



XVII Convegno dell'Associazione Italiana Veterinari Igienisti

Rintracciabilità e corretta prassi igienica nella produzione primaria: un'opportunità per il veterinario igienista



Cesenatico, 14 - 15 - 16 giugno 2007
Sala Convegni Palazzo del Turismo

CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA E SIEROLOGICA DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATA DA ALIMENTI E AMBIENTI DI LAVORAZIONE

GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATED FROM FOODS AND FOOD ENVIRONMENTS

Conter M., Di Ciccio P.¹, Zanardi E., D'Orio V.¹, Ghidini S., Vergara A.¹, Ianieri A.
 Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli
 Alimenti, Università degli Studi di Parma

¹Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Teramo

Summary. Fifty-one strains of *Listeria monocytogenes* previously isolated from foods and food environments were serotyped and three new multiplex PCRs were used to detect the main virulence genes. These results were analyzed statistically in order to understand if correlations exist between the presence of virulence genes, serotype and food. The majority of the strains belonging to serotype 1/2a and all the strains belonging to serotype 4b were isolated from fish or fish environment. On the contrary, the majority of the strains belonging to serotype 1/2b and all the strains belonging to serotype 1/2c were isolated from meat and meat environment. All tested strains showed the presence of all virulence genes, suggesting that all the strains could be virulent. The *actA* gene showed a polymorphism that could be related to a different level of strain pathogenicity, but this aspect should be further investigated by in vivo or in vitro tests. Statistical analysis showed a correlation between food matrix, serotype and one of the two forms of *actA* gene. In particular, fish matrix was related to the form of *actA* gene of 268 bp and to the serotype 4b, frequently isolated from cases of human illness.

Key words: *Listeria monocytogenes*; genotypic characterization, multiplex PCR, virulence factors, serotype.

INTRODUZIONE

Listeria monocytogenes è un microrganismo patogeno per l'uomo e gli animali, associato ad alimenti di origine animale (1, 2). L'incidenza della patologia nell'uomo è generalmente bassa, ma a causa della severità della malattia e dell'alto tasso di mortalità, negli ultimi anni si sta rivolgendo una grande attenzione allo studio delle sue proprietà di virulenza (3, 4). L'incidenza della malattia dipende da numerosi fattori, compresi, la dose infettante e lo stato immunitario dell'ospite (3, 4). Inoltre, è stata ampiamente dimostrata la variabilità nella virulenza a seconda dei ceppi in causa (5, 6). La virulenza di *L. monocytogenes* è dovuta all'espressione di numerosi geni responsabili della penetrazione all'interno delle cellule, della proliferazione e della diffusione da cellula a cellula. La comprensione e la valutazione del rischio posto da questo patogeno richiede, quindi, il rilevamento e l'identificazione di questi geni accanto ad altre caratteristiche dei ceppi quali, ad esempio, il sierotipo di appartenenza. Dei tredici sierotipi identificati, infatti, solamente 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 (7, 8). 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 (9).

Nel presente lavoro sono riportati i risultati della caratterizzazione genotipica e sierologica di ceppi di *L. monocytogenes* isolati da alimenti di origine ittica e suina e dai relativi ambienti di lavorazione. La prima è stata effettuata mediante lo sviluppo di tre nuove PCR multiplex che consentono l'identificazione di genere, di specie e la contemporanea definizione dei principali geni associati alla virulenza. Infine è stata analizzata la correlazione tra caratteristiche genetiche, matrice e sierotipo.

MATERIALI E METODI

Per questo studio sono stati considerati 51 ceppi di *L. monocytogenes*, di cui 28 da matrici carnee e dai relativi ambienti di lavorazione, 17 da prodotti ittici e dai relativi ambienti e 6 di riferimento (ATCC 7644, 15313, 19111, 19114, 19115 e NCTC 11994). Tutti i ceppi sono stati isolati ed identificati con la metodica UNI EN ISO 11290-1 ed in seguito sono stati sottoposti al test di sierotipizzazione usando *Listeria Antiser* "SEIKEN" (Denka Seiken, Tokyo, Japan) in accordo con le istruzioni fornite dal produttore. Il DNA genomico è stato estratto mediante il kit "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche) seguendo le istruzioni del produttore. In seguito sono state messe a punto tre multiplex PCR per il rilevamento 1) dei geni *rrn* (16S rRNA), *hlyA* (listeriolosina) e *actA* (actina), 2) *inlA* (internalina A), *inlB* (internalina B) e *iap* (proteina p60), 3) *plcA* (fosfolipasi C fosfatidil-inositolo specifica) e *plcB* (fosfolipasi C fosfatidilcolina specifica), modificando le PCR di Border *et al.* (10) e Jaradat *et al.* (11). I primer (tabella 1) sono stati sintetizzati da Eurogentec (Seraing, Belgium). Tutte le amplificazioni sono state eseguite in un volume di 50 µl contenente buffer 1X (10mM Tris/HCl pH 8.3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl), 200 µM dNTP mix, 1 µM ciascun primer, 2,5U di Taq polimerasi (5U nel caso di *plcA* e *plcB*) e 2 µl di DNA. La prima amplificazione è stata eseguita allo scopo di rilevare i geni *rrn*, *hlyA* e *actA*, e conteneva i primer U1, L11, LM1, LM2, actAF, actAR. I cicli di reazione erano: 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*, conteneva i primer inlAF, inlAR, inlBF, inlBR, iap1, iap2, mentre la terza amplificazione per il rilevamento di *plcA* e *plcB*, conteneva i primer plcAF, plcAR, plcBF e plcBR. In entrambe queste amplificazioni i cicli di reazione erano: 94°C per 180 sec, seguiti da 35 cicli di 94°C per 60 sec, 55°C 120 sec e 72°C per 60 sec, seguiti da 72°C per 5 minuti. I prodotti di PCR sono stati visualizzati in gel di agarosio all'1,5% previa colorazione in bromuro di etidio. L'analisi statistica è stata effettuata mediante SPSS ver. 13.0 (Chicago, Illinois).

RISULTATI

In totale sono stati sierotipizzati 45 ceppi e sono stati rilevati 4 sierotipi distinti. Escludendo i ceppi di riferimento, 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.

I prodotti dell'amplificazione di tutti i geni considerati erano presenti in tutti i ceppi, ad esclusione del ceppo ATCC 19114 (4a) che non mostrava la presenza dei frammenti relativi a *iap* e a *plcA*. Inoltre, tutti i prodotti dell'amplificazione erano delle dimensioni attese (tabella 1). È da notare che l'amplificazione del gene *actA*, uno dei principali geni responsabili della virulenza, che media la motilità intra- e intercellulare (3) ha dato amplificati di due diverse dimensioni. Il 76,5% degli isolati, compresi i ceppi di riferimento ATCC 7644, 15313, 19111 e 19115, mostrava un prodotto di 385 pb, mentre il restante 23,5%, compresi i ceppi di riferimento ATCC 19114 e NCTC 11994, mostrava un prodotto di 268 pb.

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, anche dalle carni e dai relativi ambienti di lavorazione. Il sierotipo 4b, sebbene sia quello meno frequente, viene, inoltre, isolato esclusivamente da ambienti e prodotti ittici. Infine, è netta l'associazione tra i sierotipi 1/2b e 1/2c e le carni e i relativi ambienti di lavorazione. Questi dati sono in accordo con quanto riportato da altri autori (12, 13, 14)

Relativamente alle multiplex PCR, considerando che i geni di virulenza presi in esame sono stati rilevati in tutti i ceppi isolati, non è stato possibile poter associare questo dato né al sierotipo, né alla fonte del ceppo. In effetti, alcuni ricercatori hanno rilevato la presenza dei geni responsabili della virulenza in ceppi isolati da patologia nell'uomo (11, 15) e da alimenti (16, 17). Nonostante la scarsità di studi presenti in letteratura, i ceppi isolati da alimenti presentavano, rispetto a quelli umani, una variabilità più marcata nella presenza di tali geni. A tale proposito rimane da approfondire se effettivamente i ceppi non presentassero i geni oppure se i protocolli utilizzati non ne consentissero l'amplificazione, anche a causa del polimorfismo dimostrato per alcuni di essi (6, 18).

I primer utilizzati per l'amplificazione di *actA* hanno permesso di evidenziare il polimorfismo presente per questo gene. Wiedmann *et al.*, (6) riportano che le diverse forme di *actA* potrebbero essere associate a una diversa virulenza dei ceppi, anche se questo aspetto andrebbe testato con metodi in vitro o in vivo. Nel nostro studio, la forma di *actA* di 268 pb è stata più spesso isolata da ceppi provenienti da ambienti e prodotti ittici e non è mai stata isolata da ceppi di origine carnea. Inoltre, l'MCA rivela che la forma di *actA* di 268 pb è altamente correlata con il sierotipo 4b che, come ampiamente riportato in letteratura, risulta essere il sierotipo più frequentemente isolato da casi di malattia nell'uomo (7, 8). Franciosa *et al.*, (15) non avevano rilevato nessuna correlazione tra sierotipo e una delle due forme di *actA*, tuttavia, in questo studio, erano stati considerati 27 ceppi esclusivamente di origine clinica e di due soli sierotipi (1/2a e 4b).

In conclusione, risulta evidente la correlazione tra la matrice da cui il ceppo viene isolato ed il sierotipo. In particolare emerge che i sierotipi 1/2a e 4b sono legati soprattutto all'ambiente ittico, mentre è maggiore l'associazione tra i sierotipi 1/2b e

1/2c con le carni e i relativi ambienti di lavorazione. Le PCR multiplex messe a punto in questo lavoro hanno permesso di disporre dei dati sulla presenza dei principali geni responsabili della virulenza in breve tempo e riducendo i costi d'analisi. I profili ottenuti mostrano che tutti i geni considerati sono presenti in tutti i ceppi testati che, quindi, possono essere potenzialmente patogeni. Il polimorfismo mostrato dal gene *actA*, la probabile correlazione di una delle due forme di *actA* ad una maggior virulenza dei ceppi e la connessione tra il sierotipo e la matrice d'origine suggeriscono che andrebbero considerati altri geni coinvolti nella virulenza e al contempo le capacità di invasione e proliferazione in vitro, al fine di chiarire le reali potenzialità patogene dei ceppi.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Chao G., Deng Y., Zhou X., Xu Q., Qian X., Zhou L., Zhu B. 2006. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in delicatessen food products in China. *Food Control* 17, 971-4.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Dussurget O., Pizzarro-Cereda J., Cossart P. 2004. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual Review of Microbiology* 58, 587-610.
- 5) Farber J., Peterkin PI. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology Review* 55, 476-511.
- 6) Wiedmann M., Bruce JL., Keating C., Johnson AE., McDonough PL. 1997. Ribotypes and virulence gene polymorphism suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection and Immunity* 65, 1707-16.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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* 29, 851-75.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Jay M.J. 1996. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. *Food Control* 7, 209-14.
 - 13) 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.
 - 14) Thévenot D., Delignette-Muller M.-L., Christieans S., Leroy S., Kodjo A., Vernozy-Rozand C. 2006. Serological and molecular ecology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from 13 French pork meat salting-curing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology* 112, 153-61.
 - 15) Franciosa G., Maugliani A., Floridi F., Aureli P. 2005. Molecular and experimental virulence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from cases with invasive listeriosis and febrile gastroenteritis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43, 431-9.
 - 16) Shakuntala I., Malik S.V.S., Barbuddhe S.B., Rawool D.B. 2006. Isolation of *Listeria monocytogenes* from buffaloes with reproductive disorders and its confirmation by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 117, 229-34.
 - 17) Jallewar P.K., Kalorey D.R., Kurkure N.V., Pande V.V., Barbuddhe S.B. 2007. Genotypic characterization of *Listeria* spp. isolated from fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology* 114, 120-3.
 - 18) Vines A., Swaminathan B. 1998. Identification and characterization of nucleotide sequence differences in three virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* strains representing clinically important serotypes. *Current Microbiology* 36, 309-18.

Tabella 1: Sequenze dei primer utilizzati.

Gene bersaglio	Sequenze (5'-3')	Dimensioni dell'amplificato (pb)
<i>rrn</i>	CAG CAG CCG CGG TAA TAC CTC CAT AAA GGT GAC CCT	938
<i>hlyA</i>	CCT AAG ACG CCA ATC GAA AAG CGC TTG CAA CTG CTC	702
<i>inlA</i>	CCT AGC AGG TCT AAC CGC AC TCG CTA ATT TGG TTA TGC CC	255
<i>inlB</i>	AAA GCA CGA TTT CAT GGG AG ACA TAG CCT TGT TTG GTC GG	146
<i>actA</i>	GAC GAA AAT CCC GAA GTG AA CTA GCG AAG GTG CTG TTT CC	268 o 385
<i>plcA</i>	CGA GCA AAA CAG CAA CGA TA CCG CGG ACA TCT TTT AAT GT	192
<i>plcB</i>	GGG AAA TTT GAC ACA GCG TT ATT TTC GGG TAG TCC GCT TT	261

ISSN 1825-4454

Impaginazione a cura della
segreteria organizzativa I Viaggi di Salomone
www.iviaggidisalomone.it