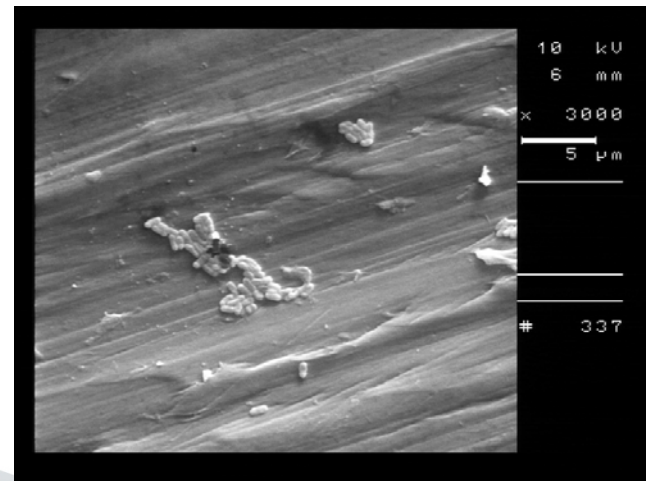
Teflon 12 ° C



Acciaio 37 ° C



Teflon 37 ° C



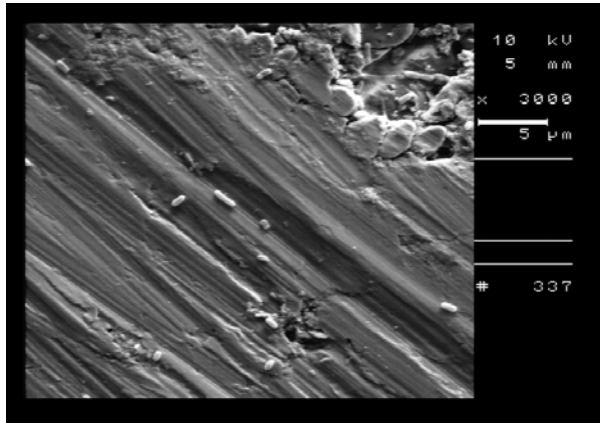


ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

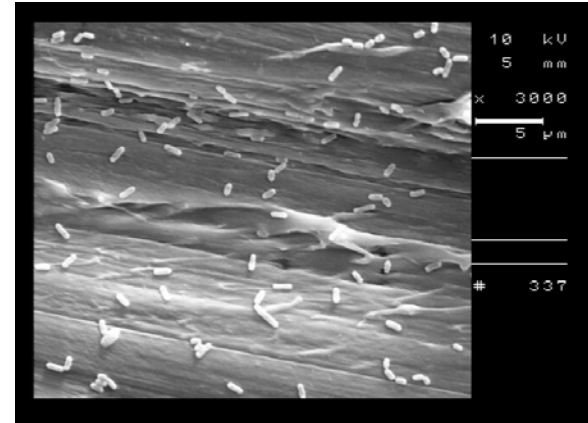
# RISULTATI ALL' ANALISI AL SEM

Campione D2 T01

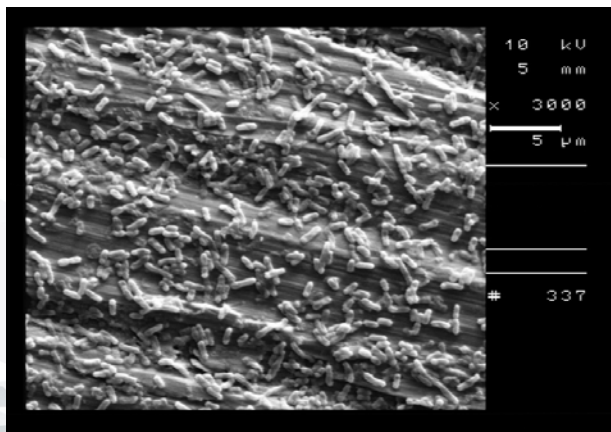
Acciaio a 12° C



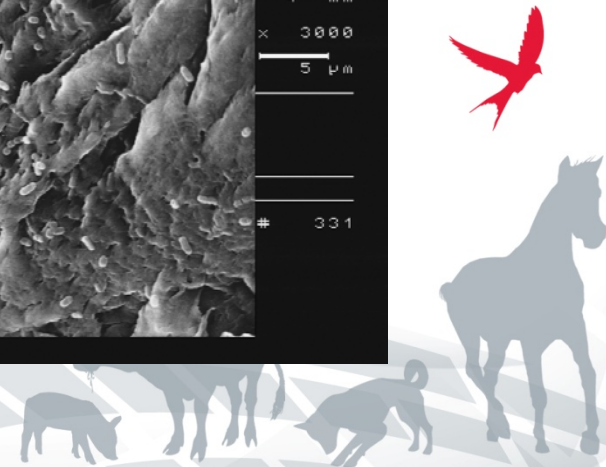
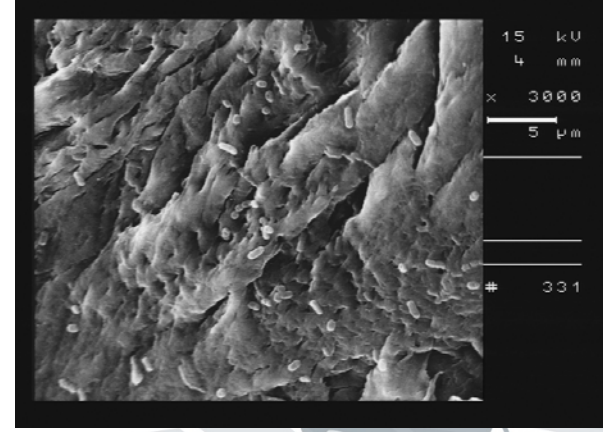
Teflon a 12° C



Acciaio a 37° C

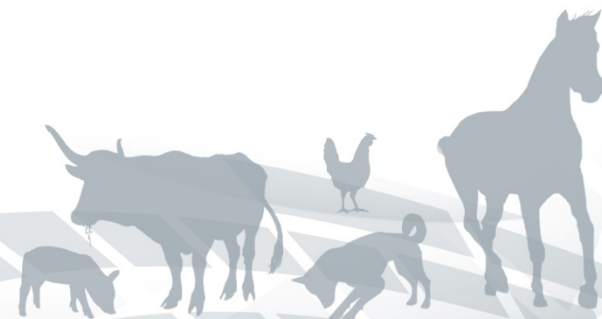


Teflon a 37° C



# DISCUSSIONE

- Dall'analisi sui ceppi mediante microarray i geni di virulenza non sono fattori discriminanti in quanto risultano presenti in tutti i ceppi analizzati.
- Nella **DITTA 1** i ceppi isolati si distribuiscono in due sottogruppi dove i ceppi costituenti ciascun sottogruppo risultano avere pattern genomici simili.
- Nello **DITTA 2** i ceppi risultano caratterizzati da pattern genomici eterogenei.





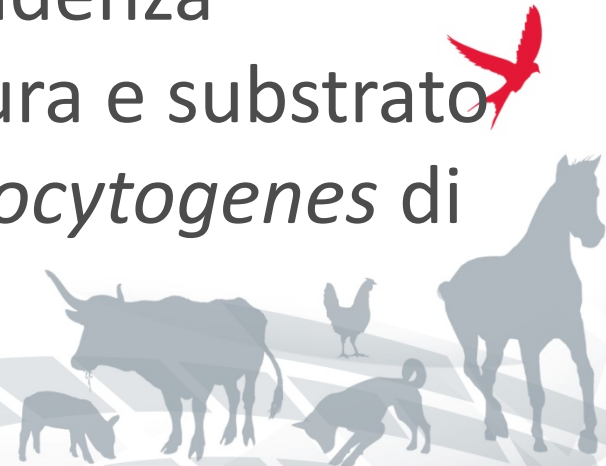
# DISCUSSIONE

- In entrambi gli stabilimenti i ceppi si differenziano dal pattern genomico del ceppo di riferimento 1/2 a utilizzato.



# DISCUSSIONE

- L'isolamento di ceppi con medesimo pattern genomico provenienti da uno stesso luogo di prelievo, ma appartenenti a diversi periodi di campionamento, presuppone la presenza di ceppi persistenti.
- L'analisi dei biofilm mette in evidenza l'influenza dei fattori temperatura e substrato sulla capacità della *Listeria monocytogenes* di produrre il biofilm stesso.



# CONCLUSIONI

- Questo studio preliminare sulla caratterizzazione genomica non ci consente di utilizzare i geni di virulenza come fattori discriminanti, perchè presenti in tutti i ceppi analizzati. Pertanto sarebbe opportuno ampliare il pannello dei target oggetto di indagine molecolare e valutarne l'espressione.



# CONCLUSIONI

- Visto la persistenza dei ceppi nei luoghi di lavorazione, sarebbe auspicabile estendere queste analisi su tutti i ceppi in modo da ampliare le conoscenze sui fattori di rischio a tutela della salute del consumatore.







ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO



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

