



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO in

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E SICUREZZA DEGLI
ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

(Direttore Prof. Giovanni Garippa)

***INDIRIZZO IN: Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale
(XXIII CICLO)***

(coordinatore: prof. Basilio Remo Floris)

**EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE, FATTORI DI PATOGENICITÀ E
ANTIBIOTICO – RESISTENZA**

DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATA DA SALSICCIA OVINA

Docente Guida

Chiar.mo Prof. Enrico P. L. De Santis

Direttore

Prof. Giovanni Garippa

Tutor

Dott. Sebastiano Virgilio

Tesi di dottorato della

Dott. ssa M. Nives Rosa

ANNO ACCADEMICO 2009 – 2010

Indice

1	Introduzione	3
2	<i>Listeria monocytogenes</i> e listeriosi	7
2.1	Caratteristiche	7
2.1.1	Ecologia della <i>Listeria</i>	10
2.1.2	Fattori di virulenza	13
2.2	Patologia e patogenesi	19
2.3	Terapia	26
3	Parte sperimentale	27
3.1	Scopo del lavoro	27
3.2	Materiali e metodi	29
3.2.1	Ceppi batterici e condizioni colturali.	32
3.2.2	Conservazione dei ceppi batterici	33
3.2.3	Sierotipizzazione	34
3.2.4	Estrazione del DNA degli isolati e dei ceppi di referenza di <i>Listeria</i> spp.	37
3.2.5	Estrazione del DNA dei ceppi di referenza di <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i>	38
3.2.6	Primers utilizzati	40
3.2.7	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	41
3.2.8	Corsa elettroforetica	45
3.2.9	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE)	46
3.2.10	Suscettibilità antimicrobica	50
4	Risultati	53
5	Conclusioni	62
6	Bibliografia	67

M. Nives Rosa

"Epidemiologia molecolare, fattori di patogenicità e antibiotico-resistenza di *Listeria monocytogenes* isolata da salsiccia ovina"
Tesi di Dottorato in: Riproduzione, Produzione, Benessere animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale. (XXXIII Ciclo)
Università degli Studi di Sassari

1 Introduzione

Listeria monocytogenes è l'agente eziologico della listeriosi, una malattia a carattere zoonotico che l'uomo contrae usualmente a seguito dell'ingestione di alimenti contaminati, sia di origine animale che vegetale.

In considerazione del carattere zoonotico della malattia, trasmissibile per via alimentare, la listeriosi è stata inclusa dal legislatore comunitario nella Direttiva 2003/99/CE, Allegato I, (recepita nell'ordinamento nazionale con il Decreto legislativo n. 191/2006) tra le zoonosi e gli agenti zoonotici che devono essere sottoposti a sorveglianza (Dir. 2003/99/CE; D.Lgs. 04/04/06, n°191).

Dal rapporto EFSA 2009 (The Community Summary Report, 2009) emerge che nel 2008 sono stati confermati nell'Unione Europea 1.381 casi di listeriosi umana (di cui 75 in Italia), con una incidenza pari a 0,3 casi/100.000 abitanti; tali dati di incidenza sono riferiti in realtà esclusivamente agli episodi delle forme invasive e non di quelle gastroenteriche, ampiamente sottostimate.

Il Reg. (CE) n. 178/2002, art. 14, vieta l'immissione sul mercato di alimenti a rischio, intendendo per tali quelli dannosi per la salute umana (contenenti cioè microrganismi o loro tossine o metaboliti e residui di composti chimici in quantità tali da costituire un rischio inaccettabile per la salute umana) o inadatti al consumo umano, a seguito di fenomeni alterativi o deteriorativi che comportino modificazioni delle caratteristiche organolettiche tipiche.

Gli alimenti più frequentemente associati alla trasmissione di *Listeria monocytogenes* sono quelli pronti per il consumo (*ready to eat foods*, RTE), e comprendono prodotti lattiero-caseari (in particolare alcuni tipi di formaggi a pasta molle ottenuti da latte non pastorizzato), prodotti a base di carne, prodotti ittici (in particolare pesce affumicato) e alimenti di origine vegetale, segnatamente le verdure (The Community Summary Report, 2009).

Il Reg. (CE) n. 2073/2005 definisce alimenti pronti per il consumo quei “*prodotti alimentari destinati dal produttore o dal fabbricante al consumo umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti*”.

Si tratta di alimenti che, grazie alla loro praticità d’uso e alle mutate abitudini alimentari, hanno acquisito in questi ultimi anni un particolare favore presso i consumatori dei Paesi a più elevato reddito, USA ed Europa in particolare.

Il medesimo Regolamento include *Listeria monocytogenes* tra i criteri di sicurezza alimentare (che definiscono l’acceptabilità dei prodotti alimentari e che sono applicabili ai prodotti immessi sul mercato per l’intera durata del periodo di conservabilità in condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione e uso) per:

- gli alimenti pronti per lattanti e a fini medici speciali, nei quali il microrganismo deve essere assente in 25 g in 10 unità campionarie;
- gli alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita del microrganismo, nei quali il limite di tollerabilità nelle 5 unità campionarie

M. Nives Rosa

è fissato in 100 UFC/g se il produttore è in grado di dimostrare che nel corso della *shelf life* del prodotto il microrganismo non supererà tale soglia, o in assenza in 25 g in fase di produzione se il produttore non è in grado di dimostrare che il limite di 100 UFC/g non sarà superato nel corso della commercializzazione;

- per gli alimenti pronti che non costituiscono substrato permissivo allo sviluppo del microrganismo, per i quali il limite è fissato in 100 UFC/g in 5 unità campionarie.

Il Reg. (CE) n. 2073/05 prevede anche l'obbligo della ricerca di *L.monocytogenes* sulle superfici di lavoro degli stabilimenti che producono alimenti pronti per il consumo.

Nell'ambito delle produzioni carnee della Sardegna il prodotto principale è rappresentato come è noto dall'agnello leggero da latte, mentre le pecore a fine carriera e quelle scarsamente produttive hanno un modesto valore commerciale e un mercato molto ristretto.

Da alcuni anni, tuttavia, alcuni imprenditori isolani hanno intrapreso azioni concrete di valorizzazione delle carni di ovini adulti attraverso la trasformazione delle stesse in prodotti di salumeria (prosciutto crudo, salsiccia stagionata, filetto), la cui caratterizzazione qualitativa e igienico-sanitaria è stata definita da Enti regionali di ricerca, tra cui in particolare l'Istituto di Ispezione degli Alimenti di O.A. della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari (Mazzette

et al., 1996; Mazzette et al., 2001; Greco et al., 2005) e il Dipartimento di Igiene degli Alimenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna (Ric. Cor. 03/06, 2006; Ric. Cor. 06/07, 2007; Ric. Cor. 04/08, 2008; Rosa M.N. et al., 2010).

Gli insaccati a base di carne di pecora sono prodotti di nicchia ma con interessanti prospettive commerciali sia nei paesi occidentali che in quelli di religione musulmana ed ebraica.

Gli insaccati crudi stagionati sono resi stabili e sicuri sotto il profilo microbiologico da una serie di fattori quali il sale, i nitriti, la diminuzione del potenziale redox, la selezione dei batteri lattici, la diminuzione del pH e la riduzione dell' A_w nel corso della stagionatura.

I fenomeni chimico-fisici e microbiologici che si susseguono nel corso del processo produttivo sono fondamentali per la stabilità degli insaccati fermentati a breve stagionatura ("*semi-dry-sausages*") (Leistner et al., 2002).

La presente sperimentazione è stata condotta su campioni di salsiccia stagionata di pecora e sul relativo processo di produzione e sugli ambienti di lavorazione.

La salsiccia stagionata di pecora è un insaccato crudo pronto per il consumo che a seguito di un periodo di stagionatura non superiore a trenta giorni presenta valori di pH e A_w pari rispettivamente a 5,66 e 0,87.

2 *Listeria monocytogenes* e listeriosi

2.1 Caratteristiche

Il genere *Listeria* comprende un gruppo di batteri Gram positivi a basso contenuto di G+C, strettamente correlati a *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Appartengono a questo genere sei specie conosciute: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi*. Recentemente quest'elenco è stato aggiornato con l'introduzione di due nuove specie *L. marthii* e *L. rocourtii* individuate grazie all'ausilio di nuove tecniche di caratterizzazione molecolare (Graves et al., 2010; den Bakker et al., 2010). L'unica specie considerata patogena sia per l'uomo che per gli animali sino a qualche tempo fa è stata *L. monocytogenes*.

I batteri del genere *Listeria* spp. hanno forma bastoncellare, pleiomorfa, sono asporigeni e acapsulati, anaerobi facoltativi e mobili a temperature comprese fra 10° e 25° C. Spiccatamente psicrotrofi, duplicano a temperature comprese fra -1° e 50°C, con una temperatura ottimale di sviluppo tra 30° e 37°C e in intervalli di pH compresi fra 4,0 e 9,5. Alotolleranti, sono in grado di moltiplicarsi in presenza di concentrazioni di sale fino a 8-10% in presenza di un A_w minima di crescita compresa tra 0,900-0,880. Tra i batteri non sporigeni sono quelli maggiormente termoresistenti: per la loro inattivazione è necessario un trattamento termico di almeno 72°C per 15 secondi.

Sotto l'aspetto biochimico *L. monocytogenes* è generalmente emolitico, catalasi ed ossidasi positivo. Non riduce i nitrati, non produce idrogeno solforato e fermenta glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio, saccarosio, cellobiosio, trealosio e ramnosio con la conseguente produzione di acidi.

Pur essendo asporigeno e privo di capsula, notevole è la capacità di *L. monocytogenes* di resistere a condizioni ambientali sfavorevoli. Sollecitazioni subletali quali variazioni di pH, A_w , temperatura ambientale come anche esposizione eccessiva ad antibiotici, processi tecnologici di trattamento e conservazione degli alimenti inducono modificazioni delle caratteristiche fisiologiche, genomiche e persino morfologiche del batterio in misura più o meno importante a seconda dello stadio vitale in cui esso si trova. La maggiore capacità di resistenza si riscontra nei batteri in fase di crescita stazionaria (VBNC: *Viable But Not Culturable cell*) rispetto alla maggiore sensibilità che gli stessi dimostrano in fase logaritmica di crescita (LOG). Questa strategia di adattamento è tipica di quei microrganismi che sono indicati come "evolving pathogen".

L. monocytogenes conta attualmente 13 sierotipi diversi, distinguibili fra loro in base agli antigeni somatici O (acidi teicoici) e antigeni flagellari H. I sierotipi più frequentemente riscontrati negli isolati clinici umani e animali sono 1/2a, 1/2b e 4b nel 90% dei casi (Vasquez-Boland et al., 2001) mentre negli alimenti vengono isolati con maggiore frequenza i sierotipi 1/2a, 1/2b e 1/2c (Rocourt & Cossart, 1997).

E' però opinione recente che i diversi sierotipi non siano specie specifici e che non vi siano correlazioni tra alcuni sierotipi e una determinata forma clinica di listeriosi. Inoltre è stato accertato che la virulenza non è correlata con il sierotipo; non esistono, infatti, sierotipi più virulenti di altri che causano forme di listeriosi più gravi, rispetto ad altri considerati meno virulenti.

2.1.1 Ecologia della *Listeria*

I batteri appartenenti al genere *Listeria* ed in particolare *L. monocytogenes* per le loro spiccate caratteristiche di resistenza e adattamento a condizioni ambientali sfavorevoli sono estremamente diffusi negli ambienti più disparati. Se infatti il possesso di specifici meccanismi di patogenicità, che verranno chiariti più avanti, ne giustificano la presenza come loro habitat d'elezione all'interno delle cellule eucariotiche non è però improbabile il loro isolamento anche in altri ambienti. Da studi condotti negli Stati Uniti, il genere *Listeria* è isolato in oltre il 20% dei campioni provenienti da ambienti rurali, urbani, da allevamenti oltre che da ambienti legati alla produzione e trasformazione degli alimenti (macelli, impianti di trasformazione, punti vendita al dettaglio). L'utilizzo di tecniche di caratterizzazione molecolare e sub-tipizzazione applicate agli isolati di varia provenienza ha anche evidenziato che esistono delle associazioni tra alcuni ceppi o specie e determinati ambienti, nell'ambito dei quali gli stessi microrganismi persistono per periodi anche molto lunghi. Ad esempio, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* sono più frequentemente isolate da ambienti rurali mentre *L. innocua* e *L. monocytogenes* in ambienti urbani (Wiedmann, 2010).

Essi sono molto diffusi nel suolo e nelle acque superficiali. La loro presenza nei foraggi e soprattutto negli insilati si pensa possa essere causa di diffusione negli allevamenti dove si rinviene nel contenuto intestinale degli animali e nelle loro deiezioni. L'immissione diretta di queste nei campi o il loro utilizzo per interventi

di fertilizzazione organica insieme con le acque superficiali utilizzate per l'irrigazione contribuiscono all'ulteriore diffusione del patogeno nei foraggi e nei vegetali destinati al consumo umano. La sopravvivenza del batterio nel suolo è stata oggetto di alcuni studi sperimentali condotti da ricercatori inglesi e francesi (Nicholson et al., 2004; Girardin et al., 2005) i quali hanno accertato che la *L. monocytogenes* sopravvive nei liquami liquidi e nelle acque di scolo dell'allevamento per un periodo di tempo superiore a tre mesi, mentre nel letame solido fermentato a causa dell'eccessivo innalzamento della temperatura per processi di fermentazione organica sopravvive per non più di un mese. I tempi di persistenza del batterio vitale sul terreno dopo distribuzione del letame sono simili a quelli riscontrati nei liquami e si prolungano nel periodo invernale per la sua psicrotrofia.

Il microrganismo può facilmente diffondere negli stabilimenti alimentari e colonizzare ambienti di lavoro, superfici, attrezzature, operatori, materie prime e prodotti finiti. Nella diffusione della *L. monocytogenes* alcuni studiosi riconoscono all'uomo oltre che un ruolo attivo anche un ruolo passivo quale portatore asintomatico in percentuale variabile tra il 2% e il 6% degli individui sani (Rocourt et al., 2000; Kathariou, 2002).

La persistenza di *L. monocytogenes* negli impianti di lavorazione alimentare può essere inoltre fortemente favorita dalla sua capacità di formare biofilm che le conferiscono anche una certa protezione nei confronti dei detergenti battericidi. La sopravvivenza di *L. monocytogenes* in questi ambienti è documentato essere

superiore talvolta a dieci anni (Wiedmann, 2010; Kathariou, 2002). Le matrici alimentari maggiormente soggette a fenomeni di contaminazione sono sia i prodotti di origine animale, in particolare formaggi molli, latte crudo o pastorizzato in maniera incompleta, carne pronta al consumo, carne cruda, salumi crudi, pollame crudo, prodotti della pesca e dell'acquacoltura, in salamoia e affumicati, che i prodotti di origine vegetale, in particolare le verdure (The Community Summary Report, 2009).

2.1.2 Fattori di virulenza

Data la grande diffusione di *L. monocytogenes* nei prodotti alimentari e i numerosi dati epidemiologici riportati in bibliografia è ormai accertato che la principale via di penetrazione della *L. monocytogenes* nell'uomo è quella alimentare.

Il processo infettivo evolve in patologia quando il batterio attraversando la barriera intestinale diffonde per via ematica e linfatica raggiungendo inizialmente il fegato, in cui si moltiplica all'interno degli epatociti, e la milza, quindi sempre per via ematica raggiunge gli organi bersaglio secondari: cervello e placenta. Caratteristica di *L. monocytogenes* è proprio la sua capacità di superare le barriere dell'ospite (intestinale, emato-encefalica, materno-fetale), unitamente alla capacità di sopravvivere ai meccanismi battericidi messi in atto dai macrofagi oltreché di penetrare, per la sua natura di patogeno intracellulare facoltativo, all'interno di cellule non necessariamente fagocitiche (epatociti, neuroni, ecc.).

Peculiari sono anche i meccanismi posti in essere da *L. monocytogenes* per sfuggire alle condizioni sfavorevoli dell'ambiente gastrico e sopravvivere nell'intestino umano prima della diffusione *intra-* ed *inter-cellulare*. La terapia antiacida assunta da alcuni soggetti e talvolta lo stesso potere tamponante di alcuni cibi, veicolo stesso di infezione, abbattendo temporaneamente l'acidità gastrica influiscono favorevolmente sulle possibilità di sopravvivenza del patogeno in questi distretti e sono fattori predisponenti affinché si manifesti la

patologia o si instaurari nell'individuo la condizione di portatore asintomatico (McLauchlin et al., 2004; Rocourt et al., 2000). Abitualmente però *L. monocytogenes* ricorre ad altri meccanismi enzimatici.

Un primo meccanismo adottato dal batterio in condizioni di pH molto basso è il ricorso al sistema della glutammato-decarbossilasi (GAD) che converte una molecola di acido glutammico esterna alla cellula in una di acido gamma-idrossibutirrico (GABA), utilizzando un suo protone interno. Il risultato finale è quello di impegnare un gran numero di protoni diminuendone la loro concentrazione intracellulare, alcalinizzando nel contempo il mezzo esterno considerata la minore acidità del GABA rispetto all'acido glutammico (Olier et al., 2004).

Il secondo meccanismo conosciuto, denominato BSH (*Bile Salt Hydrolase*, idrolisi dei sali biliari), è il sistema enzimatico grazie al quale *L. monocytogenes* è in grado di idrolizzare il legame ammidico dei sali biliari coniugati, liberando acidi biliari che hanno un potere emulsionante molto inferiore rispetto ai primi e di conseguenza un effetto batteriostatico e battericida molto più basso (Olier et al., 2004).

La popolazione batterica che sopravvive a queste condizioni estreme grazie all'utilizzo dei sistemi succitati aderisce all'epitelio intestinale dove una parte penetra negli enterociti ed un'altra per "scollamento" delle *gap-junction* supera la barriera gastro-intestinale e raggiunge il circolo ematico.

Già a questo livello si attiva la risposta immunitaria cellulo–mediata dell'individuo infettato ad opera dei linfociti T citotossici.

L. monocytogenes è in grado di infettare e sopravvivere all'interno di diverse cellule eucariotiche tra le quali enterociti, macrofagi, epatociti, neuroni e fibroblasti inducendo la fagocitosi come già detto anche in cellule prive di tale vocazione.

Il processo di internalizzazione definito di tipo “zipper” prende l'avvio da un'iniziale giustapposizione delle due membrane plasmatiche, batterica e cellulare, seguita dalla progressiva interazione tra specifiche proteine batteriche di superficie e i loro rispettivi recettori sulla cellula bersaglio (Cossart & Toledo Arana, 2008).

L'Internalina A (InIA) e l'Internalina B (InIB) sono le più importanti proteine di superficie coinvolte nel meccanismo di penetrazione cellulare: appartenenti alla stessa famiglia di proteine in *L. monocytogenes* ne sono state individuate almeno 25. Esse legandosi a specifici recettori di membrana inducono il riarrangiamento del citoscheletro cellulare inducendo la fagocitosi nelle cellule bersaglio. InIA si lega selettivamente al solo recettore *E-caderina* delle cellule epiteliali umane in cui ne attiva la fagocitosi, mentre InIB interviene nell'invasione di un maggior numero di cellule, in particolare epatociti e fibroblasti, attraverso l'interazione con almeno tre recettori conosciuti *Met*, *gC1qR* e glicosamminoglicani. Tra questi il più importante è sicuramente *Met* poiché coinvolto nell'interazione con gli

epatociti, cellule del primo organo bersaglio in corso di listeriosi (Cossart & Toledo Arana, 2008).

Un'altra importante proteina è la p60 (*Invasion Associated Protein*) che si ritiene sia anch'essa coinvolta nel meccanismo di adesione del batterio alle cellule eucariotiche oltreché nella fase tardiva della divisione cellulare, per la sua attività idrolasica nei confronti della mureina (Vasquez-Boland et al., 2001).

La permanenza della *L. monocytogenes* all'interno del fagosoma ha una durata media non superiore a 30 minuti, durante i quali per un verso si attiva per impedire l'azione battericida della cellula ospite grazie alla sintesi di una superossido dismutasi (MnSOD) per l'altro sintetizza altri fattori di virulenza volti alla disgregazione del fagosoma stesso. Intervengono nella distruzione del vacuolo litico la Listeriolisina-O (LLO) e due fosfolipasi: Fosfatidilinositolo-fosfolipasi C (PlcA) e Fosfatidilcolina-fosfolipasi C (PlcB) (Cossart & Toledo Arana, 2008).

La listeriolisina O è una tossina batterica appartenente alla classe delle proteine tiolo-attivate, che attaccandosi alla membrana del fagosoma induce in essa la formazione di pori, con conseguente alterazione degli equilibri ionici e successiva disgregazione del fagolisosoma e liberazione del batterio nel citoplasma. In questo processo la listeriolisina O è adiuvata o dalla PlcA o dalla PlcB.

La PlcA interviene nella lisi della membrana singola del fagolisosoma primario, cioè originato a seguito della penetrazione diretta del microrganismo nella

cellula ospite, mentre la PlcB contribuisce alla lisi del vacuolo a membrana doppia che si forma nel passaggio della *L. monocytogenes* dalla cellula ospite alla cellula adiacente nel meccanismo di diffusione intercellulare di cui si parlerà più avanti.

All'interno del citoplasma della cellula ospite la *L. monocytogenes* si moltiplica attivamente e sintetizza altri fattori di virulenza indispensabili per il completamento del ciclo infettivo (Cossart & Toledo Arana, 2008).

Tra questi la proteina ActA espressa sulla superficie batterica attiva un complesso (*Arp2/3*) che induce la polimerizzazione dei monomeri di actina cellulare in una ramificata rete di filamenti che disponendosi ad un polo della cellula batterica (a formare le cosiddette *comet tail*) ne indirizzano lo spostamento verso la membrana plasmatica della cellula ospite. Essa sotto la spinta di questo movimento batterico protrude verso l'esterno e il conseguente invaginamento della membrana plasmatica della cellula adiacente avvia un nuovo processo di fagocitosi nei confronti dello stesso microrganismo che lo ha indotto.

Con questo sistema *L. monocytogenes* può diffondere nell'organo passando da una cellula all'altra senza venire in contatto con i liquidi organici e quindi sfuggendo agli anticorpi dell'ospite.

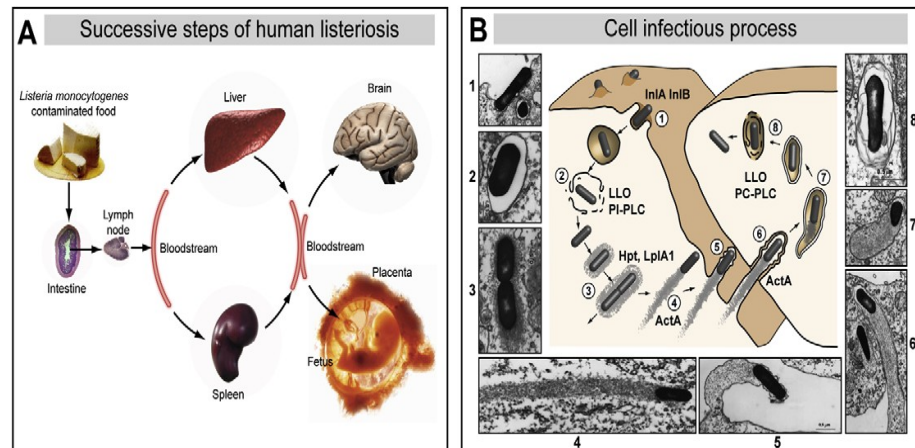


Figura 1: **A:** processo infettivo nell'uomo; **B:** meccanismo di diffusione *intra-* ed *inter-*cellulare (Cossart & Toledo Arana, 2008)

L'espressione dei geni che codificano per i fattori di virulenza sopra descritti e coinvolti nel processo infettivo di *L. monocytogenes*, è sotto il controllo del regolatore trascrizionale PrfA. L'espressione di questa proteina che promuove la sintesi dei fattori di virulenza (attivatore trascrizionale) è massima a temperature intorno a 37°C mentre si riduce notevolmente a temperature inferiori a 30°C. Ciò è stato spiegato con la scoperta dell'esistenza di segmenti di RNA messaggeri specifici che passando da uno stato di inattività a basse temperature (< 30°C) ad uno di attività ad alte temperature (37°C), attivano la sintesi del PrfA e dunque a cascata la sintesi dei fattori di virulenza.

Studi sempre più approfonditi che si avvalgono di nuove tecniche stanno evidenziando l'esistenza di altri fattori di virulenza nonché di ulteriori e sempre più complessi meccanismi di regolazione (Cossart & Toledo Arana, 2008).

2.2 Patologia e patogenesi

La malattia causata dai batteri appartenenti al genere *Listeria* è chiamata listeriosi. La specie maggiormente patogena sia per l'uomo che per gli animali è *L. monocytogenes*. In bibliografia sono riportati anche casi di listeriosi umana causati da *L. ivanovii* (Cummins et al., 1994; Lessing et al., 1994; Guillet et al., 2010) e *L. seeligeri* (Rocourt et al., 1987) mentre non si segnalano casi di patologia associati a *L. welshimeri* e *L. grayi*. Essa è una patologia a prevalente trasmissione alimentare che colpisce per lo più soggetti di età superiore a 65 anni, neonati, gestanti e immunocompromessi quali ad esempio pazienti con neoplasie maligne o sotto terapia citotossica, malati di AIDS, diabetici, individui con valvole cardiache o con patologie epatiche o renali. In particolare le gestanti e i malati di AIDS hanno una probabilità rispettivamente di circa venti e trecento volte superiore di contrarre la listeriosi rispetto ad un individuo sano (*Center for Disease Control and Prevention*, 2009).

Nelle gestanti la listeriosi, che può insorgere in qualunque momento della gravidanza, è generalmente asintomatica o decorre con una sintomatologia vaga analoga a una sindrome simil-influenzale accompagnata da brividi, mal di testa, dolori muscolari e articolari nel periodo da 2 a 14 giorni prima dell'aborto spontaneo (Vasquez-Boland et al., 2001).

L'infezione si trasmette al feto per via transplacentare provocando, a seconda dell'epoca del contagio, aborto, parto prematuro o sepsi neonatale a causa di un'infezione sistemica generalizzata nota come granulomatosi infantile o

listeriosi neonatale. L'infezione che i neonati contraggono durante il parto si trasmette per assunzione attraverso le vie aeree o la via digerente di liquido amniotico o di secrezioni vaginali contaminate e può esordire precocemente con sepsi ed insufficienza respiratoria e circolatoria oppure (meno frequentemente: dal 10 al 15 % delle listeriosi perinatali) si verificano episodi di listeriosi tardiva da uno a otto settimane dal parto con sepsi e meningite (Vasquez-Boland et al., 2001). Ancora meno frequentemente (5% dei casi) l'infezione materna non si trasmette al feto seppur in presenza di batteriemia (McLauchlin et al., 2004).

Negli individui giovani o adulti in condizioni predisponenti la listeriosi si manifesta prevalentemente in due forme principali:

- forma non invasiva le cui manifestazioni patologiche che insorgono entro poche ore dall'ingestione (12-24 ore) non sono dissimili da quelle di altre tossinfezioni alimentari con fenomeni di tipo gastroenterico (diarrea, vomito e febbre).
- forma invasiva che a seguito di un'infezione localizzata o disseminata del sistema nervoso centrale si manifesta con meningite o meningo-encefalite con emicranie, confusione, irrigidimento del collo, perdita dell'equilibrio o anche convulsioni, fino alla paralisi dei nervi cranici, preceduti da una fase iniziale, variabile da tre a dieci giorni, in cui si ha febbre, mal di testa, vomiti, difficoltà visive e malessere generale (Vasquez-Boland et al., 2001).

Il tasso medio di mortalità per i casi di listeriosi notificati si attesta mediamente su una percentuale tra il 20 ed il 30 % che sale sino al 38-45 % se riferita ai soli casi di listeriosi che colpiscono pazienti immunocompromessi o anziani.

A dispetto di queste percentuali e del fatto che *L. monocytogenes* sia ubiquitariamente diffusa e sia stata isolata in tutte le categorie di alimenti la listeriosi è una malattia rara (Rocourt, 2000; Farber et al., 1991).

Secondo quanto riportato dal *Center for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services* (CDC, USA) nel *Summary of Notifiable Diseases – United States 2008*, negli Stati Uniti nel corso del 2008 l'incidenza dei casi di listeriosi umana è stata di 0,25 ogni 100.000 abitanti con 759 casi totali, confermando il trend in diminuzione già osservato negli anni tra il 2004 e il 2007. Il maggior numero dei casi ha interessato individui di età superiore ai 65 anni con una percentuale pari al 47 % confermando le indicazioni che includono questi soggetti nei gruppi a maggior rischio di infezione, mentre non si evidenziano significative differenze tra maschi e femmine e non sono indicati casi di morte per i quali l'ultimo dato è riferito al 2006 con 30 morti accertati su un totale per quell'anno di 884 casi di listeriosi.

Analogo andamento è riportato nel Rapporto EFSA (*The Community Summary Report*, 2009) per quanto riguarda la Comunità Europea, in cui si riferisce una diminuzione dei casi di listeriosi pari all'11,1% rispetto al 2007, indicando, come già detto, un'incidenza pari a 0,3 ogni 100.000 abitanti con 1.381 casi accertati per i quali si è registrato un tasso di mortalità pari al 20,5%, in accordo con

M. Nives Rosa

quanto riferito da altre fonti bibliografiche. Anche in questo caso i soggetti maggiormente colpiti sono individui al di sopra dei 65 anni di età.

La listeriosi negli animali si manifesta in forme differenti a seconda della specie.

Negli ovini la forma più frequente è l'encefalite, ma anche aborto e irite e spesso la morte sopravviene entro un giorno dall'inizio dei sintomi.

Nei bovini la forma neurologica (con la comparsa di microascessi cerebrali) presenta un'evoluzione meno acuta e gli animali sopravvivono sino a due settimane dall'inizio dei sintomi. L'encefalite può colpire animali di ogni età ma prevale in quelli di età inferiore a tre anni, anche se non compare prima dello svezzamento. Negli animali giovani l'infezione si presenta per lo più in forma setticemica (spesso letale) con la comparsa di focolai necrotici nel fegato e in altri organi addominali. Gli aborti invece si manifestano soprattutto a fine gestazione. Esistono altre forme più rare di listeriosi quali polmoniti, endocarditi, miocarditi.

Nei bovini sono stati descritti anche casi di localizzazioni alla mammella con possibile eliminazione dell'agente eziologico attraverso il latte anche dopo l'avvenuta guarigione, rappresentando così un pericolo per la salute pubblica.

Negli equini prevale la forma meningo-encefalica, mentre nei suini e nei volatili si ha setticemia seguita da sintomi di natura nervosa.

Nell'uomo la possibilità di contrarre la listeriosi a seguito dell'ingestione di alimenti contaminati è strettamente correlata al contemporaneo verificarsi di alcuni fattori predisponenti legati a soprattutto a:

M. Nives Rosa

- Dose infettante
- Caratteristiche patogeniche del ceppo infettante
- Stato immunologico del soggetto

La dose infettante in grado di determinare episodi di listeriosi in un individuo non può essere quantificata con esattezza ma solo stimata. I valori generalmente indicati sono quelli derivanti dai dati relativi agli isolamenti ed alle quantificazioni di *L. monocytogenes* effettuate negli alimenti responsabili di episodi sporadici o epidemici di listeriosi. Generalmente si ritiene che la dose infettante in grado di provocare la patologia nell'uomo sia compresa tra 100-1.000 UFC/g o ml e 1×10^8 UFC/g o ml. Gli alimenti appena prodotti hanno cariche microbiche di *L. monocytogenes* generalmente molto inferiori alle dosi indicate (tra 0,04 e 10 UFC/g): sono le caratteristiche intrinseche dell'alimento (pH, A_w) associate ad eventuali trattamenti termici ed alle condizioni di conservazione, oltre che al tempo intercorso tra la produzione ed il consumo, che influiscono positivamente o negativamente sulla carica microbica finale dell'alimento stesso. Il limite di 100 UFC/g quale criterio di sicurezza per gli alimenti pronti al consumo indicato dagli estensori del Reg. 2073/05 tiene conto di questi aspetti.

Relativamente alle caratteristiche di patogenicità del ceppo infettante da studi effettuati *in vivo* ed *in vitro* è emerso che non tutti i ceppi di *L. monocytogenes* esprimono lo stesso grado di virulenza (Roche et al., 2001; Dongyou et al., 2003).

Ad esempio a parità di condizioni si è dimostrato che la “virulenza relativa”, ottenuta dividendo il numero dei topi morti per il numero dei topi inoculati ed espressa in percentuale, varia tra 0 e 100 % tra diversi ceppi tutti appartenenti alla specie *L. monocytogenes* (Dongyou, 2006).

Studi indirizzati alla comprensione di questi dati indicano nelle alterazioni delle sequenze geniche di alcuni fondamentali fattori di patogenicità una possibile spiegazione per questa variabilità, oltreché nella presenza di nuovi fattori di patogenicità i cui meccanismi di azione sono ancora solo parzialmente conosciuti (Van Stelten & Nightingale, 2008; Temoin et al., 2008), tra cui ad esempio l'Internalina J (Sabet et al., 2005).

Assunto che si verificano condizioni predisponenti in termini di dose infettante e patogenicità del ceppo è determinante perché si manifesti la patologia lo stato sanitario dell'individuo. L'appartenenza ad una delle categorie a rischio influisce in maniera significativa nell'insorgenza della malattia, ma anche gli individui che non vi appartengono ossia quelli definiti come immunocompetenti sono esposti allo stesso rischio seppure in misura minore.

Nei soggetti immunocompetenti o in condizioni non predisponenti l'ingestione di basse dosi di *L. monocytogenes* potrebbe non avere alcun effetto evidente se non lo sviluppo o il potenziamento di una risposta immunitaria protettiva nei confronti del microrganismo. Viceversa, negli stessi soggetti una esposizione orale ad alte cariche batteriche comporta l'insorgenza della patologia in forma non invasiva o invasiva a seconda della virulenza del ceppo coinvolto.

M. Nives Rosa

Negli individui debilitati o immunocompromessi che non sono dunque in grado di sviluppare una risposta immunitaria sufficiente a limitare la moltiplicazione batterica nel fegato, primo organo bersaglio della *L. monocytogenes*, anche l'ingestione di basse dosi infettanti può determinare la forma invasiva della malattia. La batteriemia conseguente alla massiccia proliferazione batterica negli epatociti ed il rilascio delle cellule batteriche nel circolo ematico spesso favorisce l'infezione di organi bersaglio secondari, quali cervello o placenta, oppure determina grave setticemia (Vasquez-Boland et al., 2001).

2.3 Terapia

Data l'accertata sensibilità di *L. monocytogenes* ai β -lattamici, ampicillina e gentamicina sono i trattamenti di scelta in caso di listeriosi, anche se è stato osservato che Trimethoprim-sulfamethoxazolo ha un forte effetto protettivo contro la listeriosi nei pazienti compromessi che assumono questo farmaco come terapia contro altri patogeni (Schlech, 2010).

3 Parte sperimentale

3.1 Scopo del lavoro

L'attività sperimentale svolta per la realizzazione di questo lavoro è stata condotta perseguendo da un lato l'obiettivo di verificare quale fosse la diffusione di *L. monocytogenes* in un prodotto di nicchia quale la salsiccia ovina e nel relativo stabilimento di trasformazione, dall'altro quello di caratterizzare in maniera quanto più completa possibile i ceppi batterici isolati e quando possibile confrontarli con eventuali isolati clinici umani.

L'analisi dei campioni è stata condotta parallelamente sia con metodiche colturali tradizionali che con metodiche biomolecolari.

I campioni sono stati sottoposti ad analisi colturale e biomolecolare per la ricerca di tre agenti zoonosici: *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*. Successivamente, a partire dagli isolati batterici di *L. monocytogenes* sulle piastre di isolamento selettivo degli stessi procedimenti analitici, è stata determinata l'appartenenza ai diversi sierotipi ed è stato estratto il DNA batterico totale secondo i due protocolli indicati per PCR e PFGE. Su questo DNA sono state eseguite in un caso le diverse amplificazioni volte a identificare la presenza dei geni ricercati, nell'altro le restrizioni enzimatiche per la caratterizzazione biomolecolare mediante PFGE. Infine di ciascun isolato è stata determinata la suscettibilità antimicrobica.

A conferma della validità dei protocolli applicati tutte le prove sono state sempre effettuate anche sui ceppi batterici di riferimento.

Mediante PCR sono stati ricercati il gene codificante per il 16S rRNA e i geni *hlyA*, *plcB*, *actA*, *prfA*, *iap* e *lmo2821* che esprimono rispettivamente per i fattori di patogenicità LLO, PlcB, ActA, PrfA, p60 e InJ. È stata anche allestita una Multiplex-PCR per differenziare le diverse specie nell'ambito del genere *Listeria*.

3.2 Materiali e metodi

Sono stati sottoposti ad analisi 72 campioni di salsiccia ovina e 45 tamponi ambientali, prelevati in uno stabilimento di trasformazione alimentare del territorio della provincia di Sassari.

I campioni di carne sono stati prelevati in numero di tre per ciascuna delle quattro fasi di lavorazione individuate nel processo di produzione della salsiccia. La stessa metodologia è stata applicata per sei lotti di lavorazione differenti negli anni 2008-2009. Le fasi di lavorazione sottoposte a controllo sono state: 1) trito di carne cruda; 2) impasto dopo la “concia”; 3) salsiccia fine asciugatura; 4) salsiccia fine stagionatura.

I tamponi ambientali sono stati effettuati nello stabilimento interessato dalla ricerca una prima volta in concomitanza dell’avvio della lavorazione del primo lotto analizzato, ed una seconda volta prima dell’avvio della lavorazione del sesto ed ultimo lotto, con un intervallo di tempo complessivo pari a poco meno di due anni.

I tamponi sono stati effettuati oltreché su diverse superfici anche sulle attrezzature e sulle mani degli operatori, dopo interventi di sanificazione ambientale, mediante l’utilizzo delle “*sponge bag*”. La tipologia ed il numero delle superfici sottoposte a controllo sono indicate in tabella n°1.

TIPOLOGIA	N° TOTALE
Pozzetti	6
Pavimenti	10
Pareti	6
Piani di lavoro	4
Utensili	6
Tritacarne	2
Impastatrice	2
Insaccatrice	2
Mani degli operatori	7

Tabella 1: Tipologia e numero delle superfici esaminate

Ciascun campione è stato sottoposto ad analisi con i metodi colturali per la ricerca di *L. monocytogenes* (metodo ISO 11290-1/2:1996/98 amendment 2004) giungendo a completa identificazione con le gallerie biochimiche miniaturizzate API Listeria (BioMèrieux), *Salmonella* spp. (metodo ISO 6579:2002) e *E. coli* O157:H7 (metodo ISO 16654:2001).

I ceppi batterici così isolati, propagati e conservati, sono stati ulteriormente caratterizzati.

Contemporaneamente un'aliquota di 1 ml del brodo di arricchimento primario è stata sottoposta ad estrazione del DNA utilizzando il kit "*DNeasy Blood & Tissue Kit*" (Qiagen) secondo il protocollo fornito dalla ditta.

Il DNA così estratto è stato sottoposto a due amplificazioni in Multiplex-PCR. La prima per verificare se e quale/i dei tre agenti zoonotici ricercati (*Salmonella*

spp., *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*) fosse presente nel campione, la seconda per identificare l'eventuale presenza di altre specie di *Listeria*.

M. Nives Rosa

“Epidemiologia molecolare, fattori di patogenicità e antibiotico-resistenza di Listeria monocytogenes isolata da salsiccia ovina”
Tesi di Dottorato in: Riproduzione, Produzione, Benessere animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale. (XXXIII Ciclo)
Università degli Studi di Sassari

3.2.1 Ceppi batterici e condizioni colturali.

Nella ricerca, oltre ai ceppi batterici isolati dalle matrici carnee ovine e dai tamponi ambientali, sono stati utilizzati ceppi di referenza

I ceppi di *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. innocua* NCTC 11288, *L. ivanovii* NCTC 11846, *Escherichia coli* O:157 H:7 NCTC 12900-05, e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 provengono dalla collezione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, mentre tutti gli altri sono stati gentilmente forniti dal Dipartimento di Biologia Animale Sezione Ispezione degli alimenti di origine animale dell'Università degli studi di Sassari. I ceppi di riferimento utilizzati con il relativo sierotipo sono indicati nella tabella sottostante (tabella n°2).

CEPPO	SPECIE	SIEROTIPO
ATCC 7644	<i>L. monocytogenes</i>	1/2c
NCTC 10887	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b
CIP 7835	<i>L. monocytogenes</i>	3b
NCTC 5105	<i>L. monocytogenes</i>	3a
NCTC 10527	<i>L. monocytogenes</i>	4b
NCTC 11846	<i>L. ivanovii</i>	/
NCTC 11288	<i>L. innocua</i>	/
NCTC 12900-05	<i>E. coli</i> O157:H7	/
ATCC 14028	<i>S. typhimurium</i>	/

Tabella 2: ceppi batterici di riferimento.

I ceppi batterici isolati su piastre agarizzate di terreno selettivo, sono stati sottoposti a clonaggio su piastre di agar sangue di montone. Le colonie isolate dei diversi ceppi di *L. monocytogenes* sono state propagate in 8 ml di BHI (Brain Heart Infusion, OXOID), incubate a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore in agitazione continua quindi conservate. I ceppi di *Salmonella* spp. ed *E. coli* O157:H7 sono stati propagati in 50 ml di LB-broth (Luria-Bertani Broth, DIFCO), incubato a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore in agitazione continua e conservati.

3.2.2 Conservazione dei ceppi batterici

I cloni batterici isolati sono stati conservati a -20°C in glicerolo puro sterile, nella proporzione di 150 μl di glicerolo e 850 μl di brodocoltura in fase stazionaria di crescita. Aliquote di 1 ml di questa sospensione sono state distribuite in criovials, e conservate a -80°C .

3.2.3 Sierotipizzazione

La sierotipizzazione degli isolati di *L. monocytogenes* è stata effettuata utilizzando gli antisieri commerciali distribuiti dalla Biogenetics s.r.l. e prodotti da Denka Seiken Co., Tokio Japan, con modalità differenti per la determinazione degli antigeni flagellari H e somatici O.

Per la determinazione degli antigeni flagellari H una colonia isolata in coltura pura su piastra di agar sangue è stata infissa in un tubo contenente agar mobilità 2‰ e posta ad incubare a 25°C per 24 ore. Un'ansata della porzione laterale della colonia batterica sviluppatasi con la caratteristica forma ad "ombrello" è stata trasferita in due ml di BHI liquido ed incubata a 30°C per 18 ore. Al termine sono stati aggiunti alla brodocoltura 2 ml di soluzione fisiologica con formalina 1% e la stessa è stata lasciata a riposo per circa 2,5 ore (non più di tre ore). All'interno di una micropiastra a 96 pozzetti con fondo tondo, a 7,5 µl di ognuno degli antisieri flagellari H, indicati con le lettere maiuscole A, AB, C e D, sono stati aggiunti 50 µl della sospensione batterica. La piastra così allestita è stata incubata a 52°C per un'ora, al termine della quale è stata effettuata la prima lettura ottica per verificare la presenza di un reticolo di agglutinazione, indicante una reazione positiva, o di un bottone di precipitazione indice di reazione negativa. I risultati sono stati annotati e una seconda lettura è stata effettuata dopo 18 ore di incubazione a temperatura ambiente della micropiastra.

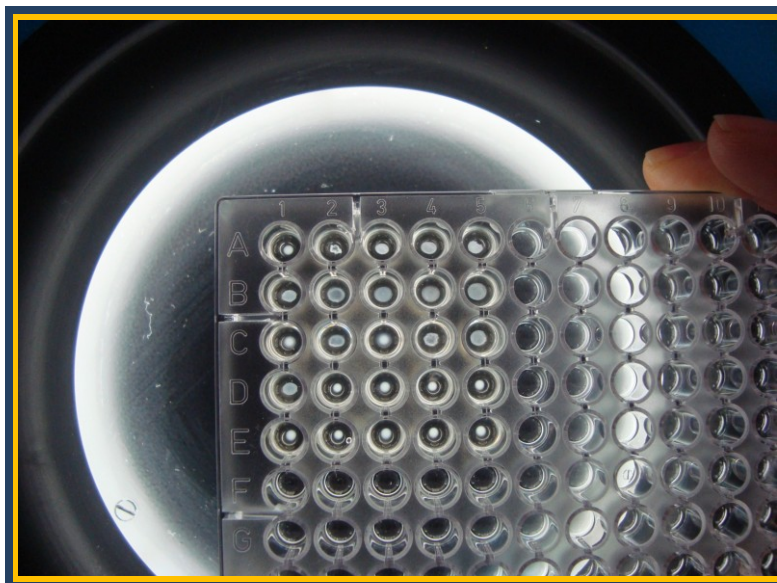


Foto 1: particolare di una piastra per la determinazione degli antigeni flagellari H inoculata

Per la determinazione degli antigeni somatici O un'abbondante patina batterica prelevata da coltura pura su piastra di agar sangue è stata risospesa in 1 ml di NaCl 0,2 %. La sospensione batterica, autoclavata a 121 °C e raffreddata in acqua, è stata centrifugata a 3.000 rpm per 20 minuti. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 200 µl di NaCl 0,2 %. Su un vetrino porta oggetto sono stati miscelati 10 µl di sospensione batterica con 15 µl di ciascun antisiero polivalente O I/II e O V/VI. La presenza di agglutinazione è rilevabile dopo 1-1,5 minuti in uno o l'altro dei due sieri polivalenti. Gli antisieri monovalenti corrispondenti all'antisiero polivalente positivo sono stati successivamente saggiati singolarmente con la stessa sospensione batterica e con le stesse modalità.

La definizione del sierotipo di appartenenza del ceppo batterico analizzato è stata dedotta dall'analisi crociata dei risultati relativi agli antigeni flagellari H e

somatici O secondo lo schema fornito dalla ditta produttrice e riportato in tabella n°3.

STRUTTURA ANTIGENICA DI CIASCUN SIEROTIPO		
Sierotipo	Antigene O	Antigene H
1/2a	I,II, (III)	AB
1/2b	I,II, (III)	ABC
1/2c	I,II, (III)	BD
3a	II,(III),IV	AB
3b	II,(III),IV,(XII),(XIII)	ABC
3c	II,(III),IV,(XII),(XIII)	ABC
3c	II,(III),IV,(XII),(XIII)	BD
4a	(III),(V), VII,IX	ABC
4ab	(III), V, VI, VII,IX,X	ABC
4b	(III),V,VI	ABC
4c	(III), V, VII	ABC
4d	(III),(V), VI, VIII	ABC
4e	(III), V ,(VIII),(IX)	ABC
7	(III),XII,XIII	ABC

Tabella 3: Struttura antigenica dei sierotipi di *L. monocytogenes*

3.2.4 Estrazione del DNA degli isolati e dei ceppi di referenza di *Listeria spp.*

L'estrazione del DNA è stata condotta sul pellet cellulare ottenuto da aliquote di brodocoltura in fase stazionaria di crescita, di ceppi isolati in coltura pura.

Un'aliquota di 1,5 ml di brodocoltura in BHI (come indicato nelle condizioni colturali) è stata centrifugata a 14.000 giri per 2 minuti. Il pellet, dopo eliminazione del surnatante, è stato risospeso in 567 µl di TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) a cui sono stati aggiunti 30 µl di Sodiiododecilsolfato al 10% (SDS, BIORAD) e 3 µl di Proteinase K (Sigma) alla concentrazione di 20 mg/ml ed incubato a 37°C per 1 ora. Dopo incubazione sono stati aggiunti 100 µl di NaCl 5M e 80 µl di esadecil-trimetil-ammonio-bromide (CTAB)/NaCl (10% CTAB in 0,7 M NaCl). La miscela è stata ulteriormente incubata a 65°C per 10 minuti. Trascorso tale tempo è stato aggiunto un uguale volume di Cloroformio/Alcool isoamilico e il tutto è stato centrifugato a 14.000 giri per 5 minuti. Il surnatante è stato recuperato e miscelato con un uguale volume di Fenolo/Cloroformio/Alcool isoamilico per 5 minuti, quindi centrifugato a 14.000 giri per altri 5 minuti. Al surnatante ottenuto sono stati aggiunti 0,6 volumi di Isopropanolo e centrifugato a 14.000 giri per 30 minuti. Il pellet di DNA ottenuto è stato lavato con Etanolo al 70%, centrifugato a 14.000 giri per 5 minuti, essiccato all'aria e infine risospeso in 100 µl di TE pH 8.0 e conservato a -20°C.

3.2.5 Estrazione del DNA dei ceppi di referenza di *Salmonella* spp. e *E. coli*

L'estrazione del DNA è stata condotta sul pellet cellulare ottenuto dopo centrifugazione di 50 ml di brodocoltura in fase stazionaria di crescita, come indicato nelle condizioni colturali, a 4.500 giri per 15 minuti. Il pellet, risospeso in 12 ml di PBS pH 7,2 – 7,4, è stato ulteriormente centrifugato a 4.500 giri per 15 minuti. Al pellet, dopo risospensione in 2 ml di TE pH 8,0, sono stati aggiunti 100 µl di SDS 10% (c. f. 0,5 %), 10 µl di Proteinase K [20 mg/ml] (c. f. 100 µg/ml), 500 µl di Lisozima [10 mg/ml] e la miscela incubata a 50 °C per 1 ora. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 2 ml di Fenolo, e in seguito ad agitazione per inversione per 10 minuti, il tutto è stato sottoposto a centrifugazione a 13.000 giri per 15 minuti. Un uguale volume di Fenolo-Cloroformio-Alcool Isoamilico è stato miscelato per inversione per 5 minuti con il surnatante ottenuto, e successivamente centrifugato a 13.000 giri per 15 minuti. Dopo centrifugazione al surnatante sono stati aggiunti 2 volumi di Etanolo freddo e NaCl [5 M] alla c.f. di 0,3 M ed agitato delicatamente per inversione sino alla formazione del "gomitolo". Il gomitolo è stato quindi recuperato e risospeso in 2 ml di TE pH 8,0 e dopo aggiunta di RNase 10 mg/ml alla c.f. di 20 µg/ml, incubato a 37 °C per 1 ora. In seguito sono stati aggiunti 2 ml di Fenolo-Cloroformio-Alcool Isoamilico, e dopo agitazione per inversione di 5 minuti, la miscela è stata centrifugata per 15 minuti a 12.500 giri. A questo punto il DNA è stato precipitato per l'aggiunta, al surnatante ottenuto di 2 volumi di Etanolo freddo e NaCl [5 M] alla c.f. di 0,3 M, concentrato dopo centrifugazione per 30 minuti a 12.500 giri, lavato con Etanolo

70%, e dopo un'ulteriore centrifugazione a 12.500 giri per 15 minuti essiccato, risospeso in 200 µl di TE pH 8.0 e conservato a -20 °C.

M. Nives Rosa

"Epidemiologia molecolare, fattori di patogenicità e antibiotico-resistenza di Listeria monocytogenes isolata da salsiccia ovina"
Tesi di Dottorato in: Riproduzione, Produzione, Benessere animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale. (XXXIII Ciclo)
Università degli Studi di Sassari

3.2.6 Primers utilizzati

L'analisi dei ceppi è stata fatta attraverso l'amplificazione di porzioni geniche individuate in sequenze riportate nella banca dati National Center for Biotechnology Information (NCBI). Di seguito è riportato l'elenco e la sequenza dei primers utilizzati, il nome del gene nell'ambito della cui sequenza sono stati ricavati, il relativo n° di accesso, la dimensione degli amplificati e la fonte bibliografica (tabella n°4).

Gene	N° di accesso	Primers	Ampliconi	Fonte bibliografica
<i>Salmonella</i> spp.,		Salm F 5'-gtcacggaagaagagaaatccgtacg-3' Salm-R 5'-gggagtcagggtgacggaaaattt-3'	375 bp	Kawasaki et al. 2005
<i>eae</i>	AB334562	Esch-F 5'-ggcggattagacttcggcta-3' Esch-R 5'-cgttttggcactattgccc-3'	120 bp	Kawasaki et al. 2005
<i>hly A</i>	EU372054	LM-F 5'-cggaggtccgcaaaagatg-3' LM-R 5'-cctccagagtgcgatggtt-3'	234 bp	Kawasaki et al. 2005
<i>act A</i>	X59723	actA-F1 5'agcatcatcgatagtgagc-3' actA-F2 5'gacgaaaatcctgaagtaaa-3' actA-R 5'ctagcaggatgctgtttcc-3'	608 bp(F1) 373 bp(F2)	In questo lavoro
<i>hly A</i>	M24199.1	hlyA-F 5' cactcagcattgattgcca-3' hlyA-R 5' atttcccttactgattgc-3'	274 bp	In questo lavoro
<i>plc B</i>	X59723.1	plcB-F 5'gcaagtgcttagtctttccgg-3' plcB-R 5'acctcgaagtttgctgtga-3'	795 bp	In questo lavoro
<i>prf A</i>	X61210.1	prfA-R 5'ccaagtagcaggacatgctaa-3' prfA-F 5'ggtatcacaagctcagag-3'	571 bp	In questo lavoro
<i>lap (p60)</i>	AF532302	lap F 5'-gggctttatccgtaaaata-3' lap R 5'-tggaagaaccttgatta-3'	445 bp	In questo lavoro
<i>Lmo 2821</i>		Lmo2821 F 5'-tgtaaccgcttacacagtt-3' Lmo2821 R 5'-ttacggctggattgtctgtg-3'	611 bp	(Dongyou L. et al, 2003)
<i>16 s rRNA</i>	X56153	16 S List F 5'-agcttgctcttccaaagt 3' 16 S List R 5'-aagcagtactcttctcct 3'	400 bp	(Sommer et al. 2003)
Multip. PCR <i>Listeria</i>	M80349 M80350 M80353 M80354	Lis 1B R 5' tatacgcgaccgaagcaa 3' Mono F 5' caaactgtaacacagctact 3' Ino F 5' actagcactccagttgtaaac 3' Siwi 2 F 5' taactgagtagcgagcgaa 3'	660 bp 870 bp 1.200 bp	(Bubert, 1999)

Tabella 4: Geni amplificati e sequenze dei primers utilizzati

3.2.7 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite nel *Thermal Cycler 9700* della *Applied Biosystem*. La costituzione delle miscele di reazione (in 25 µl) e i programmi di amplificazione utilizzati sono successivamente dettagliati.

Geni *act A*, *hly A*, *plc B*:

Miscela di reazione: 5 µl di DNA, 2.5 µl di Buffer 10X Roche, 3 mM MgCl₂, 60 µM nucleotidi, 25 pmoli di ciascun primers, 0,3 Unità di Taq polimerase della Ditta Roche.

Programma di amplificazione:

- denaturazione a 95 °C per 5 minuti;
- 35 cicli di denaturazione a 94 °C per 1 minuto, annealing a 63 °C per 1 minuto, extension a 72 °C per 1 minuto;
- extension finale a 72°C per 7 minuti.

Gene *prf A*:

Miscela di reazione: 5 µl di DNA, 2,5 µl di Buffer 10X Roche, 3 mM MgCl₂, 50 µM nucleotidi, 25 pmoli di ciascun primers, 0,3 Unità di Taq polimerase della Ditta Roche.

Programma di amplificazione:

- denaturazione a 95 °C per 5 minuti;
- 35 cicli di denaturazione a 94 °C per 1 minuto, annealing a 63 °C per 1 minuto, extension a 72 °C per 1 minuto;
- extension finale a 72°C per 7 minuti.

Gene ***iap***:

Miscela di reazione: 1 µl di DNA, 2,5 µl di Buffer 10X Roche, 1,5 mM MgCl₂, 25 µM nucleotidi, 25 pmoli di ciascun primers, 0,2 Unità di Taq polimerase della Ditta Roche.

Programma di amplificazione:

- denaturazione a 95 °C per 5 minuti;
- 35 cicli di denaturazione a 95 °C per 1.30 minuti, annealing a 46 °C per 1,20 minuti, extension a 72 °C per 2 minuti;
- extension finale a 72°C per 7 minuti.

Gene ***Lmo 2821***:

Miscela di reazione: 1 µl di DNA, 2,5 µl di Buffer 10X Roche, 1,5 mM MgCl₂, 50 µM nucleotidi, 25 pmoli di ciascun primers, 0,5 Unità di Taq polimerase della Ditta Roche.

Programma di amplificazione:

- denaturazione a 94 °C per 2 minuti;

- 25 cicli di denaturazione a 94 °C per 20'' secondi, annealing a 60 °C per 20'' secondi, extension a 72 °C per 45'' secondi;
- extension finale a 72°C per 2 minuti.

Gene *16S rRNA*:

Miscela di reazione: 5 µl di DNA, 2,5 µl di Buffer 10X Roche, 1,5 mM MgCl₂, 50 µM nucleotidi, 25 pmoli di ciascun primers, 0,1 Unità di Taq polimerase della Ditta Roche.

Programma di amplificazione:

- denaturazione a 95 °C per 5 minuti;
- 30 cicli di denaturazione a 94 °C per 45'' secondi, annealing a 50 °C per 45'' secondi, extension a 72 °C per 1 minuto;
- extension finale a 72°C per 10 minuti.

Multiplex-PCR per *Listeria spp.*:

Miscela di reazione: 5 µl di DNA, 2,5 µl di Buffer 10X Roche, 1,5 mM MgCl₂, 40 µM nucleotidi, 25 pmoli di ciascun primers, 0,5 Unità di Taq polimerase della ditta Roche, acqua q.b..

Programma di amplificazione:

- denaturazione a 95 °C per 5 minuti;

M. Nives Rosa

"Epidemiologia molecolare, fattori di patogenicità e antibiotico-resistenza di Listeria monocytogenes isolata da salsiccia ovina"
Tesi di Dottorato in: Riproduzione, Produzione, Benessere animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale. (XXXIII Ciclo)
Università degli Studi di Sassari

- 30 cicli di denaturazione a 95 °C per 1 minuto, annealing a 58 °C per 30'' secondi, extension a 72 °C per 1 minuto;
- extension finale a 72°C per 10 minuti.

Multiplex-PCR per *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*:

Miscela di reazione: 5 µl di DNA, 2,5 µl di Buffer 10X Roche, 5 mM MgCl₂, 60 µM nucleotidi, 25 pmoli di ciascun primers, 0,3 Unità di Taq polimerase della Ditta Roche.

Programma di amplificazione:

- denaturazione a 95 °C per 7 minuti;
- 35 cicli di denaturazione a 95 °C per 20'' secondi, annealing a 60 °C per 30'' secondi, extension a 72 °C per 30'' secondi;
- extension finale a 72°C per 7 minuti.

3.2.8 Corsa elettroforetica

Aliquote di 10 µl degli amplificati ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio (BioRad), in concentrazione variabile tra 1% e 2,5% in TAE 1 X, a seconda delle loro dimensioni (Tabella n° 5). I gel, colorati con bromuro d'etidio (0,5 µl/ml), sono stati quindi visualizzati al transilluminatore e fotografati.

Geni amplificati	% di agarosio
<i>16 s rRNA</i>	2.0%
<i>prf A, act A hly A, plc B, prf A, Lmo 2821</i>	1.5%
Multiplex PCR <i>Listeria</i> spp.	1.0%
Multiplex PCR <i>Listeria/Salmonella/ E. coli.</i>	2.5%

Tabella 5: concentrazione di agarosio utilizzato per la corsa elettroforetica

3.2.9 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Tutti gli isolati batterici di *L. monocytogenes* sono stati analizzati mediante PFGE in accordo con il protocollo di Graves e Swaminathan (2001).

3.2.9.1 Preparazione della sospensione cellulare

Una colonia isolata da coltura pura in agar sangue è stata inoculata in doppio in 5 ml di BHI ed incubata a 37°C o/n in agitazione. Al termine le brodoculture sono state riunite e ne è stata determinata la densità ottica ad una lunghezza d'onda pari a 600 nm.

Il pellet è stato risospeso in buffer TE pH 8,0 in quantità variabile tra 1,6 e 1,8 ml per densità ottiche a 600 nm variabili tra 1,4 e 1,6. 240 µl di questa sospensione batterica unitamente a 60 µl lisozima 10 mg/ml sono stati posti ad incubare a 37°C per 10 minuti.

3.2.9.2 Preparazione dei plugs

In un ambiente termostato a 50°C ai 300 µl di sospensione batterica lisata con lisozima sono stati aggiunti 270 µl di Agarosio *low melting* (BioRad) al 2% in acqua, unitamente a 30 µl di SDS al 10% (c. f. 1%) e 3 µl di Proteinase K 20 mg/ml (c. f. 0,2 mg/ml). Dopo aver miscelato il tutto accuratamente senza formare bolle sono stati dispensati circa 100 µl di miscela in ciascun plug del mold (50-Well Disposable Plug Molds, BioRad) sino a completa polimerizzazione a +4°C per almeno 30 minuti.

3.2.9.3 Estrazione del DNA

Nel processo di estrazione del DNA batterico totale i plugs dopo polimerizzazione sono stati trasferiti in 4 ml di buffer di lisi (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 1% Lauryl sarcosine, 0.15 mg/ml Proteinase K) ed incubati a 50°C per 2 – 3 ore in agitazione. Al termine eliminato il buffer di lisi i plugs sono stati lavati per 2 volte con 15 ml di acqua deionizzata riscaldata a 50°C per 10 minuti ciascuna, ed in seguito per 4 volte con TE pH 8,0 sempre a 50°C per 15 minuti ciascuna.

I plugs se non utilizzati subito sono stati conservati in 5 ml di TE a + 4°C sino all'uso.

3.2.9.4 Restrizione enzimatica

Il plug leggermente ridotto nelle dimensioni con l'ausilio di un bisturi è stato sottoposto a digestione enzimatica all'interno di eppendorf da 2 ml. Per ciascun ceppo batterico sono state eseguite tre digestioni enzimatiche diverse con tre diversi enzimi di restrizione: *Ascl*, *Apal*, e *SmaI* della ditta New England BioLabs, in un volume finale di 500 µl per *Ascl* e 250 µl per *Apal* e *SmaI*. Le miscele di reazione sono dettagliate di seguito. Dopo la restrizione enzimatica i plugs sono stati lavati con 5 ml di TE pH 8,0 per 30 minuti, quindi se non sottoposti a corsa elettroforetica immediata conservati a + 4°C.

Digestione con **Asc I**

Un plug, 50 µl buffer 10 X NE4, 50 µl BSA acetilata 10mg/ml, 5 µl *Ascl* (10 ui/µl),
acqua q.b..Incubare a 37°C per 5 ore

Digestione con ***Apa* I**

Un plug, 25 µl buffer 10 X NE4, 25 µl BSA acetilata 10mg/ml, 4 µl *Apa*I (50 ui/µl),
acqua q.b..Incubare a 30°C per 5 ore

Digestione con ***Sma* I**

Un plug, 25 µl buffer 10 X NE4, 25 µl BSA acetilata 10mg/ml, 1 µl *Sma* I (40 ui/µl),
acqua q.b..Incubare a 25°C per 4 ore

3.2.9.5 Corsa elettroforetica

Tutte le corse elettroforetiche dei plugs digeriti sono state effettuate in 2 litri di tampone TBE 0,5 X, su gel di agarosio a bassa elettroendosmosi (Agarose Low EEO, Bio Rad) 1% in TBE 0,5 X. I markers di peso molecolare utilizzati sono stati *Lambda Ladder PFG Marker* (50 - 1000 Kb) e *Low Range PFG Marker* (0.1 - 200 Kb) entrambi della ditta New England, BioLabs. Prima dell'avvio della corsa elettroforetica tutti i pozzetti sono stati ricoperti con gel di agarosio Low EEO 0,8 % in TBE 0,5 X. I parametri di corsa, impostati sull'apparecchio CHEF Mapper® della BioRad, sono stati i seguenti: Volt 6/cm, Angolo120°, Ramping Lineare, Switc 4 sec. – 40 sec., Temperatura 14°C, Durata 22 ore.

3.2.9.6 Colorazione

Il gel dopo la corsa elettroforetica è stato colorato per 1 minuto in una soluzione in TBE 1X di bromuro d'etidio e decolorato in acqua MilliQ per circa 1 ora. L'immagine visualizzata al transilluminatore è stata acquisita e l'analisi è stata condotta attraverso il software GEL COMPARE II (Applied Maths, Belgio).

3.2.10 Suscettibilità antimicrobica

La suscettibilità antimicrobica degli isolati di *L. monocytogenes* è stata determinata utilizzando il sistema di sensibilità su piastra Sensititre Gram Positive MIC Plate (GPALL1F; Trek Diagnostic Systems, Cleveland OH) che permette di determinare la suscettibilità nei confronti di ventuno agenti antimicrobici diversi elencati più avanti. Il lotto utilizzato è stato testato con il ceppo di riferimento *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 al fine di verificare la corrispondenza con un pannello di risultati fornito dalla ditta.

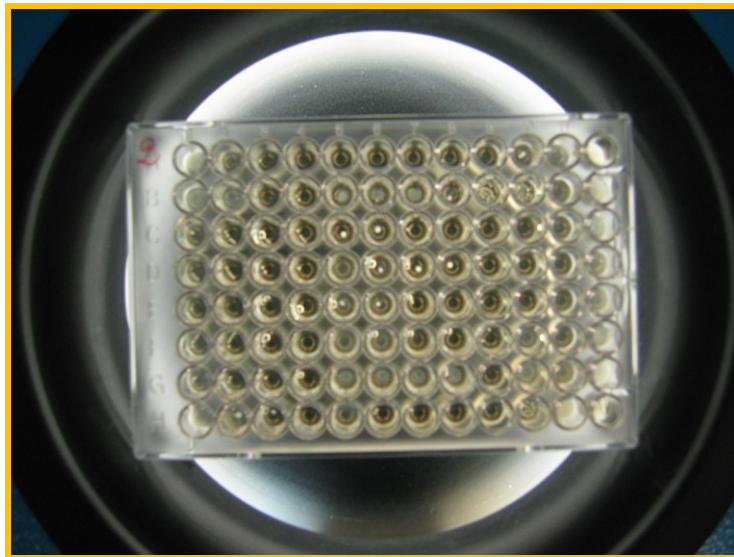


Foto 2: Piastra Sensititre per l'antibiotico-resistenza inocolata.

Per ciascun isolato di *L. monocytogenes* in coltura pura è stata preparata una sospensione batterica in acqua sterile sino a 0,5 McFarland. 10 µl di questa sospensione sono stati trasferiti in brodo Müller-Hinton con sangue di cavallo lisato (CP114-10, Trek Diagnostic Systems) e miscelati con cura, quindi ne sono

M. Nives Rosa

“Epidemiologia molecolare, fattori di patogenicità e antibiotico-resistenza di Listeria monocytogenes isolata da salsiccia ovina”
Tesi di Dottorato in: Riproduzione, Produzione, Benessere animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale. (XXXIII Ciclo)
Università degli Studi di Sassari

stati inoculati 50 µl in ciascun pozzetto della piastra in un tempo non superiore a trenta minuti dalla preparazione.

Al termine per ciascuna piastra inocolata sono stati eseguiti sull'inoculo stesso un controllo di purezza ed un conteggio delle colonie. Il controllo di purezza è stato eseguito verificando che, dopo incubazione, sulla piastra di agar sangue inocolata con 1µl di inoculo del pozzetto del controllo positivo della piastra Sensititre, fosse presente un solo tipo di colonie morfologicamente attribuibili a *L. monocytogenes*. Il conteggio delle colonie il cui valore per la validità della prova doveva oscillare in un range tra 5×10^4 e 5×10^5 UFC/ml è stato effettuato prelevando, sempre dallo stesso pozzetto del controllo positivo, per due volte con due anse diverse 1µl di inoculo e seminando il primo per isolamento su una piastra di agar sangue e diluendo il secondo in 50 µl di acqua sterile una cui aliquota di 1 µl è stata successivamente seminata per isolamento su piastra di agar sangue.

La piastra Sensititre chiusa con l'apposito adesivo copripiastra e le piastre di agar sangue inoculate sono state incubate a 37°C per 18-24 ore.

Al termine, verificata la presenza di sviluppo batterico nel pozzetto del controllo positivo interno alla piastra e la purezza dell'inoculo, è stato determinato il numero delle colonie inoculate secondo lo schema indicato (Tabella 6).

Concentrazione dell'inoculo (UFC/ml)	Numero di colonie	
	Piastra 1 μ l	Piastra 1 μ l/50
$< 5 \times 10^4$	< 50	0
5×10^4	50-100	0 - 2
$1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$	> 100	≤ 10
$> 5 \times 10^5$	> 100	> 10

Tabella 6: conteggio colonie dell'inoculo.

Soddisfatte tutte queste condizioni è stata effettuata la lettura, indicando come MIC per ciascun antibiotico saggiato la concentrazione in $\mu\text{g/ml}$ presente nel primo pozzetto in cui non si è verificato alcun sviluppo batterico. Qualora questo corrispondesse alla prima o all'ultima diluizione disponibile la MIC è stata definita rispettivamente come inferiore /uguale (\leq) e maggiore ($>$) al valore della concentrazione nota.

4 Risultati

L'analisi colturale di tutti i campioni oggetto della ricerca ha prodotto un risultato di positività per *L. monocytogenes* in 52 campioni carnei e in 4 tamponi ambientali.

Il numero e la tipologia dei campioni carnei analizzati, ordinati per lotto con le relative positività per *L. monocytogenes* è riportato nella tabella n°7.

N° Lotti	Fasi di Lavorazione N° positivi/Campioni prelevati				Campioni positivi per <i>L. monocytogenes</i>
	trito di carne cruda	impasto dopo la "concia"	salsiccia fine asciugatura	salsiccia fine stagionatura	
1	0/3	0/3	0/3	0/3	0
2	3/3	3/3	3/3	3/3	12
3	3/3	3/3	3/3	3/3	12
4	1/3	3/3	3/3	3/3	10
5	3/3	3/3	1/3	3/3	10
6	3/3	2/3	2/3	1/3	8

Tabella 7: numero dei campioni carnei prelevati suddivisi per lotto e fasi di lavorazione con relative positività

M. Nives Rosa

"Epidemiologia molecolare, fattori di patogenicità e antibiotico-resistenza di *Listeria monocytogenes* isolata da salsiccia ovina"
Tesi di Dottorato in: Riproduzione, Produzione, Benessere animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale. (XXXIII Ciclo)
Università degli Studi di Sassari

Analogamente sono riportate nella tabella n°8 le positività riscontrate relativamente ai tamponi ambientali effettuati.

TIPOLOGIA	N° TOTALE	POSITIVITÀ	
		Inizio ricerca	Fine ricerca
Pozzetti	6	1	1
Pavimenti	10	0	0
Pareti	6	0	0
Piani di lavoro	4	0	0
Utensili	6	0	1
Tritacarne	2	0	0
Impastatrice	2	0	1
Insaccatrice	2	0	0
Mani degli operatori	7	0	0

Tabella 8: Positività per le superfici ambientali esaminate

Per ogni ceppo isolato è stata confermata la sua appartenenza al genere *Listeria*, mediante amplificazione di porzioni del gene codificante per il 16S rRNA (Somer et al., 2003). Il prodotto di amplificazione ottenuto ha dimensione pari a 400 bp, come indicato dagli autori, in tutti i ceppi di riferimento ed in tutti gli isolati batterici analizzati (Foto n°3).

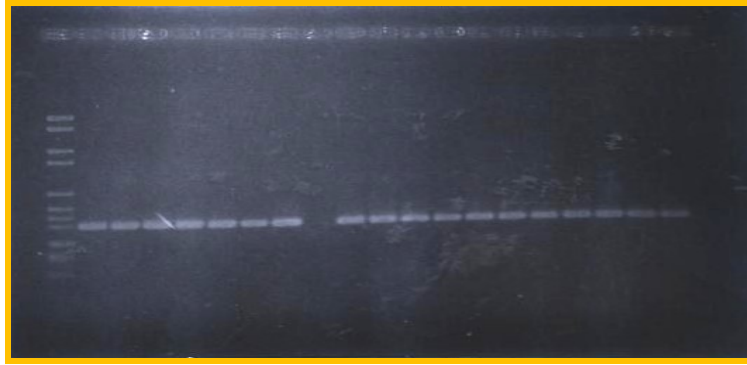


Foto 3: Amplificati per il gene **16S rRNA** (Linea 1 marker VI; Linea 2 *L. mon.* ATCC 7644; Linea 3 *L. mon.* NCTC 10887; Linea 4 *L.mon.* NCTC 5105; Linea 5 *L. mon.* CIP 7835; Linea 6 *L. mon.* NCTC 10527; linea 7 *L. innocua*; linea 8 *L. ivanovii*; linea 9 controllo negativo; Linee 10→20 isolati della ricerca)

Successivamente il DNA di ciascun isolato batterico è stato sottoposto ad ulteriori amplificazioni secondo i protocolli precedentemente descritti per verificare la presenza dei geni codificanti per alcuni dei principali fattori di virulenza, specifici per *L. monocytogenes*.

Tutti i ceppi batterici isolati amplificano per i geni *iap*, *prf A*, *act A*, *hly A*, *plc B* e *Imo2821*, generando ampliconi esattamente corrispondenti a quelli ottenuti con i ceppi di riferimento di *L. monocytogenes* e le cui dimensioni sono indicate nella tabella n°4 in corrispondenza dei relativi primers. Le stesse prove eseguite sul DNA dei ceppi di riferimento per *L. innocua* e *L. ivanovii* hanno dato un risultato negativo. (Foto n°4 e n°5)

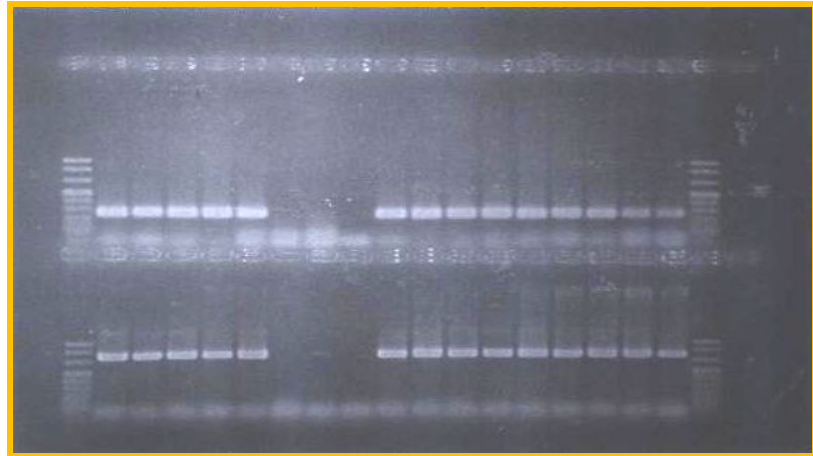


Foto 4: amplificati per *hlyA* (in alto) e amplificati per *plcB* (in basso) (Linee 1 e 19 marker VIII; Linea 2 *L. mon.* ATCC 7644; Linea 3 *L. mon.* NCTC 10887; Linea 4 *L. mon.* NCTC 5105; Linea 5 *L. mon.* CIP 7835; Linea 6 *L. mon.* NCTC 10527; linea 7 *L. innocua*; linea 8 *L. ivanovii*; linea 9 controllo negativo; linee 10→18 isolati della ricerca)

Un risultato particolare è stato quello ottenuto con l'amplificazione per il gene dell'actina. Utilizzando indifferentemente l'uno o l'altro dei primers forward (act A-F 1 e act A-F 2) in combinazione con il primer reverse (act A R), le dimensioni degli ampliconi ottenuti con l'amplificazione del DNA dei ceppi di riferimento sono differenti nell'ambito dei diversi sierotipi analizzati. I sierotipi 1/2b, 1/2c e 3a amplificano un frammento di circa 600 bp, mentre quello del sierotipo 3b e 4b ha una dimensione di circa 500 bp. Tutti gli amplificati ottenuti dal DNA dei ceppi batterici isolati dalle matrici carnee e dai tamponi ambientali hanno dimensioni identiche fra loro e a quelle del sierotipo 3b e 4b (foto n°5).

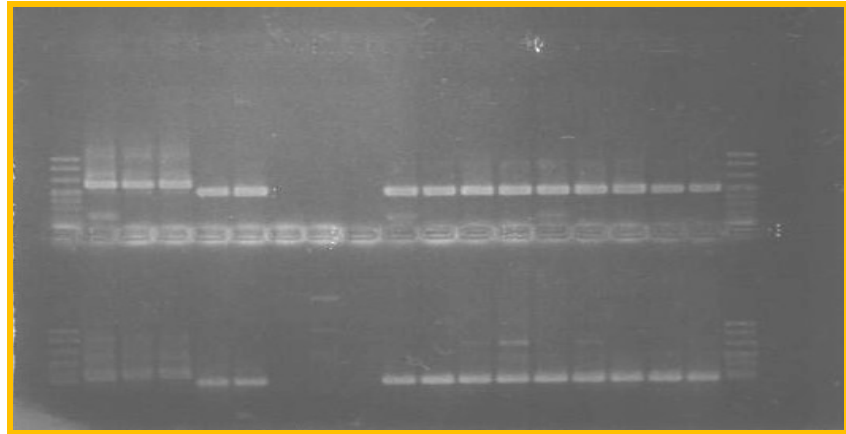


Foto 5: amplificati per *ActA 1* (in alto) e amplificati per *ActA 2* (in basso) (Linee 1 e 19 marker VIII; Linea 2 *L. mon.* ATCC 7644; Linea 3 *L. mon.* NCTC 10887; Linea 4 *L.mon.* NCTC 5105; Linea 5 *L. mon.* CIP 7835; Linea 6 *L. mon.* NCTC 10527; linea 7 *L. innocua*; linea 8 *L. ivanovii*; linea 9 controllo negativo; linee 10→18 isolati della ricerca)

L'analisi del DNA mediante Multiplex-PCR per l'amplificazione del gene *iap* nelle diverse specie di *Listeria* ha evidenziato la sola presenza nei campioni analizzati di *L. monocytogenes*; si sono osservati infatti esclusivamente amplificati di dimensione pari a 660 bp (Foto n°6). Analogo risultato è stato ottenuto con la Multiplex-PCR per la ricerca di altri agenti zoonotici che non sono stati isolati neanche con i metodi colturali tradizionali.

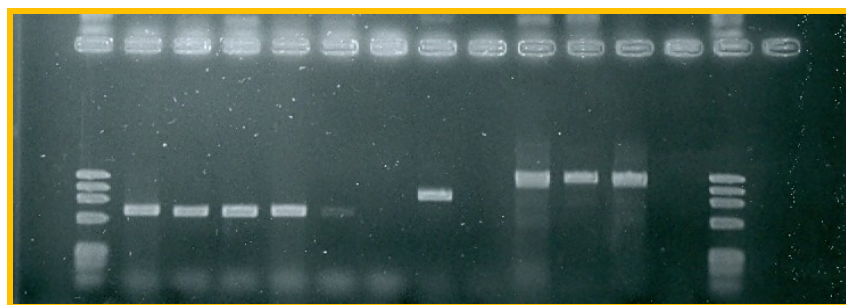


Foto 6: amplificati del gene *iap* ottenuti con la Multiplex -PCR. (Linee 2 →6 *L. monocytogenes*; Linea 8 *L. innocua*; Linea 9 *L. welshimeri*; Linea 10 *L. ivanovii*; Linea 11 *L. seeligeri*; Linee 1 e 14 Marker VIII (Roche)

L'analisi biomolecolare in PFGE di tutti gli isolati ha evidenziato come presenti sia nei campioni carnei che nei tamponi ambientali due soli pulsotipi indicati rispettivamente con le lettere A e B. L'utilizzo di tre diversi enzimi di restrizione (*ApaI*, *Ascl* e *SmaI*) ha sempre confermato la presenza di due soli pulsotipi. In particolare appartengono al pulsotipo A tutti i ceppi di *L. monocytogenes* isolati nei campioni di salsiccia del secondo lotto di lavorazione esaminato. I restanti isolati appartengono tutti al pulsotipo B includendo in essi anche gli isolati dai tamponi ambientali. Nessuno dei due pulsotipi A e B è riconducibile ai profili di restrizione dei ceppi di riferimento analizzati (Foto n° 7, 8 e 9).

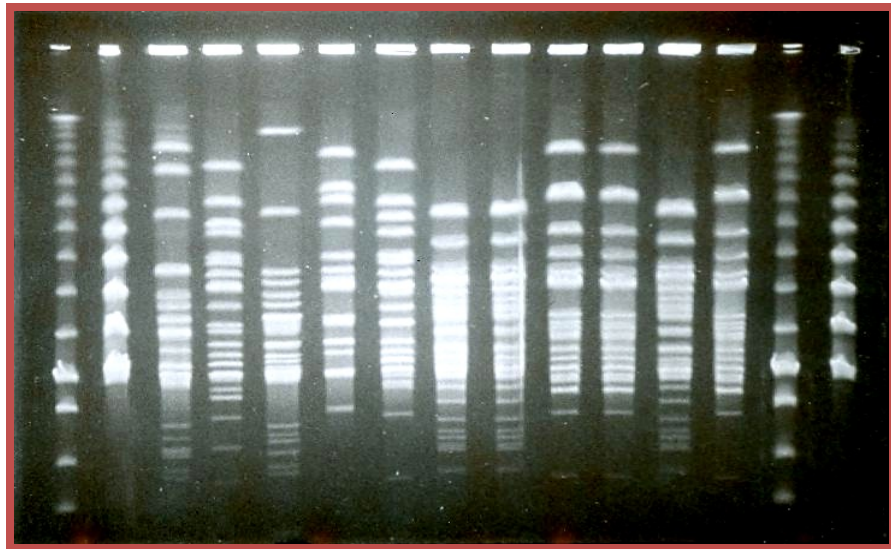


Foto 7: PFGE con *ApaI* (Linee 1 e 14: Marker *low range*; Linea 2 e 5 Marker *Lambda ladder*; Linea 3 *L. mon.* ATCC 7644; Linea 4 *L. mon.* NCTC 10887; Linea 5 *L. mon.* NCTC 5105; Linea 6 *L. mon.* CIP 7835; Linea 7 *L. mon.* NCTC 10527; Linee 8,9,12 isolati con pulsotipo B; Linee 10, 11 e 13 isolati con pulsotipo A).

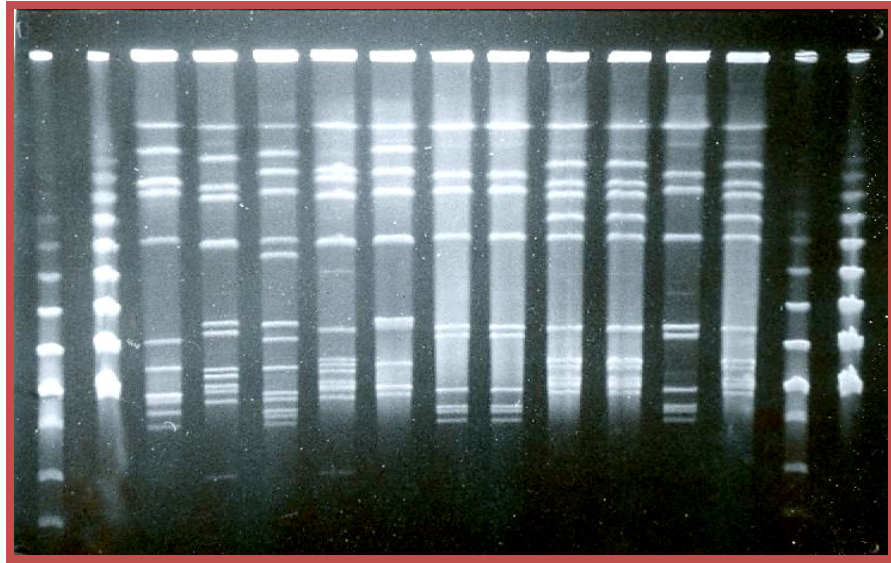


Foto 8: PFGE con *AseI* (Linee 1 e 14: Marker low range; Linea 2 e 5 Marker Lambda ladder; Linea 3 *L. mon.* ATCC 7644; Linea 4 *L. mon.* NCTC 10887; Linea 5 *L. mon.* NCTC 5105; Linea 6 *L. mon.* CIP 7835; Linea 7 *L. mon.* NCTC 10527; Linee 8,9,12 isolati con pulsotipo B; Linee 10, 11 e 13 isolati con pulsotipo A).

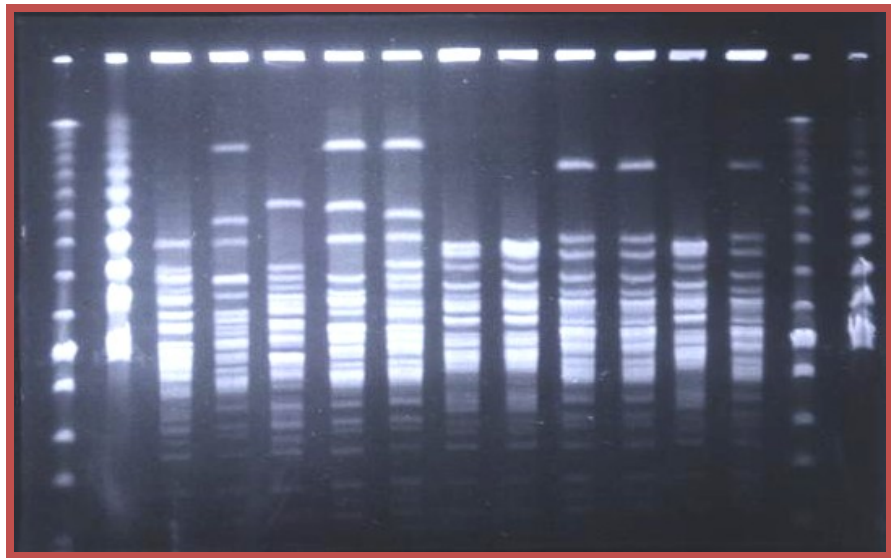


Foto 9: PFGE con *SmaI* (Linee 1 e 14: Marker low range; Linea 2 e 5 Marker Lambda ladder; Linea 3 *L. mon.* ATCC 7644; Linea 4 *L. mon.* NCTC 10887; Linea 5 *L. mon.* NCTC 5105; Linea 6 *L. mon.* CIP 7835; Linea 7 *L. mon.* NCTC 10527; Linee 8,9,12 isolati con pulsotipo B; Linee 10, 11 e 13 isolati con pulsotipo A).

M. Nives Rosa

“Epidemiologia molecolare, fattori di patogenicità e antibiotico-resistenza di Listeria monocytogenes isolata da salsiccia ovina”
Tesi di Dottorato in: Riproduzione, Produzione, Benessere animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale. (XXXIII Ciclo)
Università degli Studi di Sassari

In maniera analoga tutti gli isolati di *L. monocytogenes* analizzati appartengono a due soli sierotipi: 1/2a e 1/2b. Tutti gli isolati con sierotipo 1/2a appartengono al pulsotipo A e tutti gli isolati con sierotipo 1/2b appartengono al pulsotipo B.

Relativamente ai risultati sulla suscettibilità antimicrobica tutti i dati ottenuti sono riassunti nella tabella n°9 dove, in corrispondenza di ciascun antibiotico di cui è indicato il relativo range di concentrazione verso il quale è stata valutata la sensibilità antimicrobica di ciascun isolato, è riportata la consistenza numerica dei ceppi che hanno espresso una MIC in µg/ml pari al valore indicato nella riga in alto.

Le sbarrette verticali indicano dove noto i valori di breakpoints per *L. monocytogenes* verso quell'agente antimicrobico.

		MIC (µg/ml)										
		0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	1000
Chloramphenicol	2-16						56					
Daptomycin	0.5 – 4					16	40					
Gentamicin	2 – 16 500				56							
Linezolid	1 – 8			56								
Rifampin	0.5 – 4		56									
Trimethoprim / sulfamethoxazole	0.5/95 – 4/76		56									
Quinupristin / dalfopristin	0.5 – 4		56									
Tetracycline	2 – 16				56							
Erythromycin	0.25 – 4	56										
Oxacillin+ 2%NaCl	0.25 – 4					4	52					
Ampicillin	0.12 - 8											
Penicillin	0.06 – 8	10	40	4								
Vancomycin	0.25 – 32				56							
Levofloxacin	0.25 – 4				40	16						
Tigecycline	0.03 – 0.5			52	4							
Moxifloxacin	0.25 - 4			56								
Clindamycin	0.5 – 2		56									
Streptomycin	1000											56
Ciprofloxacin	1 – 2			18		38						
Nitrofurantoin	32 – 64										56	
Cefoxitin screen	6							56				

Tabella 9: suscettibilità antimicrobica dei 56 isolati da matrici carnee e da tamponi ambientali

5 Conclusioni

Sin dal 1987 gli Stati maggiormente evoluti sotto il profilo sanitario hanno sviluppato sistemi di sorveglianza per la listeriosi in considerazione del fatto che fosse una patologia a prevalente trasmissione alimentare e con un alto tasso di mortalità (Rocourt et al., 2000). Tali sistemi di sorveglianza si prefiggono come obiettivi

- stimare l'incidenza annuale della patologia
- l'identificazione degli alimenti a rischio e le fonti di contaminazione
- monitorare le modalità e i percorsi della trasmissione alimentare
- individuare misure che contribuiscano a ridurre la mortalità e la morbilità della listeriosi
- valutare l'impatto di possibili misure preventive

Un forte contributo al raggiungimento di questi obiettivi è stato dato proprio dalle tecniche di caratterizzazione biomolecolare. In Italia nel 2002 il Centro Nazionale per la Qualità e per i Rischi Alimentari (C.N.Q.A.R.A.) dell'Istituto Superiore di Sanità ha avviato un progetto chiamato ListerNet Italia il cui obiettivo, in collaborazione con le strutture del Sistema Sanitario Nazionale, è quello di raccogliere il maggior numero possibile di ceppi di *L. monocytogenes* di origine alimentare, ambientale e umana da sottoporre a caratterizzazione sierologica e molecolare per la realizzazione di una banca dati da utilizzare nelle

indagini epidemiologiche sugli episodi di listeriosi, sia in ambito nazionale che comunitario ed internazionale (Gianfranceschi et al., 2009). I dati raccolti confluiscono in un progetto più ampio denominato PulseNet organizzato a livello europeo sul modello di quello già attivo negli Stati Uniti ed al quale partecipano 56 Istituti di sanità pubblica e sicurezza alimentare di 29 Paesi europei. Il PulseNet Europe ed il PulseNet USA insieme ad organizzazioni analoghe di altri continenti aderiscono al progetto PulseNet International (*The International Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance*). Il PulseNet International raggruppa una rete capillare di laboratori di sanità pubblica umana e veterinaria distribuiti in gran parte del territorio mondiale, i quali mediante l'utilizzo di un unico protocollo rigidamente standardizzato per PFGE per la caratterizzazione degli isolati di *L. monocytogenes*, contribuiscono ad alimentare un database liberamente consultabile da tutti gli aderenti che fornisce in tempo reale dati sulla diffusione di un determinato ceppo batterico.

L'obiettivo è quello di acquisire un quadro epidemiologico il più possibile completo sulla diffusione di un determinato ceppo di *L. monocytogenes* sul territorio internazionale con indicazioni precise sulla provenienza geografica, l'origine (sia essa umana, alimentare, animale o ambientale) e l'anno di isolamento.

Il presente lavoro sperimentale è stato condotto, sull'esempio di quanto già realizzato per altri prodotti (ad es. per i salami "cacciatore") (Gianfranceschi et al, 2006a; Gianfranceschi et al., 2006b), per fornire un quadro preciso della

prevalenza e delle caratteristiche di agenti zoonotici, in particolare *L. monocytogenes*, anche in un prodotto di nicchia quale la salsiccia ovina.

La peculiarità del prodotto considerato emerge anche dal fatto che dalle ricerche bibliografiche effettuate (NCBI/PubMed) risultano un numero esiguo di pubblicazioni riguardanti studi effettuati su insaccati ovini.

Inoltre nel rapporto EFSA per il 2008 non sono riportati dati riferibili alla prevalenza degli agenti zoonotici *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* in prodotti carnei di origine ovina.

Lo studio effettuato contribuisce a migliorare le conoscenze igienico-sanitarie su questo prodotto nell'ottica di una sempre più capillare conoscenza epidemiologica sulla diffusione di alcuni agenti zoonotici.

I dati sperimentali ottenuti hanno escluso la presenza nella salsiccia ovina, limitatamente ai lotti e allo stabilimento considerato, degli agenti zoonotici *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 che sono risultati assenti anche nei tamponi ambientali.

Nell'ambito dei microrganismi presi in considerazione, solamente la *Listeria* è risultata presente con la sola specie *monocytogenes*, confermando che le carni trasformate come la salsiccia ovina possono essere un substrato favorevole allo sviluppo di tutte le *Listerie* e dunque anche della specie *monocytogenes* (Gianfranceschi et al., 2009).

Tutti gli isolati analizzati sono inoltre potenzialmente in grado di esprimere per tutti i fattori di virulenza ricercati, compresa l'Internalina J. Quest'ultima ha di recente assunto notevole importanza in quanto è stato dimostrato che la delezione mutante del gene *Lmo2821* che codifica per questa internalina, coinvolta come tutte le proteine della famiglia delle internaline nel meccanismo di adesione cellulare, comporta un'attenuazione della virulenza del ceppo di *L. monocytogenes* (Sabet et al., 2005). Poiché è ormai accertato che non tutti i ceppi di *L. monocytogenes* presentano lo stesso grado di virulenza e che questa sembra essere proprio modulata dalla presenza o meno di questo gene, la presenza in tutti gli isolati analizzati del gene *Lmo2821* potrebbe indicare che essi sono tutti potenzialmente virulenti (Sabet et al., 2005; Dongyou, 2006; Dongyou et al, 2003).

Tutti i ceppi isolati sono tuttavia risultati sensibili a penicillina e ampicillina, antimicrobici utilizzati nella terapia della listeriosi, come anche alla combinazione di trimethoprim-sulfamethoxazolo terapeutico di seconda scelta in soggetti allergici ai β -lattamici.

I sierotipi riscontrati sono 1/2a (12 isolati) e 1/2b (44 isolati) i quali sulla base di dati epidemiologici sono inclusi, insieme con il sierotipo 4b, nel gruppo dei sierotipi più frequentemente causa di listeriosi nell'uomo. I sierotipi più frequentemente isolati negli alimenti e negli stabilimenti di produzione alimentare sono i sierotipi 1/2a, 1/2c, 3a e 3c (Kathariou, 2002). In un recente lavoro (Gianfranceschi et al., 2009) di caratterizzazione di *L. monocytogenes*

isolati da salami italiani, i sierotipi più frequentemente riscontrati sono stati 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b.

La presente ricerca ha evidenziato la presenza di un solo pulsotipo nei tamponi ambientali effettuati all'inizio e alla fine dell'indagine in un arco temporale di due anni. Al contrario, escluso il primo lotto di lavorazione nel quale non sono state riscontrate positività per *L. monocytogenes*, nel secondo lotto i ceppi isolati appartenevano tutti al pulsotipo A, dal terzo all'ultimo lotto tutti gli isolati appartenevano al pulsotipo B, analogamente a quanto riscontrato nei tamponi ambientali. Sulla base di quanto sopra evidenziato è ragionevole presupporre che anche all'interno dello stabilimento di lavorazione interessato da questa indagine siano presenti ceppi residenti di *L. monocytogenes* che possono essere trasferiti con modalità diverse ai prodotti di lavorazione analogamente a quanto riportato in bibliografia sull'esistenza di ceppi residenti o persistenti negli stabilimenti di trasformazione anche per svariati anni (Kathariou, 2002).

6 Bibliografia

Bubert, A., Hein, I., Rauch M., Lehener A., Yoon B., Goebel W. and Wagner M.. 1999. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on Multiplex PCR. Applied an Environmental Microbiology. Vol. 65, N° 10, pagg.: 4688-4692.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2009. Division of Foodborne, Bacterial, and Mycotic Diseases, National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases. (www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/listeriosis/).

Cossart P., Toledo-Arana A.. 2008. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. Microbes and Infection. Vol. 10, pagg.: 1041-50.

Cummins A.J., Fielding A. K., McLauchlin J. 1994. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. Journal Infection. 1994, Vol. 28, 1, pagg. 89-91.

Decreto legislativo 4 aprile 2006, n. 191, “Attuazione della Direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici”. Vol. G.U. n. 119 del 24 maggio 2006.

den Bakker H.C., Bundrant B.N., Fortes E.D., Orsi R.H., Wiedmann M.. 2010. A population genetics-based and phylogenetic approach to understanding the evolution of virulence in the genus *Listeria*. Applied Environmental Microbiology. Vol.76(18): 6085-6100.

Direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17/11/2003, sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della Decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la Direttiva 92/117/CEE del Consiglio. Vol. G.U.C.E. del 12/12/2003, Serie L, 325-331 .

Dongyou L., Ainsworth, A. J.,Austin, F. W., Lawrence, M. L.. 2003. Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. Journal of Medical Microbiology. Vol. 52, pagg. 1065-1070.

Dongyou, L.. 2006. “Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen”. Journal of Medical Microbiology. Vol. 55, pagg.: 645-659.

Farber, J. M., Peterkin, P. I.. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. . Microbiol. . 1991, Vol. 55, pagg.: 752-811.

Gianfranceschi M. V., Gattuso A., Fiore A., D'Ottavio M. C., Casale M., Palumbo A., Aureli P.. 2006a. Survival of *Listeria monocytogenes* in uncooked italian dry sausage (salami). Journal Food Protection. Vol. 69, pagg.: 1533-1538.

Gianfranceschi M. V., Gattuso A., D'Ottavio M. C., Pourshaban M., Bertoletti I., Bignazzi R., Manzoni P., Marchetti M., Aureli P.. 2006b. Listeriosis associated with gorgonzola (Italian blu-veined cheese). Foodborne Pathog. Dis.. Vol. 3, pagg.: 190-195.

Gianfranceschi M.V., D'Ottavio M.C., Gattuso A., Bella A., Aureli P.. 2009. Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002-2005). Food Microbiology. Vol. 26, pagg.: 520-526.

Girardin, H., Morris, C.E., Albagnac, C., Dreux, N., Glaux, C., Nguien-The, C.. 2005. Behavior of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. FEMS Microbiology Ecology. Vol. 54, pagg.: 287-295.

Graves L.M., Helsel L.O., Steigerwalt A.G., Morey R.E., Daneshvar M.I., Roof S.E., Orsi R.H., Fortes E.D., Milillo S.R., den Bakker H.C., Wiedmann M., Swaminathan B., Sauders B.D.. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. . Int J Syst Evol Microbiol. Vol. 60(Pt 6), pagg.: 1280-8.

Graves, L. M., Swaminathan B.. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. International Journal of Food Microbiology. Vol. 65, pagg.: 55-62.

Greco, M., Mazzette, R., De Santis, E.P.L., Corona, A. and Cosseddu, A.M.. 2005. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. Meat Science. Vol. 69, pagg.: 733-739.

Guillet C., Join-Lambert O., Le Monnier A., Leclercq A., Mechai F., Mamzeer-Bruneel M.F., Bielecka M.K., Scortii M., Disson O., Berche P., Vazquez-Boland J., Lortholary O., Lecuit M.. 2010. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. Emerg. Infect. Dis. Vol. 16, 1, pagg.: 136-138.

Hof H.. 2003. History and epidemiology of listeriosis. FEMS Immunology and Medical Microbiology. Vol. 35, pagg.: 199-202.

Kathariou S.. 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. Journal of Food Protection. Vol. 65, 11, pagg.: 1811-1829.

Kawasaki S., Orikoshi N., Okada Y., Takeshita K., Sameshima T. and Kawamoto S.. 2005. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria*

monocytogenes, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. Journal of Food Protection . Vol. 68, 3, pagg.: 551-556.

Leistner L., Gould G.. 2002. Combination treatments for food stability, safety and quality. s.l.: Hurdle technologies. Cap. 7, pagg.: 66-69.

Lessing M. P., Curtis G. D., Bowler I. C. 1994. *Listeria ivanovii* infection. Journal infection. 1994, Vol. 29, 2, pagg.: 230-231.

Mazzette R., Coppa G., Serra P. G., Greco M., De Santis E. P .L., Cosseddu A. M.. 2001. Evoluzione dei parametri microbiologici nel processo di produzione del prosciutto di pecora. Alghero, SS. Atti XI, pagg.: 321-326.

Mazzette, R., De Santis, E.L.P., Coppa, G., Serra, P.G., Bean, V. and Cosseddu, A.M.. 1996. Valorizzazione delle carni ovine: Utilizzazione per la produzione dei prodotti di salumeria. Atti Convegno Associazione Italiana Veterinari Igienisti 4, pag.: 181.

McLauchlin J., Mitchell R. T., Smerdon W. J., Jewell K. 2004. *Listeria monocytogenes* an listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. International Journal of Food Microbiology. Vol. 92, pagg.: 15-23.

National Center for Biotechnology Information/U. S. National Library of Medicine. 2010. (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Nicholson, F.A., Groves, S.J., Chambers, B.J.. 2004. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. Bioresource Technology. Vol. 96, pagg.: 135-143..

Olier, M., Rousseaux, S., Piveteau, P., Lemaitre, J. P., Rousset, A., Guzzo, J.. 2004. Screening of glutamate decarboxylase activity and bile salts resistance of human asymptomatic carriage, clinical, food and environmental isolated of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiology. Vol. 93, pagg.: 87-99.

Regolamento (CE) N. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.

Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione, del 15 novembre 2005 , sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.

Ricerca corrente Ministero della Salute IZS/SA 03/06. 2006. Rischio alimentare associato al consumo di prodotti di origine ovina e caprina: prevalenza, caratterizzazione e profilo di antibiotico resistenza di *Listeria monocytogenes*, Campilobatteri termofili e *E. coli*. 2006.

M. Nives Rosa

Ricerca corrente Ministero della Salute IZS SA 06/07. 2007. Valutazione del rischio nella filiera ovi-caprina: rilievo e caratterizzazione di agenti batterici di zoonosi alimentare mediante tecniche fenotipiche e di PCR e studio delle possibili relazioni con le infezioni umane. 2007.

Ricerca Corrente Ministero della Salute IZS SA 04/08. 2008. Valutazione del rischio microbiologico in alimenti di origine ovina e messa a punto di metodiche biomolecolari per la ricerca e caratterizzazione di agenti batterici di zoonosi. 2008.

Roche, S. M., Velge B., Bottreau, E., Durier, C., Marquet-van der Mee, N. & 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. Vol. 68, pagg.:33-44.

Rocourt J., Jacquet Ch., Reilly A. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. International Journal of Food Microbiology. Vol. 62, pagg.: 197-209.

Rocourt, J., Cossart, P.. 1997. *Listeria monocytogenes*. Food Microbiology Fundamentals And Frontiers,. Washington D.C.: Doyle M. B., Beuchat L.R., Montville T. J., ASM Press, pagg.: 337-352.

Rosa M.N., Mele P., Parisi A., Latorre L., Virgilio S. and Tola S.. 2010. Molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolate from ovine sausage. Porto: Atti XVII International Symposium on Problems of Listeriosis, pag.:106.

Sabet C., Lecuit M., Cabanes D., Cossart P., Bierne H.. 2005. LPXTG Protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. Infection and Immunity. Vol. 73, N° 10, pagg.: 6912-6922.

Schlech W. F.. 2010. Update on clinical aspects of listeriosis: What's new?. Porto. Atti XVII International Symposium on Problems of Listeriosis..

Somer I., Kashi Y.. 2003. A PCR method based on 16s rRNA sequence for simultaneous detection of the genus *Listeria* and the species *Listeria monocytogenes* in food products. Journal of Food Protection. Vol. 66. N° 9, pagg.: 1658-1665.

Summary of Notifiable Diseases — United States, 2008. 2010. Department of health and human services Centers for Disease Control and Prevention. s.l. : Morbidity and Mortality Weekly Report. Published June 25, 2010, for 2008. Vol. 57, No. 54.

Temoin S., Roche S. M., Grepinet O., Fardini Y. and Velge P. 2008. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. Microbiology. 2008, Vol. 154, pagg939-948.

The Community Summary Report. 2009. Food-borne outbreaks in the European Union in 2007. s.l.: © European Food Safety Authority 2009.

The International Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance. 2010. (www.pulsenetinternational.org)

Van Stelten, A., Nightingale, K. K.. 2008. Development and implementation of a multiplex single-nucleotide polymorphism genotyping assay for detection of virulence-attenuating mutation in the *Listeria monocytogenes* virulence-associated gene inlA. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 74 N° 23, pagg.: 7365-7375.

Vasquez-Boland J.A., Khun M., Berche P., Chrakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J. and Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical Microbiology Review. Vol. 14, N° 3, pagg.: 584-640.

Wiedmann M. 2010. Ecology of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp. in natural and food associated environments. Porto. Atti XVII International Symposium on Problems of Listeriosis..