

CAMPOBASSO

Dottorato di Ricerca in *Scienze per la Salute*

XXIV ciclo

Dipartimento di Scienze per la Salute



TESI DI DOTTORATO

**Epidemiologia molecolare di *Listeria monocytogenes*:
genotipizzazione, sierotipizzazione molecolare e
analisi dei profili di espressione di geni implicati nei
meccanismi di patogenesi e virulenza**

Docente guida

Prof.ssa Michela Lucia Sammarco

Dottoranda

Dott.ssa Monia Vitullo

Coordinatore del Dottorato

Chiar.mo Prof. Guido Maria Grasso

ANNI ACCADEMICI 2009-2012

INDICE

Introduzione.....	1
Capitolo1 <i>Listeria monocytogenes</i>: biologia e patogenesi	
1.1 Inquadramento tassonomico.....	4
1.2 Morfologia e fisiologia.....	6
1.3 Diffusione nell'ambiente.....	7
1.4 Epidemiologia delle listeriosi.....	8
1.5 Alimenti a rischio e quadro normativo	10
1.6 Controllo e prevenzione.....	13
1.7 Patogenesi dell'infezione.....	15
1.7.1 Listeriosi nell'uomo.....	17
1.7.2 Listeriosi negli animali.....	19
1.7.3 Risposta immunitaria dell'ospite.....	20
1.8 Ciclo replicativo intracellulare.....	22
1.8.1 Principali determinanti di virulenza	24
1.8.2 Internaline.....	25
1.8.3 Geni del cluster LIPI-1.....	29
1.8.4 Regolazione dei fattori di virulenza: PrfA (positive regulatory factor A).....	31
1.9 Meccanismi di resistenza a stress ambientali.....	33
1.9.1 Regolazione ad opera del fattore sigma alternativo (σ^B).....	40
Capitolo 2 Tipizzazione di <i>Listeria monocytogenes</i>	
2.1 Metodi di tipizzazione di <i>L. monocytogenes</i>	42
2.2 Single Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism (sAFLP).....	44
2.2.1 Elettroforesi degli acidi nucleici e Capillary Gel Electrophoresis (CGE).....	46
2.2.2 Elettroforesi microfluidica automatizzata mediante sistema Experion TM	48
Capitolo 3 Tecniche di Real-time PCR	
3.1 Real-time PCR.....	53
3.2 La Real-time PCR quantitativa e qualitativa.....	54
3.2.1 Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT PCR) ed espressione genica	55
3.2.2 Metodo comparativo di Livak ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	56
3.2.3 Metodo della curva standard	56
Capitolo 4 Obiettivi della ricerca	58
Capitolo 5 Materiali e metodi	
5.1 Selezione e isolamento dei ceppi di <i>L. monocytogenes</i>	61
5.2 Estrazione del DNA.....	73
5.2.1 Maxwell® 16 System.....	73
5.2.2 MicroLYSIS.....	74
5.3 Single Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism (sAFLP).....	75
5.3.1 Elettroforesi microfluidica di DNA.....	76
5.3.2 Analisi dei profili di sAFLP.....	77
5.4 Disegno primers e sonde TaqMan per la sierotipizzazione di <i>L. monocytogenes</i>	78
5.4.1 Individuazione dei sierogruppi mediante due saggi in Triplex-PCR.....	86
5.5 Valutazione della resistenza al cloruro di benzalconio.....	87
5.6 Analisi dell'espressione di geni mediante qRT-PCR.....	89
5.6.1 Estrazione di RNA	91
5.6.2 Trattamento con cloruro di benzalconio	93

5.6.3 Eliminazione del DNA genomico dall'RNA estratto.....	93
5.6.4 Elettroforesi microfluidica di RNA totale	94
5.6.5 Sintesi del cDNA: reazione di retro trascrizione.....	95
5.6.6 Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR)	95
5.6.7 Analisi statistica dei risultati.....	97

Capitolo 6 Risultati

6.1 Genotipizzazione di <i>L. monocytogenes</i> mediante single Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism (sAFLP).....	98
6.2 Confronto tra elettroforesi tradizionale e separazione microfluidica automatizzata per la genotipizzazione mediante sAFLP.....	108
6.3 Standardizzazione di un saggio in Real-time Multiplex-PCR per la sierotipizzazione molecolare di <i>L. monocytogenes</i>	115
6.4 Valutazione della resistenza a concentrazioni sub-letali di cloruro di benzalconio e analisi dei profili di espressione di geni implicati nella resistenza a stress mediante saggi di qRT-PCR.....	119
6.4.1 Livelli di espressione dei geni <i>mdrL</i> , <i>lde</i> , <i>orfA</i> e <i>sigB</i>	120
6.5 Livelli di espressione dei geni <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>hly</i> , <i>prfA</i> e <i>bsh</i>	125
6.6 Analisi delle curve di melting.....	129

Capitolo 7 Discussione e conclusioni

7.1 Genotipizzazione di <i>L. monocytogenes</i> mediante single Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism (sAFLP).....	133
7.1.1 Elettroforesi tradizionale vs. separazione microfluidica automatizzata per la genotipizzazione di ceppi di <i>L. monocytogenes</i> mediante sAFLP.....	135
7.2 Standardizzazione di un saggio in Real-time Multiplex-PCR per la sierotipizzazione molecolare di <i>L. monocytogenes</i>	137
7.3 Espressione dei geni <i>mdrL</i> , <i>lde</i> , <i>orfA</i> e <i>sigB</i> ed esposizione al cloruro di benzalconio	140
7.4 Profili di espressione dei geni di virulenza <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>hly</i> , <i>prfA</i> e <i>bsh</i>	145

Riferimenti bibliografici

Capitolo 1

Listeria monocytogenes: biologia e patogenesi

Introduzione

Listeria monocytogenes è l'agente eziologico della listeriosi, infezione definita rara dall'Organizzazione Mondiale della Sanità rispetto ad altre malattie a trasmissione alimentare, ma il cui impatto mondiale in Sanità Pubblica è notevole per l'elevata mortalità e l'alto tasso di ospedalizzazione che la caratterizzano [1; 2]. Da batterio essenzialmente saprofito, che sopravvive fino a 10-12 anni in materiale vegetale in decomposizione, può rivelarsi un pericoloso patogeno intracellulare opportunista, in grado di colpire soggetti debilitati o con deficit del sistema immunitario [3; 4; 5]. Tra le fasce di popolazione a rischio, oltre a donne in stato di gravidanza e neonati, rientrano anziani e soggetti sottoposti a trattamento con farmaci immunosoppressivi, tra cui quelli utilizzati nelle terapie antitumorali, categorie in costante crescita nei Paesi industrializzati. Nei soggetti immunocompetenti, l'infezione si presenta in forma lieve con febbre e/o sintomi gastrointestinali. Di conseguenza, le infezioni sub-cliniche spesso non vengono segnalate e la listeriosi umana viene diagnosticata quasi esclusivamente nelle manifestazioni di setticemia, meningite, meningoencefalite e aborto, rendendo estremamente difficile la stima del reale impatto dell'infezione nella popolazione.

L'attenzione nei confronti del microrganismo nell'ambito della sicurezza alimentare è fortemente aumentata a seguito della recente e rapida espansione del mercato degli alimenti ready-to-eat e heat-to-eat (cibi pronti al consumo o cibi assemblati e pronti a cottura rapida o dopo un blando riscaldamento), categorie di prodotti coinvolti nella maggior parte dei casi epidemici di listeriosi [6]. Infatti, pur essendo un microrganismo asporigeno, è in grado di resistere a molteplici condizioni ambientali sfavorevoli, tra cui pH acido, alte concentrazioni di cloruro di sodio, temperature di refrigerazione, presenza di sostanze disinfettanti e altri parametri chimico-fisici che caratterizzano gli alimenti o che sono legati alle tecniche di produzione e conservazione degli stessi. Grazie anche alla capacità di produrre biofilm, che rendono difficile e a volte impossibile la decontaminazione delle superfici, rappresenta attualmente uno dei temi di maggior interesse per l'industria alimentare [2; 7].

Numerose sono le azioni intraprese a livello globale per limitare l'incidenza delle listeriosi, tra cui l'istituzione di reti di sorveglianza, sia nella Comunità Europea che negli Stati Uniti, dove addirittura vige la politica della 'tolleranza zero' per tutti i cibi pronti al consumo fin dagli anni '80, analogamente a quanto stabilito in Nuova Zelanda e Australia. Nonostante questo, eventi epidemici continuano ad essere registrati, come recentemente avvenuto tra luglio e ottobre 2011 negli USA a causa del consumo di meloni contaminati, con 116 persone infette in 25 Stati e 33 decessi. *L. monocytogenes* è stato a lungo utilizzato come modello di riferimento per lo studio dei microrganismi intracellulari, soprattutto per esaminare le interazioni ospite-

patogeno e il meccanismo di stimolazione della risposta immunitaria. Infatti, è uno dei pochi patogeni intracellulari in grado di aderire e invadere la cellula ospite, seguendo un tropismo per specifici tipi cellulari, di moltiplicare nel citoplasma e diffondere alle cellule vicine provocando una forte risposta immunitaria cellulo-mediata senza, tuttavia, essere completamente eliminato dall'ospite. Resiste inoltre alla fagocitosi dei macrofagi e l'infezione primaria genera cellule T di memoria con effetto protettivo verso infezioni successive. Per tali motivi, negli ultimi anni diversi studi di immunologia si sono focalizzati su *L. monocytogenes* per la realizzazione di vaccini attenuati o sul suo utilizzo come vettore per la distribuzione di molecole anti-infettive e vaccini contro il cancro [5; 8; 9]. Recenti lavori dimostrano inoltre, che può fornire un valido modello per esaminare i fattori necessari alla sopravvivenza microbica nell'ambiente gastrointestinale umano [5; 10]. Infatti, *L. monocytogenes* è in grado di resistere al pH acido dello stomaco, primo fattore di stress che il patogeno incontra dopo l'ingestione di alimenti contaminati da parte dell'ospite, ma anche all'elevata osmolarità e all'attività antimicrobica della bile a livello intestinale [11].

Studi filogenetici e di caratterizzazione fenotipica o molecolare hanno ormai accertato che *L. monocytogenes* rappresenta una popolazione strutturata, composta da ceppi che differiscono tra loro, soprattutto per ecologia e associazione ospite-patogeno. Data la diffusa presenza e l'estrema variabilità nella virulenza, molteplici sono le tecniche molecolari messe a punto e correntemente utilizzate per individuare le differenze esistenti all'interno della specie. Tali metodiche, rappresentano un valido supporto per tipizzare ceppi isolati da casi clinici o listeriosi animale, da alimenti o ambiente, in base a differenze nelle sequenze degli acidi nucleici; esse sono indispensabili per individuare i focolai di infezione e stabilire i legami epidemiologici nell'ambito della sorveglianza di routine o nelle indagini su eventi epidemici. Sono inoltre essenziali per il monitoraggio della contaminazione negli impianti di produzione/distribuzione degli alimenti, ma anche per comprendere l'ecologia, l'evoluzione e la struttura della popolazione microbica e per definire le specifiche caratteristiche di virulenza dei ceppi di *L. monocytogenes* [4; 12; 13]. Il metodo di riferimento per la tipizzazione molecolare di tale microrganismo è attualmente la Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE), utilizzata per la sorveglianza delle listeriosi, sia nella Comunità Europea che negli Stati Uniti, mediante la creazione di un database condiviso contenente i profili genetici dei ceppi identificati nei diversi Paesi. Ulteriori metodiche basate su restrizione enzimatica, tra cui la AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), sono largamente utilizzate per la caratterizzazione molecolare dei microrganismi patogeni in studi epidemiologici e/o tassonomici [14; 15]. Il costante progresso tecnologico ha contribuito significativamente all'evoluzione di tale campo della ricerca, permettendo l'integrazione e talora la sostituzione

completa di precedenti metodiche. Grazie alle nuove tecnologie, è stato possibile migliorare, semplificare, ridurre i tempi di analisi o il rischio chimico per gli operatori e, contemporaneamente, aumentare l'accuratezza e l'oggettività nell'interpretazione dei risultati di laboratorio. Ne sono un esempio lo sviluppo di nuovi dispositivi per l'elettroforesi capillare ad alta risoluzione, che hanno consentito la realizzazione di chip per la separazione microfluidica automatizzata di DNA, RNA e proteine, a supporto delle metodiche tradizionali di PCR [16; 17] o per accrescere la solidità e la fondatezza dei risultati scientifici in saggi che richiedono un'accurata ed esatta valutazione quali-quantitativa degli acidi nucleici [18]. Tra le tecniche di biologia molecolare che negli ultimi anni ha trovato larga applicazione nei laboratori di ricerca e di diagnostica, rientra la Real-Time PCR, metodica altamente sensibile ed accurata, che permette l'identificazione in tempo reale dei prodotti di amplificazione. Grazie alla capacità di riconoscere uno specifico target molecolare, costituisce una strategia rapida, ad alta sensibilità e specificità, utilizzata per l'identificazione e la quantificazione di microrganismi patogeni e virus, per individuare SNPs o la presenza di OGM, per esperimenti di genotipizzazione, ecc. Inoltre, mediante l'impiego di particolari chimiche fluoregeniche, è possibile realizzare saggi in Multiplex-PCR, con notevole risparmio di tempo e migliorando l'accuratezza rispetto a metodi analoghi, ma basati su elettroforesi tradizionale. La combinazione della Real-Time PCR con la retrotrascrizione di mRNA, ha permesso lo sviluppo della Quantitative Reverse Transcription PCR, tecnica ampiamente utilizzata per studi di espressione genica.

Molteplici fattori di virulenza sono stati individuati in *L. monocytogenes*, i quali vengono attivati durante l'infezione dell'ospite, segnando la transizione da saprofita extracellulare a patogeno opportunisto nell'ambiente intracellulare [19; 20]. Infatti, affinché possa instaurarsi l'infezione, è necessario che tali geni vengano espressi in quantità adeguata ed in modo coordinato nelle diverse fasi del ciclo infettivo. Inoltre, numerosi geni vengono espressi in risposta a stress di diversa natura e tale capacità è fondamentale per la sopravvivenza nell'ambiente esterno e allo stesso tempo costituisce un prerequisito per la virulenza, in quanto permette di colonizzare svariate matrici alimentari e di superare le condizioni ostili che il patogeno incontra nell'attraversamento del tratto gastrointestinale dell'ospite [21].

La comprensione di tali meccanismi molecolari e la caratterizzazione dei ceppi potenzialmente più virulenti sono aspetti fondamentali per il controllo della listeriosi, in quanto consentono di migliorare le attività di sorveglianza e di prevenzione del rischio associato a *L. monocytogenes* per la salute umana, soprattutto nelle fasce più sensibili della popolazione.

1.1 Inquadramento tassonomico

L'identificazione di *L. monocytogenes* è piuttosto recente. Sebbene Hayem (Francia, 1891) e Henle (Germania, 1893) osservarono la presenza di bacilli Gram positivi in tessuti di pazienti deceduti per una patologia riconducibile a listeriosi, Hülphers (Svezia, 1911) sembra sia stato il primo ad individuare il microrganismo oggi noto come *L. monocytogenes* [22]. La scoperta ufficiale risale al 1926 a Cambridge, nel Regno Unito, quando Murray, Webb e Swann intuirono che tale batterio era l'agente eziologico di leucocitosi mononucleare in conigli e porcellini d'India di laboratorio, da cui il nome *Bacterium monocytogenes* [23]. Nel 1927 Pirie isolò lo stesso microrganismo da gerbilli infetti in Sud Africa e denominò il genere *Listerella*. L'attuale denominazione *L. monocytogenes*, è stata concordata nel 1940 in onore del chirurgo inglese sir Joseph Lister. Nonostante il numero consistente di casi, l'elevata morbilità e letalità, scarse conoscenze si sono avute fino al 1980, soprattutto a causa dell'ignota modalità di trasmissione. Inizialmente, si era ipotizzato che tali batteri fossero correlati con i corineformi, collocandoli nella famiglia delle *Corynebacteriaceae* nella settima edizione del Bergey's Manual. Dai dati di sequenziamento del gene 16S rRNA il genere *Listeria* (insieme al genere *Brochothrix*) è stato classificato nella famiglia Listeriaceae, ampliando nel 2001 l'Ordine Bacillales, che include anche Staphylococcaceae, Bacillaceae e numerosi altri generi (*Alicyclobacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pasteuriaceae*, *Sporolactobacillaceae*, *Thermoactinomycetaceae*, *Planococcaceae*). *Listeria* spp. presenta bassi valori di mol% G+C (<50%) e una stretta correlazione con i generi *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Clostridium* [24; 25]. Dal confronto del genoma di *L. monocytogenes* e *L. innocua* è emersa una stretta relazione con *Bacillus subtilis*, facendo ipotizzare un'origine comune. Il genere comprende *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi* e due specie identificate per la prima volta nel 2009, quali *L. marthii* e *L. rocourtiae* [25; 26; 27]. *L. ivanovii* è stata identificata nel 1985 [28] e suddivisa nelle sottospecie *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* [25].

Un'ulteriore specie, denominata *L. murrayi* era stata identificata, ma successivamente riconosciuta come sottospecie di *L. grayi* [29]. La classificazione e l'attuale schema tassonomico di *Listeria* spp. sono riportati in figura 1. *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* rappresentano le uniche specie associate a patologie nell'uomo e, sebbene il cluster di virulenza che caratterizza *L. monocytogenes* sia presente anche in *L. seeligeri*, quest'ultima risulta non patogeno per l'uomo [26; 30; 31]. Specie patogene e non patogene sono strettamente correlate, infatti, dal punto di vista filogenetico si ipotizza un ceppo ancestrale comune tra *L. monocytogenes* e *L. innocua*, così come tra *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. welshimeri* (Fig. 2).

- *Listeria grayi*
 - *Listeria grayi* DSM 20601
- *Listeria innocua*
 - *Listeria innocua* ATCC 33091
 - *Listeria innocua* Clip11262
 - *Listeria innocua* FSL J1-023
 - *Listeria innocua* FSL S4-378
- *Listeria ivanovii*
 - *Listeria ivanovii* FSL F6-596
 - *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii*
 - *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis*
- *Listeria marthii*
 - *Listeria marthii* FSL S4-120
- *Listeria monocytogenes*
 - *Listeria monocytogenes* 08-5578
 - *Listeria monocytogenes* 08-5923
 - *Listeria monocytogenes* 10403S
 - *Listeria monocytogenes* 1816
 - *Listeria monocytogenes* 220
 - *Listeria monocytogenes* 690
 - *Listeria monocytogenes* ATCC 19115
 - *Listeria monocytogenes* ATCC 19117
 - *Listeria monocytogenes* EGD-e
 - *Listeria monocytogenes* F6900
 - *Listeria monocytogenes* Finland 1988
 - *Listeria monocytogenes* FSL F2-208
 - *Listeria monocytogenes* FSL F2-515
 - *Listeria monocytogenes* FSL J1-175
 - *Listeria monocytogenes* FSL J1-194
 - *Listeria monocytogenes* FSL J1-208
 - *Listeria monocytogenes* FSL J2-003
 - *Listeria monocytogenes* FSL J2-064
 - *Listeria monocytogenes* FSL J2-071
 - *Listeria monocytogenes* FSL N1-017
 - *Listeria monocytogenes* FSL N3-165
 - *Listeria monocytogenes* FSL R2-503
 - *Listeria monocytogenes* FSL R2-561
 - *Listeria monocytogenes* HCC23
 - *Listeria monocytogenes* HPB2262
 - *Listeria monocytogenes* Italy
 - *Listeria monocytogenes* J0161
 - *Listeria monocytogenes* J2818
 - *Listeria monocytogenes* L99
 - *Listeria monocytogenes* LO28
 - *Listeria monocytogenes* M7
 - *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a str. F6854
 - *Listeria monocytogenes* serotype 1/2b str. SLCC2755
 - *Listeria monocytogenes* serotype 1/2c str. SLCC2372
 - *Listeria monocytogenes* serotype 4a str. L99
 - *Listeria monocytogenes* serotype 4b str. CLIP 80459
 - *Listeria monocytogenes* serotype 4b str. F2365
 - *Listeria monocytogenes* serotype 4b str. H7858
 - *Listeria monocytogenes* serotype 7 str. SLCC2482
 - *Listeria monocytogenes* SLCC2372
 - *Listeria monocytogenes* SLCC2376
 - *Listeria monocytogenes* SLCC2378
 - *Listeria monocytogenes* SLCC2540
 - *Listeria monocytogenes* SLCC2755
 - *Listeria monocytogenes* SLCC7179
 - *Listeria monocytogenes* str. Scott A
 - *Listeria monocytogenes* XFL0605
- *Listeria rocourtiae*
- *Listeria seeligeri*
 - *Listeria seeligeri* FSL N1-067
 - *Listeria seeligeri* FSL S4-171
 - *Listeria seeligeri* serovar 1/2b str. SLCC3954
- *Listeria welshimeri*
 - *Listeria welshimeri* serovar 6b str. SLCC5334
- *Listeria* sp. 102
- *Listeria* sp. 151
- *Listeria* sp. 87
- *Listeria* sp. LM4305
- *Listeria* sp. WO2000078990
- environmental samples
- uncultured *Listeria* sp.

Figura 1 Tassonomia di *Listeria* spp.

<u>Scientific classification</u>	
Kingdom:	Bacteria
Division:	Firmicutes
Class:	Bacilli
Order:	Bacillales
Family:	Listeriaceae
Genus:	Listeria
Species:	<i>L.monocytogenes</i>

Binomial name
Listeria monocytogenes
(Murray *et al.* 1926)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)

L. monocytogenes risulta strettamente correlata con *L. innocua* e *L. marthii*. *L. ivanovii* mostra invece una maggiore similarità genetica con *L. seeligeri*. La specie *L. grayi* è geneticamente

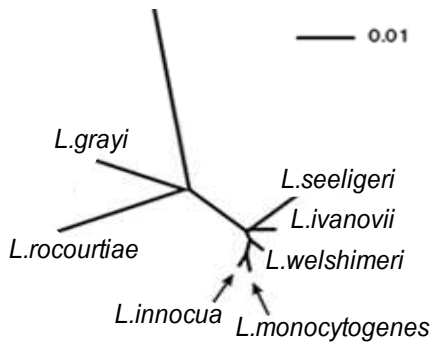


Figura 2 Albero filogenetico delle relazioni filogenetiche tra le diverse specie di *Listeria* spp. [27]

distante dalle altre, tanto da ipotizzare che possa costituire un genere (Murraya) a parte [26]. E' stato ipotizzato che nel comune antenato di *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* fosse presente il cluster di virulenza, ma due eventi indipendenti di delezione abbiano portato ad una riduzione nei genomi di *L. innocua* e *L. welshimeri*, passando da una specie ancestrale patogena ad una non patogena [25; 32].

1.2 Morfologia e fisiologia

L. monocytogenes è un batterio Gram-Positivo, catalasi positivo, ossidasi negativo, a forma di bastoncello regolare (0,4-0,5 µm × 1-2 µm), acapsulato, mobile per flagelli peritrichi (5-6) in coltura tra 20-25°C e non mobile a 37°C (Fig. 3 e 4). Tali bacilli si presentano essenzialmente come organismi singoli, anche se sono stati descritti ceppi filamentosi o raggruppati in piccole

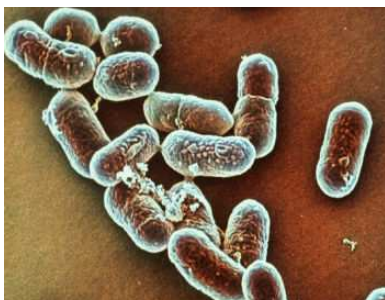


Figura 3 Immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) di *L. monocytogenes*

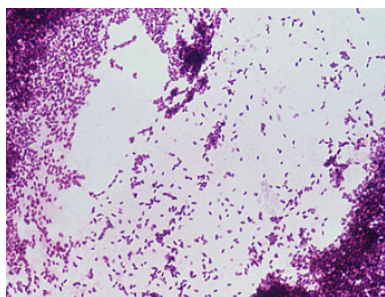


Figura 4 *L. monocytogenes*: colorazione di Gram

catene. È aerobio e/o anaerobio facoltativo, asporigeno, psicrotrofo in grado di crescere tra <0 e 45°C (optimum 30-37°C) e in ampi intervalli di pH (5,2-9); è stata riportata la crescita fino a pH 9 [33; 34]. Resistente ai processi di essiccazione degli alimenti, nei quali rimane attivo per settimane e anche mesi, sopporta anche elevate concentrazioni di nitrito di sodio [35; 36]. Inoltre, è alotollerante (concentrazioni NaCl fino a 8-10% e Aw minima 0,90-0,88) e riesce a sopravvivere in mezzi colturali liquidi (Brain Heart Infusion) contenenti 11% di NaCl [37]. Si moltiplica anche in alimenti conservati a temperatura di refrigerazione (4°C), nonostante la crescita a basse temperature è relativamente bassa, con un tempo di duplicazione massimo di circa 1-2 d a 4°C nei prodotti caseari. Resiste a diverse condizioni ambientali

sfavorevoli e rispetto ad altri microrganismi non sporigeni rappresenta il più termoresistente; sono infatti necessari 10 secondi a 72,3°C o 1 secondo a 85°C per la sua inattivazione. La pastorizzazione del latte è in grado di eliminare *L. monocytogenes*. Il tempo di riduzione decimale (D) in differenti alimenti varia da 16,7 a 1,3 minuti a 60°C e 0,20 fino a 0,06 minuti a

70 °C. Non è in grado di ridurre i nitrati e di idrolizzare l'urea, non produce idrogeno solforato e indolo, presenta attività lipolitica e β emolitica ed è grado di idrolizzare l'esculina presente nella bile. Fermenta glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio, cellobiosio, trealosio e saccarosio con conseguente produzione di acidi. Il catabolismo omofermentativo anaerobico del glucosio genera L(+) acido lattico, acido acetico ed altri prodotti. Dal metabolismo di zuccheri diversi dal glucosio, produce acidi, ma non gas. La composizione della parete cellulare è simile a quella di altri batteri Gram-Positivi ed è costituita principalmente da peptidoglicani (35% del peso secco), acidi tecoici (60-70% del peso secco) e acidi lipoteicoici (che mostrano somiglianze strutturali e biologiche con i lipopolisaccaridi di batteri Gram-Negativi).

1.3 Diffusione nell'ambiente

L. monocytogenes è il principale agente eziologico di listeriosi nell'uomo, anche se sono stati riportati rari casi di infezione provocate da *L. ivanovii* e *L. seeligeri* [38; 39]. Infezioni in pazienti con AIDS sono state associate a *L. ivanovii* [40]. La listeriosi si manifesta anche in animali domestici, uccelli e mammiferi selvatici [41]. Infatti, solo il 10% dei casi di setticemia riscontrati nelle pecore è attribuibile a *L. ivanovii*. Nonostante la sua natura essenzialmente saprofito, *L. monocytogenes* esprime diversi fattori di virulenza che sono alla base del comportamento da patogeno intracellulare facoltativo [4]. *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii* condividono l'isola di patogenicità LIPI-1, mentre LIPI-2 è presente solo in *L. ivanovii* e codifica per una fosfocolinesterasi necessaria per l'utilizzazione dei fosfolipidi negli eritrociti dei ruminanti, spiegando lo specifico tropismo di tale specie in questo gruppo di animali. Tutti i membri di *Listeria* spp. sono ubiquitari e comunemente isolati da suolo, vegetali, liquami, acqua, mangimi, una vasta gamma di alimenti di origine animale e vegetale sia crudi che processati, scarti della macellazione e feci di animali in buono stato di salute, tra cui l'uomo (Fig. 5). Si stima che circa 1-6% della popolazione ospiti il patogeno nel tratto intestinale senza manifestazioni cliniche [42]. Inoltre, la sua presenza nell'industria alimentare è molto frequente e in alcuni casi endemica, in quanto il microrganismo è in grado di formare biofilm molto

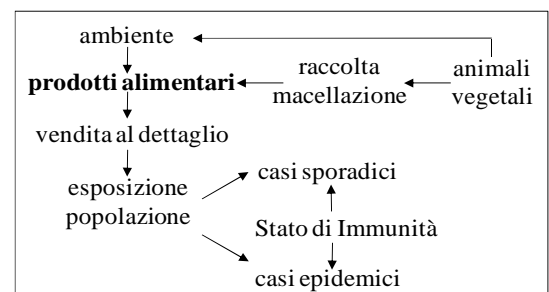


Figura 5 Diffusione di *L. monocytogenes*

difficili da eliminare [43]. Il naturale habitat di *L. monocytogenes* è rappresentato da materiale vegetale in decomposizione, in cui sopravvive fino a 10-12 anni da saprofito [3]. Gli animali da allevamento svolgono un ruolo chiave nel mantenimento del patogeno nell'ambiente, attraverso un continuo ciclo di trasmissione fecale-orale, in cui *L. monocytogenes* si comporta

da patogeno opportunisto causando infezione in soggetti debilitati o con deficit del sistema immunitario [41]. *L. innocua* è spesso isolata negli alimenti ed essendo molto simile a *L. monocytogenes* dal punto di vista fisiologico rappresenta un *organismo indicatore* del rischio di contaminazione da *Listeria* spp. nel prodotto finito o inadeguate condizioni igieniche [34].

1.4 Epidemiologia delle listeriosi

Le infezioni causate da *L. monocytogenes* sono relativamente rare se confrontate con altre zoonosi (0,35 casi all'anno ogni 100.000 abitanti nell'Unione Europea), ma caratterizzate da elevate morbilità e mortalità nella popolazione vulnerabile (donne in gravidanza, neonati, anziani, soggetti immunocompromessi) [44]. La listeriosi rappresenta anche la terza causa di meningite batterica dopo *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* [45]. Secondo dati EFSA (European Food Safety Authority) nella Comunità Europea si sono registrati 1645 casi nel 2009, con un incremento del 19% rispetto al 2008 [44]. Tuttavia, nel 2010 si è avuta una riduzione del 3,2% con 1601 casi [46]. La maggior parte delle notifiche ha riguardato Finlandia, Danimarca e Spagna. Gli anziani di età superiore ai 65 anni sono i più colpiti (1,2 notifiche per 100.000 abitanti) rappresentando il 60,2% di tutti i casi. Il tasso di mortalità è stato stimato del 17%. Circa il 40-70% dei casi di listeriosi non legati a stato di gravidanza si verificano in soggetti con AIDS, cancro, trapiantati, alcolisti o soggetti sottoposto a terapia corticosteroidica. In Inghilterra nel periodo 1999-2009 i malati di cancro hanno rappresentato circa un terzo dei casi di listeriosi. Dai dati del Ministero della Salute relativi alle malattie notificate in classe II, in Italia si sono verificati 118 casi di listeriosi nel 2008 e 109 nel 2009. L'infezione nell'uomo è prevalentemente sporadica con picchi stagionali a fine estate-inizio autunno. Secondo i dati del FoodNet, sistema di sorveglianza per le tossinfezioni alimentari statunitense nato nel 1996 e associato ai CDC (Centers for Disease Control), nel 2010 negli Stati Uniti si sono registrati 0,3 casi per 100.000 abitanti, che hanno coinvolto soprattutto persone di età ≥ 60 anni, con un tasso di ospedalizzazione del 90%. Sebbene sia meno frequente di altre infezioni a trasmissione alimentare come quelle da *Salmonella* e *Campylobacter*, il 30% di tutte le morti dovute a patogeni alimentari ogni anno in USA è causato da *L. monocytogenes* [47]. Secondo i dati RASFF del secondo trimestre 2008, *L. monocytogenes* è il secondo microrganismo (dopo *Salmonella*) più frequentemente causa di ritiro di alimenti dal mercato europeo a seguito di notifica nell'ambito del sistema di allerta rapido comunitario. Analogamente, l'USDA (United States Department of Agriculture) ha evidenziato che il 32,4% di tutti i ritiri negli Stati Uniti dal 2002 al 2006 è stato provocato dalla presenza di *L. monocytogenes*. Un recente studio sui casi registrati in Inghilterra negli anni 2001-2007 ha

evidenziato che l'incidenza della listeriosi è maggiore nei quartieri poveri rispetto a quelli ricchi, in contrasto con la maggior parte delle precedenti osservazioni che classificavano tale infezione a trasmissione alimentare come una 'malattia dell'opulenza' tipica dei Paesi industrializzati [48]. Le motivazioni risiedono nell'acquisto di cibi presso catene commerciali convenienti o collocati in quartieri degradati, all'aumento del consumo di prodotti refrigerati a lunga conservazione (spesso non adeguatamente conservati a livello domestico) e al profilo di rischio della popolazione stessa (cattivo stato di salute, condizioni croniche come cancro o diabete; fattori generalmente associati a condizioni socio-economiche svantaggiate). Nonostante le numerose azioni intraprese a livello globale per limitare l'incidenza delle listeriosi molte infezioni sub-cliniche non vengono segnalate e la listeriosi umana viene riconosciuta quasi esclusivamente nelle manifestazioni di setticemia, meningite, meningoencefalite e aborto, per cui il reale impatto dell'infezione resta ancora indefinito. Studi filogenetici e di tipizzazione molecolare hanno ormai accertato che i diversi ceppi di *L. monocytogenes* rappresentano una popolazione strutturata, composta da linee genetiche divergenti, che differiscono per ecologia e associazione ospite-patogeno (Fig. 6) [13]. Le Linee genetiche I e II includono ceppi implicati nella maggior parte (>95%) dei casi sporadici ed epidemici di listeriosi umana, mentre la lineage III comprende ceppi rari e riscontrati in casi di infezione negli animali [1; 13]. La virulenza varia significativamente tra i ceppi e molti isolati sono ipovirulenti o non patogeni per l'uomo [2; 49].

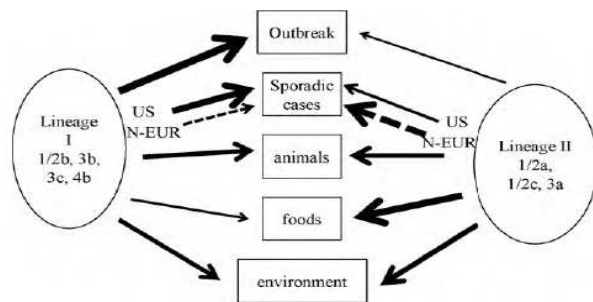


Figura 6 Distribuzione delle linee genetiche di *L.monocytogenes*

Legenda: lo spessore delle frecce indica il contributo dei ceppi di ciascuna Lineage in epidemie, casi sporadici (in Nord Europa e Stati Uniti) e isolamento da animali, ambiente e alimenti. Le lineage III e IV, contenenti solitamente ceppi animali, nonostante siano stati isolati in casi umani, non sono rappresentate in figura in quanto molto rare [13].

Si stima che il 98% di tutti i casi clinici siano dovuti a soli 3 dei 13 sierotipi esistenti, quali 1/2a (lineage II) e i sierotipi 1/2b e 4b (lineage I) [2; 13]. I ceppi della lineage II sono largamente diffusi sia nell'ambiente naturale che negli allevamenti e sono comunemente isolati da alimenti, da casi di listeriosi negli animali e casi sporadici di infezione umana [13]. Nella maggior parte delle epidemie di listeriosi sono implicati, invece, i ceppi della linea genetica I con il sierotipo 4b responsabile di circa il 40% dei casi sporadici ed epidemici in Europa e Nord America [50]. Tuttavia, uno studio retrospettivo condotto in Svezia ha evidenziato che dal 1986 al 2007 i casi associati al sierotipo 4b sono progressivamente diminuiti. Al contrario, 1/2a sta diventando predominante, in quanto dal 2000 al 2007 solo il 13% dei casi clinici è

stato riconducibile al sierotipo 4b e il 71% a 1/2a [51]. Il gruppo 1/2 (soprattutto 1/2a, 1/2b e 1/2c) è maggiormente associato all'isolamento da alimenti e ambienti di produzione [2; 52; 53]. Mediante diversi metodi molecolari, ceppi strettamente correlati e associati a distinti episodi epidemici di listeriosi geograficamente e temporaneamente lontani sono stati raggruppati nei cloni epidemici (EC) I, II, III e IV [54]. Mentre ECI, ECII e ECIV includono ceppi della lineage I di sierotipo 4b, ECIII include isolati 1/2a della lineage II [13]. Mediante MLST sono stati definiti 22 complessi clonali (CCs) di cui 7 CC comprendono il 73% di isolati associati a casi clinici verificatisi dopo il 1987, soprattutto in Francia. Di questi 7 CC, 5 appartenevano alla lineage I confermando che i sierotipi di tale raggruppamento sono responsabili della quasi totalità di casi epidemici e sporadici di listeriosi [55]. Molti isolati lineage II mostrano una virulenza attenuata per la presenza di prematuri codoni di stop nel gene *inlA* e mutazioni in *prfA* [13]. Le mutazioni non senso di *inlA* portano all'espressione di forme proteiche troncate con ridotta invasione e attenuata virulenza. In generale, una minore virulenza potrebbe derivare da mutazioni puntiformi in alcuni geni di virulenza; l'osservazione che i ceppi presentano le stesse sostituzioni, suggerisce che facciano parte di un comune modello evolutivo [56].

1.5 Alimenti a rischio e quadro normativo

Il 99% circa di casi sporadici ed epidemici di listeriosi è associato al consumo di alimenti contaminati [4]. Data la natura ubiquitaria, *L. monocytogenes* contamina sia alimenti di origine animale che vegetale qualora presentino caratteristiche tali da promuoverne la moltiplicazione, tra cui prolungata shelf-life o assenza di ulteriori trattamenti prima del consumo. *L.monocytogenes* resiste a diversi stress ambientali, tra cui basse temperature, elevate concentrazioni di cloruro di sodio, elevati tenori in grassi, bassi valori di attività dell'acqua, acidità e alcalinità; cresce sia in condizioni di microaerofilia che anaerobiosi e la presenza di nitrati di sodio non ne inibisce la replicazione. Quindi, il rischio di contaminazione degli alimenti è elevato. Il **Reg. CE 2073/2005** stabilisce i limiti microbiologici per gli alimenti distinguendo i *prodotti destinati al consumo umano diretto* (non è necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare/ridurre ad un livello accettabile i microrganismi presenti) da altre tipologie. La norma pone particolare attenzione al rischio associato a *L. monocytogenes*. Infatti, i prodotti che, pur essendo pronti al consumo, hanno caratteristiche che escludono un inquinamento da parte del batterio non sono oggetto della norma (es. conserve e prodotti che subiscono un secondo trattamento di pastorizzazione dopo confezionamento in pellicola di plastica sotto vuoto, poichè tali procedure inattivano i batteri eventualmente presenti e

impediscono la contaminazione successiva; frutta e ortaggi freschi non tagliati e non trasformati, perché è difficile che il patogeno riesca a penetrare all'interno dei loro tessuti; pane, biscotti e prodotti simili, zucchero, miele e dolci, compresi prodotti a base di cacao e cioccolato, per i bassi valori di A_w ; acqua, bibite, sidro, vino, bevande spiritose e prodotti analoghi in bottiglia o in contenitori chiusi, in quanto pastorizzazione/potabilizzazione e tenore in alcool inibiscono la crescita di cellule batteriche presenti; molluschi bivalvi vivi, in quanto non rientra nella tipica flora microbica di tali prodotti). Diversi livelli di tollerabilità sono stati stabiliti anche in base alla destinazione d'uso e ponendo attenzione agli *alimenti pronti destinati ai lattanti e a fini medici speciali*, per i quali vige l'assenza di *L. monocytogenes* in 25g (10 unità campionarie, u.c.). Ulteriore distinzione è stata fatta tra *alimenti che possono costituire substrato favorevole alla crescita di L. monocytogenes* (assenza in 125g in 5 u.c. di 25g) e *alimenti che per vari motivi non costituiscono terreno favorevole alla crescita del batterio* (tollerate 100 UFCg in 5 u.c. fino a fine vita commerciale del prodotto). Quest'ultimi sono caratterizzati da: $pH \leq 4,4$ - $A_w \leq 0,920$, $pH 5,0$ e $A_w 0,94$ contemporaneamente; shelf-life < 5 giorni. Si ammette, infatti, che in tale breve lasso di tempo e a temperatura di refrigerazione non riesca a superare 100 UFC/g. Negli USA, il Dipartimento per l'Agricoltura (USDA) applica la 'tolleranza zero' a tutti i cibi pronti al consumo fin dagli anni '80. *L. monocytogenes* può essere isolato da una vasta gamma di alimenti, quelli maggiormente coinvolti in casi epidemici di listeriosi sono i **ready-to-eat (RTE)**, prodotti vegetali e/o animali pronti al consumo, che generalmente sono confezionati e conservati a temperatura di refrigerazione [6; 57; 58]. Si stima che il 15% del salmone affumicato prodotto negli USA sia contaminato [6]. Dai dati della Global Industry Analyst (GIA) tale mercato supererà gli 81 miliardi di dollari entro il 2015 e già oggi circa il 40% degli Europei consuma almeno un pasto fuori casa costituito da alimenti pronti a cottura rapida (RTC Ready-to-Cook food) o che non prevedono/o prevedono un blando riscaldamento (RTE Ready-To-Eat food). Nel 2010 in Louisiana si sono avuti 14 casi dovuti al consumo di RTE a base di carne con due decessi e un evento epidemico ha coinvolto 9 Stati americani nel 2002 per il consumo di RTE a base di carne di tacchino [59; 60]. L'evento più eclatante in Italia, che ha coinvolto 1500 persone (292 ospedalizzazioni) si è avuto nel 1997 per il consumo di insalata di tonno e mais contaminata [61]. I **prodotti lattiero-caseari** sono ad alto rischio di contaminazione, in quanto il latte crudo può essere inquinato da diverse fonti ambientali (suolo, feci, ecc.) o prodotto da vacche mastitiche. Inoltre, la refrigerazione non blocca lo sviluppo del microrganismo. La corretta pastorizzazione elimina il patogeno, ma in alcuni prodotti può essere non efficace o non applicabile, in quanto altererebbe l'aroma (prodotti tipici). Tra 2006-2007 in Germania 187 persone sono state coinvolte in un episodio di listeriosi dovuto a formaggio prodotto con latte

pastorizzato [62]. Secondo alcuni studi circa il 10% dei formaggi è contaminato per inadeguato risanamento termico del latte usato o scarsa igiene nei locali di produzione/maturazione. Particolarmente coinvolti sono i formaggi a pasta molle o semi-dura, in cui l'Aw è superiore rispetto a quelli a pasta dura, gli erborinati (gorgonzola e taleggio) o a maturazione superficiale (camembert) per lo sviluppo di microflora disacidificanti in superficie [63]. Tra 2009-2010 si sono verificati 14 casi (5 fatali) di listeriosi in Austria e Germania associati a formaggio 'Quargel', i quali sono stati poi collegati ad altri 13 casi in Austria (2 fatali), 6 in Germania (1 fatale) e un caso nella Repubblica Ceca [64]. Anche i **prodotti carnei**, soprattutto fermentati, sono coinvolti in casi di listeriosi. La fonte di contaminazione è la cute delle carcasse da cui il patogeno diffonde ad attrezzature e locali contaminando le carni; il consumo di carni poco cotte o contaminate dopo la cottura rappresenta un serio rischio, in quanto il microrganismo può moltiplicarsi fino a livelli pericolosi. Si stima che il 15-70% degli hot-dogs sia contaminato e uno studio del 2003 su insaccati freschi e stagionati prelevati al dettaglio, dalla grande distribuzione, macellerie e salumerie del territorio Veneto ha evidenziato una prevalenza del 40,3% (salsicce e salami) e del 15,4% (stagionati pronti al consumo) rispettivamente, comunque al di sotto dei limiti di legge [65; 66]. Un importante evento epidemico associato a prodotti a base di carne si è verificato nel 2008 in Canada. Su 57 casi, 22 sono stati fatali e la compagnia responsabile ha dovuto risarcire la class-action delle vittime con 27 milioni di dollari [36]. Per quanto riguarda i **prodotti vegetali**, quelli che per morfologia hanno un maggior contatto con il suolo sono stati implicati in importanti epidemie di listeriosi. Quindi, in generale, per i vegetali freschi la contaminazione può verificarsi in pre-raccolta per il contatto con il suolo, mentre la causa più frequente di contaminazione in alimenti crudi di origine animale è la scarsa igiene nelle fasi di mungitura e macellazione. Tuttavia, la contaminazione può avvenire in ogni fase produttiva, nella vendita al dettaglio e in ambito domestico [67]. Secondo l'EFSA il 59,7% dei casi è riconducibile a cattive pratiche domestiche. *L. monocytogenes* riesce ad aderire e colonizzare superfici inerti presenti nell'industria alimentare, come vetro, metalli, gomma e plastica, ma anche nei frigoriferi e congelatori domestici, formando **biofilm** [52]. Sono stati identificati ceppi persistenti in industrie di lavorazione del pesce e affumicatori, così come in tre diversi stabilimenti di lavorazione veicolati dalle affettatrici; è stato osservato che il patogeno sopravvive anche su superfici di acciaio inox pulite e asciutte, in cui può rimanere vitale (anche 3 mesi) e causare successive contaminazioni [36]. L'eliminazione del biofilm è cruciale per la sicurezza alimentare, in quanto protegge il patogeno da sollecitazioni meccaniche e chimiche e permette la sopravvivenza in zone difficilmente raggiungibili dal sanificante. Inoltre, è stato osservato che ceppi definiti 'fortemente' aderenti a superfici inerti, presentano maggiore capacità di

adesione e invasione anche a livello cellulare rispetto a ceppi ‘debolmente’ aderenti [68]. L’eradicazione del biofilm è molto difficile e l’unico mezzo di prevenzione è il rispetto della buona prassi lavorativa e igienica nelle fasi di produzione. La quantificazione del rischio associato a *L. monocytogenes* è difficile, data la complessità del processo patogenetico e le innumerevoli fonti di contaminazione. La politica della ‘tolleranza zero’ adottata in USA e costata milioni di dollari per il richiamo dal mercato di alimenti contaminati non ha impedito il ripetersi di epidemie di listeriosi, dimostrando che l’eliminazione totale del patogeno dalla catena alimentare risulta estremamente difficile [50].

1.6 Controllo e prevenzione

La prevenzione della listeriosi passa attraverso interventi combinati a diversi livelli:

Livello istituzionale

Diverse istituzioni collaborano per la sorveglianza delle listeriosi. In Europa è stato istituito un sistema basato su un database condiviso contenente i profili genetici dei ceppi identificati nei diversi Paesi (PulseNet Europa). Esso è nato dalla collaborazione tra Centre national de la recherche scientifique e Istituto Pasteur. In Italia il DL n.191/2006 (sulla sorveglianza delle zoonosi) inserisce *L. monocytogenes* tra gli agenti zoonotici soggetti a sorveglianza. Il Reg.CE n.178/2002 (sistema di allerta comunitaria) impone la denuncia delle listeriosi, mentre il Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) notifica agli Stati Membri il rischio associato a taluni prodotti. Analogamente agli USA, in Europa è stata istituita nel 2005 un’agenzia indipendente, la European Centers for Disease Control and Prevention (ECDC), che pubblica la rivista Eurosurveillance riguardante l’epidemiologia, la sorveglianza, la prevenzione ed il controllo delle malattie infettive, tra cui le listeriosi. L’americana Food and Drug Administration per la sicurezza alimentare e nutrizione (FDA/CFSAN) con la Food Safety and Inspection Service (FSIS) e il Centers for Disease Control and Prevention (CDC), in base alle informazioni scientifiche disponibili, si occupa di valutare il rischio relativo al consumo di RTE foods. Negli anni scorsi alcune associazioni di categoria hanno inoltrato una petizione per portare il limite a 100 CFU/g nei prodotti che non supportano lo sviluppo del patogeno, ma ad oggi negli USA vige la politica della ‘tolleranza zero’ per i ready-to-eat foods [69].

Produzione primaria

Data la natura del microrganismo è fondamentale prevenire la contaminazione mediante l’applicazione di adeguate e corrette pratiche agricole e zootecniche, tra cui:

- garantire la pulizia e la salubrità dell’acqua somministrata negli allevamenti
- utilizzare solo mangimi o insilati di buona qualità

- utilizzare fertilizzanti organici non contaminati
- monitorare lo stato di salute degli animali per individuare prontamente animali con manifestazioni cliniche di listeriosi o vacche con mastite causata da *L. monocytogenes*
- effettuare adeguatamente le operazioni di macellazione e di eviscerazione

Naturalmente, l'applicazione delle regole di corretta prassi igienica nelle aziende agricole sono altrettanto importanti per garantire prodotti e materie prime di origine animale e vegetale di buona qualità igienico-sanitaria.

Industria alimentare e distribuzione

L'applicazione del sistema obbligatorio di autocontrollo HACCP rappresenta uno strumento operativo per l'analisi dei rischi associati alla produzione degli alimenti al fine di garantirne la salubrità e la sicurezza degli stessi. Esso si applica a tutta la filiera fino al consumatore finale e si basa sulla prevenzione del rischio piuttosto che sul controllo del prodotto finito. Il sistema HACCP è stato introdotto nell'UE con la Direttiva 93/43/CEE e recepito in Italia con il D.Lgs 155/97. Il 'pacchetto igiene' (Reg. CE 852, 853, 854, 882/2004 e Dir 2002/99) approfondisce le tematiche della sicurezza alimentare e le modalità di applicazione del sistema. L'utilizzo di materie prime sicure, il controllo dei CCP di processo (monitoraggio dei parametri tecnologici previsti nello schema di produzione, ad esempio nella pastorizzazione, sterilizzazione, trattamento termico post-confezionamento, catena del freddo, abbattimento termico, ecc.) e la formazione/informazione degli operatori del settore alimentare, rappresentano la strategia d'elezione per ridurre il rischio. Particolare attenzione va rivolta ai piani di pulizia e sanificazione, in quanto *L. monocytogenes* è in grado di formare biofilm, che rendono difficile o impossibile l'eradicazione del patogeno dagli ambienti di produzione [70; 71].

Tra le raccomandazioni per gli operatori del settore:

- evitare di usare concentrazioni inferiori a quelle corrette. Infatti, le cellule appena adese, se esposte alla concentrazione raccomandata di disinfettante sono facilmente uccise. Inoltre, i batteri possono adattarsi a basse concentrazioni di disinfettante e sviluppare resistenza
- la frequenza degli interventi deve essere tale da non permettere alle cellule batteriche eventualmente presenti di crescere in maniera significativa tra due interventi consecutivi
- ridurre al minimo o evitare l'uso di acqua nelle aree in cui i prodotti sono esposti a contaminazione e asciugare le superfici prima del successivo turno lavorativo
- eliminare materiale organico (detersione) prima della disinfezione
- trattare prima i pavimenti e poi le attrezzature

Livello domestico

Nonostante tutti gli alimenti siano a rischio, cottura e pastorizzazione sono in grado di eliminare il microrganismo. Si deduce che l'inadeguata conservazione domestica e la cross-contamination rappresentano le principali fonti di contaminazione [4]. Secondo dati EFSA, la temperatura è un fattore cruciale per il controllo della crescita di *L. monocytogenes* negli

alimenti pronti durante la loro vita commerciale [44]. Dal monitoraggio condotto in Europa tra 1996 e 2006 sulle temperature adottate in produzione e distribuzione, nella quasi totalità dei casi sono risultate sotto controllo (media 3,7-5,6°C) [72]. Tuttavia, tali cibi buona parte della loro shelf-life nei frigoriferi domestici, che sono meno controllati (media 5-7,2°C e nel 20-35% dei casi >8°C) [44]. Per prevenire l'infezione è importante controllare la crescita del batterio fino all'utilizzo finale. Infatti, il patogeno potrebbe essere presente nell'alimento in quantità inferiori ai limiti di legge e sviluppare successivamente [72]. La FDA e i CDC negli Stati Uniti e l'ISS in Italia forniscono indicazioni per prevenire le listeriosi a livello domestico:

- cottura completa e corretta dei cibi di origine animale e lavaggio accurato delle verdure prima del consumo
- separazione delle carni crude dalle verdure e dai cibi cotti e pronti al consumo
- uso di prodotti lattiero-caseari pastorizzati
- lavaggio accurato di utensili e mani dopo aver maneggiato cibi crudi e pulizia dei frigoriferi consumare i cibi deperibili in tempi brevi
- conservazione dei cibi pronti a 4 °C o a temperature inferiori
- scongelare gli alimenti in frigorifero, in acqua fredda o nel forno a microonde

Istruzioni per individui a rischio (donne in gravidanza e soggetti immunocompromessi):

- evitare panini a base di prodotti carnei senza preriscaldamento ad alte temperature
- evitare la contaminazione crociata tra cibi in preparazione con cibi crudi
- evitare formaggi molli, non pastorizzati o erborinati, paté di carne, pesce crudo, pesce affumicato, a meno che non sia inscatolato, hot-dogs, insalate pronte

L'informazione e la formazione dei consumatori sui rischi associati a *L. monocytogenes* e il rispetto delle buone pratiche di produzione e igiene lungo tutta la filiera alimentare sono fattori determinanti per ridurre l'incidenza delle listeriosi.

1.7 Patogenesi dell'infezione

Il tratto gastro-intestinale rappresenta il sito primario di entrata di *L. monocytogenes* nell'ospite. Poiché l'epitelio intestinale è protetto da uno strato di muco, molti batteri producono mucinasi per aderirvi; *L. monocytogenes*, invece, utilizza proteine di superficie che possono legarsi ad uno specifico tipo di mucina umana. In particolare, le internaline InlB, InlC e InlJ sono in grado di interagire con l'isoforma umana Muc2 e tale capacità è determinante per le successive fasi di adesione e invasione dell'epitelio sottostante. Ulteriore aspetto che differenzia *L. monocytogenes* da altri patogeni intestinali è l'utilizzo dei flagelli per il movimento e non per l'adesione [73]. I due principali meccanismi sfruttati da *L. monocytogenes* per attraversare la mucosa intestinale sono:

- invasione diretta degli enterociti dell'epitelio di assorbimento dei microvilli. Tale processo si verifica nell'ospite umano (e porcellini d'india) che esprime isoforme suscettibili ai recettori molecolari necessari per il riconoscimento da parte delle proteine di invasione

- translocazione mediata dalle cellule M delle placche di Peyer. Infatti, esse sono dotate di capacità pinocitotica, captano gli antigeni del lume intestinale, li trasportano intatti ai linfociti intraepiteliali e presentano l'antigene alle

cellule presentatrici (macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B) localizzate nello spazio sub-epiteliale o nella lamina propria.

Tale meccanismo di traslocazione, meno efficace del precedente, non si verifica nell'ospite con isoforme suscettibili dei

recettori molecolari, ma è aspecifico e si osserva anche in specie non patogene quali

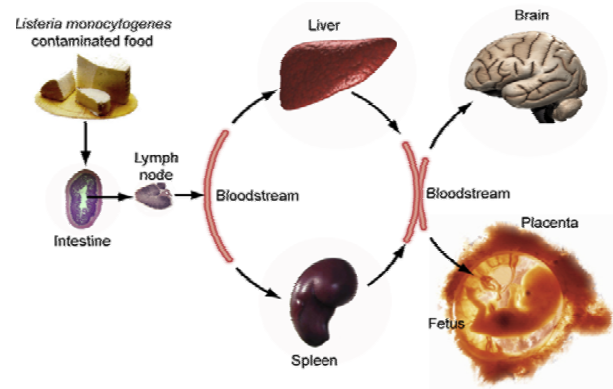


Figura 7 Ciclo patogenetico di *L. monocytogenes*

L. innocua [73]. Superata la barriera intestinale il patogeno si localizza tra i fagociti professionali (neutrofili, eosinofili e monociti/macrofagi) e nei follicoli linfatici dove si moltiplica. Quindi raggiunge i linfonodi mesenterici veicolato dai macrofagi e, per via linfoematogena, raggiunge fegato e milza, principali organi bersaglio [73; 41]. Inoltre, sempre dentro fagociti infetti nel circolo ematico e linfatico può raggiungere cervello, polmoni e placenta. L'infezione può essere trasmessa dalla madre al feto superando la barriera placentare oppure da madre a neonato attraverso la mucosa vaginale (Fig. 7). Poiché il patogeno si ritrova frequentemente negli alimenti nonostante una bassa incidenza della listeriosi in soggetti senza fattori predisponenti, si ritiene che infezioni sub-cliniche si manifestino regolarmente contribuendo alla naturale immunità anti-*Listeria*. In soggetti immunodepressi, invece, l'infezione può avanzare verso forme di setticemia o infezioni localizzate nel cervello o nell'unità feto-placentale. L'alta patogenicità è legata alla capacità di superare tre barriere: la mucosa intestinale, la barriera endoteliale emato-cerebrale a livello dei micro capillari del cervello e la materno-fetale. Inoltre, è in grado di infettare diversi tipi di cellule (macrofagi, fagociti non professionali e cellule non fagocitarie come epatociti, fibroblasti, cellule endoteliali e del tessuto nervoso) in diversi tessuti e di sopravvivere alla fagocitosi dei macrofagi (da cui il nome '*monocytogenes* [74; 75]. Tali caratteristiche di *L. monocytogenes*, unite alla capacità di proliferare in diversi serbatoi ambientali e di adattarsi a molteplici condizioni sfavorevoli fanno di questo microrganismo opportunisto un paradigma per lo studio delle interazioni ospite-patogeno, dei meccanismi patofisiologici, della regolazione genica e dell'adattamento ai fattori di stress ambientale [9; 41].

1.7.1 Listeriosi nell'uomo

La principale via di infezione di *L. monocytogenes* è di tipo oro-fecale, infatti, nel 99% circa dei casi il patogeno entra nell'ospite attraverso l'ingestione di alimenti contaminati [4]. Meno frequente è la trasmissione diretta attraverso la cute, caratterizzata da rash cutanei di piogranulomatosi su mani e braccia riscontrabili in allevatori e veterinari esposti alle secrezioni genitali o a feti in casi di aborto spontaneo nei ruminanti. Nella cosiddetta listeriosi dei ruminanti *L. monocytogenes* è veicolato da insilati contaminati e accede al romboencefalo attraverso i nervi craniali, passando da una cellula all'altra, dopo invasione dei nervi terminali di bocca, nasofaringe o occhi. In casi molto rari l'uomo può acquisire l'infezione direttamente da animali infetti o materiali da essi derivati, ma anche per trasmissione da uomo a uomo. La trasmissione verticale madre-figlio si verifica per via trans-placentale in utero o durante il parto anche se l'infezione nella madre è essenzialmente acquisita attraverso alimenti contaminati. Sono riportati casi di trasmissione in soggetti ospedalizzati a causa di materiale contaminato o tramite gli operatori sanitari [2]. Nel personale ostetrico (ma anche medici e veterinari) la listeriosi può costituire una 'malattia professionale', in quanto il liquido amniotico e il canale del parto possono presentare cariche elevatissime del batterio. L'infezione causata da *L. monocytogenes* può dare origine a due differenti forme cliniche. Nei soggetti senza fattori predisponenti si osserva una **forma non invasiva**, che si manifesta come gastroenterite accompagnata da febbre, nausea, vomito e diarrea. Molto spesso l'infezione nell'adulto sano è asintomatica o caratterizzata da sintomi simil-influenzali e l'infezione è autolimitante [2; 40;]. Il periodo di incubazione, dall'ingestione di alimenti contaminati all'inizio della listeriosi, è molto variabile e va da 1 giorno a 3 mesi [40]. La **forma invasiva** o sistemica si manifesta nella popolazione a rischio, come donne in stato di gravidanza, soggetti immunocompromessi e anziani. *L. monocytogenes* è in grado di adattarsi all'ambiente gastrointestinale avendo sviluppato diverse strategie per contrastare i cambiamenti di acidità, osmolarità, tensione di ossigeno, o gli effetti antimicrobici di peptidi e bile [73]. Superata la barriera intestinale, con la disseminazione dei linfociti ematogeni dai linfonodi mesenterici, raggiunge gli organi bersaglio fegato e milza. La maggior parte della carica batterica (90%) si localizza nel parenchima del fegato, che rappresenta il principale sito di moltiplicazione, mentre il resto dell'inoculo si localizza nella milza. La diffusione da cellula a cellula produce caratteristiche lesioni piogranulomatose. L'infezione degli organi target primari è efficacemente contenuta in un ospite immunocompetente, grazie alla risposta immunitaria cellulo-mediata, mentre in soggetti con sistema immunitario debilitato il microrganismo può raggiungere altri organi bersaglio tra cui cervello e placenta mediante la circolazione sanguigna avanzando verso la listeriosi sistemica

nelle forme di setticemia (granulomatosi settica e forma tifico-pneumonica), infezione localizzata nel cervello (forma meningoencefalica) o nell'unità feto-placentale (granulomatosi infantisettica o listeriosi neonatale). Una prolungata fase iniziale silente è dovuta al lungo periodo di incubazione della listeriosi invasiva, dai 20 ai 30 giorni fino a 3 mesi dal consumo di alimenti contaminati. Il patogeno solitamente si moltiplica all'interno di cellule fagocitarie e non, ma è possibile anche la moltiplicazione extra-cellulare, ad esempio nel lumen della cistifellea, dove la risposta immunitaria dell'ospite è relativamente inefficace. Tale organo rappresenta una riserva per la re-infezione del tratto intestinale in quanto da tale sede, durante le contrazioni della cistifellea in risposta all'alimentazione o a colecistochinina durante la normale funzione fisiologica, può raggiungere intestino e dotto biliare [73]. L'infezione sistemica è influenzata dall'immunità cellulo-mediata dell'ospite, che può portare all'eliminazione o meno del microrganismo. Tuttavia, analogamente a quanto avviene nei soggetti con deficit immunitario, in gravidanza le capacità della madre di avere un'efficace risposta cellulo-mediata contro microrganismi patogeni intracellulari è deficiente per la ridotta produzione di INF- α e di IL-12 e TNF- α in presenza di elevati tassi di estradiolo. L'infezione intrauterina può essere acquisita durante tutte le fasi della gravidanza, ma generalmente si verifica tra la 16^a e la 35^a settimana di gestazione, quando l'immunità cellulare è più compromessa [76]. Spesso il sintomo più comune nella madre è una lieve sindrome simil-influenzale con febbre, cefalea, dolori muscolari, sintomi gastrointestinali, ma le conseguenze possono essere molto serie. L'infezione intrauterina può portare infatti a parto prematuro, aborto, infezione neonatale, morte neonatale. La **listeriosi neonatale ad inizio precoce** è dovuta all'infezione in utero del neonato e si presenta entro la 1^a settimana dalla nascita, spesso entro le prime 24-48 ore, sotto forma di sepsi, problemi respiratori, congiuntivite purulenta e lesioni cutanee o, più raramente, come granulomatosi infantisettica, una sindrome caratterizzata da ascessi disseminati o granulomi a carico degli organi interni (fegato, milza, polmoni, reni, cervello). La listeriosi neonatale può verificarsi dopo una o più settimane dalla nascita (**inizio tardivo**) sotto forma di meningite, dovuta alla trasmissione durante l'attraversamento del canale del parto, anche se sono stati descritti casi di listeriosi neonatale ad inizio tardivo in neonati con parto cesareo, attribuibili a trasmissione orizzontale da parte del personale ospedaliero [41]. Il tasso di mortalità in entrambi i tipi di listeriosi neonatale è molto elevato (15-50% inizio precoce e 10-20% inizio tardivo) e può portare a idrocefalo o ritardi motori nei neonati sopravvissuti [77; 78]. Le manifestazioni cliniche della **listeriosi invasiva non legata allo stato di gravidanza**, sono essenzialmente a carico del sistema nervoso centrale e includono meningite, encefalite, meningoencefalite e setticemia, oppure forme di listeriosi viscerale, con sintomi settici e con compromissione del fegato, della milza e

dei polmoni, nei quali si formano caratteristici granulomi miliari [76]. In casi più rari, *L. monocytogenes* può anche produrre una vasta gamma di **infezioni localizzate**; sono stati infatti riportati casi di congiuntivite, infezioni cutanee, linfadenite, ascessi epatici o cerebrali, colecistite, peritonite, ascesso splenico, pleurite, infezione comune, osteomielite, pericardite, miocardite, arterite, fascite necrotizzante e endoftalmite [76]. Circa un terzo dei casi di listeriosi sistemica è a carico di pazienti immunodepressi. In soggetti sottoposti a trapianto, con neoplasie maligne, AIDS, epatite cronica, diabete, lupus o sottoposti a trattamenti chemioterapici o terapie con steroidi i tassi di mortalità sono tra i più elevati [40]. In generale, il tasso di ospedalizzazione legato ai casi di listeriosi invasiva è del 90% con una mortalità del 20-40%, anche in caso di corretta terapia e, soprattutto nei soggetti in cui l'infezione ha coinvolto il SNC, le sequele possono essere gravi e a lungo termine [79; 80]. Circa 33% dei casi clinici riguarda donne in gravidanza, che rappresentano circa il 60% di tutti i casi (uomini e donne) di infezione in soggetti tra 10-40 anni [81]. Anche gli adulti sopra i 65 anni, sono a rischio, data la normale condizione di declino del sistema immunitario, il frequente l'uso di farmaci (es. antiacido) e lo stile di vita (alimentazione poco variata e ridotta attività fisica), che può portare ad un indebolimento delle difese immunitarie. La **minima dose infettiva** non è ben definita, ma in base a studi su modelli animali, risulta essere piuttosto elevata e può arrivare anche oltre 10^6 UFC/g. La probabilità di sviluppare la listeriosi è strettamente connessa ai fattori di rischio dell'ospite, alla patogenicità e alla virulenza dei ceppi coinvolti nell'infezione [82]. Nei soggetti predisposti, una carica microbica anche relativamente bassa può portare alla sindrome sistemica, mentre la stessa carica infettante potrebbe essere ben tollerata da un individuo immunocompetente. Livelli di contaminazione inferiori a 10^2 UFC/g, riscontrabili e ammessi dalla norma in alcune tipologie di alimenti alla vendita, non sono considerati a rischio per l'uomo, tranne che per i soggetti suscettibili. L'ingestione di un elevato numero di microrganismi ($>10^6$ - 10^{11}) può causare gastroenteriti febbrili entro le 24 ore, per la massiva invasione della mucosa intestinale e, anche in soggetti sani, alte dosi di inoculo batterico ad elevata patogenicità/virulenza, possono portare a listeriosi invasiva.

1.7.2 Listeriosi negli animali

L'infezione da *L. monocytogenes* può coinvolgere diverse specie animali, sia a sangue caldo che a sangue freddo, tra cui mammiferi domestici e selvatici, uccelli, rettili, insetti, pesci, crostacei. Tra gli animali da reddito i più colpiti sono pecore e bovini, seguiti da capre, suini e avicoli ed equini. Un numero ridotto di casi in bovini e pecore è sostenuto da *L. ivanovii*, con episodi di meningoencefalite e/o aborto. Negli animali da allevamento la principale fonte di

contaminazione è rappresentata dai foraggi insilati, a causa di insufficiente acidificazione (pH>5) e spesso l'infezione è asintomatica. Questo contribuisce alla diffusione del patogeno nell'ambiente, in quanto le deiezioni possono inquinare le acque di scorrimento superficiale utilizzate per l'irrigazione dei campi o possono essere utilizzate per la concimazione, inquinando foraggi e vegetali destinati al consumo umano. Circa il 20-30% del bestiame sano presenta *L. monocytogenes* nelle feci, in particolare ceppi comunemente legati alle epidemie di listeriosi umana [4]. Analogamente a quanto si verifica nell'uomo, anche nell'animale i quadri clinici sono differenti e l'infezione può essere letale. La forma setticemica è caratterizzata da febbre, anoressia, tremori muscolari, focolai necrotici nel fegato e in altri organi addominali, soprattutto negli animali più giovani. La forma neurologica si verifica soprattutto nei ruminanti adulti con meningo-encefalite, febbre, depressione, postura anomala della testa, movimenti di maneggio (circling disease), perdita di equilibrio, disfagia, decubito e morte [68; 83]. Aborti e morti perinatali sono comuni in bovini e ovini e tali infezioni si sviluppano prevalentemente nel tardo inverno o inizio primavera e soprattutto nell'ultimo trimestre di gravidanza, talora in assenza di altri segni clinici [40]. In altri casi si manifesta sotto forma di lesioni cutanee o varie infezioni localizzate quali congiuntivite, uretrite, endocardite. *L. monocytogenes* è anche causa frequente di mastiti, aborti, infertilità, encefalite e setticemia nei bovini [84]. Nell'ambito del Regolamento di Polizia Veterinaria (DPR n. 320/1954), pur non rientrando tra le malattie a carattere infettivo e diffusivo soggette a denuncia all'autorità Sanitaria, la listeriosi deve essere comunque denunciata presso il Centro di Referenza Nazionale delle Encefalopatie degli Animali (CEA) secondo il Decreto del Ministero della Sanità del 29 gennaio 1997 ('Misure integrative per la sorveglianza permanente delle encefalopatie spongiformi degli animali'). La sorveglianza delle listeriosi negli animali è fondamentale. Un'epidemia in bovini da latte con elevata mortalità e morte acuta dopo l'insorgenza dei sintomi è stata attribuita ad un ceppo non comune di sierotipo 4b appartenente alla linea genetica III. L'alta prevalenza di *Listeria* spp., negli allevamenti animali potrebbe favorire l'evoluzione di nuovi ceppi più virulenti [85]. Di conseguenza, il monitoraggio continuo è utile non solo per migliorare la salute animale, ma anche per scoprire precocemente ceppi emergenti di *L. monocytogenes*.

1.7.3 Risposta immunitaria dell'ospite

Dopo l'ingestione di alimenti contaminati, *L. monocytogenes* invade la mucosa gastrointestinale e, attraverso il flusso sanguigno, raggiunge fegato, milza e talora il sistema nervoso centrale. Il patogeno è in grado di infettare sia fagociti (monociti, neutrofili e macrofagi), sfruttando passivamente la loro capacità di fagocitosi, che cellule non fagocitiche

mediante proteine di invasione. Successivamente, si libera nel citoplasma in cui moltiplica rapidamente per poi invadere le cellule vicine. Tale strategia, tipica dei patogeni intracellulari, evita il contatto diretto con il sistema del complemento e rende inefficace la risposta umorale. Di conseguenza, in un ospite immunocompetente, la **risposta innata** (aspecifica, non adattativa) è fondamentale, soprattutto nelle prime fasi dell'infezione [34]. Essa è attivata da recettori (PRR) che riconoscono strutture molecolari specifiche del patogeno (PAMP). L'infezione dei macrofagi stimola la secrezione di citochine, tra cui le interleuchine (IL)-1, IL-6, IL-12 e IL-18, e chemochine (MCP-1), che attivano e richiamano i neutrofili polimorfonucleati. Essi rappresentano i neutrofili più abbondanti tra le cellule bianche del sangue e, in risposta all'infezione, lasciano il flusso sanguigno per migrare verso il sito di infiammazione; la chemotassi dei neutrofili è provocata da IL-8. Sono, inoltre, coinvolti i macrofagi, che si differenziano nei tessuti dai monociti presenti nel sangue. Essi sono attratti nei loci di infezione da chemochine e sono in grado di eliminare i patogeni mediante fagocitosi. Sono attivati soprattutto da $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ prodotti principalmente da linfociti T e cellule natural killer (NK). Contemporaneamente, i macrofagi stimolano la risposta di altre cellule immunitarie, in quanto dopo l'infezione secernono TNF , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 e MCP-1. Nella risposta innata, un ruolo determinante è svolto dalle cellule NK (Fig. 8). Tali linfociti citotossici rilasciano perforine e granzimi che inducono apoptosi delle cellule bersaglio.

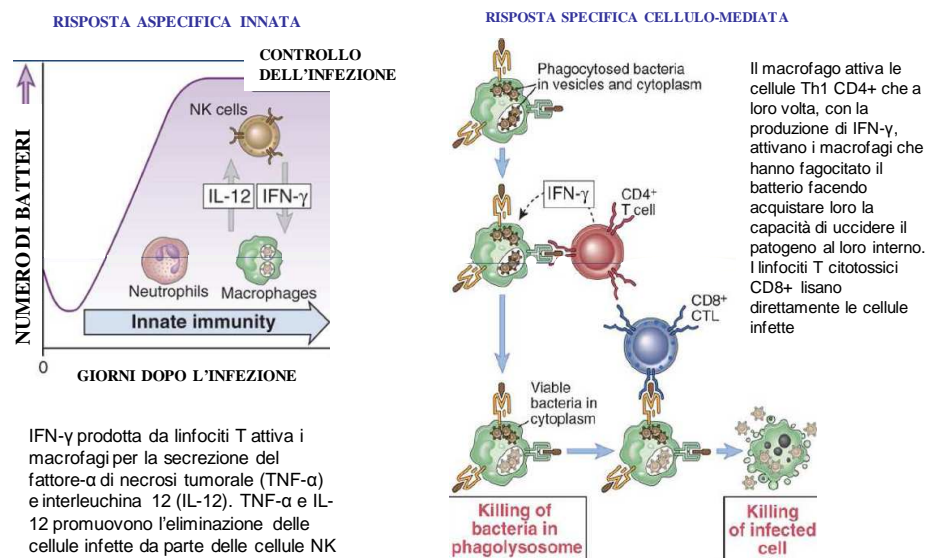


Figura 8 Risposta innata (a sinistra) e cellulo-mediata (a destra) del Sistema Immunitario dell'ospite contro i patogeni intracellulari

Esse inoltre secernono $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ a seguito di stimolazione da parte di IL-12 e IL-18 prodotti dai macrofagi attivati e dalle cellule T. Le citochine secrete ($IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$) da NK a loro volta aumentano l'attività dei macrofagi. La risposta innata, pur essendo determinante, non è sufficiente per controllare l'infezione. Infatti, circa il 90% dei batteri presenti negli epatociti è ucciso nelle prime 24 ore dai neutrofili; la restante parte internalizza e può replicare; oppure *L.*

monocytogenes sopravvive all'interno di una parte dei macrofagi. Nelle fasi successive, quindi, la risposta del sistema immunitario dell'ospite è di tipo **cellulo-mediata** (specifico, adattativa). Essa è cruciale per la completa eliminazione di *L. monocytogenes* e per l'acquisizione di resistenza. In particolare, l'iniziale produzione di IL-12 da parte dei macrofagi e di IFN- γ da parte delle cellule NK, spinge i linfociti T CD4⁺ (linfociti T helper, T_H) a differenziarsi in linfociti T_{H1} (da precursori T_{H0}), che a loro volta producono IFN- γ e attivano l'immunità cellulare. A tale attivazione delle cellule T CD4⁺, segue l'espansione di linfociti T citotossici CD8⁺, in grado di portare a morte per apoptosi le cellule infette. Inoltre, componenti batteriche (LLO) rilasciate nel citoplasma della cellula ospite vengono processate e complessate con molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità ed esposte sulla superficie cellulare delle cellule dendritiche. Ciò consente ai linfociti T CD8⁺ di riconoscere e lisare le cellule infette e, allo stesso tempo di attivare altre cellule T CD4⁺, che stimolano la produzione di IFN- γ e IL-2. La risposta delle cellule T raggiunge il picco entro 4–5 giorni dall'infezione e una volta eliminati gli antigeni batterici, le cellule T CD8⁺ vanno incontro ad apoptosi. Tuttavia, una parte di esse si differenzia in linfociti T CD8⁺ di memoria che persistono per un lungo periodo di tempo [86; 87]. Quindi, mentre la risposta innata è importante nelle fasi iniziali dell'infezione, la risposta specifica mediata dalle cellule T (immunità cellulo-mediata) è determinante per la clearance del patogeno e rappresenta la difesa principale dell'ospite, riuscendo ad eliminare anche le cellule che evadono da neutrofili e macrofagi [72]. *L. monocytogenes* è un modello di riferimento in studi di immunologia, utilizzato per comprendere il funzionamento del sistema immunitario o per sviluppare vaccini attenuati o ricombinanti, anche di tipo antitumorale [9; 41; 88].

1.8 Ciclo replicativo intracellulare

Attraverso le cellule M o le cellule epiteliali *L. monocytogenes* internalizza nella cellula ospite mediante la formazione di vacuoli endolitici primari (Fig. 9). Superata la barriera epiteliale è in grado di indurre disseminazione sistemica, soprattutto invadendo i monociti circolanti, i leucociti polimorfonucleati (PMN) e le cellule dendritiche. Mentre l'internalizzazione nei macrofagi avviene spontaneamente, l'ingresso nelle cellule non fagocitarie dell'ospite è promossa da due proteine di superficie, le internaline A e B, che attraverso il dominio LRR (leucine-rich repeat) interagiscono con specifici recettori di superficie della cellula. In particolare, *L. monocytogenes* mostra un marcato tropismo per le cellule ospiti, dovuto alla specificità di InlA per l'E-caderina umana e di InlB con tre ligandi cellulari tra cui Met, una tirosin-chinasi recettoriale trans membrana il cui ligando naturale è il fattore di crescita

epatocitario [89]. L'invasione della cellula ospite avviene quindi attraverso un meccanismo noto come 'zipper', in cui i ligandi presenti sulla superficie batterica (internaline A e B) interagiscono con recettori sulla cellula ospite (E-caderina e Met) inducendo un riarrangiamento dell'actina del citoscheletro e l'endocitosi del batterio, con formazione di un vacuolo fagocitico primario.

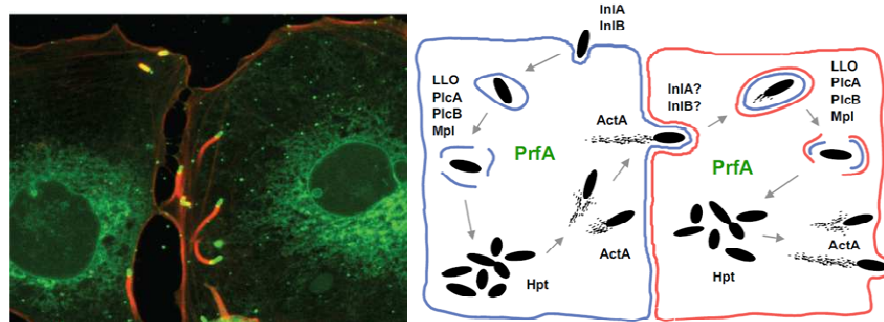


Figura 9 Ciclo intracellulare di *L. monocytogenes* e diffusione da una cellula all'altra

Entrambe le interazioni InlA-E-caderina e InlB-Met sono responsabili di un processo di ubiquitinazione dei recettori della cellula ospite a cui segue un richiamo di clatrina, proteina che gioca un ruolo fondamentale nell'endocitosi [90]. La membrana del vacuolo fagocitico contenente il patogeno viene lisa attraverso azione simultanea di fattori di danno di membrana, quali pore-forming toxin listeriolysin O (LLO), codificata dal gene *hly*, e due fosfolipasi di tipo C, codificate dai geni *plcA* e *plcB* (quest'ultimo richiede la metalloprotease Mpl per la sua attivazione), quindi evita l'esposizione ai composti litici liberandosi nel citoplasma, in cui si moltiplica rapidamente sfruttando carboidrati esoso-fosfati della cellula, mediante carrier di trasporto [31]. La tossina LLO (attiva nell'intervallo di pH 4,5-6,5) si attiva con le condizioni di acidità del fagosoma e, una volta avvenuta la rottura di quest'ultimo, viene inattivata dal pH neutro del citoplasma [41]. Una volta libero nel citoplasma, il patogeno induce l'espressione della proteina ActA, responsabile della motilità intracellulare. Il batterio si riveste di filamenti di actina contrattile a uno dei due poli assumendo l'aspetto di una cometa e acquisendo capacità di propulsione. Quando il batterio raggiunge la periferia della cellula, protrude con strutture simili a pseudopodi chiamate 'listeriopodi' e invade la cellula vicina. Infatti, estroflette la membrana della cellula ospite e inflette quella della cellula adiacente, penetrandovi e dando luogo ad un vacuolo secondario a doppia membrana. Tale processo è aiutato da InlC, che rilassa le tensioni giunturali attraverso l'interazione con TUBA, un regolatore del complesso del nodo stretto. La fagocitosi di tali strutture da parte delle cellule adiacenti provoca la formazione di un vacuolo a doppia membrana, da cui sfugge mediante LLO e fosfolipasi, in questo caso codificata da *plcB*, iniziando un nuovo ciclo di proliferazione [66; 41]. L'abilità del patogeno consiste nel disseminarsi passando da una cellula all'altra

identificato il gene *iap* (invasion associated protein), codificante proteine associate all'invasione e cruciale nel mantenimento del fenotipo invasivo in fibroblasti, epatociti e macrofagi nel modello murino. Inoltre, IAP caratterizzato da un elevato peso molecolare (60 kDa) e noto anche come P60, è determinante per la corretta divisione cellulare data la sua attività di mureina idrolasi [35]. In *L. ivanovii* è stata individuata una seconda isola di patogenicità di 22 Kb (LIPI-2), composta da geni codificanti diverse internaline, e dal gene *smcL*, che codifica la sfingomielinasi, responsabile di una forte emolisi bizonale su agar sangue e della distruzione dei fagosomi. Tale cluster di virulenza è determinante nel tropismo patogenetico verso i ruminanti, in cui *L. innocua* causa setticemia e aborto. Rispetto alle specie patogene, le non patogene hanno perso LIPI-1 (*L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi*) o posseggono un cluster ridotto (*L. innocua*, *L. welshimeri*) [54]. Tuttavia, sono stati riportati ceppi atipici caratterizzati dalla presenza/assenza di uno specifico pattern di geni di virulenza. Ad esempio, mentre *L. innocua*, non patogena per l'uomo, è tipicamente non emolitica e manca di LIPI-1, un numero ristretto di ceppi è emolitico e presenta sia tale cluster che *inlA*. Inoltre, sono stati riportati ceppi non emolitici di *L. seeligeri* privi del cluster LIPI-1, anche se in molti ceppi della specie è presente, nonostante tipicamente avirulenti [26]. Tali ceppi atipici, sebbene complichino l'identificazione tassonomica, potrebbero contribuire a comprendere l'evoluzione dei determinanti di virulenza alla base della filogenesi del genere *Listeria*.

1.8.2 Internaline

Dal sequenziamento dell'intero genoma completo di *L. monocytogenes* EGD-e, sono stati individuati 25 geni codificati proteine della famiglia delle **internaline** [91]. Tali proteine di superficie sono caratterizzate da LLR (leucine rich repeats), la cui caratteristica principale è la presenza di un dominio (parte funzionale della proteina) N-terminale con ripetizioni successive di 22 amminoacidi e un segnale peptidico, che conferisce al microrganismo la capacità di portarsi sulla superficie della cellula ospite e interagire con il proprio recettore [92]. Mentre un considerevole numero di geni codificanti le internaline è stato riportato in ceppi patogeni e non patogeni del genere *Listeria*, un diretto coinvolgimento nella virulenza è stato assegnato solo ad un gruppo ristretto di esse, tra cui InlA e InlB (indispensabili per l'invasione di diversi tipi di cellule, tra cui quelle dell'epitelio intestinale dell'uomo) e InlC [26]. Le internaline si dividono in tre classi distinte (Fig. 11) [75]. Il primo gruppo, che include InlA, comprende le internaline di elevato peso molecolare e associate alla parete cellulare per la presenza del motivo strutturale LPTXG nella regione C-terminale. La seconda classe,

rappresentata dalla sola InlB, non presenta la parte LPTXG, ma la regione C-terminale con moduli ripetuti GW, che intervengono nell'aggancio alla parete cellulare.

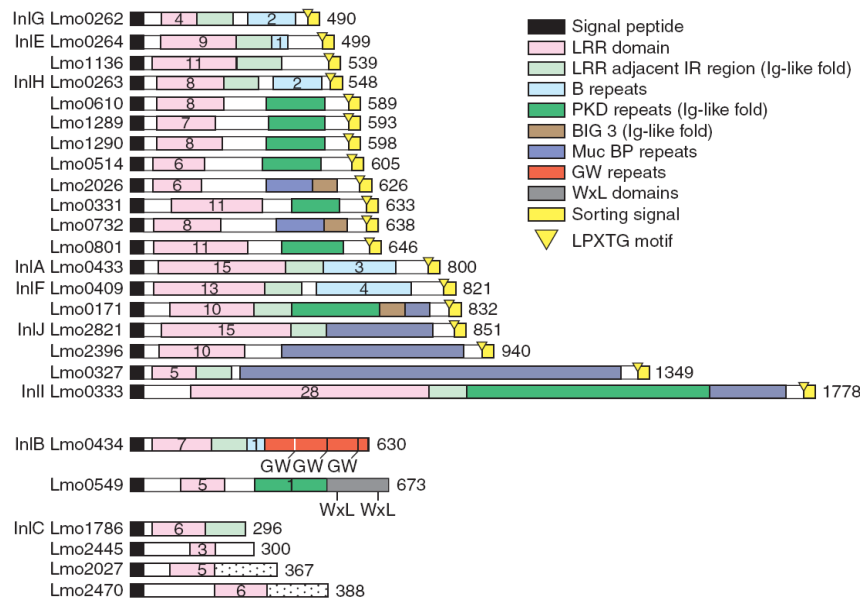


Figura 11 Famiglia delle internaline. Esse presentano una sequenza segnale all'N-terminale e un dominio LLR ricco di residui di leucina. LRR contiene da 3 (Lmo2445) a 28 (InlI) ripetizioni di circa 22 amminoacidi, una regione interna ripetuta (IR) simile alle immunoglobuline e una regione C-terminale, che media l'ancoraggio all'ospite. In base all'interazione con la superficie batterica, si dividono in tre famiglie: LPXTG, GW e secrete.

L'ultima classe, anch'essa rappresentata esclusivamente da InlC, è una proteina LRR più piccola, non collocata sulla superficie della cellula batterica. L'**internalina A** possiede un tipico segnale di trasporto di sequenza N-terminale e un corto segnale 'sorting' al C-terminale, mediante il quale si lega covalentemente ai peptidoglicani della parete della cellula batterica. Il segnale consiste di un motivo LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly), che costituisce il sistema di ancoraggio, seguito da un dominio idrofobico di circa 20 amminoacidi e una coda di residui carichi positivamente. Il segnale 'sorting' è il substrato di una sortasi A (SrtA), una transpeptidasi legata alla membrana che taglia il motivo LPXTG a livello dei residui di treonina e glicina, catalizzando la formazione di un legame ammidico tra il gruppo carbossilico della treonina e i precursori della parete cellulare [75]. InlA interagisce con l'E-caderina umana, una glicoproteina transmembrana con 5 domini extra-cellulari (EC1-EC5) e un dominio intra-citoplasmatico che regola l'adesione calcio-dipendente tra le cellule epiteliali, mediata da interazioni tra i domini EC1 e EC2. Il dominio intra-citoplasmatico connette l'E-caderina al citoscheletro interagendo con α e β -catenine [89; 93]. La specificità dell'InlA per l'E-caderina umana è dovuta alla presenza sul dominio LPXTG di una prolina in posizione 16 (Fig. 12). Nelle specie non suscettibili (topo e ratto) la prolina è sostituita da acido glutammico. Tale dominio di legame concavo circonda e riconosce l'E-caderina, per cui è responsabile

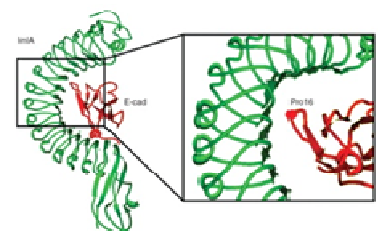


Figura 12 Struttura dei domini LRR dell'internalina A

dell'aggancio iniziale di InlA all'envelope di peptidoglicano batterico in un processo catalizzato dall'enzima sortasi A [41; 93]. Il gene *inlA*, codificante per l'omonima proteina, forma un operone con *inlB*, che a sua volta codifica per l'internalina B, anche se possono essere trascritte in modo individuale. La trascrizione di *inlA* può avvenire da quattro promotori, uno dei quali è sotto il controllo del PrfA, che è anche responsabile dell'espressione di *inlB*. L'**internalina B** è formata da 630 aminoacidi ed è caratterizzata da una sequenza di segnale di trasporto N-terminale e da 8 unità LRR, seguite da una regione inter-repeat conservata (IR) del dominio C-terminale di struttura simile alle immunoglobuline. Un dominio ripetuto B collega il dominio N-terminale a quello C-terminale, che possiede 80 aminoacidi ripetuti di glicina (G) e triptofano (W) (modulo dipeptide GW). Tale motivo GW ripetuto è implicato nel legame non covalente di InlB con gli acidi lipotecoidi (LTA). Data la natura di tale legame, InlB è presente sulla superficie della cellula batterica, ma una frazione si ritrova anche in soluzione nel mezzo extracellulare [94]. InlB è la seconda proteina di superficie implicata nei meccanismi di invasione cellulare grazie all'interazione con molteplici recettori, tra cui Met (o HGF-R), gC1q-R e con i glicosaminoglicani [95; 96]. La regione LRR interagisce con il dominio extracellulare del recettore Met, specifico per la tirosina-chinasi (RTK) e naturale recettore del fattore di crescita degli epatociti HGF [97]. Met, proteina transmembrana con attività tirosina-chinasica, è importante per la crescita e la riparazione del fegato. InlB interagisce con Met allo stesso modo di HGF. Tale interazione prevede la dimerizzazione di Met e stimola l'attività tirosina-chinasica, infatti, dopo il legame con InlB, viene attivata una rapida fosforilazione di specifici residui di tirosina del dominio citoplasmatico tirosin-chinasico di Met. La fosforilazione dei residui tirosinici Y1234 e Y1235 stimola l'attività chinasica intrinseca del recettore, mentre la fosforilazione dei residui tirosinici Y1349 e 1356, presenti al C-terminale, attiva uno specifico recettore per diversi trasduttori di segnali e proteine adattatrici tra cui Gab1, Cbl, e Shc. In particolare, Gab1 attiva la chinasi PI3K che converte il suo substrato PIP2 (fosfatidilinositolo 3,4-bifosfato) in PIP3 (fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato), portando all'aumento dei livelli di PIP2 e PIP3 all'interno della cellula. A loro volta PIP2 e PIP3 attivano il complesso Arp2/3 coinvolto nella polimerizzazione dei filamenti di actina e nel riarrangiamento del citoscheletro [75; 98]. Quindi, InlB induce un cambiamento localizzato della superficie della cellula ospite che permette l'estensione della membrane intorno al batterio facilitandone l'internalizzazione. InlB svolge anche altre azioni importanti nelle fasi successive all'internalizzazione, infatti attiva una isoforma della fosfolipasi C (PLC- γ 1) che porta alla formazione di IP3 (inositolo 1,4,5 trifosfato) e DAG (diacilglicerolo), i quali inducono il rilascio di calcio dalle riserve intracellulari e attivano gli enzimi protein-chinasi C (PKC) calcio/fosfolipidi-dipendenti. Sia il calcio che la PKC controllano la crescita cellulare e

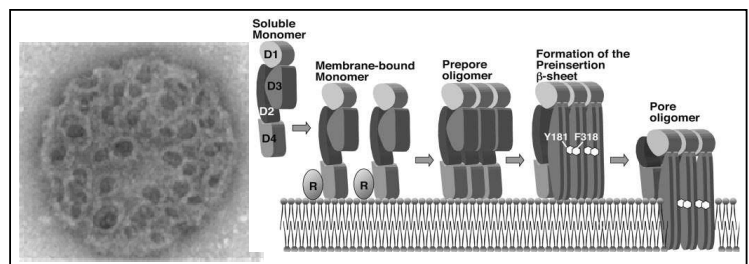
l'espressione genica. La frazione di InlB presente in soluzione nel mezzo extracellulare può interagire con ulteriori molecole, quali gC1q-R (o p32) e glicosaminoglicani (GAG) [99; 100]. In particolare, InlB è in grado di legare gC1q-R, glicoproteina ubiquitaria presente su diversi tipi di cellule tra cui linfociti, neutrofili, epatociti, cellule endoteliali e implicata nel meccanismo di attivazione del complemento nella difesa umorale contro gli agenti infettivi [100]. Il legame tra l'InlB e gC1qR è coinvolto nell'attivazione di PI3K mediante l'associazione di gC1qR con Gab1 fosforilato. Il terzo recettore per InlB è costituito dai glucosaminoglicani (GAGs) a cui è legata mediante i moduli GW. Quest'ultimo sembra aumentare l'interazione tra il recettore Met e InlB attraverso una sinergia tra i moduli GW che legano i GAGs e il dominio LRRs. Inoltre, i GAG stimolano il rilascio dell'InlB dalla superficie batterica, in quanto competono per lo stesso sito di legame, facilitando l'interazione di InlB con Met [94; 99]. Entrambe le interazioni InlA-E-caderina e InlB-Met sono determinanti nell'invasione della cellula ospite e, secondo recenti studi determinerebbero processi di ubiquitinazione dei domini citoplasmatici dei recettori. Nel primo caso tale interazione induce una tirosin-fosforilazione della E-caderina, mediata dalla chinasi Src, a cui segue ubiquitinazione catalizzata da una ubiquitina ligase. Analogamente, l'interazione InlB-Met provoca una autofosforilazione del recettore e successivo richiamo di una ubiquitina ligasi (Cbl) che ubiquitina il recettore. Tali processi di ubiquitinazione dei recettori portano al reclutamento di clatrina, proteina implicata nei meccanismi di riarrangiamento dell'actina del citoscheletro durante l'endocitosi [90]. I recettori delle internaline A e B sono specie-specifici e differenzialmente distribuiti sulle cellule dell'ospite. In particolare, InlB media l'internalizzazione batterica in diversi tipi cellulari non fagocitari, come epatociti, cellule endoteliali, fibroblasti ed è implicata nell'invasione a livello feto-placentare [89; 96; 97; 101]; l'invasione mediata da InlA è a carico di cellule di origine epiteliale, tra cui enterociti, cellule epiteliali del sistema nervoso centrale, citotrofoblasti e zone specifiche della membrana dei sinziotrofoblasti dell'embrione, che sono in contatto diretto con il sangue materno [75; 102]. Il recettore E-caderina di InlA è presente sulla superficie basolaterale degli enterociti, per cui apparentemente non accessibile. L'interazione si realizza durante il processo di ricambio degli enterociti dei villi intestinali, processo in cui le cellule apoptotiche si portano nelle zone di estrusione per essere eliminate. Questo avviene senza perdita di continuità della mucosa, in quanto le cellule circostanti rimuovono le vecchie giunzioni con la cellula estrusa e ne formano di nuove tra cellule adiacenti, mediante fagocitosi delle molecole di adesione, tra cui E-caderina [96; 103]. Quindi, mentre InlB ha un ruolo marginale nelle prime fasi dell'infezione a livello intestinale, la colonizzazione dei tessuti più profondi e quindi dei principali organi bersaglio come il fegato, richiede InlB [96; 41]. Numerose altre internaline sono codificate ed

esprese dal microrganismo. L'**internalina C** è necessaria per un'efficace diffusione del microrganismo tra le cellule polarizzate dell'epitelio intestinale e viene secreta nello spazio intracellulare. Tale fattore di virulenza si lega al dominio C-terminale SH3 di Tuba, il quale normalmente interagisce con la proteina di regolazione dell'actina umana N-WASP. Tuba e N-WASP controllano la struttura delle giunzioni apicali delle cellule epiteliali. Impedendone l'interazione, InlC rilassa la tensione corticale alle giunzioni cellula-cellula promuovendo la formazione di protrusioni e la diffusione del batterio da una cellula all'altra. Si è osservato che inlC possiede due promotori di trascrizione, di cui uno PrfA indipendente e un'altro, precedentemente individuato, PrfA-dipendente. L'espressione di *inlC* non indotta dal fattore di regolazione PrfA, potrebbe essere responsabile dell'invasione delle cellule adiacenti, mentre quella PrfA-dipendente facilita il processo di invasione cellulare mediato dall'internalina A [104]. Ulteriori tre geni codificanti InlH, InlJ e lmo2026 sono stati recentemente associati al processo di infezione, anche se la loro funzione non è ben nota.

1.8.3 Geni del cluster LIPI-1

La **listeriolisina O** (LLO), codificata da *hly*, rappresenta uno dei principali determinanti di virulenza di *L. monocytogenes* in quanto media la lisi del vacuolo fagocitino, con conseguente rilascio del microrganismo nel citoplasma senza uccidere la cellula ospite (Fig. 13). Tale tossina formante pori presenta struttura e funzioni analoghe alle citolisine colesterolo-dipendenti (CDS), famiglia a cui appartengono la perfringolisina O (PFO) e la streptolisina O (SLO) secrete da *Clostridium perfringens* e *Streptococcus pyogenes*.

Figura 13 Formazione di pori da parte di LLO [105]. La listeriolisina O è composta da quattro domini disposti in modo da costituire una molecola a forma di 'L'. La prima fase del meccanismo d'azione della tossina consiste nel legame reversibile del dominio D4 al doppio strato lipidico della membrana contenente colesterolo. Ciò provoca cambiamenti nella struttura della tossina; infatti, il dominio D2 si curva fino a collassare permettendo a monomeri adiacenti di interagire tra loro polimerizzando e a D3 di inserirsi nella membrana, fino a formare pori stabili.



I recettori delle CDC non sono noti, ma esse sono in grado di danneggiare solo membrane contenenti colesterolo [34]. LLO è responsabile dell'attività β -emolitica e agisce nell'intervallo di pH 4,5-6,5; si attiva con l'acidità del fagosoma e dopo la lisi, viene inattivata dal pH neutro del citoplasma [41]. Tale rapida degradazione, fondamentale per evitare danni alla cellula ospite, è attribuita alla presenza della sequenza PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) nel residuo N-terminale, che rappresenta il bersaglio delle proteasi della cellula eucariotica. Delezioni di tale

sequenza portano a ceppi con maggiore citotossicità, ma ridotta virulenza [106]. Un'ulteriore emolisina, la listeriolisina S (LLS), è stata riscontrata in molti ceppi implicati nei casi epidemici più importanti. Il cluster LLS, denominato isola di patogenicità 3 (LIPI-3), è stato individuato solo in ceppi della lineage I, facendo ipotizzare che LLS sia responsabile della maggiore virulenza associata a tali ceppi. La produzione di LLS è indotta da stress ossidativo e tale tossina facilita la fuga di dal fagosoma nei macrofagi [13]. La polimerizzazione di LLO determina la formazione di pori nella membrana del vacuolo fagocitico, non abbastanza grandi da permettere la fuga di *L. monocytogenes*, ma sufficienti al passaggio di elettroliti e proteine tra citoplasma e fagosoma [34]. In particolare, LLO è coadiuvata da due fosfolipasi di tipo C (PLC), quali **fosfolipasi A** (PI-PLC) e **fosfolipasi B** (PC-PLC), in grado di danneggiare la membrana cellulare. La fosfolipasi A (PlcA), codificata da *plcA* collocato a monte di *hly* in LIPI-1, è denominata PI-PLC in quanto fosfatidilinositolo specifica. Essa è richiesta per un'efficiente fuga dal fagosoma primario, in quanto danneggia e destabilizza i vacuoli acidificati in sinergia con LLO e PlcB. Tale enzima è attivo nell'intervallo di pH 5,5-7,0. La fosfolipasi C (PlcB), nota come PC-PLC (fosfolipasi fosfatidilcolina specifica) o lecitinasi è codificata da *plcB* ed è implicata nella lisi del fagosoma secondario a doppia membrana e contribuisce, con Hly e PlcA, alla distruzione dei fagosomi primari. La fosfolipasi B viene sintetizzata sotto forma di proenzima inattivo (proPC-PLC) per evitare danni ai fosfolipidi della membrana cellulare batterica. La sua maturazione in forma attiva prevede la scissione di un peptide di 24 amminoacidi presente nel dominio N-terminale, mediata dalla **metalloproteasi** zinco dipendente (Mpl). Durante la diffusione da cellula a cellula, l'abbassamento del pH innesca l'attivazione della metalloproteina Mpl e di conseguenza la maturazione di PC-PLC e il rilascio della forma attiva dell'enzima [107]. Una volta rilasciato nel citoplasma il microrganismo si moltiplica con un tempo di generazione di 40-60 minuti, sfruttando fonti di azoto e carbonio reperibili nella cellula ospite. Fondamentale per il parassitismo intracellulare è il fattore di virulenza *hpt*, codificante la permeasi **Hpt (Hexose phosphate transporter)**. Hpt è l'omologo di G6PT (glucose-6-phosphate transporter), importante nell'omeostasi del glucosio negli eucarioti, responsabile dell'assorbimento di G6P dal citoplasma nel reticolo endoplasmatico per la conversione in glucosio. Quindi, Hpt mima la funzione di G6PT per sfruttare gli esoso fosfati presenti nel comparto intracellulare. Mutanti che non esprimono *hpt*, riescono comunque a replicare nella cellula ospite sfruttando fonti alternative di carbonio. È stato osservato che gli esoso fosfati presenti nel comparto intracellulare, stimolano l'espressione dei fattori di virulenza, essendo *hpt* sotto il controllo di *prfA*. Questo è uno dei meccanismi che permette al microrganismo di assumere un comportamento saprofita o parassita intracellulare a seconda dell'ambiente in cui viene a

trovarsi. All'interno del citoplasma della cellula ospite, il patogeno induce l'espressione di **ActA** (actinpolymerizing), proteina di superficie che interagisce con il citoscheletro della cellula ospite e causa il movimento nel citoplasma fino a raggiungere la periferia e invadere la cellula adiacente [43]. ActA induce nucleazione e polimerizzazione di filamenti di actina in corrispondenza del vecchio polo della cellula batterica. Nella polimerizzazione da g-actina (globulare) a f-actina (filamentosa), le sub-unità si assemblano testa-coda creando filamenti con polarità distinta che si avvolgono a formare un'elica destrorsa. L'allungamento dei filamenti provoca la rotazione del batterio intorno al proprio asse con una forza propulsiva fino a 1 $\mu\text{m/s}$. I filamenti in formazione si degradano generando una scia simile ad una cometa.

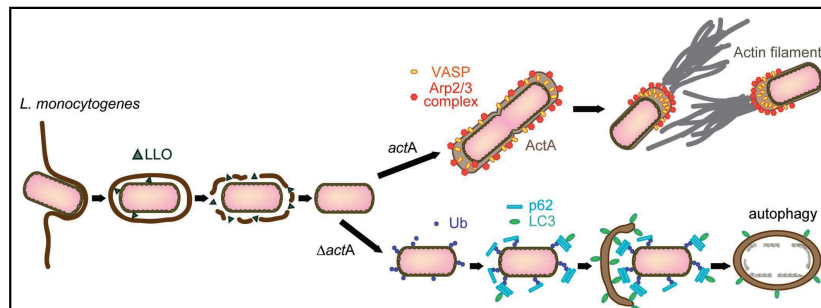


Figura 14 Meccanismo di azione di ActA [108]

Nella fase iniziale del processo, ActA si lega al complesso Arp2/3 mimando l'azione dei fattori di nucleazione dell'actina WASP (Wiskott Aldrich Syndrome Protein) dell'ospite. Ciò attiva la nucleazione, con formazione di un aggregato iniziale (nucleo) stabile a cui segue un periodo di rapido allungamento (polimerizzazione) dei filamenti. La fosfoproteina VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), tipica della cellula eucaristica, interagisce con la parte centrale di ActA, ricca di residui di prolina ed essendo una naturale molecola di legame della profilina, stimola l'assemblaggio quindi la polimerizzazione dell'actina [109]. Inoltre, è stato dimostrato l'importante ruolo di ActA nel preservare il patogeno dal processo di autofagia che si realizza nella cellula ospite (Fig. 14) [108].

1.8.4 Regolazione dei fattori di virulenza: PrfA (positive regulatory factor A)

I geni dell'isola di patogenicità LIPI-1, codificanti LLO (*hly*), ActA, PlcA, PlcB, Mpl e PrfA, gli operoni *inlAB* e *inlC* e il monocistrone *hpt* rappresentano importanti fattori di virulenza di *L. monocytogenes* e sono espressi in modo coordinato grazie al controllo positivo del regolatore trascrizionale PrfA (Fig. 15). La sua attivazione segna la transizione saprofitica extracellulare a patogeno opportunisto, per cui la sua trascrizione è finemente regolata da 3 diversi promotori [19; 20; 110]. Il primo è *PplcA*, localizzato a monte di *plcA*, il quale innesca la sintesi di mRNA bicistronico ad partire dal promotore *plcA* PrfA-dipendente; la trascrizione contemporanea di *plcA-prfA* costituisce un meccanismo di autoregolazione di PrfA basato su

feedback positivo [74]. Mutanti in cui tale regolazione è danneggiata sono avirulenti, anche se altri promotori sono efficienti, dimostrandone l'importanza nella sintesi di idonei livelli di PrfA nell'infezione [111].

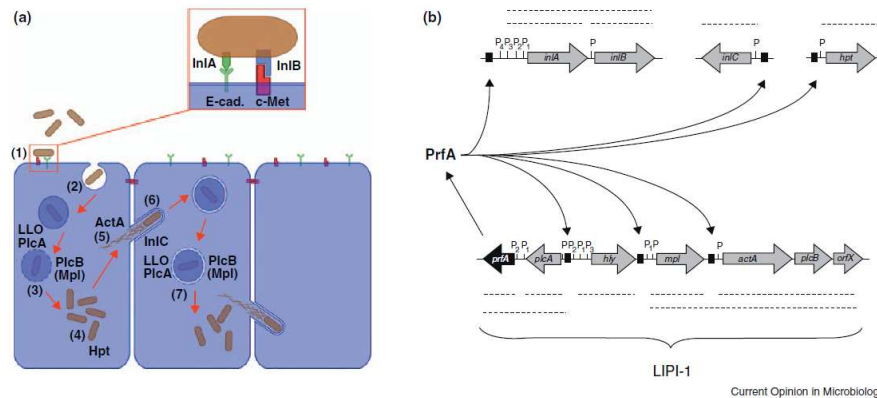


Figura 15 a) Ciclo di infezione intracellulare; b) fattori di virulenza di *L. monocytogenes* [74]

Altri due promotori, $P1prfA$ e $P2prfA$, sono localizzati a monte di *prfA*. $P1prfA$ è controllato dal fattore della forma vegetativa σ^A (housekeeping sigma factor). La regione di $P2prfA$ è costituita da due promotori sovrapposti, uno riconosciuto da σ^A e l'altro da σ^B . $P1prfA$ promuove la sintesi di bassi livelli di mRNA durante la normale crescita batterica. L'espressione dei geni di virulenza è inibita sotto 30°C, in quanto durante la sintesi di PrfA a livello del promotore $P1prfA$, una regione ancora non traslata, a basse temperature, assume una struttura secondaria che nasconde il sito di legame ribosomiale bloccando la traslazione e quindi la sintesi della proteina. Essa si denatura sopra i 30°C permettendo l'espressione di PrfA e, di conseguenza, dei geni di virulenza (Fig. 16). Tale meccanismo è cruciale per la rapida sintesi di PrfA a partire da una 'riserva' di mRNA non traslati dopo l'entrata nell'ospite e per evitarne la sintesi extracellulare [111]. $P2prfA$ è attivo durante la crescita stazionaria e sembra coinvolto nella regolazione negativa della trascrizione di PrfA. $P1prfA$ e $P2prfA$ garantiscono una minima quantità di trascritti di *prfA* monocistronico nel citosol, sufficiente a stimolare la sintesi dei geni *hly* e *plcA* (caratterizzati da promotori altamente affini a PrfA), ma non a stimolare il promotore di *actA* [74]. Diversi segnali modulano la sintesi di PrfA tra cui fattori ambientali o stati fisiologici. Fonti di carbonio quali glucosio, fruttosio, mannosio o β -glucosidi (cellobiosio) innescano un meccanismo di repressione da catabolita. Invece, gli esosofosfati della cellula ospite attivano PrfA e di conseguenza l'espressione dei geni di virulenza durante l'infezione [19]. Stress ambientali possono attivare *prfA* indirettamente, in quanto $P2prfA$ è σ^B -dipendente. Il meccanismo attraverso cui PrfA attiva e coordina l'infezione nella cellula è basato su un meccanismo di transizione allosterica mediato da un cofattore a basso peso molecolare. Infatti,

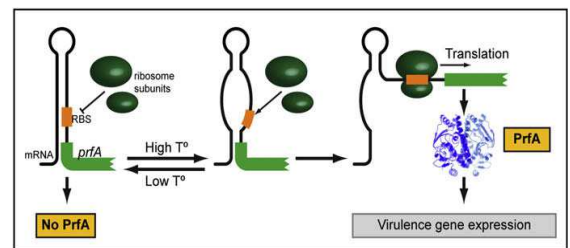


Figura 16 Meccanismo di regolazione di *prfA*

Altri due promotori, $P1prfA$ e $P2prfA$ garantiscono una minima quantità di trascritti di *prfA* monocistronico nel citosol, sufficiente a stimolare la sintesi dei geni *hly* e *plcA* (caratterizzati da promotori altamente affini a PrfA), ma non a stimolare il promotore di *actA* [74]. Diversi segnali modulano la sintesi di PrfA tra cui fattori ambientali o stati fisiologici. Fonti di carbonio quali glucosio, fruttosio, mannosio o β -glucosidi (cellobiosio) innescano un meccanismo di repressione da catabolita. Invece, gli esosofosfati della cellula ospite attivano PrfA e di conseguenza l'espressione dei geni di virulenza durante l'infezione [19]. Stress ambientali possono attivare *prfA* indirettamente, in quanto $P2prfA$ è σ^B -dipendente. Il meccanismo attraverso cui PrfA attiva e coordina l'infezione nella cellula è basato su un meccanismo di transizione allosterica mediato da un cofattore a basso peso molecolare. Infatti,

PrfA è una proteina di 237 residui amminoacidici (27 kDa) di struttura simile alla famiglia delle Crp (cAMP receptor protein), note come Cap (catabolite gene activator protein), attivatori di trascrizione negli enterobatteri [111]. In particolare, appartiene alle cAMP receptor protein (Crp)/fumarate nitrate reductase regulator (Fnr). Essa è formata da dimeri simmetrici ed è caratterizzata da un dominio N-terminale, contenente una struttura β (jelly)-roll e una α -elica responsabile dell'interazione tra i monomeri, una regione interdominio e un dominio C-terminale con un motivo Helix-Turn-Helix (HTH). Nelle Crp, il dominio N-terminale lega cAMP passando da forma inattiva ad attiva, assumendo una conformazione ad elevata affinità sia per la RNA polimerasi, che per specifici promotori, per cui avvicina il sito promotore e l'enzima, favorendo la trascrizione dei geni a valle. Il funzionamento di PrfA nella regolazione dei geni di virulenza è simile al complesso cAMP-Crp [111]: PrfA subisce uno shift conformazionale da forma debolmente attiva (ON) ad altamente attiva (OFF), mediante l'interazione tra il motivo HTH con sequenze palindrome di 14 bp con sequenza canonica denominata PrfA-boxes. Quest'ultime sono localizzate nei promotori PrfA-dipendenti e costituiscono il sito di inizio della trascrizione. L'attivazione di PrfA richiede che i motivi HTH di PrfA si leghino alle PrfA-boxes (presenti in *hly*, *actA*, *plcA*, *plcB*, *mpl*, *prfA*, *inlAB*, *inlC* e *hpt*), PrfA aggancia la RNA polimerasi al promotore e la trascrizione ha inizio [74].

1.9 Meccanismi di resistenza a stress ambientali

La capacità di *L. monocytogenes* di resistere a fattori di stress ambientale è fondamentale per la sopravvivenza nell'ambiente esterno, permette di colonizzare differenti tipologie di matrici alimentari ed è indispensabile per superare le condizioni ostili che il patogeno incontra nell'attraversamento del tratto gastrointestinale dell'ospite [21].

Resistenza a stress termico

I meccanismi implicati in tale resistenza possono essere:

- Modifiche nella composizione della membrana cellulare batterica

Incrementando gli acidi grassi C15:0 rispetto a C17:0, o passando da ramificazioni con conformazione iso ad anteiso (da i-C15:0 a a-C15:0), si riducono le interazioni C-C nelle catene carboniose adiacenti, garantendo una fluidità ottimale nonostante la temperatura esterna scenda al di sotto dei valori ottimali [112].

- Cambiamenti nell'espressione genica e nell'induzione delle proteine

In risposta a stress termico, *L. monocytogenes* produce un diverso numero di Csp (cold shock proteins) e Cap (cold acclimation proteins). È osservata una sovra-espressione di chaperones

(enzimi che prevengono associazioni non corrette e aggregazione di catene polipeptidiche non ripiegate) tra cui GroEL, ClpP e ClpB, che potrebbero essere coinvolte nella degradazione di polipeptidi danneggiati o abnormi a seguito dell'esposizione a basse temperature [69].

- Accumulo di soluti crioprotettivi

L'accumulo cellulare di glicina, betaina e carnitina mediante sistemi di trasporto degli osmoliti, aumenta la resistenza a basse temperature. Sono noti i sistemi betaine porter I (BetL), glycine betaine porter II (Gbu) e carnitine transporter (OpuC).

Sopravvivenza a bassi valori di pH

L. monocytogenes predilige valori neutri (6-7) di pH, tuttavia tollera condizioni di elevata acidità, per cui può contaminare alimenti acidi e resistere ai succhi gastrici. Inoltre, bassi valori di pH sono necessari per l'attività emolitica del patogeno, per cui tale capacità è strettamente connessa alla virulenza dei ceppi [34]. Tra i meccanismi implicati:

- Variazione dell'espressione genica

Uno dei meccanismi di risposta del microrganismo alle variazioni dell'acidità consiste nella produzione di specifiche proteine denominate acid shock proteins (ASP) [34].

- Omeostasi del pH

I microrganismi aerobi eliminano verso l'esterno l'eccesso di protoni con trasporto attivo di H^+ accoppiati ad elettroni nella catena respiratoria. I batteri anaerobi eliminano H^+ sfruttando molecole che utilizzano l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP, mediante la F₀F₁-ATPase, un enzima costituito da diverse sub unità che si comporta come un canale che pompa l'eccesso di H^+ provenienti dal citoplasma verso l'esterno consumando ATP. Essendo un microrganismo aerobio-anaerobio-facoltativo, *L. monocytogenes* si avvantaggia di entrambi i meccanismi per garantire l'omeostasi del pH all'interno della cellula batterica [113].

- Sistema della glutammato decarbossilasi (GAD)

Mediante il sistema GAD, una molecole di acido glutammico dall'ambiente extracellulare entra nel citosol batterico tramite un carrier di trasporto e decarbossilata in acido γ -amminobutirrato (GABA), con consumo di un H^+ interno alla cellula batterica. Il GABA prodotto è scambiato con una nuova molecola di acido glutammico; in tal modo il pH batterico aumenta e il mezzo esterno viene alcalinizzato, essendo GABA meno acido rispetto a GAD. L'acido glutammico è un amminoacido non essenziale presente in vari alimenti di origine animale, utilizzato anche come additivo alimentare (correttore di acidità o correttore di sapidità) o ingrediente nei mangimi. È presente nei tessuti animali quale neuro-trasmittitore e come costituente dell'acido folico nei vertebrati. Nella carne fresca si ritrova in forma legata, mentre i processi di fermentazione e stagionatura generano la forma libera, quella utilizzata dai batteri. Mediante

GAD il patogeno riesce ad attraversare l'ambiente gastrico per poi colonizzare l'intestino. Tuttavia, elevati livelli di espressione di GAD sono stati identificati anche in ceppi con bassa persistenza nell'intestino umano, suggerendo che esso non è indispensabile per superare la barriera gastrica e che tale processo coinvolge una strategia multifattoriale [57; 69].

Sopravvivenza a stress osmotico

L. monocytogenes resiste a bassi valori di A_w e alte concentrazioni saline presenti in alcuni alimenti. È stato osservato che lo stress osmotico (e pH acido) può incrementare la virulenza dei ceppi [114].

▪ Variazioni dell'espressione genica

Aumentare o diminuire la sintesi di varie proteine permette l'adattamento a concentrazione saline diverse. Sono note le Ssp (salt shock proteins), che sono indotte rapidamente ma per un breve periodo di tempo, e le Sap (stress acclimation proteins), indotte rapidamente, ma che continuano ad essere espresse diverse ore dopo il ritorno a condizioni di normalità. Tra le Ssp è stata identificata la proteina GbuA, che funge da trasportatore per glicina betaina con funzioni osmoprotettive e Ctc, che si attiva in assenza di meccanismi simili al precedente. Anche *opuCA*, coinvolto nel trasporto di carnitina, viene espresso in risposta a stress osmotico [114].

▪ Accumulo di soluti osmoprotettivi

L. monocytogenes risponde a stress osmotico accumulando composti (betaina e carnitina) che non interferiscono con l'attività cellulare, contrastando la perdita di acqua e mantenendo il turgore cellulare. Sono noti tre sistemi di trasporto di osmoliti (Gbu, OpuC, BetL) implicati nell'accumulo di betaina e carnitina, tra cui OpuC, uno specifico sistema ABC (ATP binding cassette) transporter, costituito da un complesso di proteine di membrana che utilizza ATP per traslocare soluti attraverso la membrana. È regolato negativamente dal gradiente osmotico e codificato dall'operone *opuC*, costituito da *opuCA*, *opuCB*, *opuCC* e *opuCD* [54]. È noto il promotore *sigB*-dipendente a monte di *opuCA* ed che in assenza di σ^B la trascrizione di *opuCA* si riduce drasticamente in presenza di 0,5M NaCl e che lo stress osmotico aumenta le capacità di invadere linee cellulari epiteliale del colon umano [112; 114].

Resistenza ai Sali Biliari

I sali biliari (SB) sono molecole anfipatiche con effetto detergente, indispensabili per la digestione dei lipidi. Hanno elevato potente antimicrobico, causando danni al DNA, formazione di strutture secondarie nell'RNA e alterando la stabilità di macromolecole e membrane cellulari. La resistenza ai SB è determinante per l'instaurarsi dell'infezione.

▪ Idrolasi dei Sali Biliari (BSH)

Numerosi sistemi di resistenza ai SB sono stati identificati Gram Positivi e Negativi, tra cui ceppi dei generi *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* [115]. *bsh* codifica per **Bile Salt Hydrolase** (BSH), una idrolasi dei sali biliari, che idrolizza il legame amidico tra la molecola steroidea degli acidi biliari e gli aminoacidi glicina/taurina dei SB coniugati, liberando acidi biliari liberi dal potere emulsionante inferiore rispetto alle molecole di partenza e con effetto batteriostatico e battericida ridotto. Alcuni studi hanno evidenziato un dimezzamento della MIC della bile in ceppi che non esprimono *bsh*. BSH contribuisce alla sopravvivenza nell'intestino e spiega l'isolamento all'interno della colecisti (Fig. 17), in cui la bile è 5-10 volte più concentrata [11]. L'attività BSH-asiatica è stata riscontrata in *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*, mentre è assente nelle specie non patogene *L. grayi*, *L. innocua* e *L. welshimeri*, suggerendo che *bsh* non è importante durante l'infezione e la colonizzazione dell'intestino [115; 116]. In diversi studi *bsh* è stato identificato in tutti i ceppi analizzati, ad eccezione di isolati di sierotipo 4e, in cui comunque è stata osservata la presenza di una sequenza omologa [115]. Altri geni coinvolti nella tolleranza alla bile sono *btlB* (bile tolerance locus B), il quale sembra sia assente in specie non patogene e *bilE* che codifica per un sistema di eliminazione dei SB localizzato sulla membrana [11; 116]. *L. monocytogenes* non possiede unico/specifici meccanismi di resistenza ai sali biliari. Riducendo il pH della bile, simulando il duodeno dove l'effetto antimicrobico è superiore, diversi meccanismi di resistenza (BSH, Bile, σ^B) sono necessari per la sopravvivenza [11].

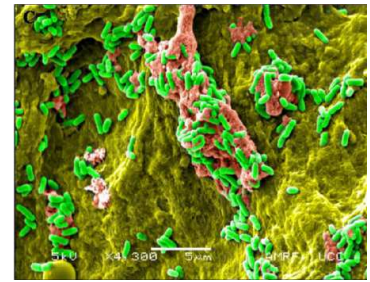


Figura 17 Epitelialio del lume della cistifellea suina infettata da *L. monocytogenes*

Formazione di biofilm

Tra le strategie di sopravvivenza in ambienti ostili rientra la formazione di biofilm, una comunità strutturata di batteri adesi ad una superficie organica o inerte, circondati da una matrice extracellulare (esopolisaccaridi, DNA extracellulare, proteine e sostanze polimeriche extracellulari come poligluttammato, acidi tecoici, ecc.), prodotta dalle cellule stesse (Fig. 18). Ceppi persistenti nell'industria alimentare, nella ristorazione collettiva e a livello domestico, rappresentano un rischio per la sicurezza alimentare. Inoltre, il biofilm conferisce resistenza ad agenti antimicrobici e disinfettanti, rendendo difficile la decontaminazione delle superfici, tanto che la presenza del patogeno può diventare endemica [2]. Sono stati osservati ceppi in grado di colonizzare superfici idrofile (acciaio inox) e idrofobe (politetrafluoroetilene) con biofilm tridimensionali a forma di fungo con canali e pori, a nido d'ape, oppure semplici aggregati di cellule o monostrati. La correlazione tra sierotipo/linea genetica/origine dei ceppi e

biofilm ancora resta da chiarire, anche se sembra che i sierotipi 1/2c e 1/2a mostrino livelli più alti di adesione [2]. In conclusione, il passaggio da vita planctonica a sessile modifica il patogeno. La crescita microbica rallenta talora fino ad una fase VBNC (Viable But Not Culturable cell), cioè cellule in una condizione di ridotta attività metabolica che non sono in grado di dividersi, ma comunque vive e coltivabili se rivitalizzate.

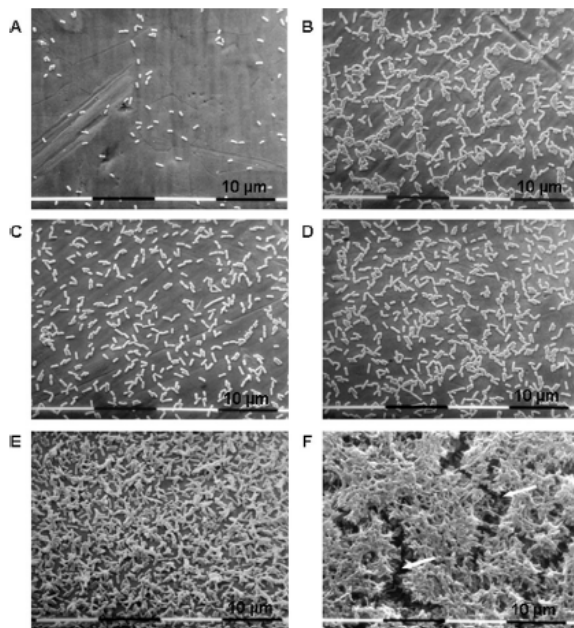
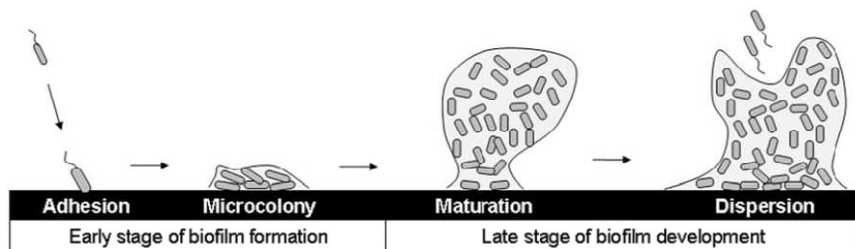


Figura 18

In alto. Rappresentazione schematica dei determinanti molecolari coinvolti nelle fasi precoci e tardive della formazione di biofilm in *L.monocytogenes*.

Fasi della formazione del biofilm:

I batteri in forma planctonica (dispersi) aderiscono alla superficie. Segue una fase di colonizzazione in cui le cellule proliferano formando micro colonie che man mano crescono e confluiscono. Il passaggio successivo consiste nella maturazione del biofilm in una struttura tridimensionale in cui le cellule batteriche sono inglobate in una matrice extracellulare. Infine, alcuni batteri vengono rilasciati dal biofilm per colonizzare altre superfici.

A sinistra. Immagine ottenuta mediante microscopia a scansione elettronica di biofilm di *L.monocytogenes* su una superficie di acciaio inox dopo 10s (A), 5h (B), 8h (C), 24h (D), 5 giorni (E) e 7 giorni (F)

All'interno del biofilm si sviluppa una maggiore resistenza a stress ambientali, non solo per la barriera fisica costituita dal biofilm stesso, ma anche a seguito di variazioni nella trascrizione dei geni. Inoltre, i batteri si staccano dal biofilm in aggregati indipendenti per colonizzare nuovi ambienti. Si è osservato che le cellule in stato di biofilm sintetizzano circa 90 tipi di proteine in più, tra cui quelle coinvolte nei meccanismi di resistenza agli stress e nelle funzioni di omeostasi cellulare, come le proteine da shock acido o termico [117]. Inoltre, negli strati profondi del biofilm, in cui l'apporto di ossigeno e nutrienti è ridotto, le cellule si trovano in sofferenza fisiologica sviluppando maggiori caratteristiche di resistenza.

Resistenza ai disinfettanti

La presenza di *L. monocytogenes* può essere facilmente prevenuta mediante l'utilizzo di molteplici disinfettanti disponibili in commercio. Tra le formulazioni più utilizzate, sia in ambiente medico che negli ambienti di produzione industriale, rientrano i composti

dell'ammonio quaternario (QACs). Tali tensioattivi cationici agiscono sulla permeabilità della membrana cellulare, a livello dei gruppi carbossilici, causando perdita di integrità con fuoriuscita di materiale citoplasmatico, degradazione di proteine, enzimi e acidi nucleici, fino a lisi della membrana. In particolare, sono caratterizzati da effetto denaturante, complessante e precipitante su proteine; alterano reazioni metaboliche come la respirazione aerobica e anaerobica del glucosio; provocano citolisi e perdita di fosforo e potassio e alterano il flusso di protoni della membrana cellulare (flusso inverso di protoni). A basse concentrazioni risultano batteriostatici, mentre a concentrazioni più elevate mostrano azione battericida. Allo stesso tempo, non sono tossici per l'uomo e non corrodono le superfici su cui vengono applicati. Tuttavia, diversi fattori, tra cui l'impiego di errati dosaggi, la presenza di biofilm batterici, un'insufficiente pulizia preliminare o un inadeguato risciacquo dopo le operazioni di disinfezione possono ridurre significativamente l'effetto battericida del disinfettante. Quest'ultimo è quantificato come la concentrazione minima richiesta per inibire la crescita di un microrganismo target (MIC), oppure come la concentrazione in grado di eliminare il 99,9% di microrganismi (MBC, Minimum Bactericidal Concentration) dopo il tempo di contatto. I batteri, a partire da matrici contaminate o veicolate da aerosol generati durante la lavorazione o le operazioni di pulizia, possono trovare rifugio in specifiche 'nicchie' (crepe, fessure, giunzioni, ecc.). Tali zone sono difficilmente accessibili per il disinfettante, oppure in esse il principio attivo (p.a.) può permanere dopo il risciacquo. Di conseguenza, i batteri sfuggiti alla sanitizzazione possono diffondere alle zone vicine. Inoltre, essi vengono esposti a concentrazioni sub-letali di disinfettante, che possono indurre modifiche strutturali o compositive della membrana cellulare tali da favorire l'adattamento al p.a. o l'acquisizione di geni di resistenza [34; 118]. L'efficacia della sanitizzazione si riduce notevolmente se la carica batterica iniziale è elevata e soprattutto in presenza di sostanza organica o di biofilm batterico, che svolgono un effetto protettivo e aumentano la possibilità che alcune cellule sopravvivano e si adattino a basse concentrazioni di residui del p.a. Molto importanti sono anche le condizioni di utilizzo del disinfettante; il tempo di contatto del p.a. con i batteri non dovrebbe essere inferiore a 10-15 minuti e la temperatura idonea, in quanto se l'energia di attivazione del principio è bassa (cloro, iodio, acido peracetico), l'effetto si raggiunge anche a bassa temperatura; viceversa, per molecole ad elevata energia di attivazione (composti quaternari e biguanidi), un'eventuale disinfezione a freddo richiede un incremento della concentrazione. Anche il pH della soluzione è determinante, infatti i composti disinfettanti sono formulati in modo da garantire una soluzione di lavoro di massima efficacia. Tuttavia, qualunque sia il numero di cellule sopravvissute, se le condizioni ambientali sono favorevoli, i batteri si moltiplicano. Nel tempo, il microrganismo può diventare 'persistente', qualora la riduzione del

numero di cellule ad opera del trattamento di sanitizzazione sia inferiore alla crescita microbica tra due interventi successivi [71]. Grazie alla capacità di moltiplicare in un ampio intervallo di temperature (fino ad alcuni gradi sotto 0°C), di pH (4,6-9.5), di sopportare attività dell'acqua anche inferiore a 0,92 ed elevate concentrazioni saline (fino a 2 M), *L. monocytogenes* trova condizioni favorevoli di crescita nell'industria alimentare, anche all'interno delle celle frigorifere o nei locali di essiccazione e stagionatura [36; 119]. La resistenza al cloruro di benzalconio, di ceppi di *L. monocytogenes* isolati da alimenti o ambienti di produzione è risultata compresa tra un minimo del 10% ad un massimo del 42-46% [120]. Il cloruro di benzalconio (BC) appartiene alla famiglia dei QACs ed è largamente impiegato nell'industria alimentare. Essendo un composto stabile nel tempo, spesso il risciacquo delle superfici non risulta efficace dando origine a fenomeni di resistenza. In *S. aureus* è stata dimostrata la presenza di una pompa di efflusso in grado di espellere le molecole del p.a. dall'interno della cellula batterica, impedendone l'accumulo [121]. La resistenza di *L. monocytogenes* al BC è stata attribuita a modifiche nella composizione cellulare in fosfolipidi e acidi grassi e diversi studi hanno messo in evidenza la presenza cromosomica di geni codificanti pompe di efflusso o mediati da plasmidi [120; 122; 123]. Due pompe di efflusso, **MdrL** (multi drug resistance in Listeria) e **Lde** (Listeria drug efflux; *lmo2741*) sono state individuate in *L. monocytogenes*. La prima, codificata da *mdrL*, è responsabile dell'espulsione dalla cellula di antibiotici (macrolidi e cefotaxime), metalli pesanti e bromuro di etidio, mentre Lde è associata alla resistenza ai fluorochinoloni e, in parte, ad arancio di acridina e bromuro di etidio. Entrambe sembrano richieste per l'adattamento al BC di ceppi naturalmente sensibili [123]. Inoltre, è stato individuato il gene *orfA*, codificante la proteina **OrfA**, che rappresenta il repressore trascrizionale del gene *mdrL* [124].

Resistenza agli antibiotici

Dopo le prime evidenze in Francia nel 1988, numerosi ceppi di *L. monocytogenes* resistenti a uno o più antibiotici sono stati isolati da ambiente, alimenti e casi clinici [50]. Sebbene si stia assistendo ad un aumento del fenomeno, le informazioni a riguardo rimangono scarse [125]. L'esito della listeriosi dipende dalla somministrazione tempestiva di antibiotici. Ad eccezione di una naturale resistenza *in vitro* ai chinoloni di vecchia generazione, fosfomicina e cefalosporine ad ampio spettro, *L. monocytogenes* è sensibile agli antibiotici utilizzati per batteri Gram-positivi. Il trattamento di riferimento si basa su un'associazione sinergica di aminopenicillina (ampicillina o amoxicillina) e gentamicina e anche se rifampicina, vancomicina, linezolid e carbapenemi sono stati proposti come possibili alternative, il trimetoprim è utilizzato in caso di intolleranza ai beta-lattamici. Analogamente a quanto si sta

osservando per altri patogeni, l'utilizzo non corretto o eccessivo di antibiotici, sia in ambito medico che veterinario, sta determinando la selezione di ceppi resistenti. La resistenza rappresenta la temporanea o permanente capacità del microrganismo di rimanere vitale e riprodursi in condizioni che uccidono o inibiscono altri ceppi e può essere una proprietà intrinseca o acquisita mediante meccanismi genetici di mutazione e selezione. I batteri Gram-positivi sono meno resistenti rispetto ai Gram-negativi, in quanto la parete cellulare è costituita essenzialmente da peptidoglicano e acidi teicoici non in grado di ostacolare il passaggio di antibiotici e disinfettanti. Tuttavia, la pressione selettiva può generare ceppi resistenti e alcuni meccanismi di adattamento, tra cui la formazione di biofilm, possono conferire resistenza ai batteri verso i composti antimicrobici [118]. Infine, è stata dimostrata una resistenza crociata tra disinfettanti ed antibiotici. Ad esempio, concentrazioni sub-letali di tricloroesani possono indurre resistenza agli aminoglicosidi, famiglia di antibiotici di cui fa parte la gentamicina, utilizzata nella terapia della listeriosi [126]. Analogamente, l'uso dei QACs nell'industria alimentare, può favorire la selezione di ceppi antibiotico-resistenti [118]. Le infezioni causate da ceppi resistenti sono un grave problema Sanitario ed economico, in quanto non rispondendo ai trattamenti convenzionali, possono richiedere l'utilizzo di farmaci costosi o potenzialmente tossici e possono determinare un prolungamento della malattia e un maggiore rischio di morte.

1.9.1 Regolazione ad opera del fattore sigma alternativo (σ^B)

Nei batteri è stato individuato un importante meccanismo di regolazione della trascrizione dei geni associati alla sopravvivenza in particolari condizioni ambientali, il quale è mediato da diverse associazioni tra fattori sigma alternativi ed la RNA polimerasi. Il fattore sigma, combinandosi con le altre sub-unità della RNA polimerasi (oloenzima) permette a quest'ultimo di riconoscere sequenze specifiche del DNA a livello del promotore, dando inizio alla sintesi di mRNA [21]. *L. monocytogenes* possiede 4 fattori sigma alternativi (σ^B , σ^C , σ^H , σ^L), di cui il fattore di risposta a stress σ^B , codificato dal gene *sigB*, è quello più studiato. Ceppi mutanti con delezioni nel gene *sigL* mostrano una crescita ridotta a basse temperature e in presenza di elevate concentrazioni di sale o acido lattico, mentre a seguito di delezioni di *sigH* si osserva una ridotta crescita in condizioni di alcalinità. Tuttavia, delezioni di *sigL*, *sigH* e *sigC* non sono accompagnate da alterazioni evidenti nel fenotipo. È stato ipotizzato che tali fattori di regolazione alternativi siano 'ridondanti', cioè che siano importanti solo per specifiche funzioni biologiche o in particolari condizioni ambientali e che si compensino tra loro [110]. Invece, σ^B svolge un importante ruolo nella regolazione dell'espressione di geni implicati nella sopravvivenza in situazioni di stress (ambiente esterno e condizioni relative alla conservazione

degli alimenti) e nel tratto gastrointestinale dell'ospite [127]. Oltre 150 geni in *L.monocytogenes* 10403S e 100 in *L. monocytogenes* EGD-e sono regolati da σ^B [28]. Inoltre, insieme a PrfA controlla importanti fattori di virulenza, tra cui l'operone InLAB. La trascrizione di σ^B può essere indotta da stress ambientali (es. shock termici, acidità, sali, stress ossidativo, ecc.) o stress energetici (carenze di fonti di carbonio, fase di crescita stazionaria, carenze energetiche, ecc.). Esso media la resistenza a basse temperature, in quanto agisce sul meccanismo di trasporto di betaina e carnitina. Mutanti *sigB* mostrano una ridotta acido resistenza durante la fase stazionaria, per alterazioni del sistema della glutammato decarbossilasi (GAD) [69; 74]. Regolando l'espressione di operoni implicati nell'apporto di soluti osmoprotettivi come OpuC (operon of osmoprotectant uptake) è determinante per la resistenza a stress osmotico [114]. Anche BilE risulta σ^B dipendente, analogamente al sistema di trasporto di osmoliti Ctc. Recenti studi hanno dimostrato che σ^B è cruciale per la sopravvivenza di *L. monocytogenes* nel tratto gastrointestinale, in quanto Bsh (idrolasi dei sali biliari) e BilE (sistema di estrusione) sono σ^B dipendenti [73; 74]. Inoltre, nonostante il promotore *bsh* presenti sia una probabile PrfA box che un sito di legame per σ^B , ad elevate concentrazioni di bile (3%), σ^B svolge un ruolo di primaria importanza, probabilmente a causa di meccanismi di cross protezione a seguito dell'esposizione a più di un singolo fattore di stress [128]. Inoltre, è ipotizzabile che alimenti con alte quantità di glutammato (substrato di GAD) possano favorire la sopravvivenza all'acidità dello stomaco o alimenti con alti livelli di carnitina (target di opuC) possano aumentare la sopravvivenza nell'intestino [5]. Infine, σ^B risulta coinvolto indirettamente nell'antibiotico-resistenza, in quanto contribuisce al mantenimento dell'integrità della parete cellulare a seguito dell'esposizione a vancomicina [129].

Capitolo 2

Tipizzazione di *Listeria monocytogene*

2.1 Metodi di tipizzazione di *L. monocytogenes*

All'interno di *L. monocytogenes* esiste un'elevata eterogeneità e molteplici tecniche sono state sviluppate per discriminare i diversi isolati batterici. Tra i metodi fenotipici più largamente utilizzati rientra la sierotipizzazione, che permette di individuare i diversi **sierotipi** (o serovar), quali 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7. Tale classificazione prevede test di agglutinazione basati sulla reazione antigene-anticorpo tra 15 antigeni somatici (O sottotipi I-XV) e 5 flagellari (H sottotipi A-E) con specifici antisieri [130]. Un'ulteriore tecnica di genotipizzazione, basata su multiplex-PCR, è stata messa a punto per semplificare tale identificazione. Essa distingue i ceppi in 4 **sierogruppi** associati ai sierotipi: Gruppo 1 (sierotipi 1/2a e 3a), Gruppo 2 (1/2c e 3c), Gruppo 3 (1/2b, 3b e 7) e Gruppo 4 (4b, 4d e 4e) [131]. Tuttavia, non distingue i sierotipi 1/2a da 3a, 1/2c da 3c, 1/2b da 3b e 7, o 4b da 4d e 4e, né separa 4a e 4c dalle altre specie di *Listeria* spp. Essendo i sierotipi 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d e 7 estremamente rari e poiché circa il 96% dei ceppi isolati da alimenti e casi clinici sono 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, tale limitazione è irrilevante dal punto di vista epidemiologico [132]. Numerosi studi basati su metodi fenotipici e molecolari hanno permesso di individuare diverse **divisioni genomiche** all'interno di *L. monocytogenes*. Uno dei primi studi, basato su MLEE (multilocus enzyme electrophoresis), aveva individuato due distinti gruppi filogenetici, quali la Divisione genetica I (contenente i sierotipi 1/2b, 4b e 4a) e II (1/2a e 1/2c) [133]. Successivamente, per mantenere la designazione iniziale, diversi autori hanno continuato a riferirsi alla linea genetica che include i sierotipi 1/2b e 4b come lineage I e alla divisione genetica contenente 1/2a e 1/2c come lineage II, mentre altri autori hanno applicato una diversa nomenclatura (Tab. 1).

Tabella 1 Linee genetiche evolutive in *L. monocytogenes* e denominazioni utilizzate [13]

Year of publication	Name for...				Reference
	Lineage I (serotypes 1/2b, 4b, and 3b)	Lineage II (serotypes 1/2a, 1/2c, and 3c)	Lineage III (serotypes 4a, 4c, and atypical 4b)	Lineage IV (serotypes 4a, 4c, and atypical 4b)	
May 1989	Division I	Division II	Not reported; one serotype 4a isolate was grouped with lineage I	Not reported	Piffaretti et al. (1989)
June 1989	Group B (serotypes 1/2b, 4b, and 3b)	Group A (serotypes 1/2a, 1/2c, and 3a)	Not reported	Not reported	Bibb et al. (1989)
1990	ETGB	ETGA	Not reported	Not reported	Bibb et al. (1990)
1991	Sequence type 1	Sequence type 2 (2A and 2B)	Not reported	Not reported	Rasmussen et al. (1991)
1992	Genotype 2	Genotype 1	Not reported	Not reported	Vines et al. (1992)
1992	Group B	Group A	Not reported	Not reported	Gutekunst et al. (1992)
1993	Cluster I	Cluster II	Not reported	Not reported	Nørrung and Skovgaard (1993)
1994	Division II (serotypes 1/2b, 3b, 4b, 4d, and 4e)	Division I (serotypes 1/2a, 1/2c, 3a, and 3c)	Not reported	Not reported	Brosch et al. (1994)
1995	Sequence type 1	Sequence type 2	Sequence type 3	Not reported	Rasmussen et al. (1995)
1997	Lineage I	Lineage II	Lineage III	Not reported	Wiedmann et al. (1997)
2004	Lineage II	Lineage I	Lineage III	Not reported	Doumith et al. (2004)
2006	Lineage I	Lineage II	Lineage IIIA and IIIC	Lineage IIIB	Roberts et al. (2006)
2008	Lineage I	Lineage II	Lineage III	Not reported	Ragon et al. (2008)
2008	Lineage I	Lineage II	Lineage III	Lineage IV	Ward et al. (2008)

Successivamente studi di microarrays hanno individuato la linea genetica III, che non include solo i sierotipi 4a e 4c, ma anche alcuni ceppi 4b atipici [13]. Ciò è stato confermato combinando la multiplex PCR secondo Doumith et al. (2004) con dati di sequenziamento di *sigB*, confermando la presenza della lineage III e discriminando ceppi di sierotipo 4b (lineage

I), associati a casi di listeriosi nell'uomo, da ceppi sierotipo 4b rari (lineage III) [134]. Altri Autori hanno indicato che la linea genetica III può essere ulteriormente divisa in tre sottogruppi: IIIA, costituito da sierotipi virulenti 4a ramnosio-positivi e 4c tipicamente avirulenti; IIIC, con ceppi atipici serovar 4c ramnosio-negativi; IIIB, rappresentato da isolati ramnosio-negativi virulenti, serovar non-4a e non-4c. Quest'ultimo potrebbe costituire una nuova sottospecie [13]. È stato suggerito che gli isolati precedentemente classificati come IIIB possano costituire la linea genetica IV, mettendo in evidenza la loro diversità filogenetica rispetto alle altre lineage [135]. In generale, si può affermare che esistono 3 principali **linee genetiche** in *L. monocytogenes*: lineage I, che raggruppa i sierotipi 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e; lineage II, con 1/2a, 1/2c, 3a, 3c e lineage III, composta dai serovars 4a e 4c. I ceppi della lineage IV sono estremamente rari e spesso esclusi da studi filogenetici [13]. La rivoluzione nelle indagini epidemiologiche scaturita dall'introduzione del sequenziamento del DNA, ha aperto nuove strade per la comprensione della struttura genetica delle specie batteriche. In particolare, dal confronto dei dati di sequenziamento del genoma completo di ceppi di *L. monocytogenes* con sierotipo 4b e 1/2a è emerso che essi sono caratterizzati rispettivamente da 51 e 83 geni. Analogamente, dal confronto del genoma di 93 ceppi attraverso tecniche di DNA microarrays, è emersa una distribuzione in 3 distinte linee genetiche, con i sierotipi 4b, 1/2b e 3b ritrovati prevalentemente nella lineage I e i sierotipi 1/2a, 1/2c e 3c nella linea II, confermando i precedenti dati di tipizzazione molecolare [136]. La sierotipizzazione basata su test di agglutinazione è ancora richiesta per il monitoraggio epidemiologico quale primo livello di discriminazione, nonostante sia dispendiosa in termini economici e di tempo e presenti fattori di confondimento, in quanto l'attività metabolica dei microrganismi è variabile ed influenzata dalle condizioni di crescita. Nonostante le difficoltà di standardizzazione tra laboratori e l'incapacità di identificare alcuni isolati, allo stesso tempo rimane una tecnica determinante dal punto di vista clinico per le dettagliate informazioni che riesce a fornire [4; 137]. Numerose tecniche di tipizzazione sono state sviluppate a supporto degli studi epidemiologici e per la caratterizzazione di *L. monocytogenes*, tra cui metodi fenotipici (es. multilocus enzyme electrophoresis MLEE) e tecniche molecolari basate su PCR e/o restrizione enzimatica (es. multiplex-PCR, repetitive element PCR, Random Amplified Polymorphic DNA, ribotyping, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Amplified Fragment Length Polymorphism) o metodi più complessi di analisi di sequenza (es. Multilocus Sequence Typing, Single Nucleotide Polymorphism typing e Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis) [4]. Grazie alla soddisfacente correlazione tra i più diffusi metodi di tipizzazione molecolare con le Linee genetiche individuate nell'ambito di *L. monocytogenes* è possibile distinguere tra loro gli isolati senza ricorrere necessariamente a complessi dati filogenetici (es. dati di

sequenziamento) [13]. Ne sono un esempio i metodi basati su enzimi di restrizione, che riescono a valutare le differenze esistenti tra i ceppi dnell'intero genoma. Attualmente il metodo di riferimento per la tipizzazione molecolare di *L. monocytogenes* è la Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), utilizzata nell'ambito del PulseNet e indicata dall'EFSA per la tipizzazione dei patogeni di origine alimentare [12; 50]. Ulteriori metodiche tra cui la AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) sono in grado di identificare le caratteristiche molecolari dei diversi ceppi batterici, valutandone le correlazioni genetiche [4; 15]. Essa è largamente utilizzata, anche come tecnica di routine di laboratorio, soprattutto per l'elevato potere discriminante e la riproducibilità.. Inoltre, non necessita di informazioni relative alle sequenze del DNA target per la costruzione di primer specifici. Data la diffusa presenza di *L. monocytogenes* e l'estrema variabilità nella virulenza, la tipizzazione di isolati è indispensabile per stabilire i legami epidemiologici nell'ambito della sorveglianza di routine o durante le indagini su eventi epidemici, per individuare le sorgenti d'infezione e tracciare le vie di trasmissione [4; 12].

2.2 Single Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism (sAFLP)

Tra i metodi utilizzati per la tipizzazione a fini epidemiologici/tassonomici di batteri patogeni rientra la tecnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), tecnica introdotta nel 1995 che combina la digestione del DNA mediante enzimi di restrizione con l'amplificazione selettiva dei frammenti ristretti usando primers specifici e complementari alle sequenze di taglio. Può essere applicata a tutti gli organismi viventi e permettere l'analisi simultanea di un grande numero di loci genetici casuali sfruttando inneschi oligonucleotidici a sequenza nota arbitraria. Nell'ambito delle tecniche di AFLP, la Single Amplified Fragment Length Polymorphisms (sAFLP), caratterizzata dall'utilizzo di un unico enzima di restrizione, viene utilizzata nella biotipizzazione di *L. monocytogenes*. Le endonucleasi di restrizione riconoscono specifiche sequenze nucleotidiche ed effettuano un taglio sulla doppia elica, in quanto sono in grado di idrolizzare i legami fosfodiesterici tra due residui nucleotidici adiacenti. L'enzima **EcoRI** è una endonucleasi di classe II ad elevata specificità, isolata da *Escherichia coli* RY13; è in grado di tagliare il DNA a doppia elica in corrispondenza di una data sequenza di 6 nucleotidi (5'-GAATTC-3') e in maniera asimmetrica con formazione di estremità definite coesive, in quanto il taglio è sfalsato e le estremità 5' sono più lunghe di quelle 3' (Fig. 19). Nella metodica sAFLP (Fig. 20),

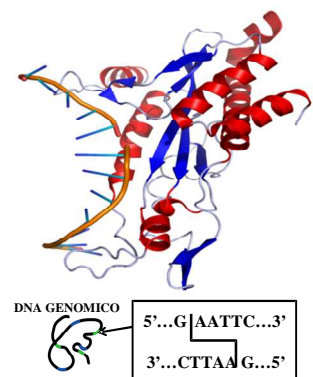
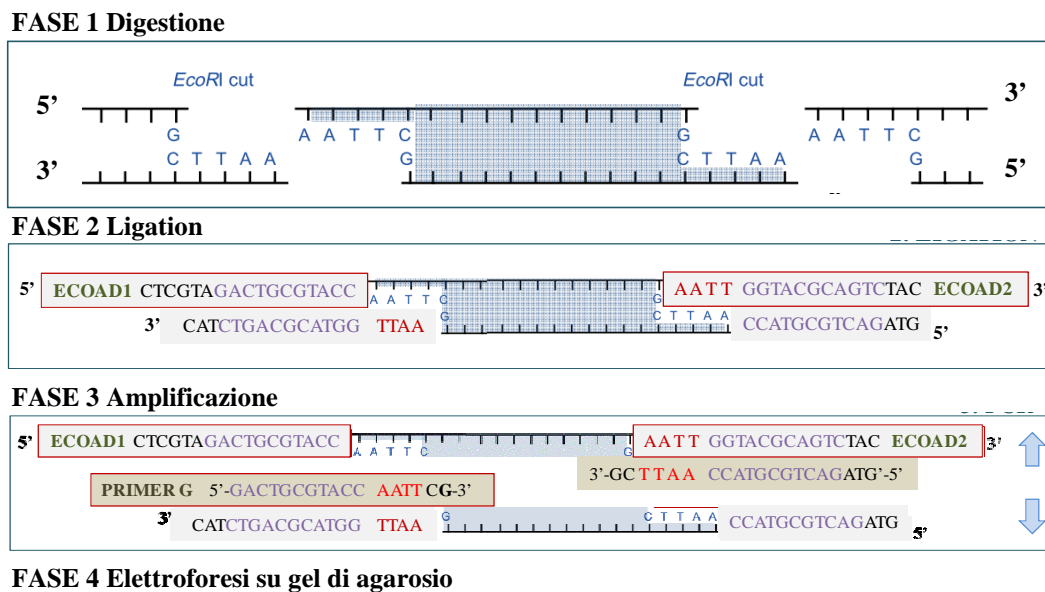


Figura 19
Struttura cristallina di EcoRI e sito di restrizione

l'enzima EcoRI viene utilizzato per la **digestione** del DNA genomico producendo frammenti di restrizione di lunghezza differente a seconda della distanza tra due siti bersaglio consecutivi. I frammenti ottenuti sono poi sottoposti a **ligation** mediante Ligase, enzima in grado di legare tramite legami fosfodiesterici le estremità di molecole di DNA o porzioni interne di DNA dove sono presenti delle interruzioni. La ligase permette quindi agli adattatori di legarsi alle estremità dei frammenti di restrizione. La sequenza degli **adattatori** oligonucleotidici a doppio filamento comprende un'estremità coesiva con il sito di restrizione ed una sequenza enzimatica-specifica, che funge da sito di appaiamento per un determinato primer [138; 139].

Figura 20 Fasi della metodica sAFLP



La ligation avviene in presenza dell'enzima di restrizione in modo da tagliare eventuali unioni tra frammenti e consentendo la sola unione tra frammenti ed adattatori. Tale legame altera il sito di restrizione impedendo che una seconda restrizione abbia luogo a ligation avvenuta. Gli adattatori sono, inoltre, realizzati in modo tale da non ricreare ulteriori siti riconosciuti dagli enzimi di restrizione. I frammenti ligati sono infine amplificati mediante reazione di PCR (**amplificazione selettiva**) utilizzando un primer complementare alle sequenze dei siti di restrizione e degli adattatori ed avente all'estremità 3' uno o più nucleotidi scelti arbitrariamente (es. G). Restrizione e ligation sono in grado di generare migliaia di frammenti, ma la complessità del genoma può essere ridotta ricorrendo a primer selettivi; solo i frammenti che posseggono tutti i nucleotidi selettivi saranno amplificati. Dopo la PCR, i frammenti sono separati in base al peso molecolare mediante **elettroforesi** su gel di agarosio. L'origine dei polimorfismi di AFLP può essere attribuita a differenti cause, tra cui mutazioni nel genoma o a livello del sito target, con **creazione o abolizione di uno o più siti di restrizione**. Inoltre, la distribuzione dei siti di restrizione è variabile nel genoma, per cui ogni ceppo genera un profilo caratteristico (**fingerprint**).

2.2.1 Elettroforesi degli acidi nucleici e Capillary Gel Electrophoresis (CGE)

L'elettroforesi è una metodica largamente utilizzata per la separazione degli acidi nucleici (DNA e RNA). In tale tecnica, molecole elettricamente cariche immerse in una soluzione elettrolitica e sotto l'influenza di un campo elettrico migrano verso il polo di carica opposta. Gli acidi nucleici all'interno di un tampone alcalino o neutro si comportano come molecole cariche negativamente per la presenza di gruppi fosfato (anioni), quindi migrano verso il polo positivo. La separazione può essere realizzata in soluzione libera, come avviene nell'elettroforesi capillare, ma molto più diffuso è l'utilizzo di un supporto solido generalmente costituito da una matrice di **agarosio**; la **poliacrilammide** si utilizza per frammenti di peso molecolare inferiore o di dimensioni simili tra loro. La velocità di migrazione dipende dal peso molecolare, in quanto le maglie del gel di agarosio oppongono una certa resistenza al movimento; molecole più grandi incontrano più difficoltà nell'attraversare i pori, al contrario di quelle di dimensioni inferiori. Sono stati sviluppati diversi sistemi alternativi all'elettroforesi su gel di agarosio, molti dei quali basati su **elettroforesi capillare ad alta risoluzione** (High Performance Capillary Electrophoresis o HPCE). Tali tecniche si avvalgono di capillari di piccolo diametro, generalmente in silice fusa; mediante l'applicazione di un campo elettrico ad alta intensità, le molecole sono separate in base a carica, dimensioni o idrofobicità. Esistono diversi tipi di HPCE, tra cui Capillary Zone Electrophoresis (CZE), Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC), Capillary Gel Electrophoresis (CGE), Capillary Isoelectric Focusing (CIEF), Capillary Isotachopheresis (CITP), ecc. [140; 141]. L'elettroforesi capillare ad alta risoluzione sfrutta la migrazione differenziata di molecole elettricamente cariche all'interno di un campo elettrico e tale processo si realizza all'interno di un capillare di silice fusa di diametro ridotto, contenente un appropriato tampone, alle cui estremità è applicata una differenza di potenziale. Una piccola quantità di campione viene introdotta dall'estremità anodica del capillare e, grazie al campo elettrico, le molecole migrano con velocità differenti lungo il canale: i cationi (+) verso il catodo (-), mentre gli anioni (-) si muovono verso l'anodo (+). In particolare, la differenza di potenziale applicata agli elettrodi genera un **gradiente di potenziale (E)**:

$$E = dV/d$$

dove ΔV = differenza di potenziale d = distanza fra gli elettrodi

La particella carica posta nel campo elettrico è soggetta a due tipi di forze opposte e la sua velocità di migrazione dipende dall'equilibrio che si instaura tra di esse:

- forze di spinta del campo elettrico (F_s) $F_s = q \times E$

dove q = carica elettrica della molecola E = gradiente di potenziale

(F_s è direttamente proporzionale a q ed E : maggiore è il gradiente di potenziale E , maggiore è la spinta)

- forze frenanti fra ioni e mezzo circostante (Ff) $F_f = 6\pi\eta r \times v$
- dove $6\pi\eta r$ = legge di Stokes
 r = raggio delle particelle
 η = viscosità del mezzo
 v = velocità di migrazione elettroforetica

Una velocità di migrazione costante (v) si raggiunge in condizioni di equilibrio tra la forza di spinta (F_s) e la forza frenante (F_f), cioè quando:

$$F_s = F_f$$

$$q \times E = 6\pi\eta r \times v$$

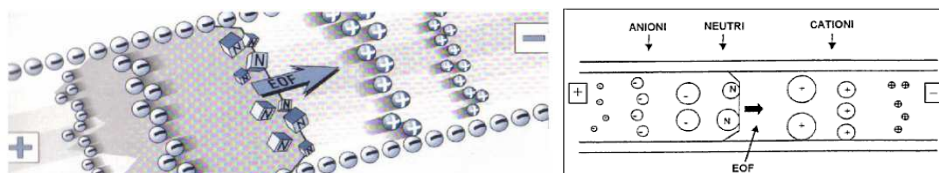
$$v = q \times E / 6\pi\eta r$$

(velocità elettroforetica v è direttamente proporzionale a q e E ed è inversamente proporzionale a η ed r)

Se le particelle sono sottoposte allo stesso campo elettrico ed immerse nello stesso mezzo: E ; 6π ; $\eta = K$ (costanti) da cui: v (velocità elettroforetica) = $K \times q / r$

Di conseguenza, la **velocità elettroforetica** dipende dal rapporto carica/raggio. Poiché il raggio di una molecola è proporzionale al peso molecolare, la velocità elettroforetica dipende dal rapporto massa/carica. Quindi le molecole sono separate in base alle diverse velocità di migrazione elettroforetica, quindi in funzione del peso molecolare. Tuttavia, le particelle sono soggette ad un **Flusso elettrosmotico (EOF)** dovuto alla ionizzazione della silice che costituisce il capillare. Infatti, sulla parete interna del capillare sono presenti gruppi silanolici (SiO^-) ionizzati negativamente che attraggono gli ioni positivi della soluzione elettrolitica dando origine ad una struttura a doppio strato piuttosto stabile. Applicando agli estremi del capillare una differenza di potenziale i cationi del doppio strato elettrico (mobili) migrano verso il catodo trascinando la nube di idratazione e generando un flusso tanto più intenso quanto più elevato è il pH della soluzione tampone. Tale flusso forza tutti gli ioni della verso il catodo con velocità diversa in base a carica e massa. In prossimità del catodo le molecole attraversano un dispositivo di rilevazione, per cui il risultato finale è un elettroferogramma, in cui il segnale è in funzione del tempo di migrazione. Il flusso EOF è caratterizzato da un profilo del fronte piatto, ovvero uniforme in tutto il diametro del capillare (Fig. 21).

Figura 21 Schematizzazione del flusso elettrosmotico (EOF) all'interno del capillare



Per una corretta separazione è necessario controllare opportunamente EOF (pH, temperatura, utilizzo di rivestimenti interni nel capillare, ecc.). Infatti, uno dei problemi che potrebbe verificarsi è l'interazione tra i gruppi silanolici presenti sulla superficie interna del capillare e le molecole da separare, soprattutto se di grandi dimensioni. Tali interazioni determinano scarsa efficienza e asimmetria dei picchi e, nei casi estremi, possono dare luogo all'adsorbimento

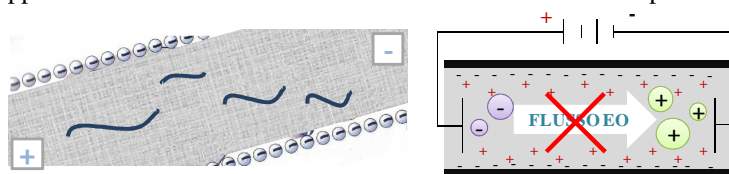
irreversibile dell'analita sulla superficie interna del capillare. Tra le tecniche di elettroforesi capillare (CE), l'**Elettroforesi Capillare su gel** (Capillary Gel Electrophoresis-CGE) realizza la separazione secondo quanto precedentemente descritto, ma utilizzando un polimero (poliacrilammide, dimetilacrilammide, polietilenossido o idrossietilcellulosa) che funge da 'setaccio molecolare' e in grado di sopprimere il flusso elettrosmotico (Fig. 22). In particolare:

$$V \text{ (vel elettrocinetica)} = v \text{ (vel. elettroforetica)} + v \text{ (vel. elettrosmotica)}$$

$$v \text{ (vel. elettrosmotica)} = 0$$

$$V \text{ (velocità elettrocinetica)} = v \text{ (velocità elettroforetica)}$$

Figura 22 Soppressione del flusso elettrosmotico mediante utilizzo di un polimero nel capillare

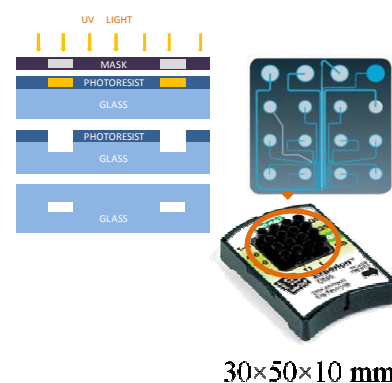


Quindi, nell'elettroforesi capillare su gel la separazione dipende dal peso molecolare (bp). Nei micro canali del chip, gli acidi nucleici sono separati in base alle diverse velocità di migrazione e, quindi, del peso molecolare come nell'elettroforesi su gel di agarosio. Alte efficienze si ottengono con campi elettrici elevati e piccole lunghezze del capillare.

2.2.2 Elettroforesi microfluidica automatizzata mediante sistema Experion™

Il sistema Experion™ (Bio Rad) sfrutta i principi dell'elettroforesi capillare su gel (**Capillary Gel Electrophoresis-CGE**) in combinazione con tecnologia **Lab-on-a-chip** (LOC) e lavorando in maniera del tutto automatizzata. I dispositivi LOC sono microsistemi complessi che coniugano tutte le funzioni generalmente svolte da strumentazione da banco in un unico dispositivo realizzato su un supporto monolitico, tipicamente silicio cristallino, e assemblato con altri materiali compatibili, quali silicio poroso, vetro o polimeri, aventi ciascuno una propria specifica funzionalità. Il chip è costituito da una piccola piastra di vetro inciso con numerosi canali miniaturizzati (50 µm di larghezza e 10 µm di profondità) opportunamente interconnessi (Fig. 23).

Figura 23 Processo di realizzazione del chip utilizzato nella Capillary Gel Electrophoresis. Il chip viene realizzato mediante fotolitografia/incisione chimica. Uno strato di biossido di silicio viene ricoperto con un sottile film di polimero organico fotosensibile. Al di sopra viene applicata una maschera resistente ai raggi UV e viene irradiato con della luce ultravioletta. Si rimuove la maschera protettiva e, mediante lavaggio con opportuno solvente, le parti del polimero sensibile alla luce vengono selettivamente eliminate, lasciando scoperto lo strato di SiO₂ sottostante. Le parti del polimero coperte dalla maschera, non colpite dalla radiazione ultravioletta, sono meno solubili al successivo lavaggio, di quelle ricoperte dalla maschera. In corrispondenza delle zone del polimero rimosse, vengono incisi dei canali. Infine, si ricopre con un ulteriore strato di vetro, ottenendo micro canali all'interno dello strato.



Per la realizzazione dell'elettroforesi viene utilizzato un opportuno Kit (scelto in base al tipo e

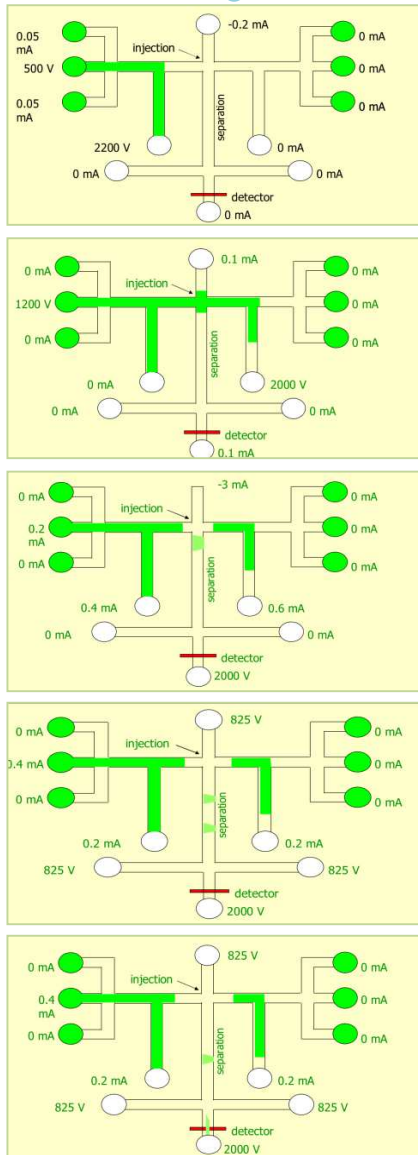
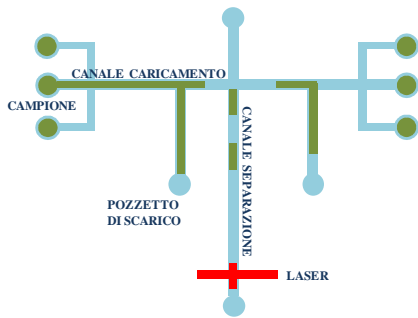


Figura 24 Separazione elettroforetica all'interno dei micro canali del chip

La presenza del gel sopprime il flusso elettrosmotico per cui la separazione è dovuta solo al peso molecolare degli acidi nucleici. Il campione viene inviato lungo il canale di caricamento per effetto della differenza di potenziale e una piccola frazione di esso viene convogliata verso il 'canale di separazione', in cui avviene la separazione elettroforetica. La frazione non utilizzata a fini analitici viene raccolta in un pozzetto di scarico.

quantità di campione da analizzare) che include chip e reagenti, tra cui uno specifico ladder, gel, colorante e buffer. Nel chip viene introdotta una miscela (gel-stain solution GS) costituita da un polimero (che sostituisce il gel di agarosio) e da un colorante fluorescente in grado di legare gli acidi nucleici intercalandosi tra le basi azotate.

In questo modo DNA o RNA possono essere rilevati dal laser a fluorescenza indotta (Photodiode, 635 nm excitation) che costituisce il sistema di rilevazione dello strumento. Mediante una specifica combinazione di tempo/pressione tale miscela (GS) viene iniettata fino a riempire completamente la rete di micro canali strettamente interconnessi del chip. Inoltre, durante tale fase, il dispositivo rileva e regola automaticamente la temperatura, che rappresenta un parametro fondamentale per garantire la riproducibilità dell'analisi a causa dell'elevata viscosità del gel. Una piccola quantità di campione (1µl) viene introdotta nel chip, insieme ad uno specifico buffer e la successiva separazione elettroforetica si realizza applicando una

differenza di potenziale alle estremità del capillare. Infatti, gli elettrodi di platino presenti nel coperchio dello strumento, che pescano nei pozzetti del chip, controllano la tensione applicata

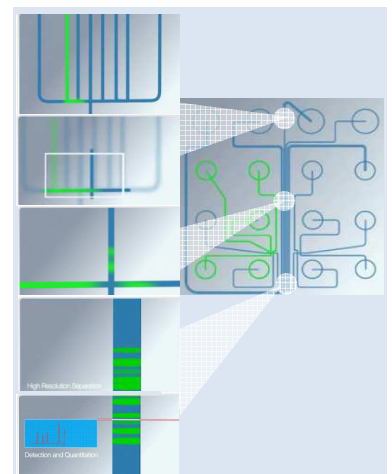


Figura 25 Percorso del campione all'interno del chip fino al detector

Inoltre, analogamente a quanto accade nell'elettroforesi tradizionale, il campione precedentemente marcato con il colorante fluorescente, subisce anche un passaggio di 'destaining' prima di raggiungere il detector (Fig. 24). Nella parte terminale del canale di

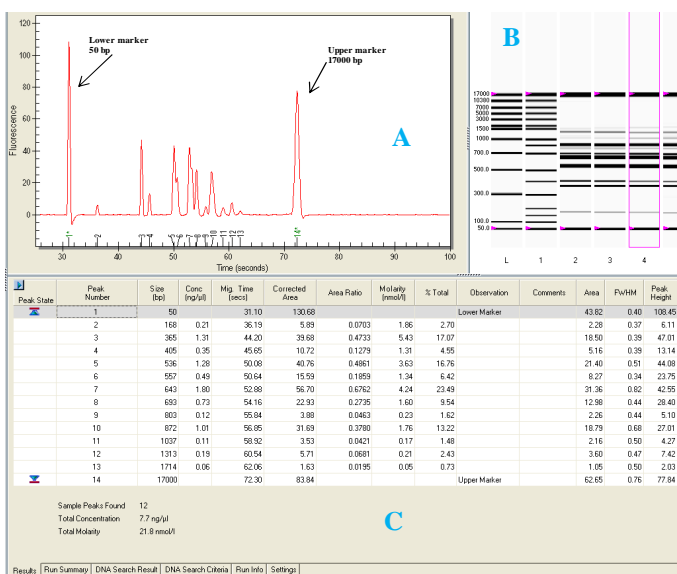


Figura 26 Risultati forniti dal sistema Experion™ (Experion™ DNA 12K analysis kit). A) elettroferogramma; B) gel virtuale; C) tabella riassuntiva

separazione, il laser a fluorescenza eccita il colorante provocando l'emissione di un segnale di fluorescenza qualora esso sia legato agli acidi nucleici (complesso DNA o RNA/colorante). Un fotodiodo rileva la fluorescenza e registra l'uscita del campione. Infine, il software mette in grafico l'intensità di fluorescenza in funzione del tempo uscita del campione generando un elettroferogramma (Fig. 25). Il primo risultato elaborato dallo strumento è relativo al ladder, precedentemente caricato nel chip

insieme ai campioni e agli altri reagenti. I risultati relativi a 11-12 campioni si ottengono in 30-40 minuti in un unico passaggio, in quanto è sufficiente caricare i reagenti e i campioni nel chip e avviare lo strumento. Al termine della separazione elettroforetica mediante sistema automatizzato Experion™, il software sottrae il rumore di fondo, identifica ed integra i picchi ottenuti costruendo uno specifico e caratteristico elettroferogramma per ciascun campione. Oltre ad elaborare i risultati sotto forma di elettroferogramma (Fig. 26; A), in cui è riportata l'intensità di fluorescenza in funzione del tempo di eluizione, il software converte i dati in un'immagine densitometrica, simile ad un gel di agarosio (gel virtuale) (Fig. 26; B). Inoltre, a ciascun campione è associata anche una tabella riassuntiva (Fig. 26; C), in cui sono riportate numericamente tutte le informazioni quali/quantitative relative a ciascun picco dell'elettroferogramma e i parametri statistici calcolati dal software. L'elettroferogramma che si ottiene dalla separazione elettroforetica di DNA utilizzando *Experion™ DNA 12K analysis kit* è costituito dai picchi generati dai frammenti di DNA contenuti nel campione (ampliconi di PCR, frammenti di restrizione, ecc.), insieme a due picchi relativi ai markers interni (**upper marker** e **lower marker**): ciascun elettroferogramma è delimitato da un lower (100 bp) e un upper (12000 bp) marker. Tali riferimenti interni sono utilizzati per normalizzare i tempi di migrazione tra i campioni al fine di compensare le piccole variazioni nei tempi di uscita dei campioni caricati nei differenti pozzetti del chip. Lower e upper marker sono contenuti nel loading buffer e sono riportati anche nell'immagine del gel virtuale. L'elettroferogramma

generato dal **12K DNA ladder** è, invece, utilizzato dal software per il calcolo del peso molecolare dei frammenti (espresso in bp). Esso contiene 13 frammenti di peso molecolare noto ed è delimitato dai due markers interni. Il software costruisce una curva standard dei tempi di migrazione in funzione della dimensione dei frammenti ottenenti dalla separazione del ladder e calcola il peso molecolare dei frammenti di DNA del campione comparando i loro tempi di migrazione con la curva standard. L'upper marker rappresenta anche lo standard interno per l'**analisi quantitativa**. Infatti, poiché l'area del picco è proporzionale alla quantità di DNA, il software determina *percentuale* e *concentrazione* di ciascun frammento confrontando l'area del picco dell'upper marker con l'area di ogni singolo picco dell'elettroferogramma. La **percentuale** indica la quantità di ciascun frammento rispetto all'area totale di tutti i frammenti che compongono il campione (% sul totale), mentre la **concentrazione** di ogni frammento viene ricavata comparando la sua area con il rapporto tra concentrazione e area del picco dell'upper marker:

$$[\text{ng}/\mu\text{l}]_{\text{picco}} = [\text{ng}/\mu\text{l}]_{\text{upper marker}} \times \text{Area}_{\text{picco}} / \text{Area}_{\text{upper marker}}$$

Inoltre, il software applica un fattore di correzione ricavato dai rapporti tra concentrazione e area per tutti i frammenti del DNA 12K ladder. Infatti, poiché la quantità di colorante che si lega agli acidi nucleici aumenta linearmente con l'aumentare del loro peso molecolare, l'effettiva composizione dei frammenti di DNA può incidere sulla quantità di colorante incorporato, soprattutto per i frammenti più piccoli. Grazie al fattore di correzione, si tiene conto della relazione tra intensità di fluorescenza e peso molecolare. La concentrazione è, infine, convertita in molarità tramite l'equazione:

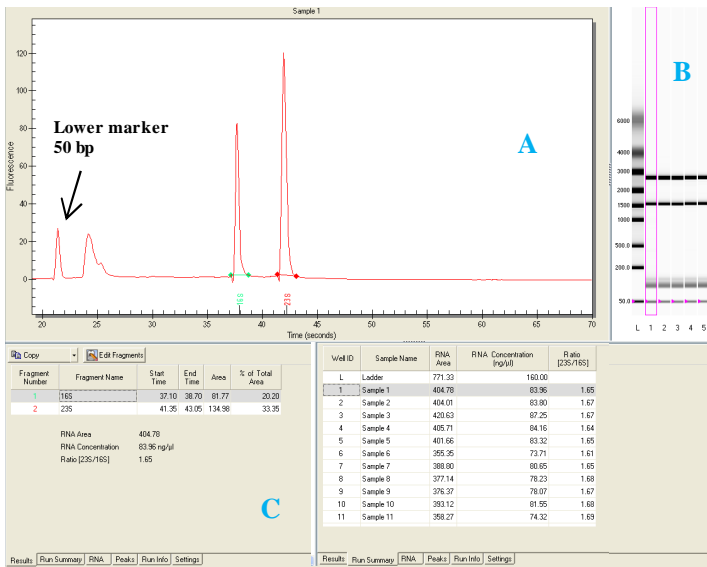
$$\text{Molarità}(\text{nmol/L}) = [\text{ng}/\mu\text{l}]_{\text{picco}} / (660 \times \text{peso molecolare del picco Kbp}) \times 10^6$$

(660 è una media della massa atomica)

Una delle principali applicazioni dell'elettroforesi microfluidica automatizzata riguarda la valutazione di integrità e purezza dell'RNA. In generale, la misura dell'assorbanza a 260 nm (A_{260}) permette di calcolare la concentrazione di RNA, mentre valori superiori a 1,8 del rapporto A_{260}/A_{280} sono indice di RNA non degradato e non contaminato. Inoltre, la purezza può essere verificata mediante elettroforesi su gel, che permette di visualizzare le bande relative alle due subunità ribosomiali. Mediante elettroforesi microfluidica automatizzata tali parametri possono essere ricavati in un'unica analisi ed in maniera accurata. Nel caso di RNA totale estratto da cellule procariotiche si utilizza *ExperionTM RNA Std Sens analysis kit*. L'elettroferogramma che ne deriva è costituito da due picchi relativi alle subunità 16S e 23S e dal picco relativo al marker interno (**lower marker**, 50 bp) (Fig. 27; A). Quest'ultimo è visibile anche nell'immagine del gel virtuale (Fig. 27; B), in quanto è contenuto nel loading

buffer ed è utilizzato per normalizzare i tempi di migrazione tra tutti i campioni caricati nei differenti pozzetti del chip.

Il software costruisce una curva standard dei tempi di migrazione in funzione della dimensione dei frammenti ottenenti dalla separazione del ladder (**RNA ladder**, costituito da nove picchi tra 200-6000 nt, incluso il lower marker) e calcola il peso molecolare dei due picchi delle due



unità ribosomiali del campione comparando i loro tempi di migrazione con la curva standard. Quindi, tali picchi di interesse vengono identificati e integrati automaticamente dal software. Nella tabella fornita dal software, sono riportate le caratteristiche qualitative di ciascun campione analizzato. In particolare, il software calcola automaticamente il rapporto percentuale tra le subunità ribosomiali 23S e 16S per tutti i campioni (Fig.

Figura 27 Risultati forniti dal sistema Experion™ (Experion™ RNA Std Sens analysis kit). A) elettroferogramma; B) gel virtuale; C) tabella riassuntiva delle caratteristiche delle subunità 16S e 23S

27; C). Tale valore indica lo stato di integrità dell'RNA e dovrebbe essere circa 2:1. In presenza di RNA degradato tale rapporto tende ad assumere valori più bassi e i picchi 16S e 23S non risultano visibili (Fig. 28).

La presenza di ulteriori picchi è indice di contaminazione (es. presenza di proteine, DNA genomico, tRNA, ecc.) e quindi di scarsa purezza dell'RNA. La **quantificazione** dell'RNA (ng/μl) viene effettuata confrontando l'area sottesa dall'elettroferogramma del campione (escluso il lower marker) con quella sottesa dall'elettroferogramma del ladder, essendo nota la sua concentrazione (160 ng/μl).

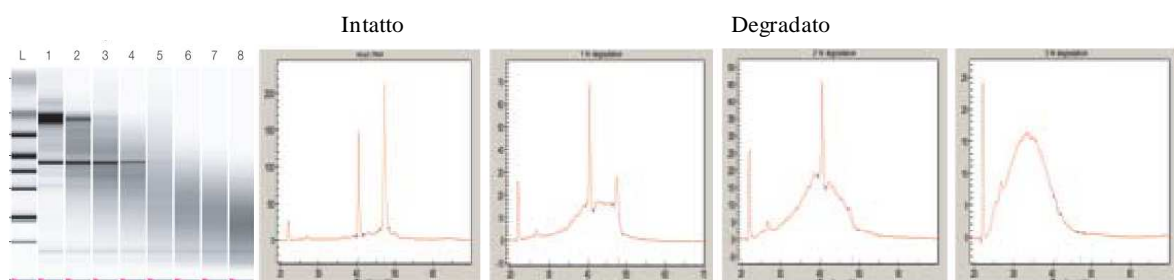


Figura 28 Virtual gel ed elettroferogrammi relativo a campioni di RNA con integrità decrescente

Capitolo 3

Tecniche di Real-time PCR

3.1 Real-time PCR

La Real-Time PCR è una metodica di recente introduzione altamente sensibile ed accurata che permette l'identificazione in tempo reale dei prodotti di amplificazione. Essi sono misurati durante la fase esponenziale della PCR, quando l'efficienza di amplificazione non è influenzata dalle variabili di reazione ottenendo risultati più accurati rispetto alla PCR tradizionale. La rilevazione è resa possibile dalla presenza di molecole fluorescenti e può essere effettuata

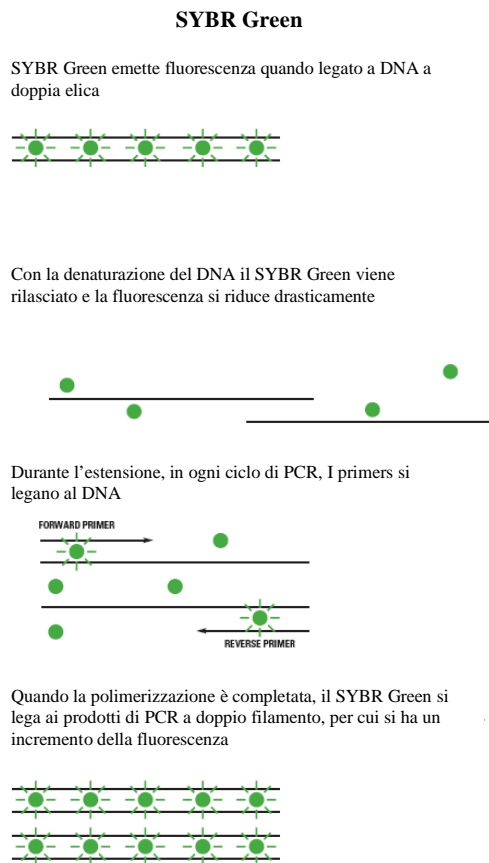


Figura 29 Legame tra SYBR Green e DNA e meccanismi di reazione

mediante sistemi aspecifici o specifici. Nel primo caso, si utilizzano molecole **intercalanti fluorescenti** (SYBR Green) che si legano in maniera aspecifica agli acidi nucleici a doppio filamento. Durante la PCR, la DNA polimerasi amplifica il target aumentando progressivamente la quantità di amplicone, a cui si lega il fluorocromo SYBR Green I. Solo dopo tale legame si determina un aumento di fluorescenza (eccitazione 488 nm, emissione 530 nm) proporzionale alla quantità di amplicato ottenuto (Fig. 29). Altri sistemi utilizzati sono le **sonde ad ibridazione**, specifiche per il frammento di interesse, marcate con molecole fluorescenti (Molecular beacons, Sonde FRET e Dual-labeled tra cui le sonde TaqMan), il cui vantaggio principale consiste nel rilevamento dei soli prodotti di amplificazione e nella

possibilità di realizzare saggi in multiplex-PCR. Le sonde TaqMan (o Double-Dye Oligonucleotide) sono le più utilizzate e sfruttano l'attività 5' nucleasica della Taq polimerasi per il rilevamento di uno specifico prodotto di PCR. Sono costituite da una breve sequenza oligonucleotidica a singolo filamento complementare ad una data regione target e presentano un fluorocromo reporter legato all'estremità 5' e un quencher all'estremità 3' (Fig. 30). Quando la sonda è intatta, la vicinanza del quencher riduce la fluorescenza emessa dal fluorocromo reporter, mediante il trasferimento spaziale dell'energia di risonanza di fluorescenza. Dopo l'annealing viene scissa dall'attività 5' nucleasica della Taq polimerasi e ciò allontana reporter e quencher, aumentando il segnale del reporter. Inoltre, viene rimossa la sonda dall'elica del target consentendo all'estensione del primer di procedere fino. Successivamente, altre molecole di reporter vengono separate a ogni ciclo di PCR con conseguente aumento dell'intensità della

fluorescenza. Maggiore è il numero di copie iniziali di DNA target, tanto prima si osserverà un aumento significativo della fluorescenza [142; 143]. Qualunque sia la chimica utilizzata, mettendo in funzione la fluorescenza con il numero di cicli di reazione, si ottiene una **curva di amplificazione** in cui dopo la fase iniziale si osservano una fase esponenziale (l'amplificazione con la massima efficienza), una fase lineare (l'efficienza comincia a diminuire) e un plateau (la reazione si arresta, in quanto i reagenti e l'attività della polimerasi si esauriscono). Per ciascuna curva di amplificazione viene fissata una linea soglia (**threshold**) che si discosta dal rumore di fondo ed interseca la curva generata dal campione nella fase esponenziale; il punto di intersezione tra threshold e curva di amplificazione rappresenta il **ciclo soglia (Ct)**. A differenza delle sonde ad ibridazione, la cui specificità

per la sequenza genica di interesse è assicurata dalla loro stessa natura, in saggi con SYBR Green, è necessario verificare tale specificità mediante **curva di melting**. Tale curva di dissociazione si ottiene riscaldando (dalla temperatura di annealing fino a 95°C) progressivamente i campioni al termine dell'amplificazione. In questo modo si ha un calo di fluorescenza fino a raggiungere la temperatura (al punto di flesso) in cui metà dell'amplificato si trova nello stato di doppia elica e metà in quello denaturato (T_m). Mettendo in grafico la derivata prima della fluorescenza con la temperatura, il flesso viene convertito in un picco unico: la presenza di picchi con tempi inferiori o maggiori di T_m indica eventuali dimeri di primers o prodotti aspecifici. Mediante l'utilizzo di sonde ad ibridazione è possibile amplificare più target nella stessa reazione con risparmio di tempo e di materiale; tuttavia, è importante ottimizzare

la reazione affinché l'amplificazione di una specie non sia dominante sull'altra, riducendone o impedendone l'efficiente amplificazione. Le sonde TaqMan sono le più utilizzate per multiplex-PCR.

3.2 La Real-time PCR quantitativa e qualitativa

La Real-Time PCR può essere utilizzata per indagini qualitative o quantitative. Nel primo caso si determina la presenza/assenza di un target (applicata per l'identificazione delle specie

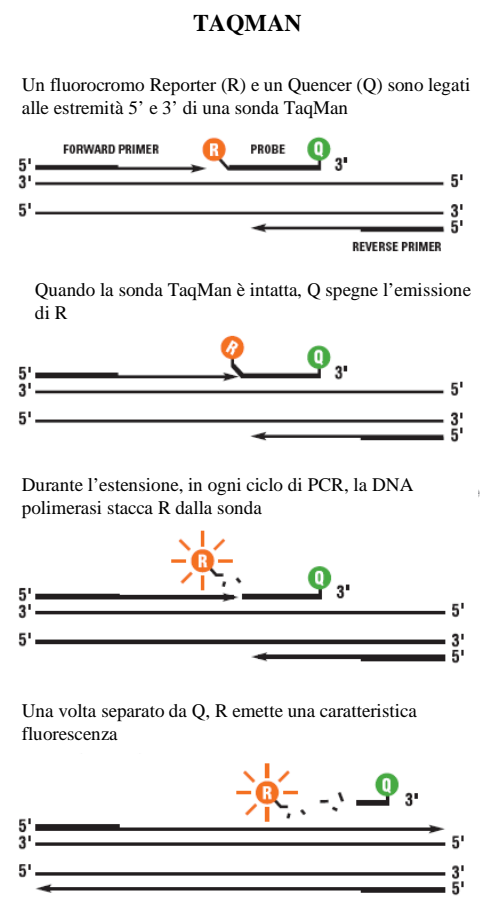


Figura 30 Funzionamento delle sonde TaqMan

microbiche, per la tipizzazione, per valutare la presenza di SNPs, ecc.), mentre nel secondo caso si quantificano i prodotti amplificati (analisi dell'espressione genica, per identificare e quantificare microrganismi patogeni, per la quantificazione di microRNA, ecc.). La quantificazione può essere assoluta o relativa; nella **quantificazione assoluta**, la quantità iniziale di template è determinata mediante interpolazione del Ct del campione ignoto con la retta di taratura realizzata con diluizioni seriali a concentrazione nota di uno standard esterno. La **quantificazione relativa** permette di valutare la quantità di template in relazione a quella di un riferimento interno (gene housekeeping), che viene amplificato nelle stesse condizioni. Per tale motivo non richiede una curva standard di campioni a concentrazione nota.

3.2.1 Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT PCR) ed espressione genica

La Real-Time PCR quantitativa in combinazione con la retrotrascrizione dell'mRNA è la tecnica più utilizzata in studi di espressione genica; tale approccio prende il nome di Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT PCR) ed è utilizzato anche per validare esperimenti di microarray, per il monitoraggio di biomarcatori e sta progressivamente sostituendo la metodica Northern blot [144; 145]. La metodica valuta l'espressione genica tramite il contenuto di mRNA per il gene di interesse presente nel campione e prevede alcune fasi preliminari, quali l'estrazione dell'RNA totale dal campione, la retro trascrizione e l'amplificazione del cDNA in Real-Time PCR. Per valutare e confrontare i livelli di espressione genica nei procarioti è importante partire da colture cellulari con caratteristiche prestabilite e costanti e l'estrazione dell'RNA deve avvenire in corrispondenza della fase di crescita esponenziale, in cui le condizioni colturali sono costanti, non si ha carenza di nutrienti e i livelli di RNA sono massimi per l'elevata attività metabolica, in quanto tutte le cellule si riproducono con tempi di generazione costanti. Bisogna, inoltre, considerare che le molecole di mRNA batterico hanno vita breve e si degradano rapidamente. La qualità dell'RNA totale estratto deve essere opportunamente valutata, in quanto indice dello stato di integrità dell'mRNA, che rappresenta solo il 3% circa dell'RNA totale. Ciò si realizza misurando il rapporto percentuale tra le subunità ribosomiali 23S e 16S mediante spettrofotometria ($OD_{260/280} > 1,8$), elettroforesi su gel o microfluidica [145]. Lo studio dell'espressione genica mediante qRT PCR prevede l'utilizzo di uno (o più) standard endogeno (**gene di riferimento** o housekeeping) che abbia un livello di espressione costante in tutti i campioni testati e non influenzabile dall'eventuale trattamento effettuato sui campioni. Esso viene incluso in ciascun saggio per normalizzare l'espressione del gene target, quindi per eliminare le differenze dovute a differenti concentrazioni iniziali di cDNA e alle condizioni sperimentali. Per validare un

esperimento di qRT PCR, è necessario valutare l'**efficienza** (ϵ) della reazione di qRT-PCR. Infatti, la resa reale della reazione di PCR differisce da quella ideale, in quanto essa raggiunge una fase di plateau in cui il tasso di accumulo del prodotto diminuisce a causa di numerosi fattori, tra cui la degradazione dei reagenti e l'inibizione da parte del prodotto:

$$QF = QI \cdot 2^n \quad \text{resa ideale} \qquad QF = QI (1+\epsilon)^n \quad \text{resa reale}$$

QF= quantità finale di amplificato; QI= quantità iniziale di template; n= numero di cicli PCR

L'efficienza si calcola mediante una **curva standard** di diluizioni seriali di cDNA (almeno 5 diluizioni decimali in triplicato) per tutte le coppie di primers che si intende utilizzare. Dalla retta di regressione ottenuta mettendo in grafico il logaritmo della quantità di partenza di con il valore di Ct ottenuto per ciascuna diluizione, si ottengono: il coefficiente (r) di correlazione di Pearson (o coefficiente R^2 di determinazione; $R^2 > 0.980$ o $r > |0,990|$), la pendenza o **slope** della retta (-3,32; accettabile tra 3,1 e 3,58) e efficienza ($\epsilon = 10^{-1/\text{slope}}$; compresa tra 0,90-1,05: 90-105%). È possibile, inoltre, stabilire l'intervallo di concentrazioni in cui la quantificazione è possibile. Esistono diversi approcci per l'analisi dei risultati a seconda dell'efficienza ϵ e del numero di geni di riferimento utilizzati.

3.2.2 Metodo comparativo di Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

È il metodo più utilizzato e prevede il confronto diretto tra Ct del gene target e del gene di riferimento. Presuppone che entrambi siano amplificati con un'efficienza simile e prossima al 100% (differenza massima 5%) e il confronto con un 'calibratore' (campione non trattato, wilde type, ecc.). L'espressione del gene nel campione è espressa come variazione rispetto a quella che lo stesso gene presenta nel calibratore. In particolare, si calcola:

$$\begin{aligned} \Delta Ct \text{ campione} &= Ct \text{ gene target} - Ct \text{ gene riferimento} \\ \Delta Ct \text{ calibratore} &= Ct \text{ gene target} - Ct \text{ gene riferimento} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct \text{ campione} - \Delta Ct \text{ calibratore} \\ n\text{Fold} &= 2^{-\Delta\Delta Ct} \end{aligned}$$

Il risultato è espresso aumento/diminuzione di espressione del gene target nel campione rispetto al calibratore ed è normalizzato rispetto al gene di riferimento, per compensare qualsiasi differenza nella quantità di cDNA di partenza [146].

3.2.3 Metodo della curva standard e sue modifiche

Si applica se le efficienze di reazione del gene target e reference non sono simili. Ogni esperimento include una curva standard ottenuta con diluizioni seriali di uno standard esterno (es, cDNA plasmidico, ssDNA, dsDNA plasmidico, ecc.) a concentrazione nota, sia per il gene target studiato, sia per il gene housekeeping. Per ciascun campione la quantità di gene target e

reference viene determinata per interpolazione con la rispettiva curva standard e per determinare l'espressione relativa di un gene target si calcolano:

quantità gene target nel campione = ng target/ng gene di riferimento

quantità gene target nel calibratore = ng target/ng gene di riferimento

nFold = quantità gene target nel campione / quantità gene target nel calibratore

Il risultato rappresenta l'aumento/diminuzione dell'espressione del gene target rispetto al calibratore ed è normalizzato rispetto al gene di riferimento. Tale approccio, analogamente al metodo Livak, è indipendente dalla quantità iniziale di cDNA e fornisce una quantificazione molto accurata. Il

metodo della curva standard può essere applicato, con alcune modifiche, per valutare i livelli di espressione del gene di interesse rispetto ad un gene di riferimento senza necessità di utilizzare un calibratore [147]. Anche in questo modello matematico è necessario allestire diluizioni seriali di uno standard esterno (uguali per tutti i campioni da

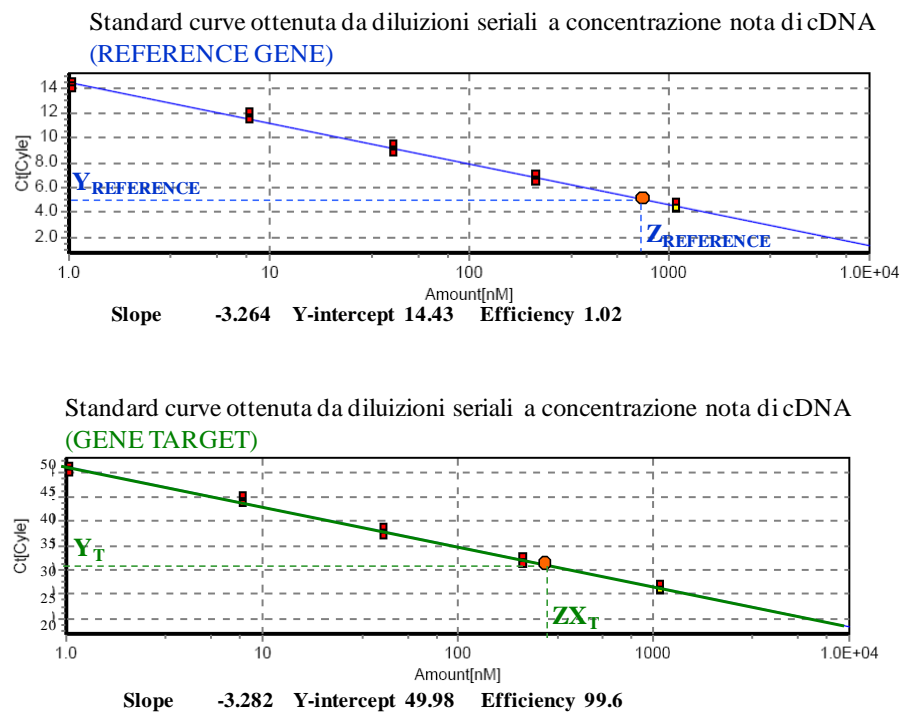


Figura 31 Calcolo dell'espressione genica mediante metodo della curva standard (senza calibratore)

analizzare e da includere in ciascun esperimento) a concentrazioni note (es. cDNA di un ceppo di riferimento, DNA plasmidico, ecc.) per ottenere una curva standard, sia per il gene target, sia per il gene di riferimento selezionato. Successivamente, partendo dai valori di Ct ottenuti per ciascun campione studiato relativi al gene di riferimento ($Y_{REFERENCE}$) e al gene target (Y_{TARGET}) si risale alle quantità ($Z_{REFERENCE}$ e Z_{TARGET}) dall'interpolazione con le rispettive curve di calibrazione (Fig. 31). Per determinare l'espressione relativa del gene di interesse nel campione si calcola il rapporto tra questi due valori ottenuti:

$$nFold = Z_{TARGET} / Z_{REFERENCE}$$

Con tale metodo è possibile risalire anche all'efficienza di reazione di ciascun esperimento.

Capitolo 4

Obiettivi della ricerca

L. monocytogenes è un bacillo Gram-positivo responsabile della listeriosi, un'infezione relativamente rara rispetto ad altre malattie a trasmissione alimentare, ma il cui impatto in Sanità Pubblica è notevole. Si caratterizza, infatti, per un elevato tasso di ospedalizzazione (90%) e di letalità (20-40%) legati ai casi di listeriosi invasiva e soprattutto per il coinvolgimento di particolari fasce vulnerabili di popolazione, tra cui donne in gravidanza, neonati, immunocompromessi e anziani, categorie in costante crescita nei Paesi industrializzati. Nei soggetti immunodepressi, l'infezione può evolvere nella forma clinica di setticemia o infezione localizzata nel cervello o nell'unità feto-placentale.

L'elevata patogenicità è legata alla capacità di superare la mucosa intestinale, la barriera endoteliale emato-cerebrale a livello dei micro capillari del cervello e la materno-fetale. Tra i batteri asporigeni, *L. monocytogenes* rappresenta uno dei patogeni più resistenti e in grado di adattarsi a molteplici condizioni di stress ambientale, anche grazie alla capacità di produrre biofilm, che conferiscono protezione alle cellule batteriche e rendono molto difficile l'eradicazione del patogeno dalle superfici colonizzate.

All'interno della specie esiste, tuttavia, una notevole variabilità, soprattutto per quanto riguarda il grado di virulenza e l'associazione ospite-patogeno, caratteristiche responsabili della diversa capacità patogenetica dei ceppi batterici.

Considerando tali premesse, gli obiettivi del presente lavoro di ricerca hanno riguardato l'applicazione e lo sviluppo di metodi molecolari a supporto dello studio dell'epidemiologia del patogeno e la caratterizzazione degli isolati mediante lo studio di meccanismi genetici alla base della virulenza e della capacità di resistenza a stress ambientale.

In particolare, lo studio ha affrontato i seguenti punti:

- **Genotipizzazione di *L. monocytogenes* mediante single Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism (sAFLP)**

Tale metodica, basata su restrizione enzimatica con enzima EcoR1, è in grado di valutare le differenze esistenti nell'intero genoma batterico. È caratterizzata da un elevato potere discriminante e permette di valutare le relazioni genetiche tra i ceppi. Analogamente ad altre tecniche di tipizzazione molecolare può contribuire all'identificazione di epidemie di ampia portata spazio-temporale stabilendo relazioni tra casi apparentemente sporadici, di risalire alle sorgenti di infezione e riconoscere i focolai d'infezione. Inoltre, si rivela utile per studi tassonomici, in quanto contribuisce ad ampliare le conoscenze sulla struttura genetica della popolazione e sull'ecologia del patogeno.

- **Confronto tra elettroforesi tradizionale e separazione microfluidica automatizzata per la genotipizzazione mediante sAFLP**

La recente introduzione di dispositivi per l'elettroforesi capillare ad alta risoluzione ha consentito la realizzazione di chip per la separazione microfluidica automatizzata degli acidi nucleici in maniera del tutto automatizzata. La possibilità di sostituire l'elettroforesi su gel di agarosio, fase cruciale della sAFLP per l'ottenimento di profili di restrizione specifici per ciascun ceppo, rappresenta un'evoluzione della metodica tradizionale verso la semplificazione, la riduzione dei tempi di analisi e l'oggettività nell'interpretazione dei risultati.

▪ **Standardizzazione di un saggio in Real-time Multiplex-PCR per la sierotipizzazione molecolare di *L. monocytogenes***

Dati europei ed internazionali riportano che la maggior parte (circa il 96%) dei ceppi isolati da alimenti e casi clinici di listeriosi sono riconducibili a solo 4 (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) dei 13 sierotipi noti in *L. monocytogenes*. Nonostante la tradizionale sierotipizzazione basata su agglutinazione sia dispendiosa in termini economici e di tempo e presenti fattori di confondimento, rappresenta l'unica tecnica per l'identificazione univoca dei sierotipi ed è richiesta per il monitoraggio epidemiologico, quale primo livello di discriminazione. Recenti metodi molecolari basati su Multiplex-PCR, permettono di distinguere i ceppi in 4 sierogruppi con una specifica distribuzione dei sierotipi maggiormente coinvolti nei casi di listeriosi umana e di quelli che comunemente si riscontrano in campioni di origine alimentare e ambientale: Gruppo 1 (1/2a e 3a), Gruppo 2 (1/2c e 3c), Gruppo 3 (1/2b, 3b e 7) e Gruppo 4 (4b, 4d e 4e). Poiché i sierotipi 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d e 7 sono estremamente rari, l'impossibilità di riconoscere i singoli sierotipi rappresenta una limitazione irrilevante dal punto di vista epidemiologico. Al fine di semplificare e rendere più rapida l'identificazione dei sierogruppi è stato messo a confronto con un nuovo saggio in Real-Time PCR utilizzando sonde ad ibridazione, disegnato *ad hoc*, in confronto con il metodo classico di PCR. Tale approccio potrebbe contribuire al miglioramento della sorveglianza epidemiologica e al controllo del rischio associato al patogeno.

▪ **Valutazione della resistenza a concentrazioni sub-letali di cloruro di benzalconio, mediante analisi dei profili di espressione di geni implicati nella resistenza a stress mediante saggi di qRT-PCR**

L. monocytogenes è un microrganismo in grado di resistere a diversi fattori di stress ambientale e l'esposizione a concentrazioni sub-letali di disinfettante, spesso riconducibile a pratiche igieniche scorrette, può portare alla selezione di ceppi resistenti verso i composti antimicrobici. In tale studio, è stata valutata l'attività antibatterica del cloruro di benzalconio in isolati esposti a concentrazioni sub-letali del principio attivo. Inoltre, è stata determinata l'espressione di geni codificanti per i sistemi di efflusso MdrL e Lde, del gene *orfA*,

ipotetico repressore di *mdrL* e del gene *sigB*, codificante per un fattore sigma alternativo che conferisce resistenza a fattori di stress ambientale in molti batteri Gram-Positivi, tra cui *Listeria* spp. Le variazioni nei livelli di espressione di tali geni a seguito del trattamento disinfettante sono state indagate mediante saggi di qRT-PCR, al fine di valutare il ruolo di tali fattori nella resistenza al cloruro di benzalconio.

Tale disinfettante è utilizzato per la disinfezione nell'industria alimentare e come antisettico in ambito sanitario. L'attivazione dei sistemi di efflusso e del fattore di risposta a stress in seguito all'esposizione a concentrazioni sub-letali del principio attivo potrebbe portare non solo a una riduzione della sensibilità verso il cloruro di benzalconio, ma anche allo sviluppo di ceppi antibiotico-resistenti attraverso un meccanismo di resistenza crociata, nonché all'attivazione di ulteriori fattori di resistenza regolati da *sigB*.

▪ **Valutazione dei profili di espressione genica dei principali determinanti di virulenza in ceppi di *L. monocytogenes* di differente origine mediante saggi di qRT-PCR**

L. monocytogenes esprime molteplici fattori di virulenza che sono alla base del passaggio da un comportamento da saprofita a patogeno intracellulare opportunisto. Tali geni localizzati in "*Listeria pathogenicity island*" (LIPI-1) regolano il ciclo replicativo intracellulare e sono implicati nel meccanismo infettivo. Insieme a tale cluster, le internaline rappresentano una importante famiglia di geni responsabili della virulenza, in quanto interagiscono con specifici recettori di superficie della cellula ospite promuovendone l'invasione. Mediante saggi di qRT-PCR, sono stati analizzati i profili di espressione dei geni *hly*, *prfA*, *inlA* e *inlB* in isolati da casi clinici e da alimenti in fase di crescita esponenziale. Inoltre, è stato considerato anche il gene *bsh*, responsabile della resistenza ai sali biliari. La comprensione dei meccanismi molecolari e la caratterizzazione dei ceppi potenzialmente più virulenti sono aspetti fondamentali per il controllo della listeriosi, in quanto consentono di migliorare le attività di sorveglianza e di prevenzione del rischio associato a *L. monocytogenes* per la salute umana, soprattutto nelle fasce più sensibili della popolazione.

Capitolo 5

Materiali e metodi

5.1 Selezione e isolamento dei ceppi di *L. monocytogenes*

I ceppi di *L. monocytogenes* analizzati in questo studio appartengono ad una ceppoteca composta da isolati provenienti dalla rete di sorveglianza della regione Lombardia, Istituto Zooprofilattico di Teramo e Health Protection Agency di Londra con diversa provenienza geografica. Tali ceppi sono stati isolati da casi clinici, da alimenti, da tamponi ambientali su superfici di industrie alimentari, da casi di listeriosi animale e da mangime (Tab. 4-7). Per quanto riguarda i ceppi umani, i principali fattori di rischio per i pazienti infetti sono stati distinti in iatrogeni e correlati a stato di immunocompromissione da HIV, malattie di base come neoplasia, diabete, gravidanza, insufficienza epatica e renale. In generale, i ceppi umani sono stati isolati da emocolture, liquor, tampone faringeo (feto morto), tampone auricolare (feto morto), liquido amniotico e catetere venoso centrale. I ceppi puri di *L. monocytogenes* sono stati utilizzati per l'estrazione di DNA e RNA totale dopo semina su terreno solido selettivo e differenziale ALOA (Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti, Biolife, Milano) e incubazione a 37°C overnight. A partire da tale terreno selettivo, una singola colonia pura è stata seminata per striscio su piastre contenenti terreno di coltura TSA (Tryptone Soya Agar 1,5%, Biolife) e incubate a 37°C per 24-48 ore per l'estrazione del DNA mediante sistema automatizzato Maxwell (Promega, Milano). In alternativa, ceppi puri di *L. monocytogenes* conservati in beads sono stati seminati su terreno Agar Sangue (Biolife) e incubati a 37°C per 24-48 ore. Successivamente, una singola colonia è stata utilizzata per l'estrazione dei DNA mediante kit MicroLYSIS (Microzone, UK). Per l'estrazione di RNA totale, invece, una colonia pura è stata inoculata in tubi contenenti BHI (Brain Heart Infusion Broth, Biolife) e incubati a 37°C fino al raggiungimento della torbidità desiderata. Per ciascun isolato di *L. monocytogenes* appartenente alla ceppoteca sono noti sierotipo, sierogruppo e linea genetica di appartenenza, classificazioni strettamente interconnesse tra loro (Tab. 2).

Tabella 2 Struttura antigenica dei sierotipi di *L.monocytogenes*

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)	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, VI, (VIII), (IX)	ABC
7	(III), XII, XIII	ABC

* presenza antigene non è sempre riscontrata

In base agli antigeni somatici O e flagellari H, è possibile identificare 13 sierotipi in *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7), 7 in *L. seeligeri* (1/2a, 1/2b, 3b, 4a, 4b, 4c, 6b), i sierotipi 5 e 1/2b in *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e i sierotipi 6a e 6b in *L. grayi*. La tipizzazione sierologica degli isolati è stata effettuata mediante *Listeria* antisera kit (Denka Seiken, Tokyo, Japan), in accordo con le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. Il sierotipo viene determinato sulla base dei patterns di reazione ottenuti dalla combinazione dei fattori antigenici O e H in accordo con lo schema standard di Seeliger e Höhne (1979) [130].

Tra le metodiche maggiormente utilizzate per semplificare l'individuazione del sierotipo rientra lo schema di classificazione dei principali sierotipi (1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b) in quattro gruppi distinti mediante Multiplex PCR sviluppato da Doumith et al. (2004) e validato mediante prove interlaboratorio [131]. In particolare, la metodica classifica i ceppi in **sierogruppi** I (1/2a, 3a), II (1/2c, 3c), III (1/2b, 3b,7), IV (4b, 4d, 4e). Tali sierogruppi possono essere a loro volta raggruppati in **Linee genetiche** o divisioni evolutive: lineage I (sierotipi 1/2b, 4b, 3b, 4d, 4e), lineage II (sierotipi 1/2a, 1/2c e 3a) e lineage III (sierotipi 4a e 4c). Esse si differenziano per l'associazione con una definita distribuzione di sierotipi, per il potenziale patogenetico e la specificità per l'ospite. La lineage di appartenenza dei ceppi analizzati in questo lavoro è stata identificata mediante Multiplex-PCR secondo il protocollo di Ward et al. (2004) utilizzando tre set di primer sulla base delle sequenze di geni nel cluster di virulenza LIPI-1 . La correlazione esistente tra le tecniche per la tipizzazione di *L. monocytogenes* citate è schematizzata in tabella 3.

Tabella 3 Correlazione tra sierotipo, siero gruppo e linea genetica in *L. monocytogenes*

Lineage (Ward et al. 2004)	Sierogruppo (Doumith et al., 2004)	Sierotipo (Seeliger and Höhne, 1979)
I	III	1/2b, 3b
	IV	4b, 4d, 4e
II	I	1/2a, 3a
	II	1/2c, 3c
III		4a, 4c, 4b atipici

Ad ogni ceppo, inoltre, è stato associato uno specifico profilo di PCR-RFLP del gene *inlA* riferito alla forma intera (profili B, C ed E) o troncata (profili A e D) della proteina (internalina A) [137], quest'ultima attribuita alla presenza di prematuri codoni di stop. L'amplificazione di un frammento del gene *inlA*, caratterizzato da eterogeneità dovuta a punti di mutazione, è seguita dalla restrizione enzimatica mediante le endonucleasi *AluI* e *Tsp509I*. L'analisi combinata dei profili ottenuti per ciascun enzima consente di identificare un unico pattern di RFLP per ciascun isolato, confrontato con i profili del ceppo di riferimento EGD-e e di altri riportati in letteratura.

Tabella 4 Ceppi di origine umana di *L. monocytogenes*

CODICE	SESSO	DATA DI NASCITA	PROVENIENZA	ORIGINE	FATTORI DI RISCHIO	Sierotipo	Sierogruppo	Lineage	Profilo RFLP
LMO 01	M	02/04/1926	Lombardia	Emocoltura	Ambientali	1/2b	III	I	B
LMO 02	F	12/08/1938	Lombardia	Emocoltura	Non compilato	1/2b	III	I	B
LMO 03	F	07/06/1953	Lombardia	Catetere venoso centrale	Emopatia, trapianto	1/2a	I	II	C
LMO 04	M	14/01/1921	Lombardia	Emocoltura	Non compilato	4b	IV	I	B
LMO 05	F	17/08/1960	Lombardia	Emocoltura	Iperpiressia in travaglio	4b	IV	I	B
LMO 06	M	24/06/1938	Lombardia	Porzione mitrale	Non compilato	1/2a	I	II	C
LMO 07	M	27/09/1959	Lombardia	Emocoltura	HIV	1/2b	III	I	D
LMO 08			Lombardia	Liquor		4b	IV	I	B
LMO 09	F	24/07/1954	Lombardia	Emocoltura	Trattamento con immunosoppressori	4b	IV	I	E
LMO 10	M	08/06/1948	Lombardia	Emocoltura	Non compilato	1/2b	III	I	B
LMO 11	M	27/07/1929	Lombardia	Emocoltura	Non compilato	1/2b	III	I	B
LMO 12	M	09/12/1948	Lombardia	Emocoltura	Trattamento con immunosoppressori	1/2a	I	II	C
LMO 13	F	21/09/1969	Lombardia	Tampone faringeo (feto morto)	Gravidanza	4b	IV	I	B
LMO 14	M	12/06/1952	Lombardia	Liquor	Trattamento con immunosoppressori	4b	IV	I	E
LMO 15	M	06/04/1932	Lombardia	Liquor, sangue periferico	Neoplasia, diabete	1/2a	I	II	C
LMO 16	M	20/06/1927	Lombardia	Emocoltura	Neoplasia, diabete	1/2a	I	II	C
LMO 17	M	30/11/1954	Lombardia	Liquor	Neoplasia(polmonare) +Tratt. immunosoppressori	1/2a	I	II	N.D.
LMO 18	F	18/10/1949	Lombardia	Emocoltura	Neoplasia (mammaria)+Diabete+ Tratt. immunosoppressori	1/2a	I	II	N.D.
LMO 19	M	21/01/2007	Lombardia	Aspirato gastrico	Non compilato	1/2a	I	II	C
LMO 20	M	14/08/1933	Lombardia	Liquor	Emopatia	4b	IV	I	B
LMO 22	F	24/01/1948	Lombardia	Emocoltura	Trattamento con immunosoppressori	4b	IV	I	B
LMO 21	M	23/6/1965	Lombardia	Emocoltura	Nessuno	1/2a	I	II	C
LMO 23	M	10/10/2000	Lombardia	Non compilato	Gravidanza	1/2a	I	II	N.D.
LMO 24	M	16/12/1951	Lombardia	Emocoltura	neoplasia, diabete, trattamento con immunosoppressori	1/2a	I	II	N.D.
LMO 25	F	20/12/1933	Lombardia	Emocoltura	Emopatia, trattamento con immunosoppressori	1/2a	I	II	C
LMO 26	F	24/12/1924	Lombardia	Emocoltura	Neoplasia, emopatia, trattamento con immunosoppressori	1/2a	I	II	N.D.
LMO 27	M	19/11/1945	Lombardia	Trombo aneurismatico	Diabete, HIV	4b	IV	I	B
LMO 28	M	08/06/1931	Lombardia	Emocoltura	Trattamento con immunosoppressori, emopatia	4b	IV	I	B
LMO 29	M	29/05/1941	Lombardia	Liquor	Dialisi	1/2a	I	II	C
LMO 30	F	01/01/1935	Lombardia	Emocoltura	Non noto	1/2b	III	I	B
LMO 31	F	24/4/28	Lombardia	Liquor+Emocoltura	Neoplasia (LLC)	4b	IV	I	B
LMO 32	F	05/08/1958	Lombardia	Emocoltura	Emopatia, trattamento con immunosoppressori, trapianto, dialisi	4b	IV	I	N.D.

LMO 33	F	25/07/1959	Lombardia	Emocoltura	Neoplasia	4b	IV	I	B
LMO 34	F	22/09/1940	Lombardia	Emocoltura	Emopatia	1/2a	I	II	C
LMO 35	M	07/10/1928	Lombardia	Emocoltura	Dialisi + insufficienza renale	1/2a	I	II	D
LMO 36	F	12/11/1933	Lombardia	Emocoltura	Neoplasia, insufficienza epatica	4b	IV	I	B
LMO 37	M	13/09/1937	Lombardia	Emocoltura	Insufficienza epatica, diabete in valutazione (lieve aumento Hb glicata)	3a	I	II	N.D.
LMO 38	M	24/10/2007	Lombardia	Liquor	Non compilato	4b	IV	I	B
LMO 39	F	14/07/1953	Lombardia	Emocoltura	Neoplasia, trattamento con immunosoppressori, citolitici, corticosteroidi	1/2a	I	II	D
LMO 40	M	13/10/1966	Lombardia	Emocoltura	HIV, favismo, pancitopenia, pregressa neuro toxoplasmosi e neuroleue, leishmaniosi viscerale cronica	4b	IV	I	N.D.
LMO 41	F	20/07/1979	Lombardia	Liquor	Deficit immunitario congenito (ipogammaglobulinemia)	4b	IV	I	B
LMO 42	F	06/09/1975	Lombardia	ferita placenta lato fetale	Gravidanza	1/2a	I	II	C
LMO 43	F	06/09/1975	Lombardia	Liquido amniotico	Gravidanza	1/2a	I	II	C
LMO 44	M	05/02/1908	Lombardia	Tampone auricolare dx	Non compilato	1/2a	I	II	C
LMO 45	F	20/07/1932	Lombardia	Liquido cefalo rachidiano	Non compilato	1/2a	I	II	C
LMO 46	M	30/10/1936	Lombardia	Emocoltura	Dialisi, Insufficienza renale	4b	IV	I	B
LMO 47	M	19/10/1967	Lombardia	Emocoltura	In corso ultimi accertamenti	1/2a	I	II	A
LMO 48	F	02/06/1926	Lombardia	Emocoltura	Insufficienza epatica	1/2a	I	II	D
LMO 49	F	19/12/40	Lombardia	Emocoltura	Emopatia	1/2a	I	II	A
LMO 50	M	12/11/1936	Lombardia	Emocoltura	Altro: epatopatia da potus	1/2a	I	II	N.D.
LMO 51	M	16/09/1946	Lombardia	Emocoltura	Neoplasia (Linfoma Hodgkin)	1/2b	III	I	B
LMO 53	M	05/08/1931	Lombardia	Liquor	Nessuno (npl 20 aa prima, risolta)	1/2a	I	II	D
LMO 54	F	20/05/1940	Lombardia	Emocoltura	Neoplasia	1/2b	III	I	B
LMO 55	M	22/02/1941	Lombardia	Emocoltura	Emopatia (anemia)	1/2a	I	II	C
LMO 56	F	08/10/1969	Lombardia	Emocoltura	Neoplasia	1/2b	III	I	B
LMO 57	M	31/08/1935	Lombardia	Emocoltura	Emopatia	4b	IV	I	B
LMO 58	F	22/01/1948	Lombardia	Emocoltura	Nessuno	4b	IV	I	B
LMO 59	M	02/11/1963	Lombardia	Emocoltura	HIV, insufficienza epatica	4b	IV	I	B
LMO 60	F	31/12/1929	Lombardia	Liquor	Emopatia: sospetto linfoma, crioglobulinemia, splenectomia	1/2a	I	II	C
LMO 61	M	17/01/1920	Lombardia	Emocoltura	Emopatia, Insufficienza renale, diabete	4b	IV	I	B
LMO 62	M	17/08/1948	Lombardia	Emocoltura	Neoplasia, dimesso in condizioni preterminali per cachessia	1/2a	I	II	C
LMO 63	F	13/12/2008	Lombardia	Tampone faringeo e t. auricolare (feto morto)	Nato morto 28a settimana	1/2a	I	II	A
LMO 64	M	18/03/1937	Lombardia	Liquor (post-mortem)	Insufficienza epatica da cirrosi, dialisi, insufficienza renale	1/2a	I	II	N.D.
LMO 65	M	30/07/2028	Lombardia	Emocoltura	Diabete, K epatico, Neoplasia vescicale in anamnesi pregressa	1/2a	I	II	C

LMO 66	F	25/02/1935	Lombardia	Liquor	Nessuno	4b	IV	I	B
LMO 67	M	19/05/2008	Lombardia	Emocoltura (liquor effettuato a Niguarda)	Nessuno	1/2a	I	II	C
LMO 68	F	22/08/1949	Lombardia	liquido di ascesso (collo)	Diabete	1/2a	I	II	E
LMO 69	M	05/09/1942	Lombardia	Liquor	Neoplasia vescicale in anamnesi	1/2a	I	II	E
LMO 70	M	16/10/1940	Lombardia	Agoaspirato	Diabete	1/2a	I	II	C
LMO 71	F	22/12/27	Lombardia	Liquor	Neoplasia, trattamento con immunosoppressori, corticosteroidi	1/2a	I	II	D
LMO 74	F	12/03/1954	Lombardia	Liquor, emocoltura	Ipertensione BPCO Obesità	1/2a	I	II	A
LMO 75	M	06/12/1922	Lombardia	Pus prelevato da cisti	Emopatia: componente monoclonale gamma tipizzazione IgG-K (8,2% - 0,55g/dl)	1/2a	I	II	E
LMO 76	M	18/05/1939	Lombardia	Liquor	Dialisi, insufficienza renale	4b	IV	I	B
LMO 77	F	24/12/1931	Lombardia	Emocoltura	Neoplasia- insufficienza epatica	1/2a	I	II	N.D.
LMO 99	F	05/04/1942	Lombardia	Emocoltura	Diabete, in sufficienza epatica, ipertensione	4b	IV	I	B
LMO 111	M	14/09/1946	Lombardia	Paziente	Immunosoppresso	1/2a	I	II	E
LMO 133	F	07/10/1936	Lombardia	Paziente	Neoplasia	4b	IV	I	B
LMO 141			Lombardia	Paziente		1/2a	I	II	E
LMO 150	M	22/09/2010	Lombardia	Paziente	Nessuno	4b	IV	I	B
LMO 153			Lombardia		food	1/2a	I	II	D
LMO 159	F	31/01/1942	Lombardia	Paziente	Insuf. renale	1/2a	I	II	E
TS 1			UK	Paziente		4b	IV	I	B
TS 2			England	Paziente		1/2c	II	II	D
TS 3			Canada	Paziente		1/2b	III	I	B
TS 8			England	Paziente		1/2c	II	II	D
TS 12			England	Paziente		4b	IV	I	B
TS 13			USA	Paziente		4b	IV	I	B
TS 14			USA	Paziente		1/2a	I	II	C
TS 16			UK	Paziente		1/2b	III	I	B
TS 17			USA	Paziente		1/2b	III	I	B
TS 19			England	Paziente		4b	IV	I	B
TS 22			USA	Paziente		4b	IV	I	B
TS 23			England	Paziente		1/2a	I	II	E
TS 24			USA	Paziente-madre		1/2b	III	I	B
TS 26			Canada	Paziente		4d	IV	I	B
TS27			Canada	Paziente		4b	IV	I	B
TS 28			USA	Paziente-placenta		4b	IV	I	B
TS 30			UK	Paziente		1/2a	I	II	C
TS 31			Francia	Paziente		4b	IV	I	B
TS 33			England	Paziente		1/2a	I	II	E
TS 34			USA	Paziente-neonato		4b	IV	I	B
TS 35			USA	Paziente		4b	IV	I	B
TS 38			England	Paziente		4b	IV	I	E

TS 41			USA	Paziente		4b	IV	I	B
TS 42			USA	Paziente		4b	IV	I	B
TS 43			USA	Paziente		4b	IV	I	B
TS 44			UK	Paziente		1/2a	I	II	C
TS 46			UK	Paziente		1/2b	III	I	B
TS 48			USA	Paziente		1/2b	III	I	B
TS 55			Svizzera	Paziente		4b	IV	I	B
TS 56			USA	Paziente		1/2a	I	II	C
TS 57			UK	Paziente		1/2c	II	II	D
TS 63			Canada	Paziente		4b	IV	I	B
TS 64			USA	Paziente-neonato		1/2b	III	I	B
TS 65			England	Paziente		4b	IV	I	B
TS 66			USA	Paziente		1/2b	III	I	B
TS 69			Francia	Paziente		4b	IV	I	B
TS 71			Svizzera	Paziente		4b	IV	I	B
TS73			Canada	Paziente		4b	IV	I	B
TS 75			USA	Paziente		4b	IV	I	B
TS 76			USA	Paziente		4b	IV	I	B
TS 77			USA	Paziente		1/2a	I	II	C
TS 79			Canada	Paziente		4b	IV	I	B

Tabella 5 Ceppi di *L. monocytogenes* isolati da alimenti

CODICE	ISOLATI	PROVENIENZA	ORIGINE	Sierotipo	Sierogruppo	Lineage	Profilo RFLP
1	2527 A	Lombardia	Materia prima	1/2c	II	II	D
3	2532 A	Lombardia	Materia prima	1/2c	II	II	D
4	2532 B	Lombardia	Materia prima	1/2c	II	II	D
5	2615 A	Lombardia	Macinato per insaccati	1/2b	III	I	B
6	2615 B	Lombardia	Macinato per insaccati	1/2c	II	II	D
7	2616 A	Lombardia	Macinato per insaccati	1/2c	II	II	D
8	2616 B	Lombardia	Macinato per insaccati	1/2b	III	I	B
9	2617 A	Lombardia	Macinato per insaccati	1/2b	III	I	B
10	2617 B	Lombardia	Macinato per insaccati	1/2b	III	I	B
11	2618 A	Lombardia	Macinato per insaccati	1/2c	II	II	D
12	2618 B	Lombardia	Macinato per insaccati	1/2b	III	I	B
16	2689 B	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2c	II	II	D
17	2702 A	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2b	III	I	D
18	2702 B	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2c	II	II	D
19	2704 A	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2c	II	II	D
20	2704 B	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2a	I	II	A
21	2707 A	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2c	II	II	D
22	2707 B	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2c	II	II	D
23	2710 A	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2c	II	II	D
24	2710 B	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2c	II	II	D
25	2803 A	Lombardia	Salame (1 settimana di stagionatura)	1/2c	II	II	D
26	2803 B	Lombardia	Salame (1 settimana di stagionatura)	1/2c	II	II	D
27	2817 A	Lombardia	Salame dopo 1 settimana di stagionatura	1/2c	II	II	D
28	2817 B	Lombardia	Salame dopo 1 settimana di stagionatura	1/2c	II	II	D
31	2930 A	Lombardia	Salame dopo 2 settimane di stagionatura	1/2c	II	II	D
32	2930 B	Lombardia	Salame dopo 2 settimane di stagionatura	1/2c	II	II	D
33	2940 A	Lombardia	Salame dopo 2 settimane di stagionatura	1/2a	I	II	D
34	2940 B	Lombardia	Salame dopo 2 settimane di stagionatura	1/2c	II	II	D
36	3102 B	Lombardia	Salame(3 settimane di stagionatura)	1/2c	II	II	D
37	3106 A	Lombardia	Salame dopo 3 settimane di stagionatura	1/2c	II	II	D
38	3106 B	Lombardia	Salame dopo 3 settimane di stagionatura	1/2c	II	II	D
39	3108 A	Lombardia	Salame dopo 3 settimane di stagionatura	1/2c	II	II	D
40	3108 B	Lombardia	Salame dopo 3 settimane di stagionatura	1/2c	II	II	D
41	3265 A	Lombardia	Salame dopo 4 settimane di stagionatura	1/2b	III	I	B
42	3265 B	Lombardia	Salame dopo 4 settimane di stagionatura	1/2b	III	I	B
43	3282 B	Lombardia	Salame dopo 4 settimane di stagionatura	1/2b	III	I	B
44	3282 C	Lombardia	Salame(4 settimane di stagionatura)	1/2b	III	I	B
45	3284 A	Lombardia	Salame (4 settimane di stagionatura)I	1/2c	II	II	D
46	3284 B	Lombardia	Salame (4 settimane di stagionatura D	1/2c	II	II	D
47	3289 A	Lombardia	Salame dopo 4 settimane di stagionatura	1/2c	II	II	D
48	3289 B	Lombardia	Salame dopo 4 settimane di stagionatura	1/2b	III	I	B
49	4626	Lombardia	Materia prima	1/2c	II	II	D
50	4627	Lombardia	Materia prima	1/2c	II	II	D
51	4628	Lombardia	Materia prima	1/2a	I	II	A

52	4629	Lombardia	Materia prima	1/2c	II	II	D
53	4742	Lombardia	Macinato	1/2c	II	II	D
54	4745	Lombardia	Macinato	1/2c	II	II	D
55	4746	Lombardia	Macinato	1/2a	I	II	A
56	4747	Lombardia	Macinato	1/2c	II	II	D
57	4748	Lombardia	Macinato	1/2a	I	II	A
59	4751	Lombardia	Macinato	1/2c	II	II	D
63	4794	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2c	II	II	D
64	4795	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2c	II	II	D
65	4798	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2c	II	II	D
66	4799	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2c	II	II	D
67	4800	Lombardia	Salame dopo asciugatura	1/2c	II	II	D
69	4927	Lombardia	Salame dopo 1 settimana di stagionatura	1/2a	I	II	A
70	4928	Lombardia	Salame dopo 1 settimana di stagionatura	1/2a	I	II	A
72	4942	Lombardia	Salame dopo 1 settimana di stagionatura	1/2a	I	II	A
73	LMPC 2 18/12	Lombardia	Gorgonzola	1/2a	I	II	D
74	LMPC 3 18/12	Lombardia	Gorgonzola	1/2a	I	II	D
75	LMPC 4 18/12	Lombardia	Gorgonzola	1/2a	I	II	D
76	LMPC5 18/12	Lombardia	Gorgonzola	3a	I	II	D
77	LMPC 6 18/12	Lombardia	Gorgonzola	1/2a	I	II	D
78	LMPC7 18/12	Lombardia	Gorgonzola	3a	I	II	D
79	LMPC 8 18/12	Lombardia	Gorgonzola	1/2b	III	I	B
81	LMPC 7 19/02	Lombardia	Gorgonzola	1/2a	I	II	N.D.
82	LMPC 8 19/02	Lombardia	Gorgonzola	1/2a	I	II	N.D.
83	LMPC1 03/03	Lombardia	Gorgonzola	3a	I	II	D
86	LMPC 5 03/03	Lombardia	Gorgonzola	1/2a	I	II	D
87	LMPC 6 03/03	Lombardia	Gorgonzola	1/2a	I	II	D
93	LMPCDM 1 10/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
94	LMPCDM 1 05/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
95	LMPCDM 10 05/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
96	LMPCDM 10 06/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
97	LMPCDM 10 10/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
98	LMPCDM 11 05/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
99	LMPCDM 11 06/05	Lombardia	Taleggio	1/2b	III	I	B
100	LMPCDM 11 10/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
101	LMPCDM 12 05/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
102	LMPCDM 12 06/05	Lombardia	Taleggio	1/2b	III	I	B
103	LMPCDM 12 10/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
106	LMPCDM 14 05/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
115	LMPCDM 3 06/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
116	LMPCDM 3 10/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
121	LMPCDM 5 06/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
122	LMPCDM 5 10/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
124	LMPCDM 6 06/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
127	LMPCDM 7 06/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
128	LMPCDM 7 10/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
130	LMPCDM 8 06/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D

131	LMPCDM 8 10/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
132	LMPCDM 8 05/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
133	LMPCDM 9 06/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
134	LMPCDM 9 10/05	Lombardia	Taleggio	1/2a	I	II	D
TS 9		Canada	Alimento	4b	IV	I	C
TS 10		USA	Alimento	4b	IV	I	B
TS 11		USA	Alimento	1/2a	I	II	C
TS 15		USA	Alimento	1/2a	I	II	C
TS 18		USA	Alimento	1/2a	I	II	C
TS 20		USA	Alimento	1/2a	I	II	C
TS 21		Svizzera	Alimento	4b	IV	I	B
TS 25		USA	Alimento	3b	III	I	B
TS 29		USA	Alimento	4b	IV	I	C
TS 32		USA	Alimento	4b	IV	I	B
TS 36		USA	Alimento	1/2a	I	II	C
TS 37		England	Alimento	4b	IV	I	E
TS 39		USA	Alimento	1/2a	I	II	C
TS 40		England	Alimento	4b	IV	I	B
TS 45		England	Alimento	4b	IV	I	B
TS 47		Canada	Alimento	1/2b	III	I	B
TS 49		USA	Alimento	1/2a	I	II	C
TS 50		Canada	Alimento	4b	IV	I	B
TS 51		England	Alimento	4b	IV	I	B
TS 52		USA	Alimento	1/2a	I	II	C
TS 54		USA	Alimento	3b	III	I	B
TS 58		USA	Alimento	1/2b	III	I	C
TS 68		USA	Alimento	1/2a	I	II	C
TS 74		USA	Alimento	3b	III	I	B

Tabella 6 Ceppi di *L. monocytogenes* isolati da tamponi ambientali su superfici di industrie alimentari e da animali

CODICE	ISOLATI	PROVENIENZA	ORIGINE	Sierotipo	Sierogruppo	Lineage	Profilo RFLP
29	2920/3 A	Lombardia	Tampone	1/2c	II	II	D
30	2920/3 B	Lombardia	Tampone	1/2c	II	II	D
60	4753	Lombardia	Tampone ambientale	1/2c	II	II	D
61	4755	Lombardia	Tampone ambientale	1/2c	II	II	D
62	4756	Lombardia	Tampone ambientale	1/2c	II	II	D
137	LIST 31	Bologna	Tampone ambientale	1/2a	I	II	A
139	LIST 33	Bologna	Tampone ambientale	1/2a	I	II	A
140	LIST 34	Bologna	Tampone ambientale	4b	IV	I	B
141	LIST 35	Bologna	Tampone ambientale	4b	IV	I	B
142	LIST 36	Parma	Tampone ambientale	1/2a	I	II	A
143	LIST 37	Parma	Tampone ambientale	1/2a	I	II	A
TS 53		Scozia	Animale	1/2a	I	II	D
TS 59		Scozia	Animale	1/2a	I	II	C
TS 78		Scozia	Animale	1/2a	I	II	C

Tabella 7 Ceppi selezionati per sierotipizzazione mediante Real Time PCR (TaqMan)

* F= da alimenti; H=umano; E= ambientale; A=animale

CODICE	SPECIE	*	ORIGINE	Provenienza	Sierotipo	Sierogruppo
H113660420	<i>L.monocytogenes</i>	F	Marinated BBQ chilli beef	UK	1/2a	I
H113700586	<i>L.monocytogenes</i>	F	Pita pockets filled with grated cheese & shredded ham carrots&labbage	UK	1/2a	I
H113660421	<i>L.monocytogenes</i>	F	Marinated BBQ chilli beef	UK	1/2a	I
H114600074	<i>L.monocytogenes</i>	F	Beef salad sandwich	UK	1/2a	I
H113960303	<i>L.monocytogenes</i>	F	Co-op melon and grape	UK	1/2a	I
H113960305	<i>L.monocytogenes</i>	F	Melon and grape	UK	1/2a	I
H113960307	<i>L.monocytogenes</i>	F	Ham salad sandwich	UK	1/2a	I
H113960308	<i>L.monocytogenes</i>	F	Ham salad sandwich	UK	1/2a	I
H113960310	<i>L.monocytogenes</i>	E	Cloth	UK	1/2a	I
H112720084	<i>L.monocytogenes</i>	F	Carrow cheese	UK	1/2a	I
H112560277	<i>L.monocytogenes</i>	F	Butter	UK	1/2a	I
H112240569	<i>L.monocytogenes</i>	F	RTE sandwich	UK	1/2a	I
H112360666	<i>L.monocytogenes</i>	F	Carrow cheese	UK	1/2a	I
H112540122	<i>L.monocytogenes</i>	F	Butter	UK	1/2a	I
H112249557	<i>L.monocytogenes</i>	F	Chorizo	UK	1/2a	I
H112800615	<i>L.monocytogenes</i>	F	Chicken slicer	UK	1/2a	I
H112880616	<i>L.monocytogenes</i>	F	Cream	UK	1/2a	I
H100120117	<i>L.monocytogenes</i>	F	Potted beef	UK	1/2a	I
H100120118	<i>L.monocytogenes</i>	F	Tuna and sweetcorn	UK	1/2a	I
H100200533	<i>L.monocytogenes</i>	H	Blood	UK	1/2a	I
H113180648	<i>L.monocytogenes</i>	F	Butter	UK	1/2b	III
H113180030	<i>L.monocytogenes</i>	H	Blood	UK	1/2b	III
H112800622	<i>L.monocytogenes</i>	F	Egg mayo roll	UK	1/2b	III
H112840101	<i>L.monocytogenes</i>	E	Tea towel	UK	1/2b	III
H112800603	<i>L.monocytogenes</i>	F	Lettuce	UK	1/2b	III
H112640028	<i>L.monocytogenes</i>	F	Cheese	UK	1/2b	III
H112540119	<i>L.monocytogenes</i>	F	Cheese	UK	1/2b	III
H112420034	<i>L.monocytogenes</i>	F	Cream	UK	1/2b	III
H112260514	<i>L.monocytogenes</i>	F	Cheese	UK	1/2b	III
H112300404	<i>L.monocytogenes</i>	F	Cheese (ruid)	UK	1/2b	III
H111740289	<i>L.monocytogenes</i>	F	Whipped cream	UK	1/2b	III
H111220178	<i>L.monocytogenes</i>	F	Cake	UK	1/2b	III
H100440362	<i>L.monocytogenes</i>	F	Ham	UK	1/2b	III
H100440364	<i>L.monocytogenes</i>	F	Ham	UK	1/2b	III
H100440365	<i>L.monocytogenes</i>	F	Ham	UK	1/2b	III
H100440366	<i>L.monocytogenes</i>	F	Ham	UK	1/2b	III
H100440388	<i>L.monocytogenes</i>	F	Prawn and mayonnaise sandwich	UK	1/2b	III
H100440395	<i>L.monocytogenes</i>	F	Prawn and mayonnaise sandwich	UK	1/2b	III
H100440402	<i>L.monocytogenes</i>	F	Coronation chicken sandwich	UK	1/2b	III
H100440403	<i>L.monocytogenes</i>	F	Coronation chicken sandwich	UK	1/2b	III
H113700581	<i>L.monocytogenes</i>	F	Chicken sandwich with salad and mayonnaise	UK	1/2c	II
H113700583	<i>L.monocytogenes</i>	F	Chicken sandwich with salad and mayonnaise	UK	1/2c	II
H113700582	<i>L.monocytogenes</i>	F	Chicken sandwich with salad and mayonnaise	UK	1/2c	II
H113700580	<i>L.monocytogenes</i>	F	Chicken sandwich with salad and mayonnaise	UK	1/2c	II
H113700584	<i>L.monocytogenes</i>	F	Chicken sandwich with salad and mayonnaise	UK	1/2c	II
H113200687	<i>L.monocytogenes</i>	F	Sliced chicken log	UK	1/2c	II
H112800620	<i>L.monocytogenes</i>	F	Scotch beef	UK	1/2c	II
H112840103	<i>L.monocytogenes</i>	F	Cooked ham	UK	1/2c	II
H110720138	<i>L.monocytogenes</i>	F	Wilshire ham	UK	1/2c	II
H110660532	<i>L.monocytogenes</i>	F	Topside	UK	1/2c	II
H110640169	<i>L.monocytogenes</i>	F	Roast beef	UK	1/2c	II
H111560281	<i>L.monocytogenes</i>	F	Beef and horse	UK	1/2c	II
H111060747	<i>L.monocytogenes</i>	F	Pitta pockets	UK	1/2c	II
H111060070	<i>L.monocytogenes</i>	F	Deli	UK	1/2c	II

H110620231	<i>L.monocytogenes</i>	F	Ox tongue	UK	1/2c	II
H111000199	<i>L.monocytogenes</i>	F	Ham sandwich	UK	1/2c	II
H100120119	<i>L.monocytogenes</i>	F	Pieczoma ham	UK	1/2c	II
H100160125	<i>L.monocytogenes</i>	H	Cerebrospinal fluid (Maschio nato 29/5/52)	UK	1/2c	II
H100360033	<i>L.monocytogenes</i>	E	Environmental	UK	1/2c	II
H100360035	<i>L.monocytogenes</i>	E	Environmental	UK	1/2c	II
H113680556	<i>L.monocytogenes</i>	F	Cooked ham	UK	4	IV
H113700110	<i>L.monocytogenes</i>	H	Cerebrospinal fluid (Maschio nato 6/10/25)	UK	4	IV
H113700585	<i>L.monocytogenes</i>	E	Raw chicken prep surface	UK	4	IV
H113680557	<i>L.monocytogenes</i>	F	Cooked ham	UK	4	IV
H113660423	<i>L.monocytogenes</i>	H	Blood (donna nata 16/9/24; febbre e sepsi)	UK	4	IV
H113660422	<i>L.monocytogenes</i>	F	Cooked crab meat from freezer	UK	4	IV
H113640264	<i>L.monocytogenes</i>	H	Blood (UMANO; Maschio ; sepsi)	UK	4	IV
H113920735	<i>L.monocytogenes</i>	F	Ham and coleslaw barm	UK	4	IV
H113960302	<i>L.monocytogenes</i>	H	Knee fluid (Femmina; artrite remumatoide)	UK	4	IV
H112880617	<i>L.monocytogenes</i>	F	Camembert	UK	4	IV
H112840653	<i>L.monocytogenes</i>	H	Placenta	UK	4	IV
H112560276	<i>L.monocytogenes</i>	H	Blood	UK	4	IV
H112240554	<i>L.monocytogenes</i>	H	Blood	UK	4	IV
H112260128	<i>L.monocytogenes</i>	F	Chicken	UK	4	IV
H112660130	<i>L.monocytogenes</i>	F	Sliced beef	UK	4	IV
H112520339	<i>L.monocytogenes</i>	F	Lung	UK	4	IV
H112460254	<i>L.monocytogenes</i>	F	Turkey breast	UK	4	IV
H112340372	<i>L.monocytogenes</i>	F	Dressed crab	UK	4	IV
H111400089	<i>L.monocytogenes</i>	H	Blood (donna nata 9/9/70; febbre)	UK	4	IV
NCTC 11994	<i>L.monocytogenes</i>		Reference strain	UK	4	IV
H100560299	<i>L.monocytogenes</i>	E	Cloth	UK	4b	IV
H105080865	<i>L.monocytogenes</i>	H	Blood (donna nata 26/1/70)	UK	4b	IV
H111300140	<i>L.monocytogenes</i>	F	Ice cream	UK	4b	IV
H113040172	<i>L.monocytogenes</i>	F	Orange ice cream	UK	4b	IV
H113040173	<i>L.monocytogenes</i>	F	Vanilla ice cream	UK	4b	IV
NCTC 10812	<i>L.grayi</i> subsp <i>murrayi</i>	F	Reference strain	UK		
H090327077	<i>L.grayi</i>	F	Food	UK		
NCTC10814	<i>L.grayi</i> subsp <i>murrayi</i>		Reference strain	UK		
NCTC10815	<i>L.grayi</i> subsp <i>grayi</i>		Reference strain	UK		
NCTC 11288	<i>L.innocua</i>		Reference strain	UK		
H093900152	<i>L.innocua</i>	F	Crayfish	UK		
H093900152	<i>L.innocua</i>	F	Crayfish	UK		
H094300351	<i>L.innocua</i>	F	Coleslaw	UK		
NCTC 11846	<i>L.ivanovii</i>		Reference strain	UK		
H090320783	<i>L.ivanovii</i>	F	Food	UK		
NCTC 2701	<i>L.ivanovii</i> subsp <i>londoniensis</i>		Reference strain	UK		
H054420073	<i>L.ivanovii</i>	A	Animal	UK		
NCTC 10889	<i>L.seeligeri</i>		Reference strain	UK		
H101440622	<i>L.seeligeri</i>	F	Cheese	UK		
NCTC 11856	<i>L.seeligeri</i>		Reference strain	UK		
NCTC 11289	<i>L.seeligeri</i>		Reference strain	UK		
H1049220667	<i>L.welshimeri</i>	F	Pastirma	UK		
H104420630	<i>L.welshimeri</i>	E	Environmental	UK		
H104220650	<i>L.welshimeri</i>	H	Seric	UK		
H101020051	<i>L.welshimeri</i>	F	Chicken sandwich	UK		
H104420631	<i>L.monocytogenes</i>		Reference strain	UK	4a or 4c	IV *
H105120698	<i>L.monocytogenes</i>		strain from EU-NRL		4c	IV*
H110340516	<i>L.welshimeri</i>	F	Beef sandwich	UK		
H104680692	<i>L.monocytogenes</i>		strain from EU-NRL, France		4a	IV*

*Linea genetica III

5.2 Estrazione del DNA

L'estrazione di DNA è stata realizzata su colture pure di *L. monocytogenes*. Per la tipizzazione mediante sAFLP il DNA è stato estratto mediante sistema automatizzato Maxwell[®]16 System (Promega, Italia). Per la sierotipizzazione basata sull'analisi di due saggi in Triplex-PCR è stato utilizzato sia tale sistema, sia il kit di estrazione MicroLYSIS (Microzone, UK).

5.2.1 Maxwell[®] 16 System

Per l'estrazione del DNA è stato impiegato il sistema automatizzato Maxwell[®]16 System in combinazione con il kit Cell Purification Cat.#AS1010 (Promega). Il DNA è stato estratto direttamente da colture in piastre di TSA o agar sangue (Biolife) e, come previsto per batteri Gram positivi, la patina batterica (~10 µg) è stata sottoposta ad uno specifico pretrattamento con Proteinasi K ed agenti caotropici, in associazione a trattamento termico. Le successive fasi di estrazione e purificazione del DNA sono completamente automatizzate con l'estrazione simultanea di 16 campioni in 40 minuti. La lisi cellulare e la purificazione del DNA sono realizzate sfruttando il legame dell'acido nucleico con particelle di silice magnetizzata. Lo strumento consente la purificazione di DNA da campioni di differente origine (sangue, cellule e tessuti), mediante la predisposizione di cartucce (cartridge) contenenti i reagenti specifici per ogni fase, massimizzando la semplicità e la convenienza.

Pretrattamento per l'estrazione di DNA da batteri Gram positivi

- Trasferire 300 µl di soluzione contenente 260 µl di buffer L6 e 40 µl di Proteinasi K (20 mg/ml) (IBI Shelton Scientific, Milano) in tubi da 1,5 ml
- Inoculare in tale miscela un'ansata (10 µl) di patina batterica pura (Fig. 32) e vortexare
- Incubare a 65°C per 10 minuti e successivamente a 95 °C per 10 minuti
- Centrifugare a 12.000 g per 1 minuto.

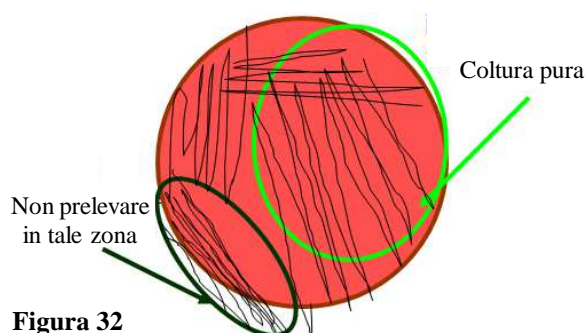


Figura 32
Modalità corretta per il prelievo della patina batterica

Estrazione e purificazione del DNA

- Selezionare il programma di estrazione appropriato (estrazione di DNA da cellule)
- Trasferire l'intero campione pretrattato (300 µl) nel pozzetto n.1 della cartuccia (Fig. 33)
- Posizionare il pistone (plunge) nel pozzetto n.7 della cartuccia (Fig. 33)
- Caricare le cartucce prepite (incluso il controllo negativo)

- Predisporre un tubo di eluizione nella rispettiva postazione dello strumento in corrispondenza di ciascuna cartuccia, contenente 300 µl di buffer di eluizione e avviare lo strumento
- Al termine del processo, rimuovere i tubi di eluizione dalla piattaforma e posizionarli nel rack magnetico che permette di raccogliere tutte le particelle sul fondo del tubo
- Trasferire i campioni da ciascun tubo di eluizione in tubi sterili opportunamente contrassegnati
- Rimuovere le cartucce e i pistoni dalla piattaforma dello strumento ed eliminarli.

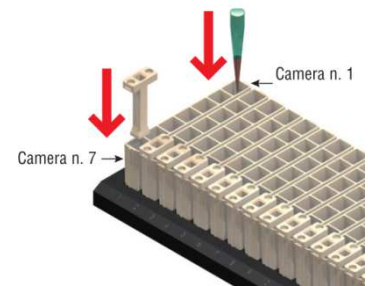


Figura 33
Caricamento della cartuccia

Il DNA così estratto è pronto per essere utilizzato (conservare a 4 °C se utilizzato entro un breve periodo o a -20 °C per una conservazione a lungo termine).

5.2.2 MicroLYSIS

- Dispensare 19 µl di reattivo MicroLYSIS (Microzone) in tubi da 0,2 ml opportunamente contrassegnati
- Inoculare la patina batterica, prelevata da coltura in piastra, mediante ansa da 1 µl e vortexare vigorosamente
- Predisporre un tubo per in controllo negativo (NTC)
- Sottoporre la miscela ai seguenti cicli termici mediante thermocycler:

Step 1: 65°C per 5 minuti

Step 2: 96°C per 2 minuti

Step 3: 65°C per 4 minuti

Step 4: 96°C per 1 minuto

Step 5: 65°C per 1 minuto

Step 6: 96°C per 30 secondi

Step 7: portare il campione a 20°C

Il Kit permette una rapida ed efficiente estrazione del DNA batterico. Tuttavia, non prevede alcuna fase di purificazione del prodotto ottenuto.

Il DNA estratto può essere conservato a 4 °C per 1 settimana o -20°C per periodi di tempo più lunghi (tuttavia, si consiglia di utilizzare il DNA in breve tempo).

5.3 Single Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism (sAFLP)

La metodica è stata condotta in accordo con il protocollo descritto da Guerra et al. (2002) con alcune modifiche [138; 139]. Il DNA utilizzato è stato estratto mediante Maxwell[®]16 System (Promega). La tecnica prevede la digestione del DNA genomico mediante enzima di restrizione. I frammenti ottenuti vengono sottoposti a ligation, in cui degli 'adattatori' si legano alle estremità dei frammenti, in quanto complementari alla sequenza del sito di restrizione. Successivamente, i frammenti legati sono sottoposti ad amplificazione mediante PCR con primer complementare all'adattatore più una base selettiva (Guanina). Segue l'elettroforesi su gel di agarosio ad alta risoluzione per separare i prodotti di amplificazione. In particolare, il protocollo di sAFLP prevede:

FASE 1: Digestione

Digerire 10 µl di DNA (4 µg DNA) con 20 U di enzima EcoR1 (MBI-Fermentas, Milan, Italy) in buffer 1x (volume di reazione 20 µl). Incubazione a 37 °C overnight.

FASE 2: Ligation

Aggiungere a 5 µl di DNA digerito una miscela di reazione (volume finale 20 µl) contenente 0,1 µM degli adattatori ECOAD1 (5-CTCGTAGACTGCGTACC-3; Eurogentec, Belgium) e ECOAD2 (5-AATTGGTACGCAGTCTAC-3; Eurogentec) e 1 U di T4 DNA ligase (MBI-Fermentas). Incubare a temperatura ambiente per 3 ore. Riscaldare a 80°C per 10 minuti per inattivare la ligasi, quindi diluire in acqua (1:5). Il DNA diluito può essere conservato a 4°C.

FASE 3: Amplificazione

Per la reazione di PCR preparare 50 µl di miscela contenente 200 µM dNTPs, 2,5 mM di MgCl₂, 1,5 µM primer G specifico e complementare agli adattatori con una base selettiva (5-GACTGCGTACCAATTTCG-3; Eurogentec), 1,25 U di Taq polymerase (Promega) in 1X PCR buffer con 5 µl di DNA diluito. Il protocollo di reazione prevede una denaturazione iniziale a 94°C per 4 minuti, seguita da 35 cicli a 94°C per 1 minuto, 60°C per 1 minuto e 72°C per 2 minuti e 30 secondi.

FASE 4: Elettroforesi

Separare gli amplificati in un gel di agarosio al 2,5% (w/v) (Bio-Rad) contenente bromuro di etidio (4,30 ore a 400 mA e 90 V). Caricare 10 µl di campione e 7,5 µl di marker 100 bp ladder (MBI-Fermentas). A fine corsa, immergere il gel in una soluzione di bromuro di etidio (0,4 µg/ml) per circa 15 minuti.

5.3.1 Elettroforesi microfluidica di DNA

La separazione elettroforetica dei frammenti di restrizione ottenuti mediante metodica sAFLP, è stata realizzata anche mediante sistema automatizzato Experion™ (BioRad), utilizzando il kit Experion™ DNA 12K Analysis kit, il quale permette la separazione nell'intervallo 100-12000 bp. Per valutare tale metodica alternativa di elettroforesi è stato selezionato un sottogruppo di 50 ceppi di *L. monocytogenes*, le cui caratteristiche sono riportate in tabella 8.

Tabella 8. Caratteristiche dei ceppi selezionati

No. di ceppi	Sierotipo	Linea genetica	profilo RFLP dell' <i>inlA</i>	Origine *
4	4b	I	B	H
2	4b	I	B	E
1	4b	I	B	F
5	1/2b	I	B	F
1	1/2b	I	D	F
9	1/2c	II	D	F
1	1/2c	II	D	E
8	1/2a	II	D	F
2	1/2a	II	D	H
7	1/2a	II	C	H
1	1/2a	II	A	H
2	1/2a	II	A	F
4	1/2a	II	A	E
3	3a	II	D	F

* H = umani; F = alimenti; E = ambiente;

Il protocollo prevede le seguenti fasi:

- *Diluzione del campione*

Se necessario, diluire opportunamente i prodotti di PCR in TE buffer (1/10) fino alla concentrazione finale di circa 35 µg/µl. La concentrazione di DNA deve essere < 50 µg/µl.

- *Lavaggio degli elettrodi*

Prima e dopo l'analisi lavare gli elettrodi dello strumento utilizzando Experion Electrode cleaner e Experion DEPC-Treated Water. Tali soluzioni vengono messe a contatto per alcuni minuti con gli elettrodi all'interno di un supporto specifico simile ad un chip.

- *Priming del chip*

Caricare 9 µl di gel-stain solution nello specifico pozzetto del chip (Fig. 34) e procedere con la preparazione del chip (priming) mediante opportuna combinazione di pressione/tempo (C1) nella Priming Station, in modo da riempire tutti i microcanali del chip con il gel

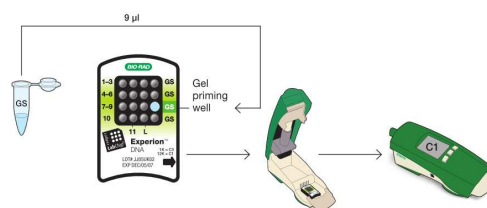


Figura 34 Priming Chip Experion™ DNA 12K Analysis kit

- *Caricamento del chip* (Fig. 34)

Caricare altri 9 µl di gel-stain solution nei restanti pozzetti denominati GS

Caricare 5 µl di loading buffer in tutti i pozzetti, ad eccezione di quelli contrassegnati con GS

Nei pozzetti da 2 a10 introdurre 1 µl di ciascun campione

Nel pozzetto L caricare 1 µl di 12K ladder

Nei pozzetti 1 e 11 caricare 1 µl di una miscela di 1 K e 12K ladder. Sottoporre il chip ad agitazione nella Vortex Station, per un tempo prestabilito, al fine di eliminare eventuali bolle di aria, che potrebbero compromettere l'analisi

- *Elettroforesi*

Introdurre il chip, nella Electrophoresis Station entro 5 minuti dal caricamento, per evitare l'evaporazione dai pozzetti. Avviare il programma specifico DNA 12K. La riproducibilità del metodo è stata valutata caricando ciascun campione in duplicato nello stesso chip e testando lo stesso campione in due chip differenti.

5.3.2 Analisi dei profili di sAFLP

L'analisi dei profili di sAFLP ottenuti mediante le due metodiche elettroforetiche è stata condotta con software Bionumerics versione 6.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). La similarità tra i profili è stata determinata mediante coefficiente di correlazione di Dice, impostando una tolleranza dell'1% per la posizione delle bande e i dendrogrammi sono stati generati mediante algoritmo di raggruppamento UPGMA (unweighted pair group method algorithm). È stato stabilito un livello minimo di similarità $\geq 0,90$ per l'identificazione di profili indistinguibili tra loro.

Per l'analisi dei risultati dell'elettroforesi su gel di agarosio sono state utilizzate le immagini acquisite con sistema di fotodocumentazione UV transilluminator Fire-Reader (UVITEC Cambridge; Eppendorf) e quelle del virtual gel del sistema Experion™. Come riferimento interno è stato utilizzato il profilo del marker 100 bp (MBI-Fermentas) per la metodica tradizionale, mentre in ciascun chip è stata introdotta una miscela di 1K+12K DNA ladder per ottenere un maggior numero di bande di peso molecolare noto e, quindi, per semplificare e ottimizzare l'interpretazione dei risultati (Fig. 35). In entrambe le metodiche elettroforetiche sono state considerate le bande di peso molecolare ≤ 1000 bp, anche se i campioni sottoposti a sAFLP generano frammenti compresi tra 150bp e 2000 bp.

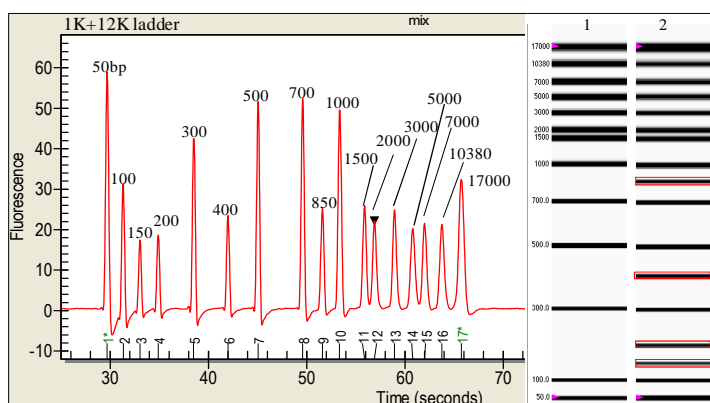


Figura 35 Elettroferogramma della miscela 1K ladder + 12K ladder (sinistra). Gel virtuale (destra) di 12K ladder (linea 1) e 1K ladder +12K ladder (linea 2);

5.4 Disegno primers e sonde TaqMan per la sierotipizzazione di *L. monocytogenes*

Dall'analisi del genoma di *L. monocytogenes* EGD-e sierotipo 1/2a, *L. monocytogenes* CLIP 80459 sierotipo 4b e *L. innocua* CLIP 11262 sierotipo 6a, è stata osservata una correlazione tra i principali sierotipi con alcuni geni [137]. In particolare, il gene *lmo0737* è associato al gruppo I (sierotipi 1/2a-3a), mentre il raggruppamento II (1/2c-3c) dai geni *lmo0737* e *lmo1118*. Quest'ultimo pur ibridizzando solo con tali sierotipi, è stato identificato anche in EGD-e, che costituisce un ceppo atipico. Infine, i geni ORF2819 e ORF2110 sono target specifici per il sierogruppo III (1/2b-3b) e IV (4b-4d-4e)

rispettivamente. Il gene *prs* (phosphoribosyl pyrophosphate synthetase), in quanto housekeeping in *Listeria* spp., è amplificato in tutti i sierogruppi. Recenti studi hanno, inoltre, riportato l'esistenza di ceppi di sierotipo 4b caratterizzati dalla presenza del gene *lmo0737* [132]. L'individuazione dei sierogruppi è basata su Multiplex-PCR seguita da elettroforesi su gel

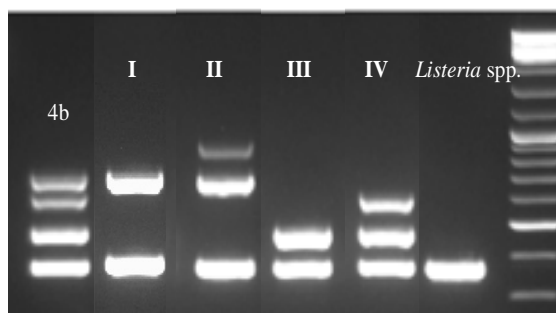


Figura 36 Profili associati ai sierogruppi di *L.monocytogenes* [137] e a ceppi con sierotipo 4b atipici [138]

di agarosio (Fig. 36), in accordo con il protocollo di Doumith et al. (2004). Al fine di rendere più rapida e specifica l'individuazione dei sierogruppi, sono stati disegnati *ex novo* nuove coppie di primers e rispettive sonde ad ibridazione per i geni *lmo0737*, *lmo1118*, ORF2819, ORF2110 e *prs*. Inoltre, il gene specie-specifico phosphatidylinositol-phospholipase C (*plcA*), codificante la Phosphatidylinositol-phospholipase C (PI-PLC), è stato selezionato per l'identificazione della sola specie *L. monocytogenes*. Le coppie di primers e le rispettive sonde TaqMan per la sierotipizzazione di *L. monocytogenes* mediante Real-time Multiplex-PCR sono state disegnate sulla base delle regioni conservate ottenute dall'allineamento mediante software BioEdit versione 7.0.0 delle sequenze geniche relative ai target *lmo0737*, *lmo1118*, ORF2819, ORF2110 e *prs* (Fig. 37-41), depositate in GenBank (Genetic Sequence Data Bank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), database gestito dal National Center for Biotechnology Information (NCBI). Per il disegno di primers e sonde complementari alla sequenza nucleotidica d'interesse sono state seguite le linee guida di seguito riportate:

Linee guida generali per il disegno dei primers

- **Lunghezza dei primer** 18-30 paia di basi (ottimale 20-24 bp). Tale parametro determina la specificità. Infatti, la probabilità di trovare una singola base (A, G, C o T) in una sequenza

Figura 37 Allineamento delle sequenze relative alla regione genica *lmo0737* di *L. monocytogenes* e relativi primers (grigio) e sonda TaqMam (azzurro)



Figura 38 Allineamento delle sequenze relative alla regione genica *lmo1118* di *L. monocytogenes* e relativi primers (grigio) e sonda TaqMam (azzurro)

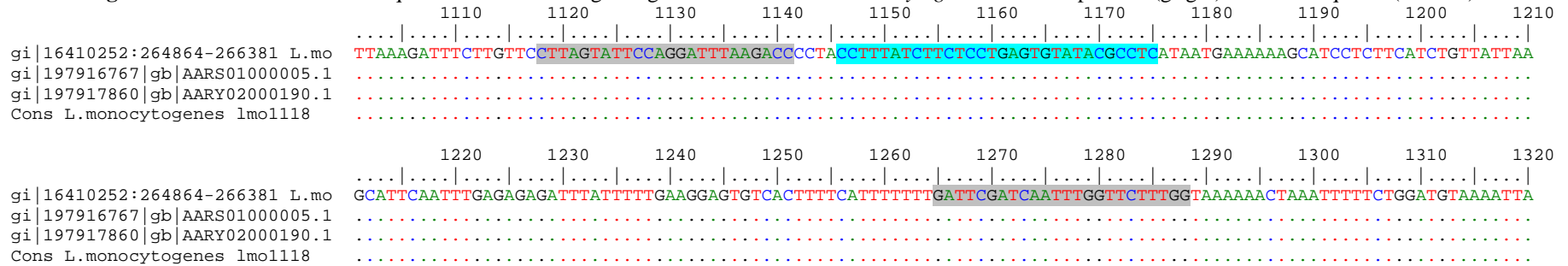


Figura 39 Allineamento delle sequenze relative alla regione genica ORF2819 di *L. monocytogenes* e relativi primers (grigio) e sonda TaqMam (azzurro)

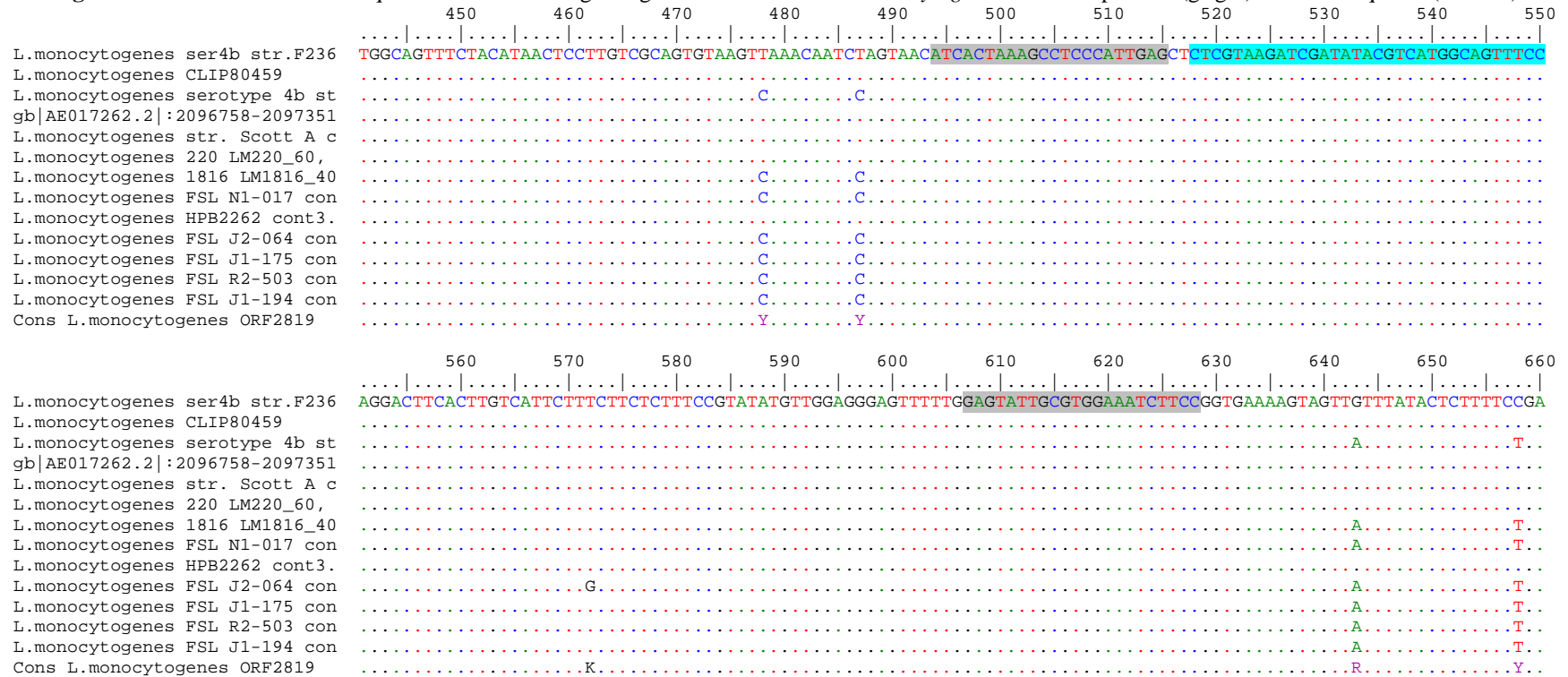


Figura 40 Allineamento delle sequenze relative alla regione genica ORF2110 di *L. monocytogenes* e relativi primers (grigio) e sonda TaqMam (azzurro)

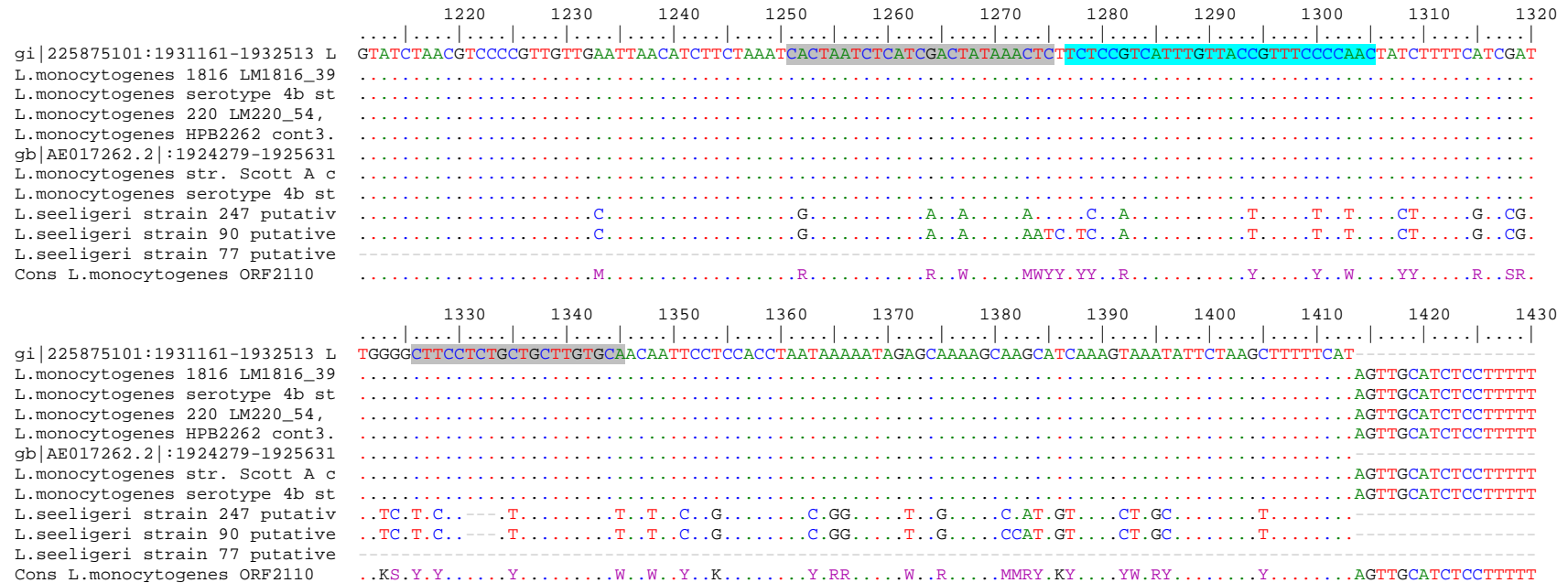
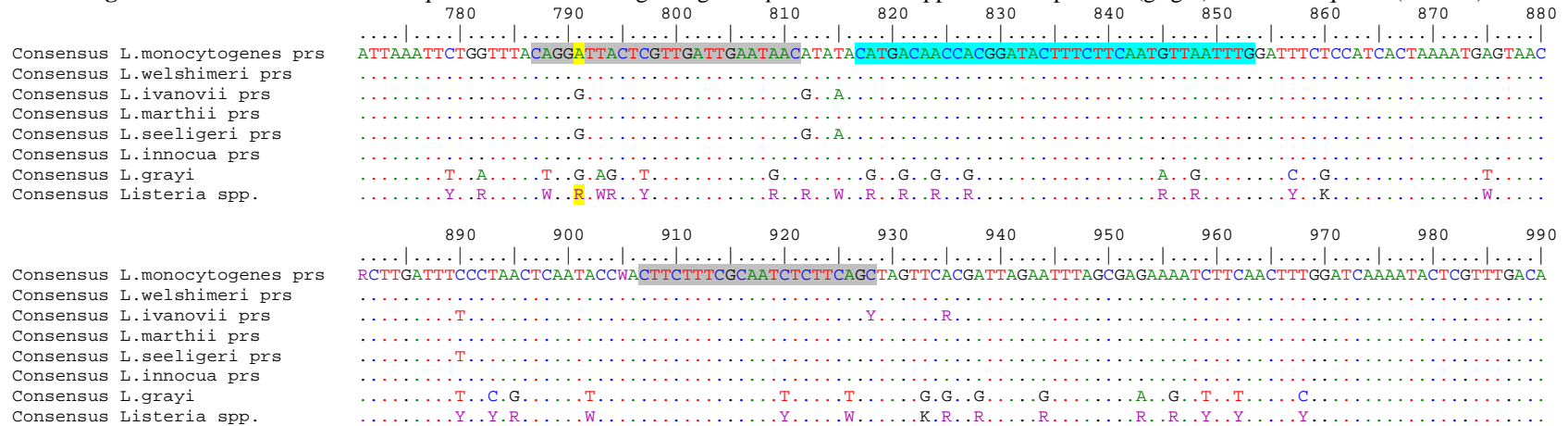


Figura 41 Allineamento delle sequenze relative alla regione genica *prs* di *Listeria* spp. e relativi primers (grigio) e sonda TaqMam (azzurro)



casuale di DNA è $\frac{1}{4}$ (4^{-1}). Per un oligonucleotide di 16 basi è di 4^{-16} ($=1/4\ 294\ 967\ 296$) che corrisponde alla dimensione del genoma di un eucariote complesso medio (es. *Homo sapiens*) ed è 1000 volte più grande del genoma di *E. coli*. Di conseguenza, un oligonucleotide con almeno 17 o più basi sarà estremamente specifico. Il limite superiore per la lunghezza di un primer è dettato dalla sua T_m . Un primer troppo lungo avrà una temperatura di melting che alle alte temperature di annealing (70-72 °C) non sarà sufficiente a limitare fenomeni di ibridazione a siti aspecifici dovuti alla stabilità di legami non complementari (*mismatch pairing*). Solitamente, quindi la lunghezza di un primer non supera le 30 basi [148].

- **Temperatura di melting (T_m)** compresa tra 55°C e 60°C

La T_m dei primers dipende dal contenuto in G+C e dalla lunghezza. Considerando un primer di 20 basi, la T_m viene calcolata applicando la formula $[4(G + C) + 2(A + T)]^\circ\text{C}$. I primers forward e reverse devono avere T_m uguali (è accettabile una differenza massima pari a 4°C) per rese di reazione ottimali e alta specificità. Infatti, una T_m troppo bassa porta all'amplificazione di frammenti non specifici, mentre una T_m troppo elevata può ridurre la resa poiché solo una frazione delle molecole del primer riesce ad innescare la polimerizzazione a causa dell'elevata instabilità del loro appaiamento con il DNA stampo. In base alla T_m si stabilisce la temperatura di annealing (T_a) della PCR, che dovrebbe essere di alcuni gradi inferiore alla T_m

- **Contenuto in G+C** 30-80% (ottimale tra il 40 e il 60%). Evitare sia valori troppo bassi (bassa T_m) sia valori troppo alti (alta T_m). Se il valore G+C è troppo elevato, non si ha denaturazione ottimale durante il ciclo termico, ottenendo così una reazione meno efficiente. Le sequenze ricche di G/C sono suscettibili di interazioni non specifiche che riducono l'efficienza della reazione e produrre un segnale non specifico
- **Lunghezza dell'amplicone** 50-150 paia di basi
- **Evitare basi di timina (T) all'estremità 3'** per evitare mismatching, ovvero legami non complementari e aumentare la specificità dell'amplificazione, disegnare primer in cui le ultime basi al terminale 3' siano una G o C, in quanto il terminale 3' è quello che porta all'innescamento effettivo della polimerizzazione. Tuttavia, è necessario evitare in tali estremità regioni estremamente ricche di basi G e/o C, per ridurre la possibilità di prodotti aspecifici
- **Evitare sequenze ripetute** La presenza di regioni a bassa complessità, sia di singoli nucleotidi sia di regioni di- o tri-nucleotidiche, può portare ad uno slittamento dell'appaiamento o all'annealing aspecifico. Evitare soprattutto ripetizioni di 3 o più G o C
- **Evitare strutture secondarie e formazione di dimeri di primers** tali strutture possono impedire l'amplificazione o diminuirne la resa. Infatti, competono per l'annealing del

primer con lo stampo sul DNA bersaglio, diminuendo drasticamente la concentrazione effettiva di primer disponibile per la reazione di amplificazione.

Le principali strutture secondarie sono:

Hairpin: si formano per l'interazione intramolecolare tra i nucleotidi del primer; i meno tollerati sono gli hairpin al terminale 3'

Self dimer: si formano per l'interazione intermolecolare tra due molecole di primer dello stesso tipo nei punti in cui il primer è omologo a se stesso

Cross dimer: si formano tra due molecole di primer di tipo diverso nelle regioni di omologia di sequenza.

Linee guida generali per il disegno di sonde TaqMan

- **Lunghezza della sonda** 18-30 basi

Maggiore è la lunghezza della sonda, maggiore sarà la sua specificità per il target, anche se aumenta la distanza tra i fluorofori Reporter e Quencher

- **Contenuto in G+C** 30-80%

- **Temperatura di melting** almeno 10°C superiore rispetto alla T_m dei primers, in genere compresa tra 68° e 70°C. In tal modo, si verifica dapprima l'appaiamento della sonda e successivamente dei primers durante la fase di annealing della PCR

- **Evitare G all'estremità 5'**

La guanina mostra un effetto quenching in questa posizione (vicino al fluoroforo Reporter), anche dopo la scissione della sonda, riducendo i valori di fluorescenza emessa. Nel caso si utilizzi come reporter FAM, evitare G nella seconda posizione dell'estremità 5'

- **Il numero complessivo di G deve essere inferiore al numero di C**

- **Distanza dal forward** la sonda deve essere il più vicino possibile al primer forward, senza sovrapposizioni. Di solito l'estremità 3' del forward dista 2 fino ad un massimo 5 bp dall'estremità 5' della sonda

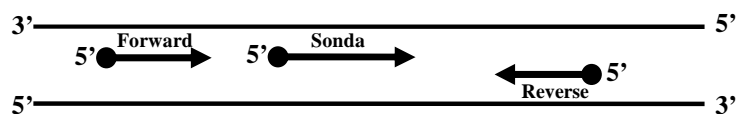
- **Evitare sequenze ripetute** soprattutto quattro o più basi G

- **Evitare strutture secondarie** (hairpin).

Per il disegno di primer e sonde con le caratteristiche più idonee, sono stati utilizzati i software PrimeExpress 3.0 (Applied Biosystem) e Primer3 (URL: http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) partendo da una sequenza di DNA in formato Pearson (FASTA). Tale ricerca è realizzata considerando che è necessario disegnare un primo primer (forward) sull'elica senso del DNA e l'altro (reverse) sull'elica opposta

(antisenso), o viceversa, in modo da avere i due terminali 3' dei primer a delimitare il segmento da amplificare. La sonda va disegnata sulla stessa elica del primer forward (Fig. 42).

Figura 42 Annealing di primers e sonde sulla doppia elica del DNA



Per il calcolo dei principali parametri da considerare è stato utilizzato il programma on-line Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). La specificità del disegno è stata verificata attraverso BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) analysis per la ricerca di omologia tra le sequenze disegnate e quelle depositate in banca dati e per stabilire potenziali cross-ibridazioni con altre sequenze nucleotidiche.

In tabella 9 sono riportate le caratteristiche principali e le sequenze dei primers e delle sonde TaqMan utilizzate nelle Multiplex-PCR.

I primers disegnati per l'amplificazione del gene *prs* sono risultati specifici per tutte le specie di *Listeria* spp., fatta eccezione per *L. grayi* non riconosciuta, mentre per la specie *L. rocourtiae*, di recente identificazione, nessuna sequenza genica è depositata in GenBank.

Nessuna omologia è stata osservata tra i primers per l'amplificazione di ORF2110 e *L. seeligeri*, sebbene alcune sequenze depositate di tale specie abbiano fornito un elevato livello di similarità con tale regione tipica di *L. monocytogenes* (Fig. 40).

Per il gene specie-specifico *plcA*, si è fatto riferimento alla procedura operativa standard utilizzata presso l'Health Protection Agency (Londra, UK) per l'identificazione di *L. monocytogenes*. Per la standardizzazione delle Triplex-PCR, le sonde *lmo1118* e *prs* sono state marcate con il fluoroforo DragonFly Orange (DFO; eccitazione 550±10nm, emissione 586±10nm) all'estremità 5' e Black Hole Quencher [BHQ-2] all'estremità 3'; le sonde TaqMan per i target ORF2819 e *plcA* sono state realizzate con reporter 6-carboxy-fluorescein (FAM; eccitazione 470±15nm, emissione 520±15nm) e Black Hole Quencher [BHQ-1]; ORF2110 e *lmo0737* con Yakima Yellow (YY; eccitazione 520±10nm, emissione 558±12 nm) in 5' e BHQ-1 in 3' (Tab. 9).

Tabella 9. Caratteristiche e sequenze nucleotidiche (5'-3') dei primers e delle sonde TaqMan utilizzate nelle Multiplex-PCR

Sequenze nucleotidiche (5'-3')		Lunghezza (bp)	T _m (°C)	Contenuto GC %	Amplicone (bp)
(http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html)					
ORF2819					
Forward	ATCACTAAAGCCTCCCATTGAG	22	45	60.1	135
Reverse	GGAAGATTTCCACGCAATACTC	22	45	60.1	
Probe	[5']6-FAM-CTCGTAAGATCGATATACGTCATGGCAGTTTCC-[3']BHQ-1	33	45	72.5	
<i>plc</i>*					
Forward	CGGCGCACCTAACCAAGTAA	20	55	60.5	80
Reverse	CAGTCTGGACAATCTCTTTGAATTTT	26	35	61.7	
Probe	[5']6-FAM-TCAAGATGACTACAATGGTCCGAGTGTGAAAA-[3']BHQ-1	32	41	70.1	
<i>lmo0737</i>					
Forward	GCATCTTGTTTAGCAAGTGGATC	23	60.9	43	103
Reverse	GAGCACGGAAGTTGCTAGGT	20	60.5	55	
Probe	[5']-Yakima Yellow-CCAACACTTTCTCATCAATACCATCTTCCC-[3']BHQ-1	30	43	69.2	
ORF2110					
Forward	CACTAATCTCATCGACTATAAACTC	25	36	60.9	95
Reverse	TGCACAAGCAGCAGAGGAAG	20	55	60.5	
Probe	[5']-Yakima Yellow-TCTCCGTCATTTGTTACCGTTTCCCCAAC-[3']BHQ-1	29	48	70.3	
<i>lmo1118</i>					
Forward	CTTAGTATTCCAGGATTTAAGACC	24	60.3	38	171
Reverse	CAAAGAACCAAATTGATCGAATC	24	60.3	38	
Probe	[5']DragonFly-CCTTTATCTTCTCCTGAGTGTATACGCCTC-[3']BHQ-2	30	47	70.8	
<i>prs</i>					
Forward	CAGGRTTACTCGTTGATTGAATAAC	25	30-40	60.9-62.5	142
Reverse	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	22	45	60.1	
Probe	[5']DragonFly-CATGACAACCACGGATACTTTCTTCAATGTTAATTTG-[3']BHQ-2	37	35	71.1	

* Procedura Operativa Standard per l'identificazione di *L. monocytogenes* (HPA, Londra, UK)

5.4.1 Individuazione dei sierogruppi mediante due saggi in Triplex-PCR

A partire dallo schema di tipizzazione di Doumith et al. (2004) sono state disegnate *ex novo* coppie di primer e rispettive sonde TaqMan per l'identificazione degli stessi target molecolari, strettamente associati al sierotipo di appartenenza dei ceppi. Gli esperimenti sono stati condotti su 109 ceppi di *L. monocytogenes* e *Listeria* spp., isolati da casi clinici, alimenti e tamponi ambientali, come riportato in tabella 7. Sono state realizzate due Triplex-PCR: la prima per la ricerca dei geni ORF2110, ORF2819 e *lmo1118*; la seconda per i target *lmo0737*, *plcA* e *prs* (Tab. 10). Per quanto riguarda il gene *plcA*, si è fatto riferimento a quanto riportato dalla procedura operativa standard utilizzata presso il laboratorio dell'Heath Protection Agency di Londra e la sua amplificazione è stata utilizzata per l'identificazione di *L. monocytogenes*. Ciascuna reazione è stata realizzata in un volume finale di 25 µl contenente 5 µl di DNA estratto mediante MicroLYSIS (Microzone) in accordo con il seguente protocollo (Tab. 10):

Tabella10 Protocollo di reazione delle due Triplex-PCR per la sierotipizzazione di *L. monocytogenes*

Multiplex-PCR 1	Concentrazione finale	Multiplex-PCR 2	Concentrazione finale
Master Mix (2X)	1X	Master Mix (2X)	1X
<i>ORF2819</i> F+R	0,3 µM	<i>lmo0737</i> F+R	0,3 µM
<i>ORF2110</i> F+R	0,3 µM	<i>plcA</i> F+R	0,3 µM
<i>lmo1118</i> F+R	1 µM	<i>prs</i> F+R	1 µM
Sonda <i>ORF2819</i>	0,1 µM	Sonda <i>lmo0737</i>	0,1 µM
Sonda <i>ORF2110</i>	0,1 µM	Sonda <i>plc</i>	0,1 µM
Sonda <i>lmo1118</i>	0,2 µM	Sonda <i>prs</i>	0,2 µM

Per ciascuna reazione, è stata utilizzata la TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase UNG (Applied Biosystem, UK), contenente ROX come reference dye. Primers e sonde TaqMan sono prodotte da Eurogentec, Belgium.

Le due Triplex-PCR sono state realizzate in parallelo utilizzando lo strumento 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystem) e impostando i filtri per i fluorofori VIC (*lmo0737* e *ORF2110*), FAM (*ORF2819* e *plcA*) e NED (*lmo1118* e *prs*). Il protocollo di PCR prevede una fase di attivazione iniziale a 95°C per 20 secondi, seguiti da 40 cicli a 95 °C 3 secondi e 60°C per 30 secondi. Tutti i campioni sono stati analizzati in doppio e con controllo negativo NTC. Specificità e riproducibilità sono state valutate inserendo il ceppo di riferimento NCTC 11994 e due ceppi selezionati (ceppo n.103, 4b e n.17, 1/2c) in ciascuna reazione.

5.5 Valutazione della resistenza al cloruro di benzalconio

Per valutare gli effetti del cloruro di benzalconio su colture di *L. monocytogenes* si è fatto riferimento alla procedura prevista dal protocollo UNI EN 1276/2000, utilizzando il metodo della filtrazione su membrana. Tale metodica prevede la preparazione di una soluzione del disinfettante alla concentrazione stabilita, cui viene aggiunta la sospensione batterica di prova, in presenza o assenza di sostanze interferenti, al fine di simulare le cosiddette condizioni di “pulito” e di “sporco” (in base alla quantità di di BSA utilizzata, rispettivamente 0,3% e 3%). La miscela è mantenuta a temperatura predefinita e, dopo il tempo di contatto, viene prelevata un'aliquota da sottoporre immediatamente a filtrazione su membrana. Per ciascun isolato si determina la riduzione nella conta delle unità vitali a seguito del trattamento.

Nel presente lavoro è stato utilizzato come disinfettante un preparato commerciale contenente cloruro di benzalconio. Come descritto in tabella 11, le prove sono state eseguite in condizioni cosiddette di “pulito” (concentrazione di BSA 0,3%) e si è scelto di utilizzare una soluzione di disinfettante alla concentrazione sub-letale di 10 ppm messa a contatto con la sospensione batterica per 5 minuti.

Tabella 11 Condizioni sperimentali

Prova in condizioni di “pulito”				
Temperatura di contatto	Tempo di contatto	Concentrazione di disinfettante	Sostanza interferente	Concentrazione sospensione batterica
20°C ± 1°C	5 min	10 ppm	BSA 0,3%	2 x 10 ⁸ UFC/ml

Il protocollo ha previsto le seguenti fasi:

- prelevare in condizioni asettiche alcune ansate della coltura pura (precedentemente preparata su terreno solido TSA) e stemperare in una provetta contenente 10 ml di soluzione fisiologica. Dopo aver agitato la sospensione per qualche minuto, effettuare la lettura della densità ottica della sospensione per ottenere una concentrazione iniziale costante di 2x10⁸ UFC/ml (OD₆₀₀ = 0,1), ricorrendo ad eventuale diluizione. La sospensione batterica di prova deve essere mantenuta alla temperatura stabilita ed utilizzata entro 2 ore
- preparare la soluzione del disinfettante al momento dell'utilizzo ed utilizzare entro 60 minuti
- per simulare le condizioni di “pulito”, utilizzare una soluzione di sieroalbumina bovina (BSA, Sigma Aldrich, Milano), preparata alla concentrazione finale 0,3 g/l
- preparare una miscela contenente 1 ml di BSA 0,3% e 1 ml della sospensione batterica a titolo noto, mantenuta a bagnomaria alla temperatura stabilita (20°C ± 1°C) per 2 min

- aggiungere 8 ml della soluzione di disinfettante a concentrazione nota, misurando il tempo di contatto dopo agitazione
- prelevare in doppio 0,1 ml dalla miscela e trasferire in dispositivi separati per la filtrazione, in cui viene posta una membrana di porosità 0,45 µm (Albet) con 50 ml di acqua distillata sterile
- prelevare sterilmente la membrana, depositare su piastra di TSAe incubare a 37°C
- effettuare la lettura delle piastre dopo le 48 ore.

Vanno anche effettuate prove di convalida per verificare la sterilità della sostanza interferente, l'assenza di qualsiasi effetto letale nelle condizioni di prova e la procedura di filtrazione.

- *Controllo della sterilità della sostanza interferente:* prelevare 100 µl di BSA e seminare in due piastre di TSA. Dopo incubazione a 37°C ± 1°C per 24-48 ore eseguire la lettura delle piastre.

- *Verifica dell'assenza di qualsiasi effetto letale nelle condizioni di prova:* in una provetta sterile sono introdotti 1 ml di BSA e 1 ml della sospensione batterica preparata; la miscela è posta in bagnomaria alla temperatura stabilita per 2 minuti. Aggiungere 8 ml di acqua distillata sterile e, alla fine del tempo di contatto, prelevare 1 ml in doppio e trasferire in due dispositivi separati per la filtrazione, muniti di membrana appropriata e contenenti 50 ml di acqua distillata sterile. Dopo la filtrazione trasferire le membrane in condizioni asettiche su due piastre di TSA. Dopo incubazione a 37°C ± 1°C per 24-48 eseguire la lettura delle piastre.

- *Convalida del procedimento di filtrazione:* prelevare due aliquote da 0,1 ml della sospensione batterica a titolo noto (10² UFC/ml), filtrare in 50 ml di acqua distillata sterile e adagiare su piastre di TSA. Contare le colonie dopo incubazione a 37°C ± 1°C per 24-48 ore.

Tutte le prove vanno eseguite in doppio e, dopo la lettura dei risultati, viene calcolata la media aritmetica del numero di colonie cresciute su ogni piastra di TSA per ogni campione. L'attività battericida del cloruro di benzalconio è data dalla riduzione delle cellule vive (R) mediante la seguente formula: $R = \frac{N_i}{N_f} \times 10^{-1}$ dove:

N_f

N_i : numero di UFC/ml nella sospensione batterica iniziale

N_f : numero di UFC/ml dopo il trattamento con cloruro di benzalconio

10⁻¹ : fattore di diluizione.

Il disinfettante è considerato efficace solo in caso di una riduzione della conta di unità vitali di almeno 10⁵ dopo il tempo di contatto stabilito.

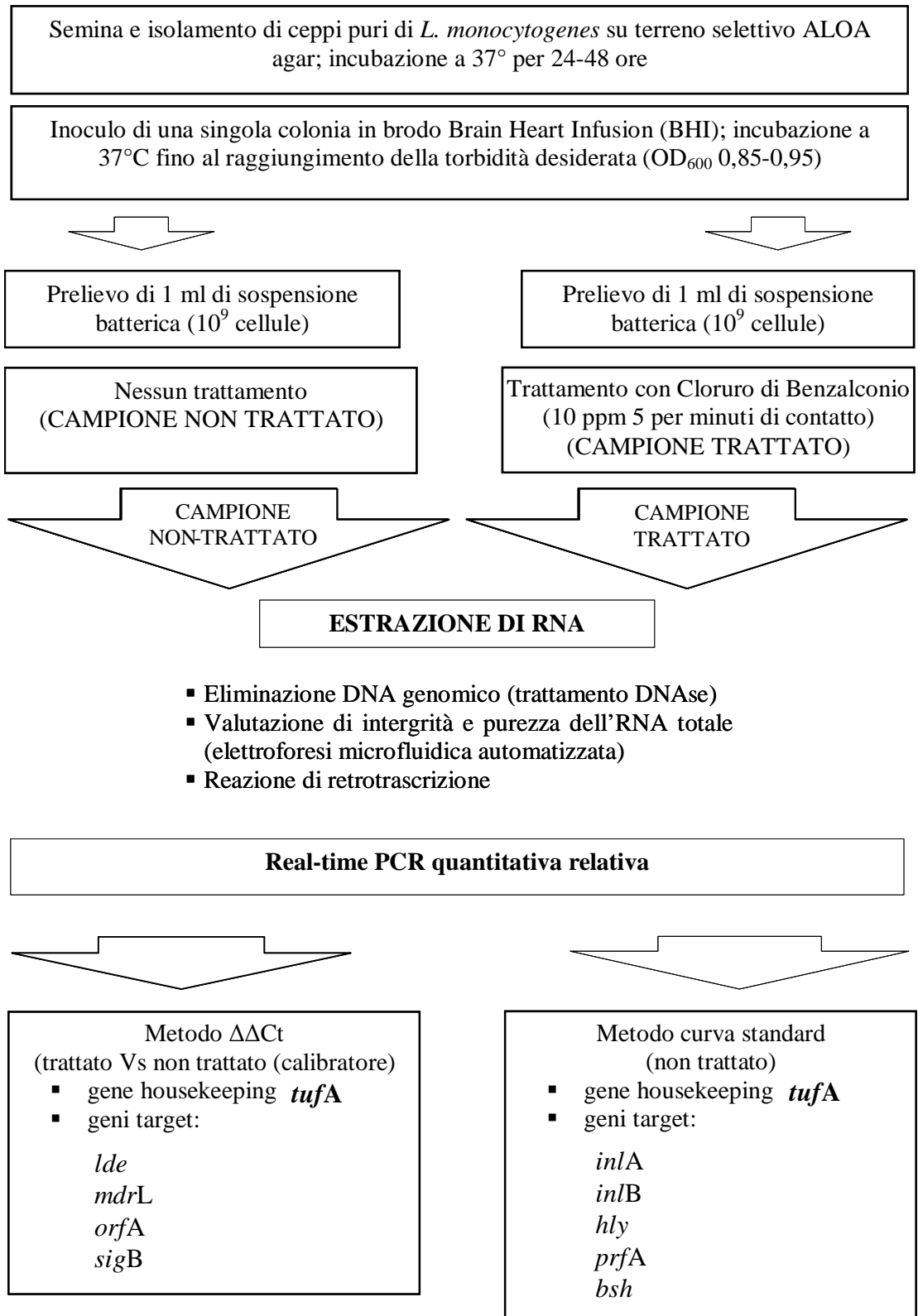
5.6 Analisi dell'espressione di geni mediante qRT-PCR

Per 20 ceppi di *L. monocytogenes* sono stati valutati i livelli di espressione di differenti geni mediante due procedure distinte, seguendo lo schema riportato in figura 43.

Gli effetti del trattamento con cloruro di benzalconio (concentrazione di 5 ppm) sono stati analizzati in relazione ai geni codificanti per le pompe di efflusso MdrL (multi drug resistance in *Listeria*, gene *mdrL*), responsabile dell'espulsione dalla cellula di antibiotici (macrolidi e cefotaxime), metalli pesanti e bromuro di etidio e Lde (*Listeria* drug efflux; gene *lde* lmo2741), associato alla resistenza ai fluorochinoloni e, in parte, ad arancio di acridina e bromuro di etidio. Inoltre, è stata valutata l'espressione del gene *orfA*, codificante per il repressore trascrizionale di *mdrL*, e del fattore di risposta a stress σ^B codificato dal gene *sigB* che regola l'espressione di geni implicati nella sopravvivenza del patogeno in situazioni di stress ambientale. L'effetto del trattamento con disinfettante è stato valutato mediante confronto tra ceppo trattato e non sottoposto a trattamento.

Inoltre, su colture batteriche in fase di crescita esponenziale, è stata analizzata l'espressione dei geni *inlA* e *inlB*, codificanti per le rispettive internaline A e B, determinanti nel processo di invasione della cellula ospite da parte del patogeno. Inoltre, è stata valutata l'espressione di uno dei principali fattori di virulenza di *L. monocytogenes*, quale *hly*, responsabile della risposta emolitica e il gene *prfA*, che controlla positivamente l'intero cluster di virulenza LIPI-1. Infine, è stato considerato il gene *bsh*, codificante per una idrolasi dei sali biliari, fondamentale per il superamento del tratto gastrointestinale dell'ospite. L'espressione di tali geni in ceppi non sottoposti a trattamento con disinfettante è stata valutata applicando il metodo della curva standard (con opportune modifiche).

Figura 43 Schema della procedura seguita per valutare i livelli di espressione dei geni target



5.6.1 Estrazione di RNA

L'RNA totale è stato estratto da colture pure di *L. monocytogenes* trattate (T) e non (NT) con cloruro di benzalconio. In accordo con il protocollo UNI EN ISO1276/2000 le prove sono state condotte simulando le condizioni di 'pulito' (soluzione 0,3% di BSA). Per l'estrazione è stato utilizzato il sistema RNeasy Mini Kit (Qiagen, Milano) in combinazione con RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen), che viene aggiunto direttamente alla sospensione batterica prima dell'estrazione per stabilizzare *in vivo* l'RNA. Infatti, le molecole di mRNA procariotico hanno vita breve e vengono degradate in pochi minuti essendo soggette a degradazione enzimatica; inoltre, durante la manipolazione dei campioni possono verificarsi fenomeni di induzione genica. La combinazione di questi due effetti può portare ad un profilo di trascrizione molto diverso dal reale pattern di espressione *in vivo*. L'eliminazione di DNA genomico dai campioni di RNA totale è stata condotta mediante RNase-Free DNase Set (Qiagen). In base alle indicazioni fornite dalla casa produttrice del kit, è stato selezionato il protocollo di estrazione e purificazione di RNA basato su lisi enzimatica. Tuttavia, sono state apportate alcune variazioni considerando le specifiche condizioni sperimentali ed in accordo con Werbrouck et al. (2006) [147].

Preparazione della sospensione batterica

1. Inoculare una singola colonia di *L. monocytogenes* (prelevata da piastra di terreno selettivo ALOA) in 10 ml di BHI (Brain Heart Infusion Broth, Biolife)
2. Incubare la sospensione batterica a 37°C fino al raggiungimento di una densità ottica (OD₆₀₀) compresa tra 0,85-0,95 ($\pm 1-3 \times 10^9$ cellule/ml). In corrispondenza di tali valori, le cellule batteriche si trovano nella fase di crescita esponenziale, in cui le condizioni colturali sono più costanti, con un'ottimale concentrazione di nutrienti, ed i livelli di RNA sono massimi per l'elevata attività metabolica in quanto il tempo di generazione è massimo
3. Prelevare 1 ml della sospensione batterica e trasferire in tubi da 15 ml con tappo a vite

Stabilizzazione dell'RNA

4. Mettere a contatto 1 ml di sospensione batterica con 1 ml di soluzione di BSA 0,3 % per 2 minuti
5. Trasferire i 2 ml (1 ml coltura +1 ml BSA) in tubi da 15 ml contenenti 8 ml di acqua distillata sterile (per il **campione non sottoposto a trattamento; NT**)
6. Centrifugare a 4000 rpm per 10 minuti

7. Eliminare 9,5 ml di surnatante, recuperare i restanti 500 μ l e trasferirli in tubi sterili da 2 ml
 8. Aggiungere 2 volumi (1000 μ l) di RNAProtect Bacteria Reagent e vortexare immediatamente per 5 secondi
 9. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti
 10. Centrifugare a 7500 rpm per 10 minuti
 11. Eliminare tutto il surnatante per ottenere il pellet batterico
- Qualora il pellet non venga utilizzato al momento, può essere conservato fino a 2 settimane a - 20°C o 1 mese a -70°C

Estrazione e purificazione

12. Aggiungere al pellet batterico 100 μ l di soluzione di buffer TE contenente 5 mg/ml di lisozima (Invitrogen) e 13 mg/ml di proteinase K (Promega) e risospendere il pellet mediante pipettamento. In tale fase avviene la lisi della cellula batterica
13. Vortexare per 10 secondi ed incubare a 37°C per 30 minuti
14. Aggiungere 350 μ l di buffer RLT, previa aggiunta di β -mercaptoetanololo (10 μ l in 1 ml) e vortexare vigorosamente
Tale buffer contiene guanidina tiocianato, l'agente caotropico in grado di denaturante le strutture cellulari e di inattivare gli enzimi ribonucleasi (RNase); il β -mercaptoetanololo è in grado di rompere i ponti disolfuro delle proteine
15. Aggiungere 250 μ l di etanolo (96-100%) e agitare mediante pipettamento
L'etanolo induce aggregazione e precipitazione degli acidi nucleici
16. Trasferire 700 μ l della miscela di lisato nella colonnina di estrazione e centrifugare a 10000 rpm per 15 secondi. Eliminare il filtrato
La membrana, costituita da una matrice silicea presente nelle colonnine del kit, è in grado di legare gli acidi nucleici in presenza di agenti caotropici, contenuti nel buffer (RW1, RPE). Dopo aver lavato la matrice silicea con passaggi successivi, l'RNA viene eluito in mezzo acquoso
17. Aggiungere 350 μ l di buffer RW1 alla colonnina, centrifugare a 10000 rpm per 15 secondi ed eliminare il filtrato
18. **Trattamento con RNase-Free DNase Set (Qiagen):** aggiungere direttamente sulla membrana della colonnina 80 μ l di miscela (preparata al momento) contenente 10 μ l di DNase I e 70 μ l di buffer RDD e incubare 37°C per 30 minuti
19. Aggiungere 350 μ l di buffer RW1 e aspettare 5 minuti. Centrifugare a 10000 rpm per 15 secondi. Eliminare il filtrato con tutto il tubo di eluizione
20. Posizionare le colonnine in nuovi tubi da 2 ml

21. Aggiungere 500 µl di buffer RPE. Centrifugare a 10000 rpm per 15 secondi. Eliminare il filtrato
22. Aggiungere 500 µl di buffer RPE. Centrifugare a 10000 rpm per 2 minuti. Eliminare il filtrato e il tubo di eluizione
23. Posizionare le colonnine in nuovi tubi da 1,5 ml
24. Aggiungere 50 µl di RNase-free water. Centrifugare 1 minuto a 10000 rpm ed eliminare la colonnina
25. Trasferire il filtrato in tubi da 0,5 ml opportunamente contrassegnati. Nel filtrato è contenuto l'RNA purificato che può essere conservato a -20°C.

5.6.2 Trattamento con cloruro di benzalconio

Il trattamento con disinfettante è stato eseguito prima dell'estrazione di RNA totale come descritto in precedenza e in parallelo con lo stesso campione non sottoposto a contatto con disinfettante. La procedura prevede le stesse fasi descritte nel protocollo di estrazione di RNA da cellule di *L. monocytogenes* (paragrafo 5.6.1), tuttavia il punto 5 va sostituito con:

5. Trasferire i 2 ml (1 ml coltura + 1 ml BSA) in tubi da 15 ml contenenti 8 ml soluzione 10 ppm di cloruro di benzalconio in acqua distillata sterile, preparata al momento (per il **campione sottoposto a trattamento; T**). Agitare vigorosamente e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti

5.6.3 Eliminazione di DNA genomico dall'RNA estratto

Un ulteriore trattamento con DNase è stato necessario per eliminare la contaminazione residua di DNA genomico nell'RNA totale estratto ed è stato effettuato mediante DNase I (RNase-free) (Ambion, Inc).

In particolare, dopo aver diluito il campione di RNA (1:10) in RNase free water, 35 µl di tale diluizione sono stati trattati con quattro unità dell'enzima in presenza dello specifico buffer di reazione e incubati a 37°C per 30 minuti. Per inattivare l'enzima, i campioni sono stati sottoposti a 75°C per 10 minuti dopo aggiunta di EDTA (5 mM).

5.6.4 Elettroforesi microfluidica di RNA totale

La valutazione della purezza e della qualità dell'RNA totale estratto da cellule di *L. monocytogenes*, è stata condotta mediante sistema automatizzato Experion™ (BioRad), utilizzando Experion™ RNA StdSens Analysis kit (Bio-Rad)

Preparazione del campione e del Ladder

Sottoporre un opportuno volume del campione di RNA totale (2-3 µl) e di RNA ladder (3µl) a denaturazione mediante trattamento termico a 70°C per 2 minuti e rapidamente porre in ghiaccio fino al momento dell'utilizzo

Lavaggio elettrodi

Prima e dopo ogni analisi lavare gli elettrodi dello strumento utilizzando Experion Electrode cleaner e Experion DEPC-Treated Water (BioRad). Tali soluzioni sono messe a contatto per alcuni minuti con gli elettrodi all'interno di un supporto simile ad un chip

Priming del chip (Fig. 44)

Caricare 9 µl di gel-stain solution (BioRad) e procedere con la preparazione del chip (priming) mediante un'opportuna combinazione di pressione/tempo (B1) all'interno della Priming Station, in modo da riempire tutti i microcanali del chip con il gel

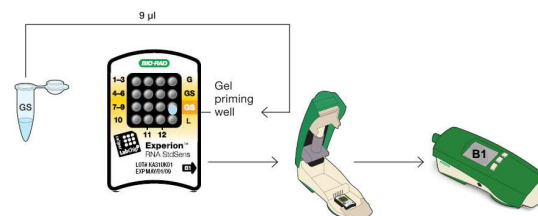


Figura 44 Schema per la Preparazione del chip per l'elettroforesi di RNA totale procariotico

Caricamento del chip

Caricare altri 9 µl di gel-stain solution nel restante pozzetto denominato GS

Caricare 9 µl di gel filtrato (senza aggiunta di RNA StdSens stain) nel pozzetto G

Caricare 5 µl di loading buffer in tutti i pozzetti, ad eccezione di quelli denominati GS o G

Introdurre i campioni (1 µl) nei pozzetti da 1 a 12

Caricare 1 µl di RNA ladder (BioRad) nel pozzetto L

Sottoporre il chip ad agitazione nella Vortex Station, per un tempo prestabilito, al fine di eliminare eventuali bolle di aria, che potrebbero compromettere l'analisi

Elettroforesi

Introdurre il chip, privo di bolle, nella Electrophoresis Station entro 5 minuti dal caricamento, per evitare l'evaporazione dai pozzetti. Avviare il programma Total RNA StdSens.

5.6.5 Sintesi del cDNA: reazione di retrotrascrizione

La retrotrascrizione di mRNA in cDNA è stata realizzata mediante iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Il buffer contenuto in tale kit contiene oligo (dT), random primers e inibitori delle RNase in una miscela pronta per l'uso.

Dopo aver stimato la concentrazione dell'RNA totale estratto, preparare una miscela di reazione contenente 4 µl di 5× iScript reaction mix, 1 µl di enzima iScript reverse transcriptase, RNA (~14 µl) e Nuclease free-water fino a volume finale di 20 µl. Procedere con l'incubazione a 25°C per 5 minuti, 42°C per 30 minuti e 85°C per 5 minuti.

In parallelo, per ciascun campione è stato preparato un controllo non retrotrascritto NoRT (no-reverse transcriptase control) ottenuto con gli stessi componenti ad eccezione dell'enzima.

5.6.6 Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

Il cDNA ottenuto dai ceppi di *L. monocytogenes* è stato amplificato mediante qRT-PCR in SYBR Green utilizzando il termociclatore Realplex (Eppendorf) secondo lo schema di reazione riportato in tabella 12. Le coppie dei primers per i geni target analizzati sono riportate in tabella 13.

Tabella 12 Protocollo di reazione per la retro trascrizione di RNA

COMPONENTI DI REAZIONE	CONCENTRAZIONE FINALE
SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara)	1×
ROX Reference Dye II (Takara)	1×
Forward Primer (Eurogentec)	0,3 µM/0,6 µM *
Reverse Primer (Eurogentec)	0,3 µM/0,6 µM *
cDNA	2 µl (<100 ng)
dH ₂ O	a volume finale di 25 µl

* 0,3 µM per *tufA orfA sigB inlA hly prfA bsh*; 0,6 µM *mdrL lde inlB*

Il protocollo di amplificazione consiste in 40 cicli a 95 °C per 5 secondi (denaturazione), 65°C per 30 secondi (annealing/extension) per *mdrL, lde, orfA* e *sigB* o 60 °C per *inlA, inlB, hly, prfA* e *bsh*. Per verificare l'accuratezza e la riproducibilità del metodo, le prove sono state condotte in triplicato per ciascun campione, mentre la specificità delle coppie di primers è stata verificata mediante l'analisi delle curve di melting.

In ogni saggio è stata anche verificata la presenza di contaminazioni introducendo un controllo negativo (NTC; miscela senza cDNA) e un campione di RNA non retrotrascritto (NoRT; retrotrascrizione senza enzima), per verificare la presenza di DNA genomico residuo. Inoltre,

per ciascuna coppia di primers è stata calcolata l'efficienza di reazione mediante allestimento di cinque diluizioni seriali in triplicato del cDNA del ceppo di riferimento F2365.

Per valutare i livelli di espressione dei geni target *mdrL*, *lde*, *sigB* e *orfA*, è stato utilizzato il metodo Livak, confrontando i valori di Ct del ceppo esposto a cloruro di benzalconio (T) con quello non sottoposto a trattamento disinfettante (NT) e normalizzando i risultati rispetto al gene di riferimento *tufA* [146].

Tabella 13 Sequenze nucleotidiche (5' - 3') dei primers utilizzati per le reazioni di qRT-PCR

Gene target	Primers	Amplificone (bp)	Riferimenti
<i>tufA</i>	Fwd: GCTGAAGCTGGCGACAACA Rev: CTTGACCACGTTGGATATCTTCAC	64	[147]
<i>inlA</i>	Fwd: GAACCAGCTAAGCCIGTAAAAG Rev: CGCCIGTTTGGGCATCA	64	[147]
<i>inlB</i>	Fwd: GGAAAAGCAAAAGCAIGATTTC Rev: TCCATCAACATCATAACTTACTGTGTAAA	81	[147]
<i>inlC</i>	Fwd: TGTGCATTAATATGGGTTCTGGAA Rev: TGGTTAATAGGCGTTGGTCGTT	70	Questo studio
<i>hly</i>	Fwd: TGCAAGTCCTAAGACGCCA Rev: CACTGCATCTCCGTGGTATACTAA	112	[149]
<i>prfA</i>	Fwd: CAATGGGATCCACAAGAATA Rev: AGCCTGCTCGCTAATGACTT	186	[150]
<i>bsh</i>	Fwd: AGCCAATTCCGCCCATCCCAC Rev: CGCGTTCCTTCGAGTGAAACCCCA	88	Questo studio
<i>lde</i>	Fwd: GGC ACTATCAACGGCAGCGGT Rev: TGTGTCCGACAACGCTCCACC	70	Questo studio
<i>mdrL</i>	Fwd: CCTCGGTACTGCAACTCGGC Rev: CCGCCATCGCACCACCAATCA	71	Questo studio
<i>orfA</i>	Fwd: TTTGCATAATTGGAAGCCGGTTTGC Rev: TGATTGCTCGTGAAGCTTCTAGTGG	60	Questo studio
<i>sigB</i>	Fwd: AAAGAAACGGGTGAACTACTCGAT Rev: CAACGCCTCTCGAAGTTTTTTAA	87	[151]

I livelli di espressione dei geni target *inlA*, *inlB*, *hly*, *prfA* sono stati valutati mediante metodo della curva standard. In ciascun saggio è stata effettuata una serie di 5 diluizioni seriali (1:3) in triplicato di cDNA del ceppo di riferimento F2365 a concentrazioni note, sia per il gene housekeeping *tufA*, che per ciascun gene target. Mediante interpolazione dei valori di Ct sulla curva standard si è risaliti alla quantità di amplificato nel campione analizzato. Dal rapporto tra le quantità ottenute per *tufA* ed il gene target è stato ricavato il livello di espressione del gene di interesse, normalizzato rispetto al gene di riferimento.

5.6.7 Analisi statistica dei risultati

L'indice di diversità di Simpson (D) è stato applicato per valutare il potere discriminante della metodica di tipizzazione sAFLP condotta con elettroforesi tradizionale e microfluidica. Esso calcola la probabilità che due ceppi non correlati, appartenenti alla popolazione di interesse, vengano classificati in due gruppi distinti. La formula per il calcolo di D è la seguente:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

dove N è il numero totale di ceppi della popolazione analizzata, s è il numero complessivo di tipi osservati, n_j è il numero di ceppi appartenenti all' j -esimo tipo. Il valore di D varia tra 0 e 1; maggiore è il suo valore, maggiore è la diversità tra i ceppi e, quindi, il potere discriminante della metodica [152].

Per verificare l'effetto dell'esposizione a concentrazione sub-letale del cloruro di benzalconio sull'espressione dei geni *mdrL*, *lde*, *orfA* e *sigB* è stato utilizzato il metodo dell'ANOVA (analisi della varianza), utilizzando il programma SPSS v.17.0 (Statistical Package for the Social Sciences). Tale test statistico è stato utilizzato anche per la valutazione di differenze statisticamente significative tra ceppi isolati da casi clinici e quelli da alimenti nell'espressione dei geni *inlA*, *inlB*, *hly*, *prfA* e *bsh* e per valutare le differenze tra sierotipi e linee genetiche nelle temperature di melting di tutti i geni analizzati.

Le differenze sono state considerate significative a valori di P inferiori a 0,05.

Per stabilire la relazione esistente tra l'espressione dei diversi geni è stato applicato il coefficiente di correlazione di Pearson (R^2) e il rispettivo livello di significatività.

Capitolo 6

Risultati

6.1 Genotipizzazione di *L. monocytogenes* mediante single Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism (sAFLP)

I 250 ceppi di *L. monocytogenes* tipizzati mediante sAFLP sono stati analizzati mediante software Bionumerics v.6.0 (Applied-Maths, Belgio), confrontando i frammenti di restrizione ottenuti per ciascuno di essi con le bande del marker di riferimento. Gli isolati hanno generato profili di restrizione composti da un minimo di 8 ad un massimo di 13 frammenti di peso molecolare compreso nel range 150-2000 bp (Fig. 45-47). Tali profili di restrizione sono stati confrontati tra loro usando il coefficiente di correlazione di DICE con raggruppamento UPGMA, ottenendo il corrispondente dendrogramma.

Il sistema UPGMA impiega un algoritmo di clusterizzazione sequenziale nel quale le relazioni genetiche sono identificate in ordine di similarità e l'albero stesso è costruito in maniera sequenziale. Ai fini dello studio sono stati considerati solo i frammenti fino a 1000 bp, poiché i risultati finali di clusterizzazione risultavano invariati (dati non riportati). Dall'analisi bioinformatica dei profili ottenuti, i ceppi sono stati separati in due grandi clusters, denominati Gruppo 1 e Gruppo 2 (Fig. 48). Tali raggruppamenti hanno permesso di separare in maniera ben definita tutti gli isolati di sierotipo 1/2b, 3b e 4b della lineage I da tutti i sierotipi 1/2a, 3a e 1/2c della linea genetica II, riflettendo la struttura filogenetica della specie.

Unica eccezione si è avuta considerando i ceppi TS9, TS29, TS37 e TS38 di sierotipo 4b, i quali sono stati inclusi nel Gruppo 2, caratterizzati,

infatti, da un profilo simile a quello dei ceppi della lineage I. Nel Gruppo 1 sono stati inclusi

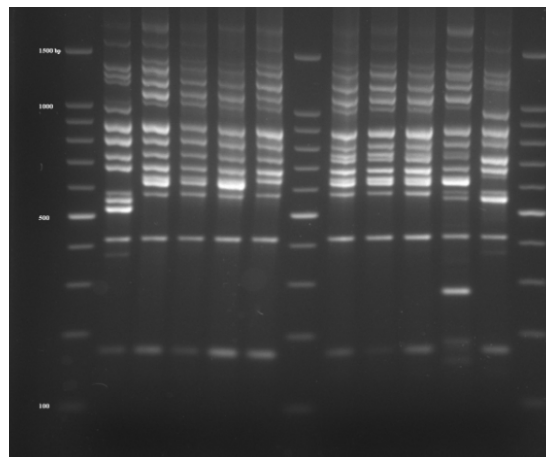


Figura 45 Profili di sAFLP dei ceppi LMO45, 115, 116, 76, 78 106, 122, 124, LMO71, LMO25

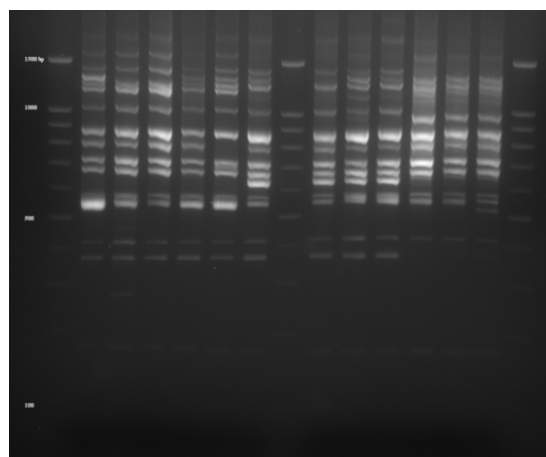


Figura 46 Profili di sAFLP dei ceppi 26, 46, 7, 45, 63 137, 139, 142, 143, LMO21, LMO25, LMO29

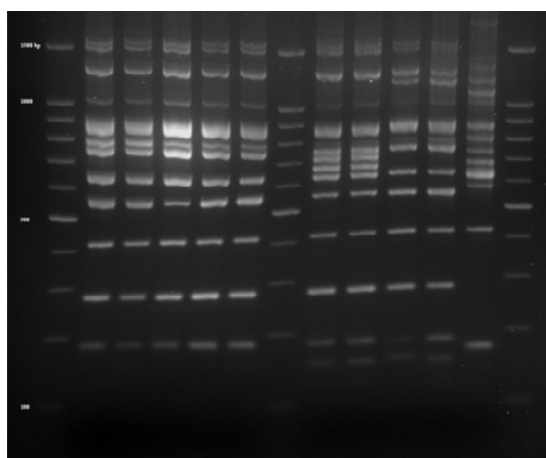


Figura 47 Profili di sAFLP dei ceppi 8, 9, 17, 42, 44, 140, 141, LMO41, LMO46, 76

93 ceppi, isolati soprattutto da casi clinici (n=66; 71%) seguiti da isolati da alimenti (n=25; 27%) e ambientali (n=2; 2%) (Fig. 49).

Il secondo raggruppamento, che ha compreso 157 ceppi, è risultato composto per il 60% (n=95) da isolati da alimenti, per il 32% (n=50) da ceppi umani, per il 6% (n=9) da isolati da ambiente e 2% (n=3) da casi di listeriosi animale (Fig. 50).

Figura 48 Struttura del dendrogramma ottenuto dall'analisi dei profili sAFLP dei 250 ceppi di *L. monocytogenes*

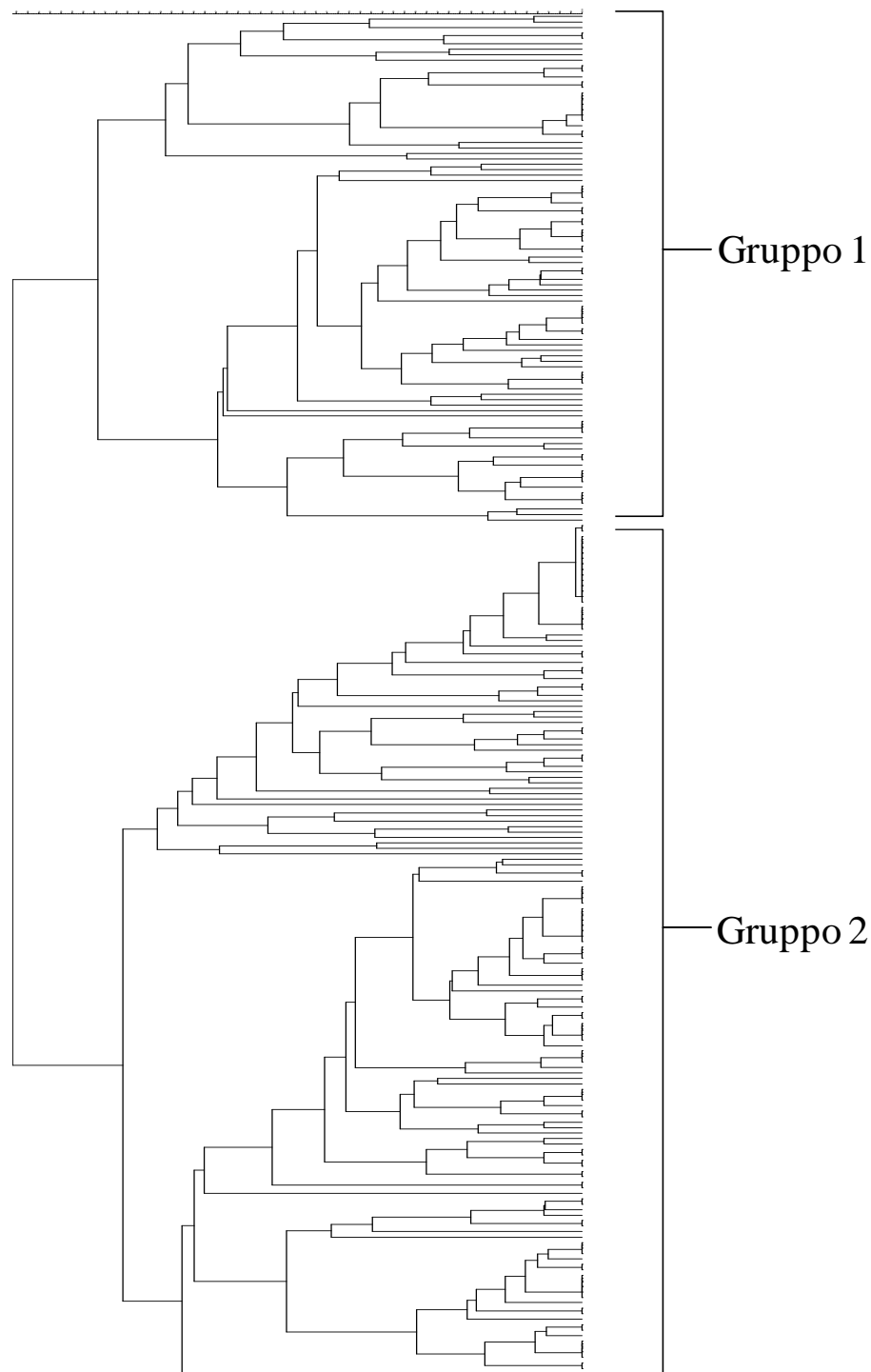
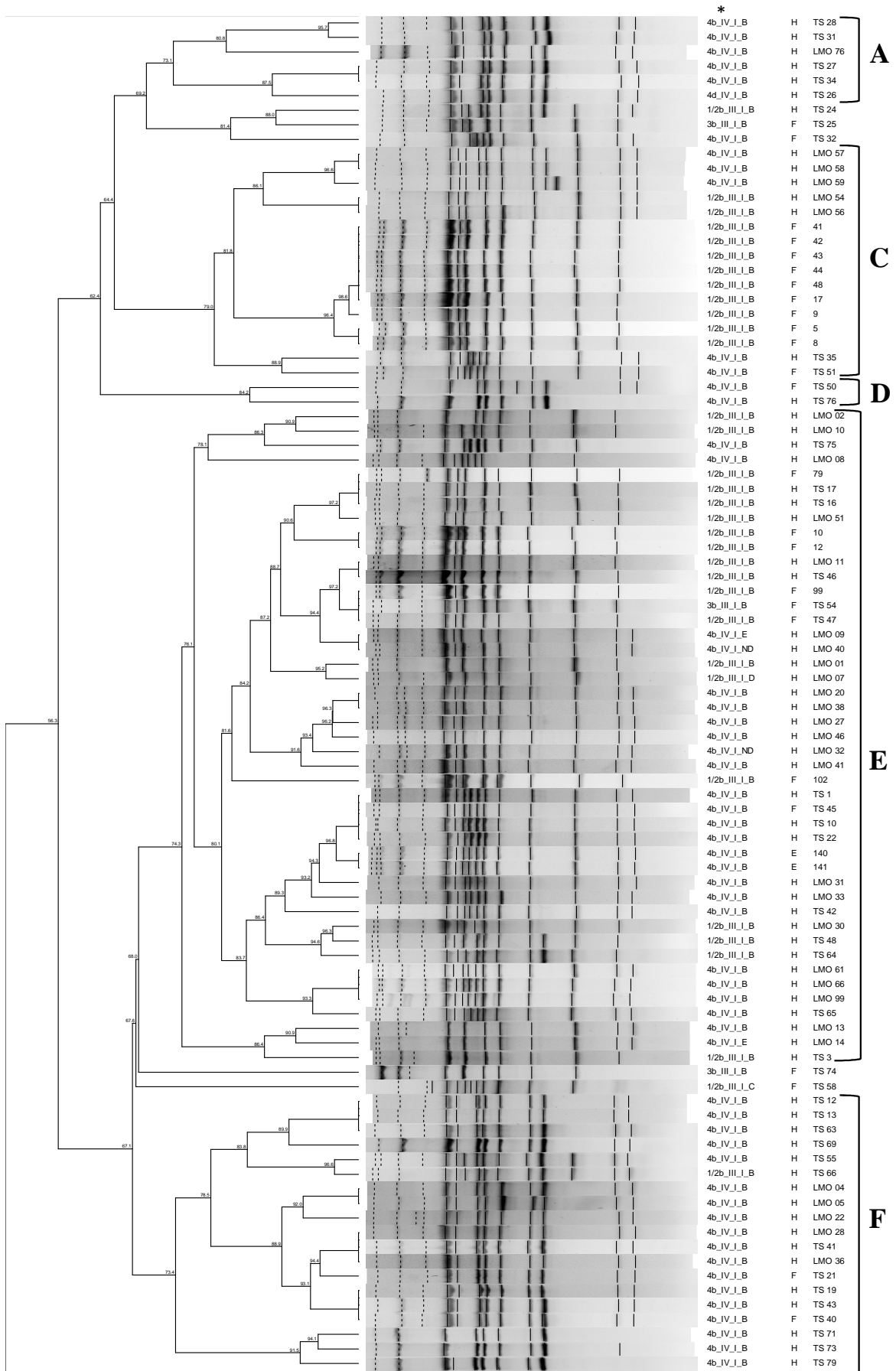


Figura 49 Dendrogramma relativo al Gruppo1

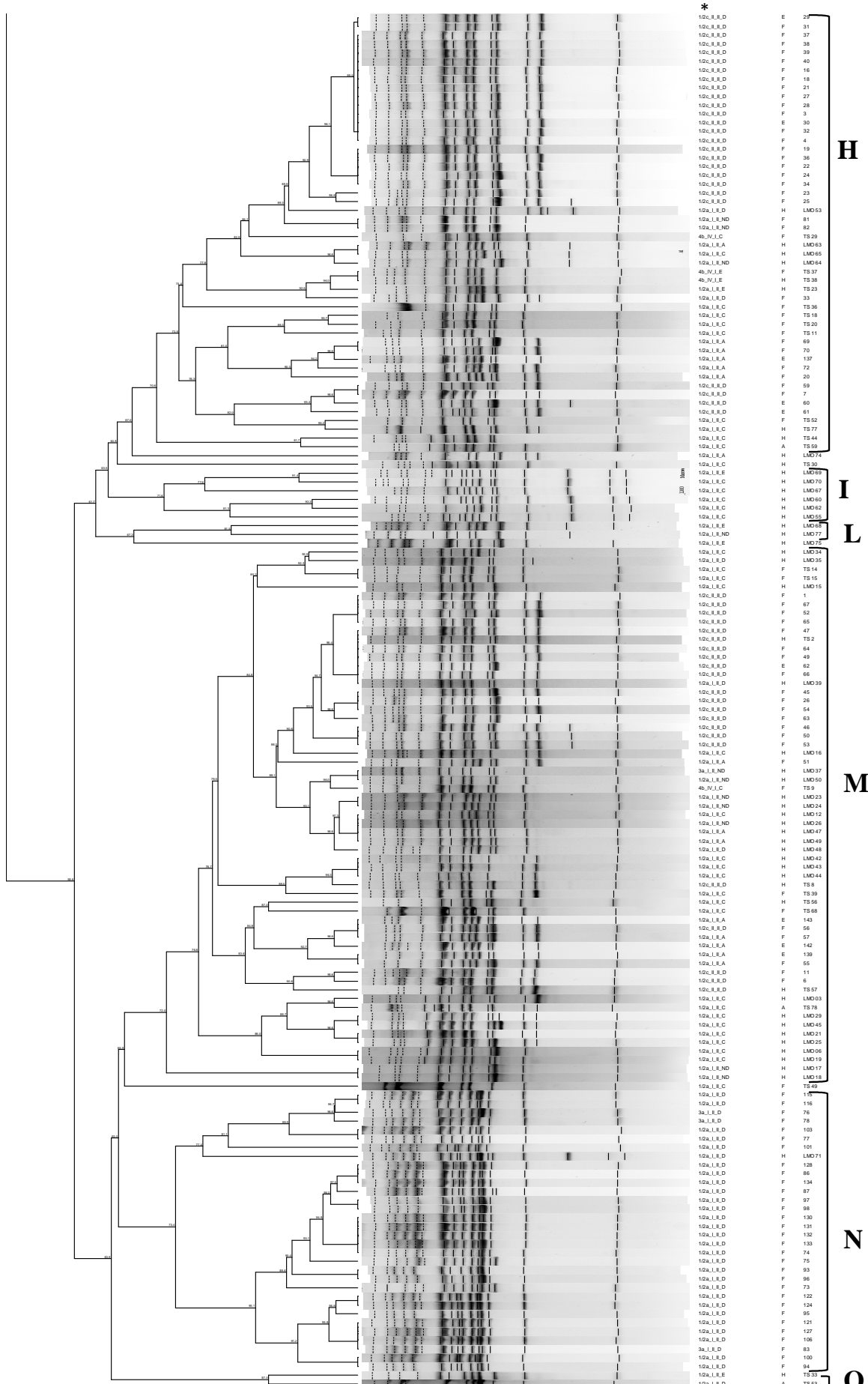


* sierotipo, sierogruppo, Lineage, origine (H umani F alimenti E ambiente A animali), codice ceppi

La maggior parte dei ceppi (90/93) appartenenti al Gruppo1 è risultata caratterizzata da un profilo RFLP di *inlA* attribuibile a forme intere della proteina, quali profilo B (87 ceppi), profilo C (1 ceppo) e profilo E (2 isolati). Tale gruppo ha inoltre incluso un unico ceppo con profilo troncato D e due isolati con profilo non definito (N.D.). All'interno del cluster 2, si è osservato un andamento opposto, in quanto la maggior parte (64,3%) dei ceppi inclusi era stata classificata come profilo D (86 ceppi) o A (15 ceppi). Inoltre, in tale gruppo sono stati inclusi 38 ceppi con profilo C, 7 di tipo E e 11 non definito.

Considerando un livello di similarità del 70%, i 250 ceppi sono stati suddivisi in 13 clusters. I ceppi appartenenti alla linea genetica I sono stati divisi in 6 sottogruppi, identificati con le lettere A-F (Fig. 49 e Fig. 50). Il cluster A ha incluso ceppi umani di sierotipo 4b con stesso profilo di restrizione e provenienti da USA (TS28, TS34), Canada (TS26, TS27), Francia (TS31) e Italia (LMO76). Il gruppo B è risultato composto da tre ceppi, TS25 e TS32 isolati da alimenti, TS24 da casi clinici. Nel gruppo C, insieme a tre ceppi umani di sierotipo 4b (LMO57-LMO59), sono stati raggruppati 11 isolati di sierotipo 1/2b di cui sei (41-44, 48, 17), da campioni di salame, sono risultati identici e tre ceppi (5, 9, 8) da macinato per insaccati con medesima provenienza. Nello stesso gruppo sono stati inclusi cinque ceppi isolati da emocoltura (LMO54, LMO56, LMO57-59) e due ceppi con profilo diverso, TS35 e TS51. Il sottogruppo D ha incluso solo due ceppi 4b isolati da alimenti (TS50, Canada) e un caso di listeriosi (TS76, USA). Il gruppo E è stato il più numeroso all'interno del gruppo 1, in quanto formato da 45 ceppi appartenenti ai sierotipi 4b (n=25), 1/2b (n=19) e 3b (n=1). Al suo interno è stato individuato un sottogruppo rappresentato da tre isolati umani (LMO13, LMO14, TS3) con una similarità del 74,3% con i restanti ceppi del gruppo E. Quest'ultimi sono stati suddivisi in tre ulteriori raggruppamenti, di cui uno formato da soli quattro ceppi umani, dei quali due di sierotipo 4b (TS75, LMO08) e due ceppi 1/2b (LMO02, LMO10); un secondo sottogruppo di 22 ceppi ha incluso dodici ceppi isolati da casi clinici, soprattutto da emocoltura (LMO51, LMO11, LMO9, LMO40, LMO01, LMO50, LMO20, LMO38, LMO27, LMO46, LMO32, LMO41), cinque isolati da formaggio (79, 99, 102) e macinato per insaccati (10, 12), insieme a isolati umani TS17, TS16 e TS46 e ceppi isolati da alimenti TS54 e TS47; il terzo sottogruppo ha incluso ceppi 4b caratterizzati da un profilo con un numero maggiore di frammenti di restrizione, ad eccezione di tre ceppi 1/2b (LMO30, TS48, TS64), il cui profilo differisce da quello degli altri membri dello stesso raggruppamento. Al suo interno sono stati inclusi ceppi identici quali TS1, TS10, TS22, TS45, insieme con i ceppi 140 e 141 isolati da tamponi ambientali e LMO61, LMO66, LMO99, insieme ad altri ceppi tutti isolati da casi clinici.

Figura 50 Dendrogramma relativo al Gruppo2



L'ultimo cluster (F) individuato nel Gruppo 1 è risultato composto da soli due isolati da alimenti (TS21, TS40) insieme a 17 ceppi umani. Solo i due ceppi TS74 e TS58 rispettivamente di sierotipo 3b e 1/2b isolati da alimenti non sono stati inclusi in nessun cluster. Nel Gruppo 2, ad un livello di similarità del 70%, sono stati individuati 6 gruppi (G-N) di cui i cluster G e H hanno incluso 56 ceppi geneticamente più distanti rispetto agli altri componenti dello stesso gruppo. In particolare, il gruppo G ha incluso 22 ceppi di sierotipo 1/2c con una similarità superiore al 90% (27-32, 36-40, 22-25, 16, 18, 19, 21, 3, 4, 34) isolati da alimenti (soprattutto salame) e da due tamponi ambientali. Inoltre, nello stesso gruppo sono stati inclusi ulteriori quattro ceppi di sierotipo 1/2c isolati da macinato per insaccati (59, 7) e tamponi ambientali (60, 61), insieme a 21 ceppi di sierotipo 1/2a e tre ceppi di sierotipo 4b (TS29, TS37, TS38) caratterizzati da un profilo simile ai ceppi della lineage II. Tra i ceppi 1/2a sono stati inclusi due ceppi con profilo RFLP di *inlA* non definito isolati da gorgonzola (81, 82), risultati identici tra loro, così come i ceppi 69 e 70, isolati da salame, anch'essi indistinguibili. I rimanenti ceppi di sierotipo 1/2a del gruppo G sono stati isolati da feto morto (LMO63), da paziente deceduto (LMO64) e da liquor (LMO53) o emocoltura (LMO65) e tre ceppi umani (TS77, TS23, TS44). Invece, i ceppi 1/2a di origine alimentare provengono da campioni di salame (33, 72, 20) e macinato per insaccati (59) e da vari alimenti contaminati (TS11, TS18, TS20, TS36, TS52). Nel cluster G è stato incluso anche un isolato di origine animale (TS59). Nel sottogruppo H sono ricaduti solo sei ceppi umani di sierotipo 1/2a con profilo intero di RFLP di *inlA* C (LMO70, LMO67, LMO60, LMO62, LMO55) ed E (LMO69). Anche il gruppo I è risultato composto da pochi ceppi, quali LMO68 e LMO77 con un livello di similarità di 81,5% isolati da liquido di ascesso ed emocoltura. Al contrario, il cluster L è risultato molto numeroso, in quanto costituito da 61 ceppi. Al suo interno sono stati inclusi 17 ceppi di sierotipo 1/2c con un livello di similarità superiore al 93% isolati da alimenti, soprattutto salame e materia prima per la loro produzione (1, 23, 63-67, 45-47, 49, 50, 52-54) a da tampone ambientale (62), insieme al ceppo umano TS2. Tuttavia, il profilo di tali ceppi 1/2c, analogamente a quello relativo ad altri ceppi dello stesso cluster L, quali TS8, TS57, 6 e 11 è risultato composto dallo stesso numero di frammenti di restrizione degli altri ceppi di sierotipo 1/2c individuati nel cluster G precedentemente descritto.

Il raggruppamento L è risultato composto prevalentemente da ceppi di sierotipo 1/2a, molti dei quali isolati da emocoltura (LMO34, LMO35, LMO39, LMO16, LMO12, LMO18, LMO21, LMO23-26, LMO37, LMO47-LMO50) e altri campioni biologici umani (LMO06, LMO15, LMO17, LMO19, LMO29, LMO42-LMO45, LMO03, TS56). Nonostante il sierotipo 1/2a sia prevalente nei ceppi isolati da alimenti, nel cluster L è stato incluso un numero maggiore di ceppi umani, mentre quelli isolati da alimenti (TS39, TS68, 55-57) sono risultati meno

prevalenti. Anche tre ceppi isolati da tamponi ambientali presso aziende di Parma e Bologna sono stati inclusi nel cluster L (139, 142, 143), insieme al ceppo TS78 di origine animale. Il cluster M individuato nel Gruppo 2 ha incluso 29 ceppi di sierotipo 1/2a e tre isolati 3a, i quali non hanno generato un profilo di restrizione differente dai precedenti. Tutti i ceppi individuati in tale cluster sono stati classificati come profilo D di RFLP di *inlA* e hanno generato un profilo di sAFLP differente da tutti gli altri ceppi di sierotipo 1/2a analizzati, composto infatti da un maggior numero di bande (fino a 13 frammenti). Tali ceppi sono stati isolati da campioni di formaggio taleggio (93-98, 100, 101, 103, 106, 115, 116, 121, 122, 124, 127, 128, 130-134) e gorgonzola (76-78, 86, 87, 73-75, 83) e solo un ceppo (LMO71) di origine umana.

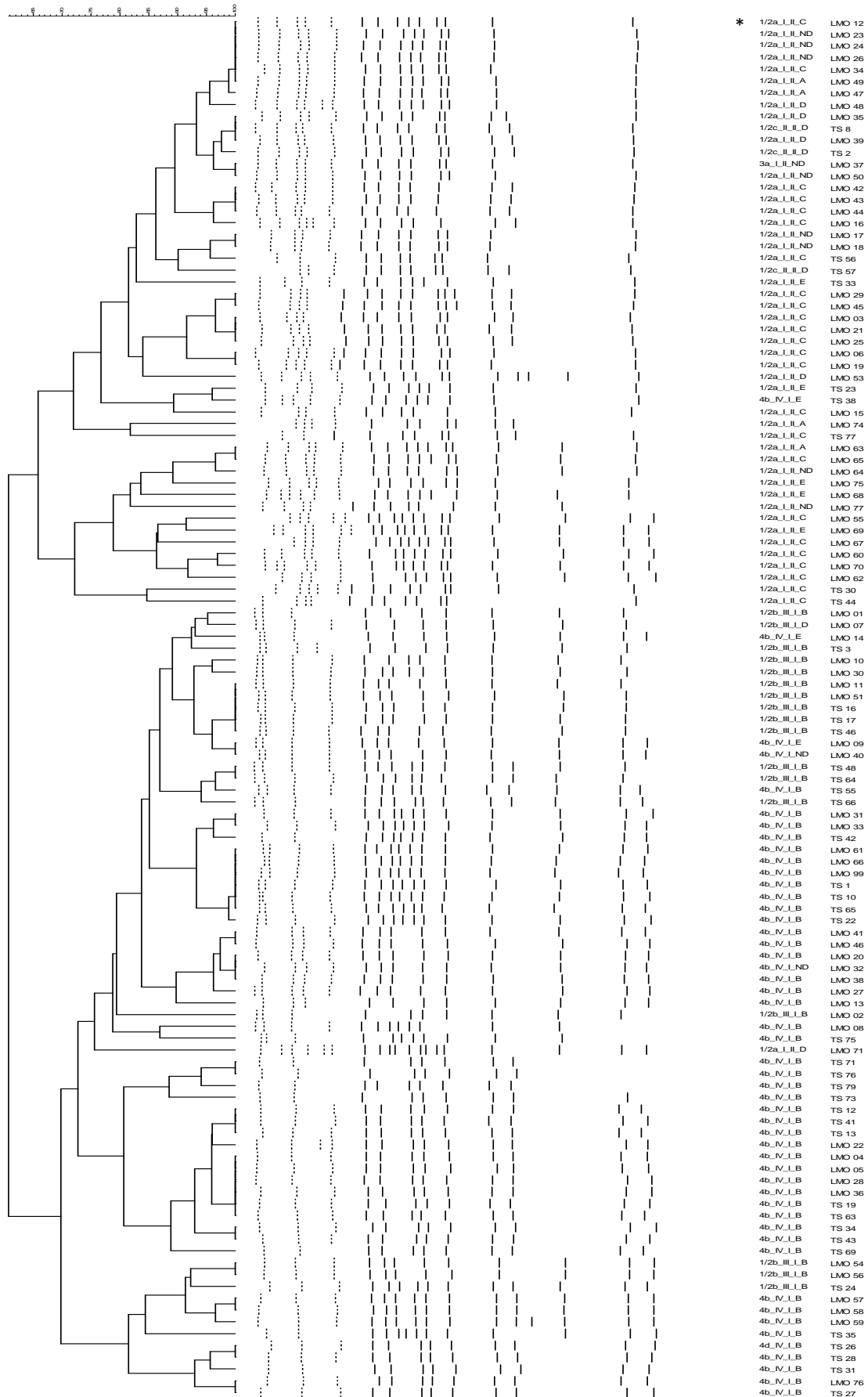
Infine, il gruppo N ha incluso solo un isolato da paziente (TS33) e un ceppo animale (TS53), entrambi di sierotipo 1/2a. Gli unici ceppi che non sono stati inclusi in nessuno dei clusters del Gruppo 2 finora descritti sono i ceppi umani LMO75, LMO76, TS30 e il ceppo TS49 isolato da alimenti, tutti di sierotipo 1/2a.

Analizzando il dendrogramma ottenuto dall'analisi dei profili di restrizione dei 117 ceppi umani è stata osservata una netta separazione tra la linea genetica I e II (Fig. 51). Considerando un livello di similarità del 70% circa, sono stati generati due grandi raggruppamenti, di cui il primo contenente 49 ceppi di sierotipo 1/2a, 3a, 1/2c e il secondo contenente 67 ceppi di sierotipo 4b, 3b e 1/2b.

Solo il ceppo TS38 è stato incluso nel gruppo relativo alla linea genetica II, sebbene identificato come sierotipo 4b. Infatti, il profilo sAFLP di tale ceppo mostra una similarità superiore al 95% con il ceppo TS23 di sierotipo 1/2a, con il quale condivide un profilo intero (tipo E) di RFLP di *inlA*. I ceppi umani di sierotipo 1/2c hanno generato profili identici a quelli 1/2a dello stesso cluster. Nessun ceppo di sierotipo appartenente alla linea genetica I è stato, invece, incluso nel cluster relativo alla lineage II.

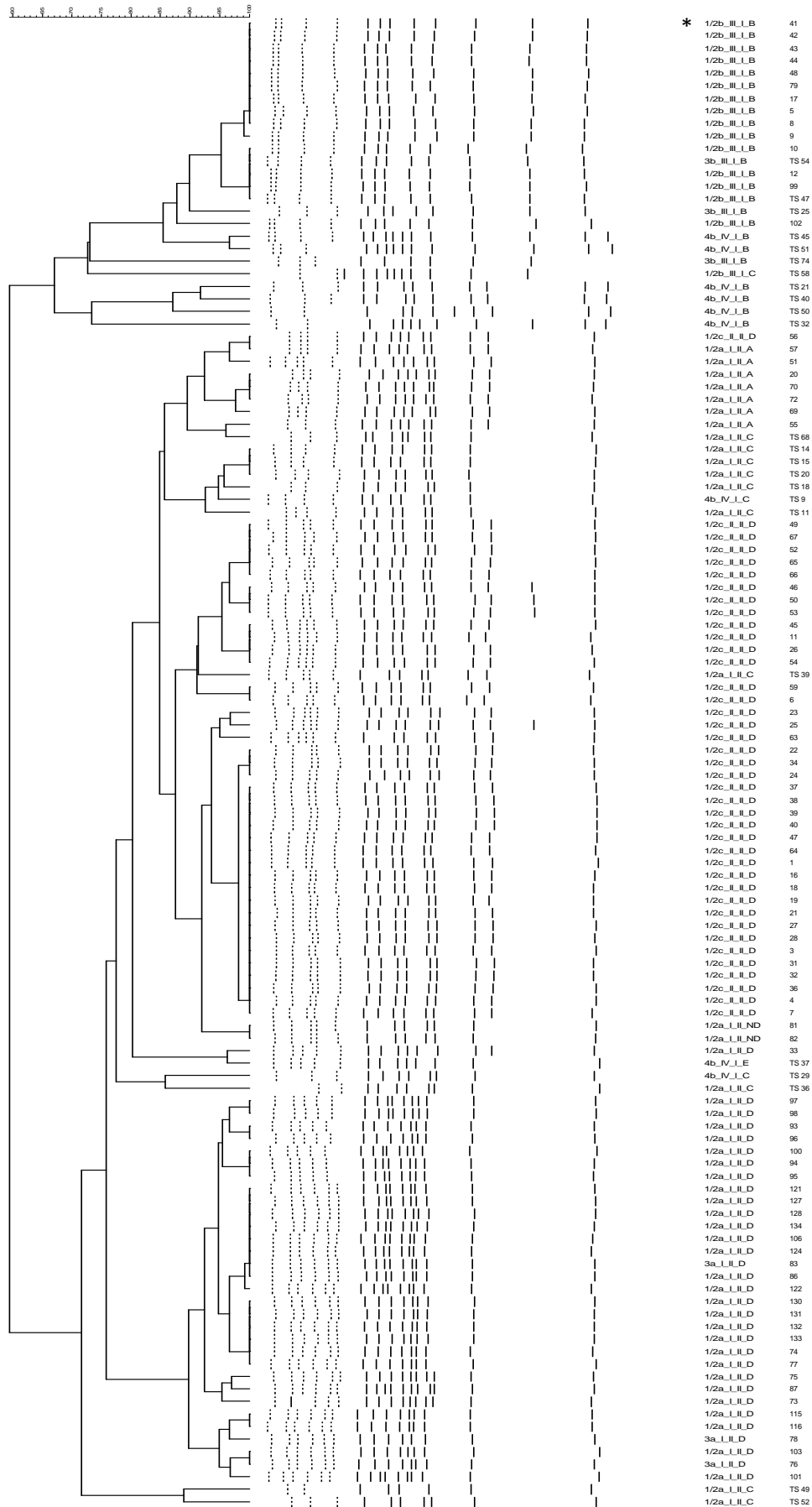
Dal dendrogramma ottenuto dai profili sAFLP dei 119 ceppi isolati da alimenti sono stati ottenuti due clusters ad un livello di similarità del 70% (Fig. 52). Il primo raggruppamento è risultato meno numeroso in quanto costituito da 25 ceppi di sierotipo 4b, 3b e 1/2b, mentre nel secondo gruppo è stata inclusa la maggioranza dei ceppi. Infatti, quest'ultimo è risultato composto da 91 isolati di sierotipo 1/2a, 3a, 1/2c e da tre ceppi di sierotipo 4b (TS9, TS29 e TS37). Tutti i 40 isolati di sierotipo 1/2c, inclusi nel dendrogramma, sono stati raggruppati insieme con un livello di similarità del 90%, ad eccezione del ceppo 56. Quest'ultimo, infatti, ha generato un profilo identico con il ceppo 57 di sierotipo 1/2a. Infine, tutti i 31 isolati 1/2a con profilo D di RFLP di *inlA* hanno costituito un unico raggruppamento con un livello di similarità del 90%.

Figura 51 Dendrogramma relativo ai ceppi umani



* sierotipo, sierogruppo, Lineage, profilo RFLP *inA*, origine, codice ceppi

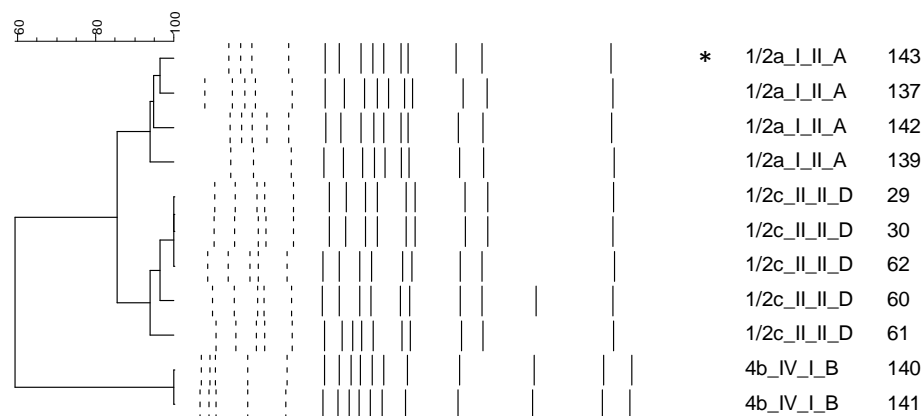
Figura 52 Dendrogramma relativo ai ceppi isolati da alimenti



* sierotipo, sierogruppo, Lineage, profilo RFLP *inlA*, codice ceppi

Prendendo, infine, in considerazione il dendrogramma dei ceppi di origine ambientale, anche in questo caso la distinzione tra le due Linee genetiche è emersa chiaramente (Fig. 53). All'interno del gruppo relativo alla lineage II, è stata osservata anche una clusterizzazione dei ceppi di sierotipo 1/2c e 1/2a in due gruppi separati, con un livello di similarità superiore al 90%.

Figura 53 Dendrogramma relativo ai ceppi isolati da ambiente



* sierotipo, sierogruppo, Lineage, profilo RFLP *inlA*, codice ceppi

6.2 Confronto tra elettroforesi tradizionale e separazione microfluidica automatizzata per la genotipizzazione mediante sAFLP

Un sottogruppo di 50 ceppi di *L. monocytogenes*, isolati da casi clinici (n=14), alimenti (n=29) e tamponi ambientali (n=7), già caratterizzati per sierotipo, sierogruppo, lineage e profilo di RFLP del gene *inlA*, sono stati sottoposti a tipizzazione mediante sAFLP e la separazione dei frammenti di restrizione è stata condotta sia mediante tradizionale elettroforesi su gel di agarosio, sia utilizzando il sistema automatizzato ExperionTM (Bio-Rad).

La struttura del dendrogramma ottenuto dai profili di elettroforesi su gel di agarosio (Fig. 54) ha mostrato congruenza con quella del dendrogramma ottenuto analizzando i gel virtuali (Fig. 55). I profili di sAFLP sono risultati identici o altamente simili con entrambe le metodiche e composti da un minimo di otto fino ad un massimo di tredici frammenti di peso molecolare compreso tra 150 e 2000 bp. Tuttavia, sono stati considerati ai fini dell'indagine solo i frammenti di peso molecolare ≤ 1000 bp, in quanto ciò non influisce sul risultato finale (dati non riportati).

Il potere discriminante di entrambe le metodiche è risultato molto elevato con un indice di Simpson pari a 0,965 (elettroforesi su gel di agarosio) e 0,957 (sistema ExperionTM).

Tutti i 50 ceppi di *L. monocytogenes* analizzati con le due tecniche elettroforetiche sono stati raggruppati in due cluster ben distinti (*I* e *II*), in accordo con la precedente identificazione della linea genetica. La totalità dei ceppi con sierotipo 1/2b e 4b sono stati chiaramente separati dai ceppi 1/2a, 3a e 1/2c.

In particolare, all'interno del cluster *II* sono stati identificati i due sottogruppi α e β costituiti dagli stessi ceppi in entrambe le metodiche di separazione.

Analogamente, ad un livello di similarità superiore all'80%, nel cluster β sono stati individuati i sottogruppi *a*, *b* e *c* in entrambi i dendrogrammi (Fig. 54 e Fig. 55).

Inoltre, i ceppi risultati geneticamente indistinguibili o strettamente correlati (1 sola banda di differenza) usando il metodo tradizionale, lo sono stati anche con l'elettroforesi microfluidica automatizzata [153].

I profili di sAFLP della maggior parte dei ceppi sono stati composti dallo stesso numero di bande caratterizzate da identico peso molecolare, indipendentemente dal metodo usato (Fig. 56). Ad esempio, i profili dei ceppi con sierotipo 1/2c sono stati composti da 9 frammenti (Fig. 56 A, linea 1; Figure 56 B, linea 1 e Fig. 57), ad eccezione dei ceppi 12 e 27 isolati da alimenti, che hanno generato 10 frammenti, sia su gel di agarosio (Figure 56 A, linea 2) sia nel gel virtuale (Fig. 56 B, linea 2).

Figura 54 Dendrogramma ottenuto mediante elettroforesi su gel di agarosio

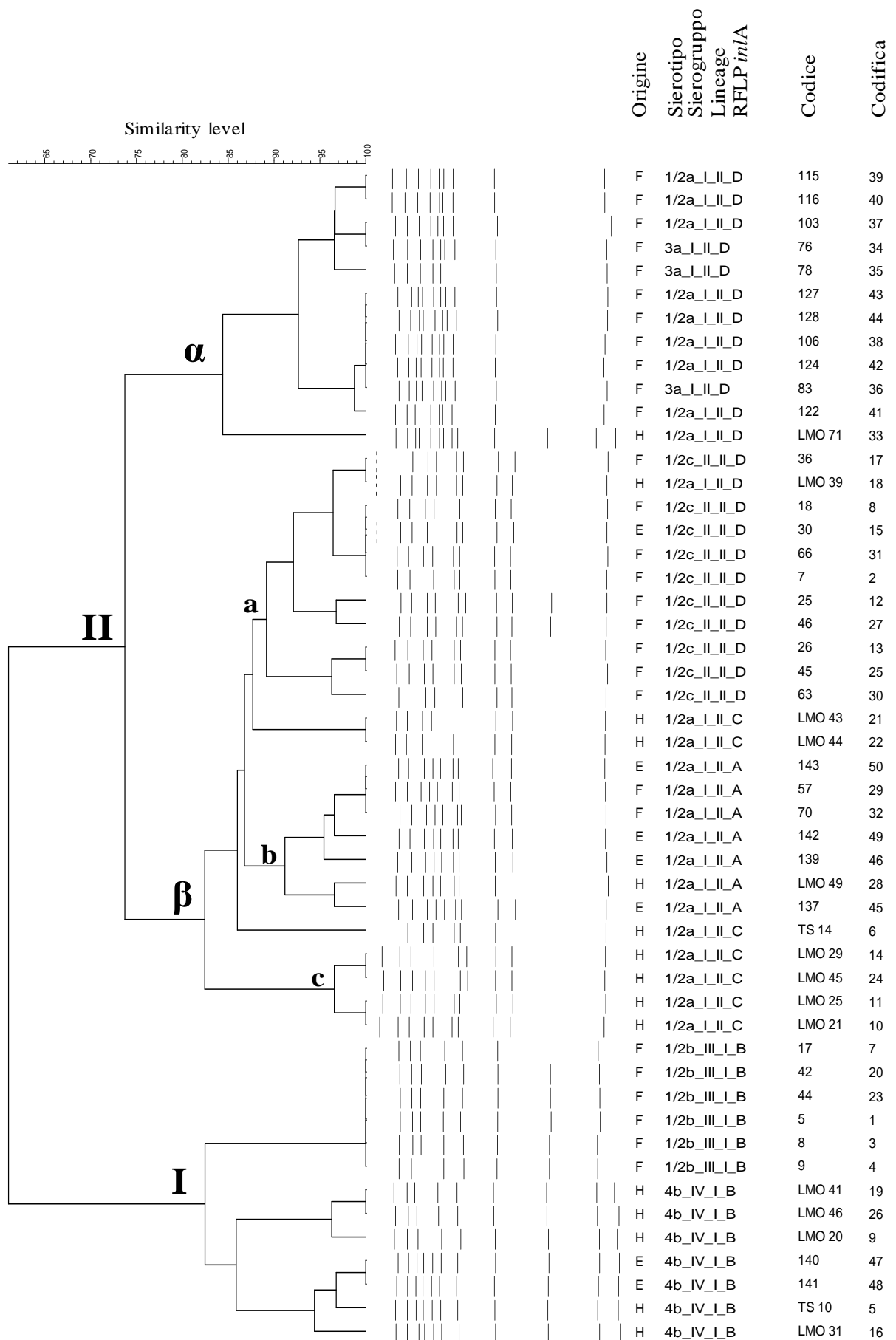


Figura 55 Dendrogramma ottenuto mediante elettroforesi microfluidica automatizzata

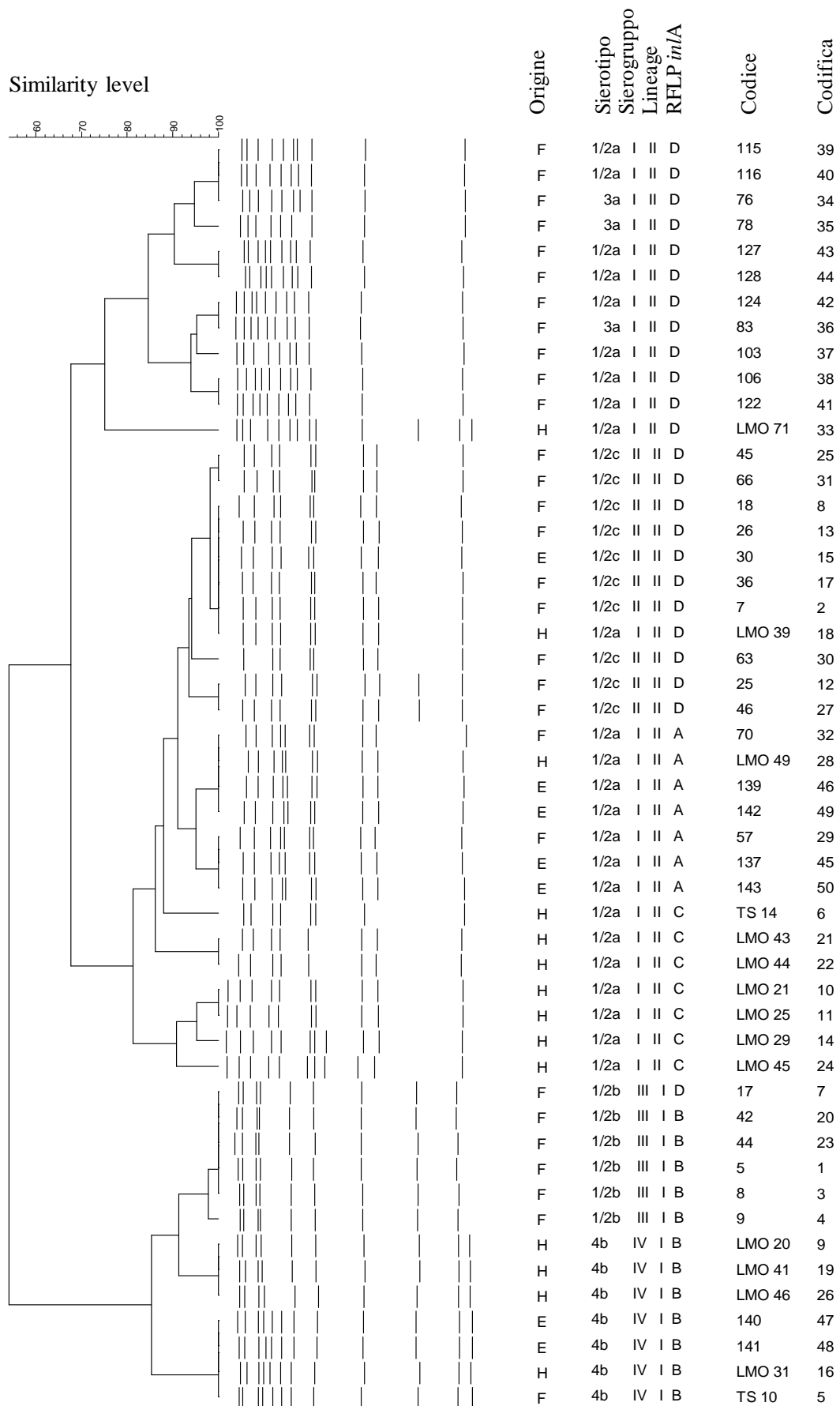
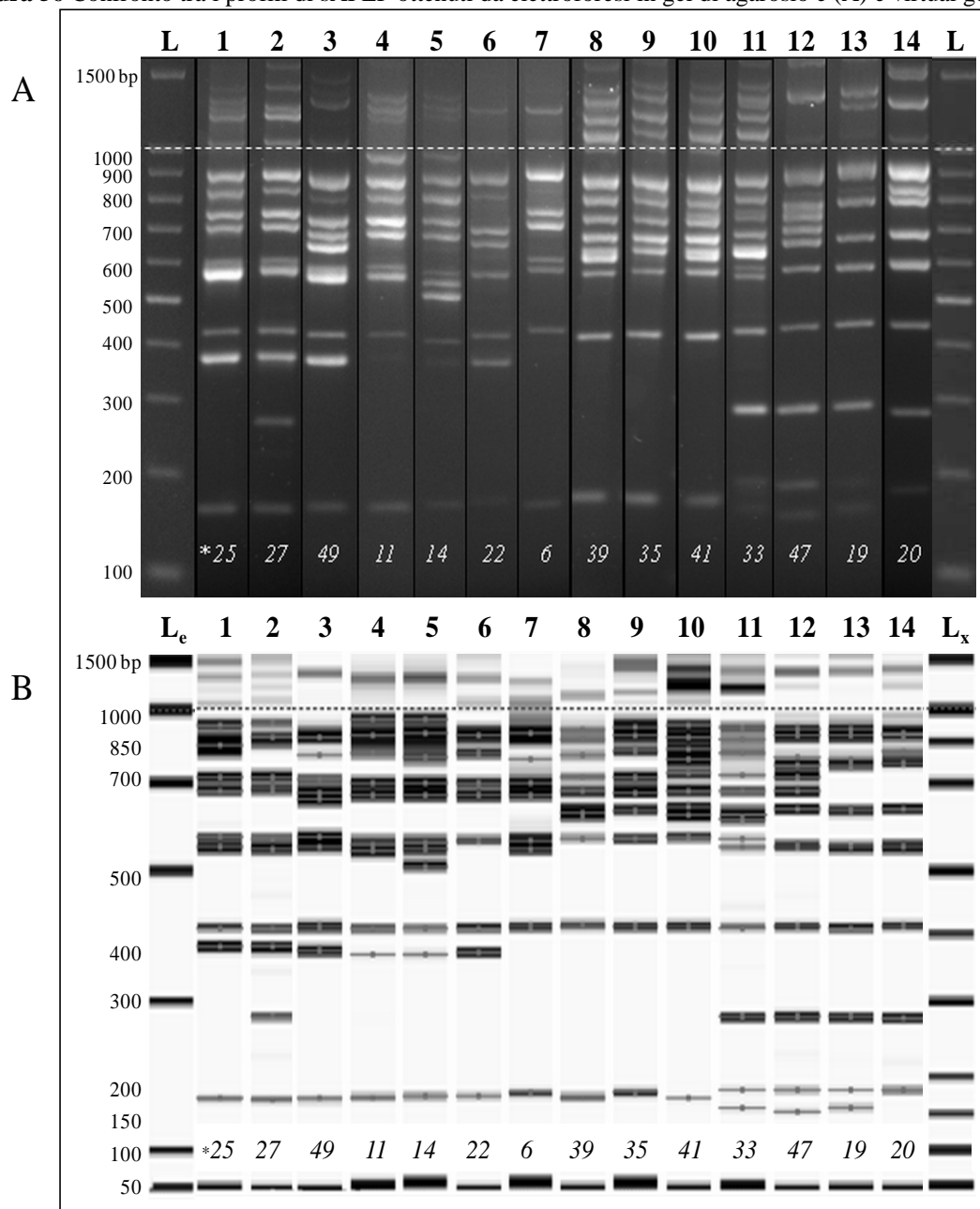
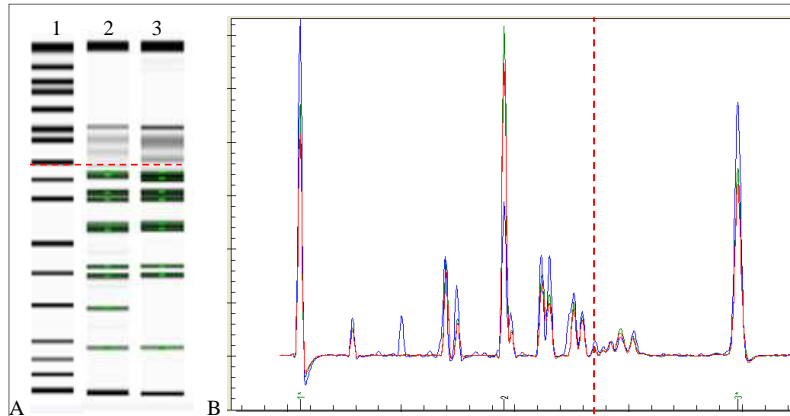


Figura 56 Confronto tra i profili di sAFLP ottenuti da elettroforesi in gel di agarosio e (A) e virtual gel (B)



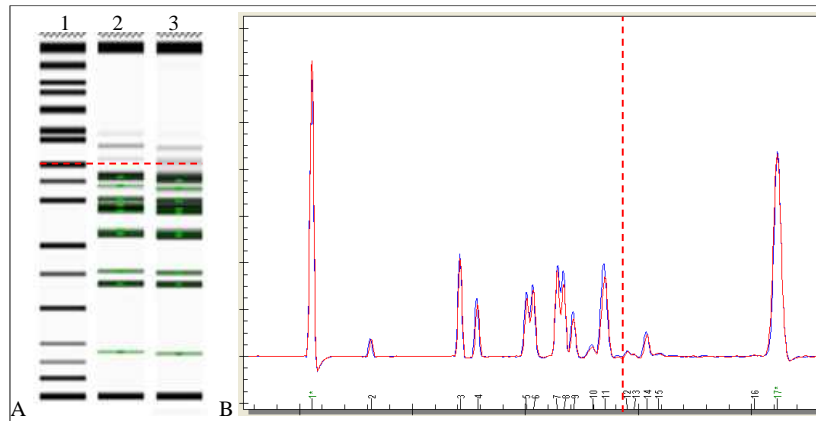
* Codice dei ceppi; L 100 bp ladder; L_e 12K Experion Ladder; L_x 1+12K mix Experion Ladder

Figura 57 Immagine del gel virtuale (A) del sistema ExperionTM dei ceppi di sierotipo 1/2c: linea1, 1+12K Ladder; linea 2, ceppo 27; linea 3, ceppo 2; Elettroferogramma (B) del ceppo 27 (blu) e 2 (rosso)



Entrambe le metodiche elettroforetiche hanno evidenziato una maggiore eterogeneità tra i ceppi di sierotipo 1/2a, al contrario di quelli 1/2c. In particolare, i ceppi 1/2a con profilo A di RFLP hanno prodotto un caratteristico profilo (10 frammenti) (Fig. 58), che differisce di una banda rispetto al profilo dei ceppi 1/2c, per entrambi i metodi di elettroforesi, come mostrato nella linea 3 della figura 56 (A e B).

Figure 58 Immagine del gel virtuale (A) del sistema Experion™ dei ceppi di sierotipo 1/2a (profilo A di RFLP *inlA*): linea 1, 1+12K Ladder; linea 2, ceppo 45; linea 3, ceppo 49; Elettroferogramma (B) del ceppo 45 (rosso) e 49 (blu);



Un profilo identico tra gel di agarosio e virtuale è stato generato dai ceppi umani con sierotipo 1/2a e profilo C di RFLP (Fig. 56 A e B, linee 4-5; Fig. 59), fatta eccezione per i ceppi 6, 22 (Fig. 56 A e B, linee 6-7) e 21 che sono stati raggruppati in modo leggermente diverso utilizzando il metodo tradizionale (Fig. 54 e 55).

Una banda di differenza è stata osservata applicando i due diversi metodi per tutti i ceppi di sierotipo 1/2a e 3a con profilo D di RFLP di *inlA* (Fig. 56 A e B, linee 8-11 e Fig. 60). Infatti, il sistema Experion™ ha permesso di evidenziare la presenza di due picchi molto ravvicinati rispetto alla sola banda osservata in elettroforesi su gel di agarosio di peso molecolare intorno a 900 bp.

Figure 59 Immagine del gel virtuale (A) del sistema Experion™ dei ceppi 1/2a (profilo C di RFLP *inlA*): linea 1, 1+12K Ladder; linea 2, ceppo 11; linea 3, ceppo 14; linea 4, ceppo 21. Elettroferogramma (B) del ceppo 11(rosso) e 14 (blu);

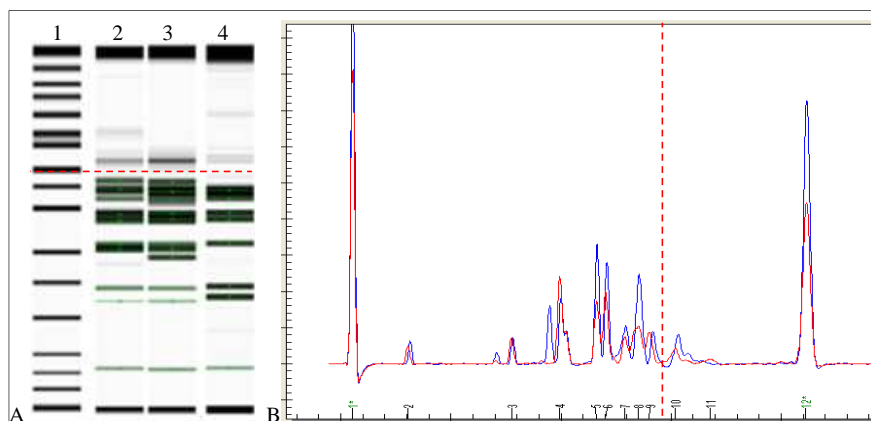


Figure 60 Immagine del gel virtuale (A) del sistema Experion™ dei ceppi 1/2a e 3a (profilo D di RFLP *inIA*): linea1, 1+12K Ladder; linea 2, ceppo 35; linea 3, ceppo 41; linea 4, ceppo 42; linea 5, ceppo 33; linea 6, ceppo 39. Elettroferogramma (B) dei ceppi identici 41, 42 e 39. Elettroferogramma (C) del ceppo 35 (rosso), ceppo 41 (blu). Elettroferogramma (D) del ceppo 33 (rosso) e del ceppo 39 (blu);

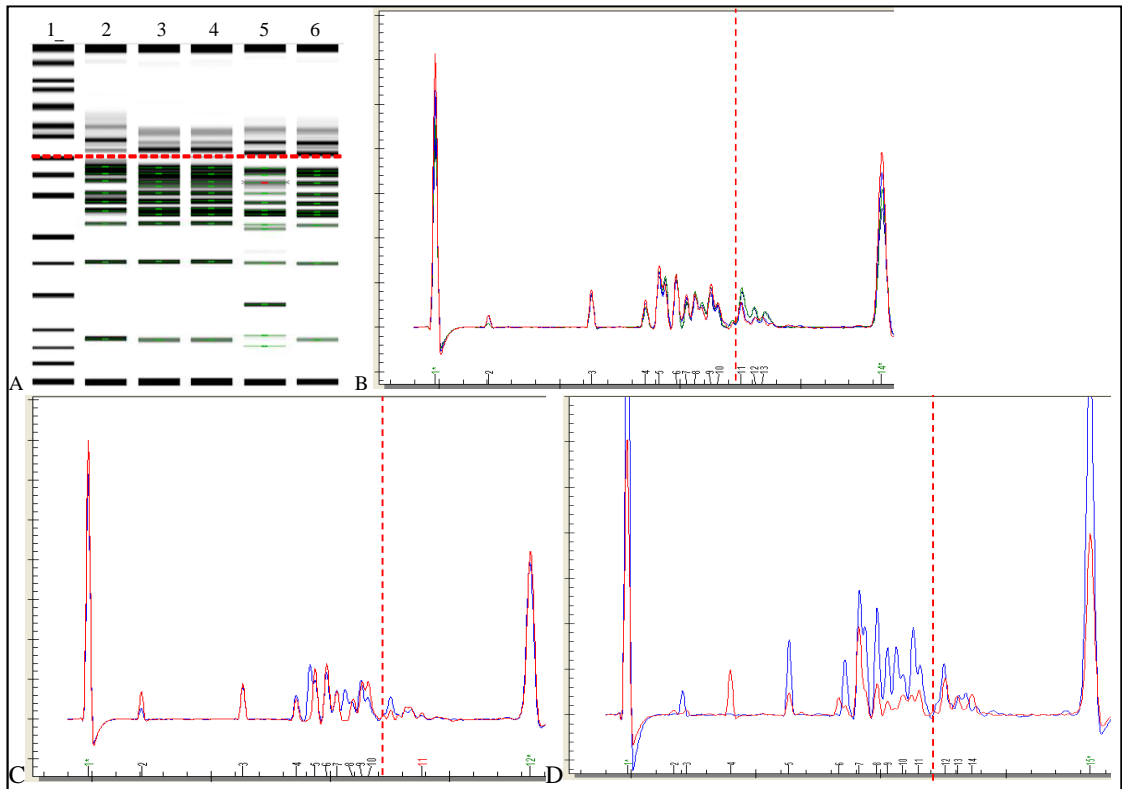
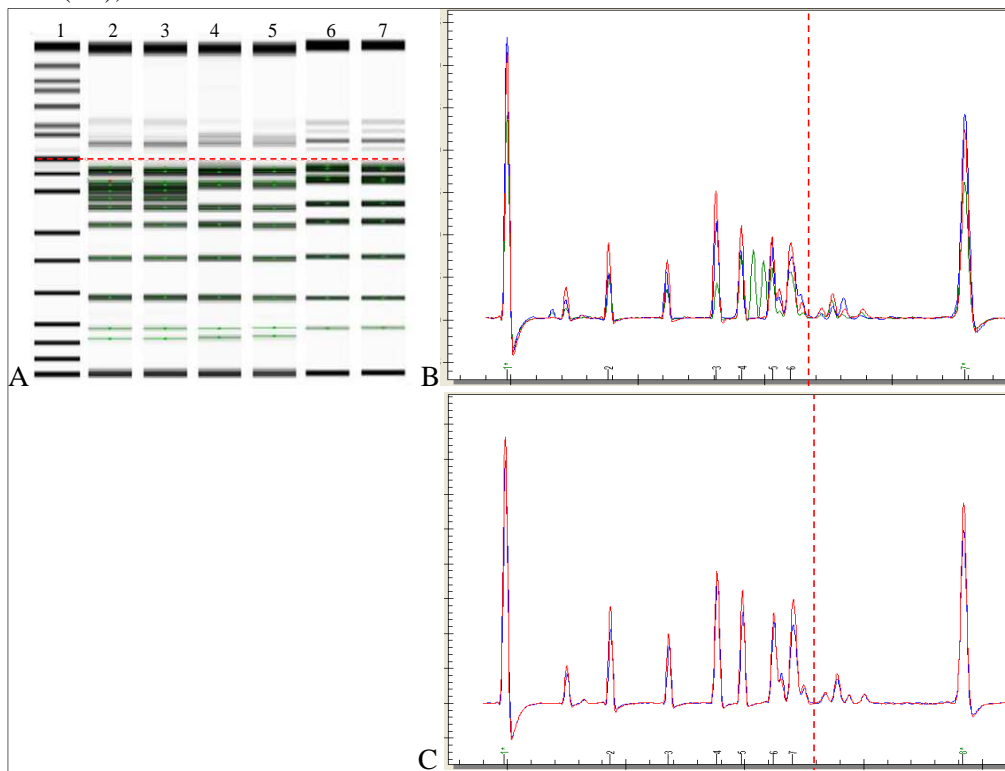


Figure 61 Immagine del gel virtuale (A) del sistema Experion™ dei ceppi di sierotipo 4b e 1/2b: linea1, 1+12K Ladder; linea 2, ceppo 19; linea 3, ceppo 26; linea 4, ceppo 48; linea 5, ceppo 5; linea 6, ceppo 20; linea 7, ceppo 23. Elettroferogramma (B) dei ceppi (4b) 48 (rosso), 5 (blu) e 26 (verde). Elettroferogramma (C) dei ceppi (1/2b) 20 (rosso) e 23 (blu);

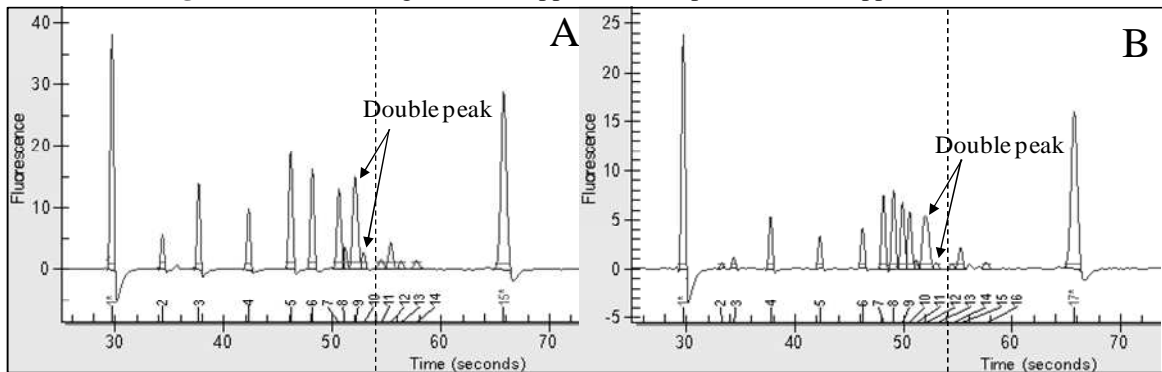


Tuttavia, entrambi i metodi elettroforetici hanno raggruppato la totalità dei ceppi di sierotipo 1/2a e 3a con profilo D di RFLP di *inlA* all'interno del cluster α (Fig. 54 e 55).

Inoltre, gli isolati 4b e 1/2b (Fig. 56 A e B, linee 12-14 e Fig. 61) hanno prodotto una doppia banda di (~850 bp) che non è stato possibile rilevare con l'elettroforesi su gel di agarosio (anche aumentando la concentrazione del gel fino al 3,5% (w/v); dati non riportati), bensì con l'elettroferogramma, ottenendo in corrispondenza di tale banda due picchi di peso molecolare molto simile, ma distinguibili e riproducibili (Fig. 62).

Infine, le bande di peso molecolare inferiore a 200 bp sono state chiaramente rilevate mediante separazione microfluidica, mentre con il metodo tradizionale la visualizzazione è stata possibile solo con un'ulteriore fase di colorazione del gel di agarosio in soluzione con bromuro di etidio.

Figura 62 Electroferogramma di ceppi con sierotipo 1/2b e 4b: ceppi 20 (A) e 47 (B)



6.3 Standardizzazione di un saggio in Real-time Multiplex-PCR per la sierotipizzazione molecolare di *L. monocytogenes*

La totalità dei ceppi di *L. monocytogenes* analizzati mediante Multiplex-PCR in Real-time con l'utilizzo di sonde TaqMan ha sempre confermato la precedente classificazione in sierogruppi basata sul protocollo di Doumith et al. (2004) [131].

In particolare, tutti gli isolati appartenenti alle specie *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* identificati mediante valutazione dell'attività biochimico-metabolica in gallerie API® Listeria 10300 (bioMérieux) sono stati correttamente classificati come *Listeria non-monocytogenes*. L'unica eccezione è stata osservata per *L. grayi* poiché la sequenza del gene *prs* non è stata riconosciuta dai primer disegnati.

Per l'interpretazione dei risultati è stato seguito lo schema riportato in tabella 14 e dalla combinazione dei dati di presenza/assenza di ciascun gene ottenuti dalle singole Triplex-PCR è stato possibile attribuire un determinato 'profilo' a ciascun sierogruppo di *L. monocytogenes* e ai ceppi non-*monocytogenes*, come evidenziato nelle figure 63 e 64.

Tabella 14 Distribuzione dei geni target tra i sierogruppi

		Sierogruppi				
Geni target Triplex-PCR 1	Dye	I (1/2a, 3a)	II (1/2c, 3c)	III (1/2b, 3b)	IV (4b, 4d, 4e)	<i>Listeria non monocytogenes</i>
ORF2819	FAM	-	-	+	+	-
ORF2110	YY	-	-	-	+	-
<i>lmo1118</i>	DFO	-	+	-	-	-
Geni target Triplex-PCR 2	Dye	I (1/2a, 3a)	II (1/2c, 3c)	III (1/2b, 3b)	IV (4b, 4d, 4e)	<i>Listeria non monocytogenes</i>
<i>plcA</i>	FAM	+	+	+	+	-
<i>lmo0737</i>	YY	+	+	-	- (+)*	-
<i>prs</i>	DFO	+	+	+	+	+

* *lmo0737* è positivo nei ceppi caratterizzati dal nuovo profilo 4b

Una specifica ed univoca amplificazione dei geni *lmo0737*, ORF2819, *lmo1118* e ORF2110 è stata osservata per tutti i ceppi di *L. monocytogenes* analizzati, permettendone la corretta classificazione in sierogruppi.

Curve di amplificazione caratterizzate da un segnale di fluorescenza basso ma riproducibile sono state osservate nei sierotipi 1/2a e 1/2c (Triplex-PCR 2). Tuttavia, tale aspetto non è risultato rilevante ai fini dell'analisi grazie alla contemporanea amplificazione del gene *plcA*, che permette di identificare la sola specie *L. monocytogenes*. L'amplificazione del gene *prs* nella Triplex-PCR 2 ha reso possibile l'univoco riconoscimento di ceppi del genere *Listeria* spp. non appartenenti alla specie *L. monocytogenes*.

Figura 63 Profili ottenuti mediante Triplex-PCR 1 (colonna sinistra) e Triplex-PCR 2 (colonna destra) relativi ai sierogruppi I, II e III di *L. monocytogenes*

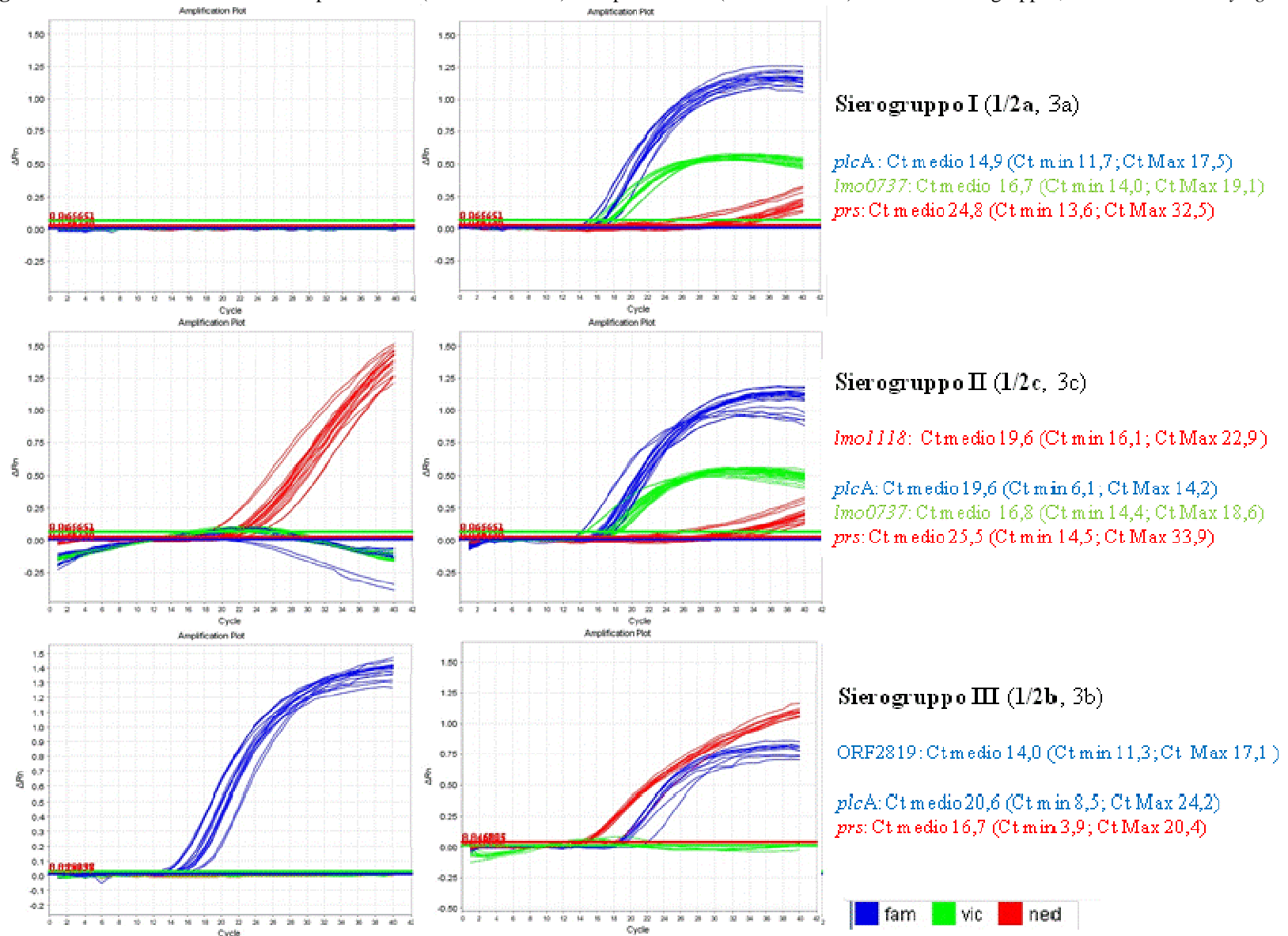
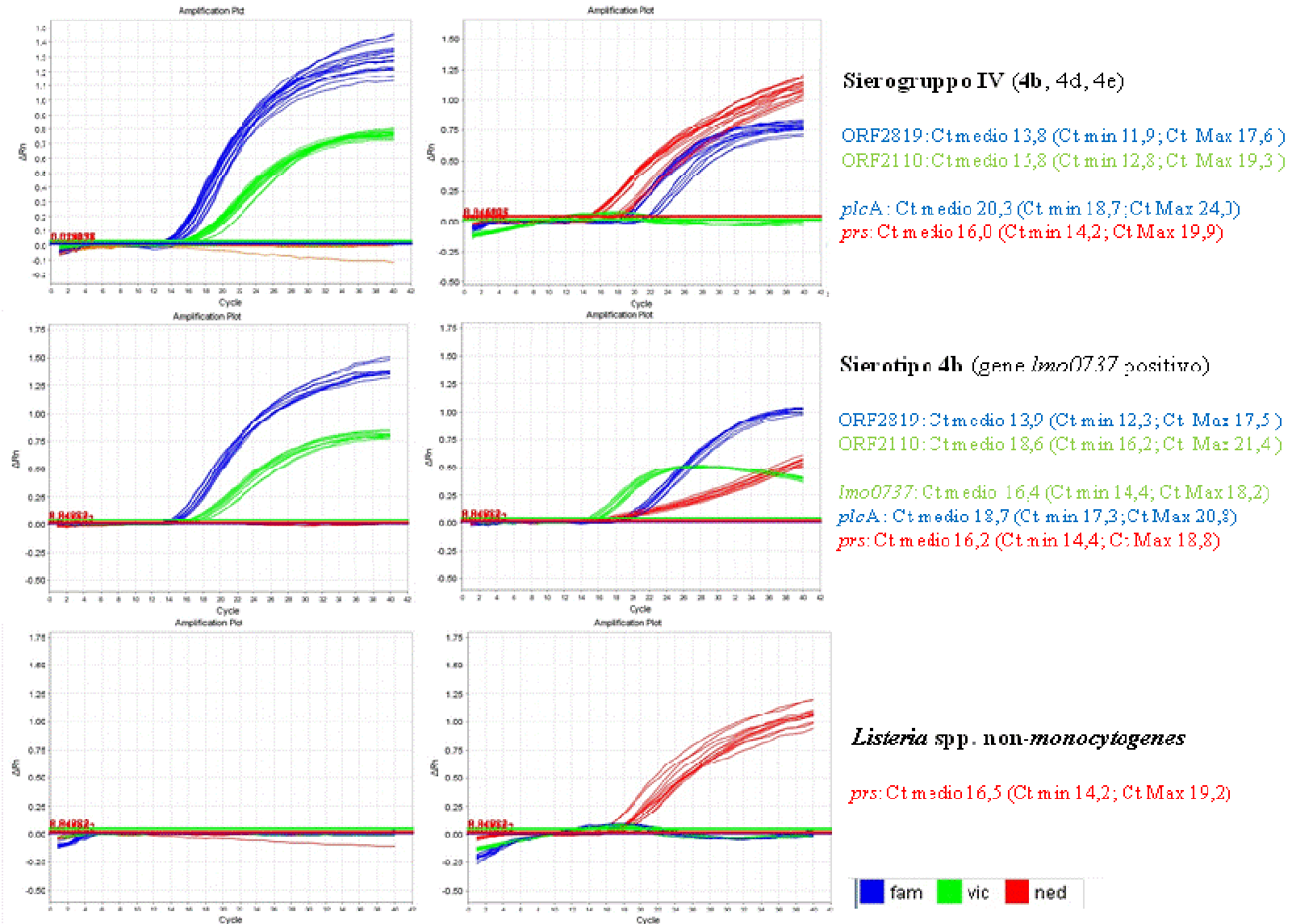


Figura 64 Profili ottenuti mediante Multiplex-PCR (Triplex-PCR 1 e Triplex-PCR 2) relativi al sierogruppo IV di *L. monocytogenes*, a ceppi con nuovo profilo 4b e ceppi *Listeria spp. non-monocytogenes*



L'impossibilità di classificare ceppi 'non tipizzabili' in sierogruppi con il metodo di riferimento è stata confermata anche con il metodo alternativo in Real-time, che ha identificato tali ceppi solo a livello di specie come *L. monocytogenes* (amplificazione contemporanea dei soli *plcA* e *prs*). L'assegnazione del sierotipo è stata, quindi, possibile solo attraverso la sierotipizzazione convenzionale basata su test di agglutinazione.

Tabella 15 Risultati ottenuti per la caratterizzazione di ceppi 'non tipizzabili'

ceppi	Corretta assegnazione*	Doumith et al., 2004	Questo studio
H104420631	4a o 4c (Lineage III)	non determinato	<i>L. monocytogenes</i>
H105120698	4c (Lineage III)	non determinato	<i>L. monocytogenes</i>
H110340516	<i>L. welshimeri</i>	non determinato	<i>L. non-monocytogenes</i>
H104680692	4a (Lineage III)	non determinato	<i>L. monocytogenes</i>

* assegnazione definitiva attraverso sierotipizzazione convenzionale

Il ceppo isolato da alimenti H110340516 è stato classificato come non-*monocytogenes* mediante amplificazione del gene *prs*, al contrario del metodo di riferimento. In tal caso, è stato necessario ricorrere a test API per l'identificazione (Tab. 15).

6.4 Valutazione della resistenza a concentrazioni sub-letali di cloruro di benzalconio e analisi dei profili di espressione di geni implicati nella resistenza a stress mediante saggi di qRT-PCR

In questo studio, è stata determinata l'attività antibatterica del cloruro di benzalconio a concentrazione sub-letale, su 20 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da casi clinici e alimenti. Le condizioni sperimentali del trattamento sono state scelte in base a studi precedenti, in cui sono state testate differenti concentrazioni del principio attivo, diversi tempi di contatto e condizioni cosiddette di 'pulito' e di 'sporco'. Da tali prove, è emerso che la dose in grado di provocare una riduzione della conta vitale con effetto non battericida nella maggior parte dei ceppi testati era pari a 10 ppm per 5 minuti di contatto, in assenza di sostanza interferente (dati non riportati). In tabella 16, è riportata la media dei risultati delle prove effettuate in condizioni di 'pulito' (BSA 0,3%), espressa come riduzione decimale delle cellule vive a seguito del contatto con la soluzione disinfettante. Il trattamento è stato considerato efficace nel caso di una riduzione decimale del numero di cellule vitali superiore a 5 unità logaritmiche ($\log R \geq 5$).

Tabella 16 Attività antibatterica del cloruro di benzalconio nei ceppi umani e isolati da alimenti

Ceppi umani	Riduzione decimale delle cellule vive (\log_{10} ufc/ml)	Ceppi isolati da alimenti	Riduzione decimale delle cellule vive (\log_{10} ufc/ml)
LMO05	4,3	5F	RT
LMO21	NR	7F	5,6
LMO41	NR	36F	NR
LMO45	NR	44F	NR
LMO111	4,8	46F	RT
LMO133	NR	78F	RT
LMO141	5,1	86F	4,9
LMO150	NR	115F	6,5
LMO153	NR	116F	5,9
LMO159	5,2	127F	6,2

NR= nessuna riduzione

RT= riduzione totale

Dall'analisi dei risultati è emerso che il disinfettante è risultato efficace nel 75% dei ceppi analizzati. Tuttavia, stratificando i dati in base alla differente origine degli isolati, è stata osservata una notevole diversità nella risposta alle condizioni sperimentali dei ceppi. Infatti, il trattamento è stato efficace nel 70% degli isolati da alimenti e solo per i ceppi 36F, 44F e 86F sono stati osservati valori di $\log R < 5$. Al contrario, per quanto riguarda i ceppi umani, il disinfettante non ha determinato una riduzione decimale media della conta vitale superiore a 5 nell'80% dei casi e solo per i ceppi LMO05 e LMO 111 il trattamento si è rivelato efficace. Inoltre, in nessun ceppo umano è stata osservata una riduzione totale delle cellule a seguito dell'esposizione al principio attivo, mentre ciò si è verificato in tre isolati da alimenti (5F, 46F e 78F). Al contrario, nessuna riduzione nella conta vitale è stata osservata nella maggior parte

dei ceppi umani (LMO21, LMO41, LMO45, LMO133, LMO150, LMO153) e solamente in due isolati da alimenti (36F e 44F).

6.4.1 Livelli di espressione dei geni *mdrL*, *lde*, *orfA* e *sigB*

Un totale di 20 ceppi di *L. monocytogenes* è stato analizzato, mediante saggi di Quantitative Real-time Reverse Transcription PCR al fine di valutare le variazioni dei livelli di espressione dei geni target *mdrL*, *lde*, *orfA* e *sigB* a seguito dell'esposizione a concentrazioni sub-letali di cloruro di benzalconio. Per ciascuna coppia di primer, incluso quella per il gene di riferimento *tufA*, è stata valutata l'efficienza di reazione (ϵ), mediante allestimento di una curva standard. I valori di efficienza di tutti i geni sono riportati in tabella 17. La differenza tra l'efficienza del gene di riferimento e dei geni target è stata sempre inferiore al 5%, infatti, i quattro geni di interesse hanno evidenziato un valore ϵ di $1,01 \pm 0,05$. Tale risultato è alla base della corretta applicazione del metodo comparativo di Livak [146].

Tabella 17 Parametri ricavati dalla curva standard per i geni target e di riferimento

Gene	Slope	Y-Intercept	R ²	Efficiency
<i>tufA</i>	-3,292	25,93	0,994	1,01
<i>mdrL</i>	-3,314	32,55	0,996	1,00
<i>lde</i>	-3,215	34,07	0,987	1,05
<i>orfA</i>	-3,212	32,94	0,994	1,05
<i>sigB</i>	-3,262	28,44	0,994	1,03

La contaminazione da DNA genomico residuo a seguito del trattamento con enzima DNasi è stata considerata trascurabile, poiché la differenza di Ct osservata tra ciascun campione analizzato (sia sottoposto a trattamento disinfettante sia non trattato) ed il rispettivo controllo non retrotrascritto (NoRT) è risultata sempre >10 cicli, corrispondente ad un fattore di diluizione superiore a circa 1:1000. L'espressione dei geni target *mdrL*, *lde*, *orfA* e *sigB* è stata definita come l'incremento o il decremento del livello di espressione nel campione esposto alla concentrazione sub-letale di cloruro di benzalconio (10 ppm) per un tempo di contatto di 5 minuti, rispetto ad un controllo (stesso campione, medesime procedure sperimentali ad eccezione del trattamento disinfettante) ed è stata normalizzata rispetto all'espressione del gene di riferimento (*tufA*).

In tabella 18, sono riportati i risultati dei livelli di espressione ($n\text{Fold} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$) ottenuti per i ceppi umani e gli isolati da alimenti di *L. monocytogenes*. Dall'analisi dei risultati è emerso che sia per i ceppi clinici sia per gli isolati da prodotti alimentari, il trattamento a concentrazione sub-letale con cloruro di benzalconio ha influito in maniera piuttosto variabile sull'espressione dei geni target selezionati in questo studio.

Tabella 18 Livelli di espressione dei geni *mdrL*, *lde*, *orfA* e *sigB* nei ceppi umani (codice LMO) e negli isolati da alimenti (codice F)

Ceppi	<i>Geni target</i>			
	<i>mdrL</i>	<i>orfA</i>	<i>lde</i>	<i>sigB</i>
LMO05	1,65	1,96	0,44	1,61
LMO21	1,60	1,35	1,49	1,44
LMO41	2,38	0,89	8,28	1,04
LMO45	0,97	1,04	0,96	1,59
LMO111	0,57	0,97	0,72	1,20
LMO133	1,53	0,71	7,67	0,69
LMO141	1,08	1,21	0,54	0,81
LMO150	0,57	0,70	2,10	0,31
LMO153	1,59	0,79	0,77	0,86
LMO159	0,69	1,88	2,97	1,27
5F	0,16	0,48	0,20	0,47
7F	1,19	1,08	1,06	0,89
36F	2,85	2,51	2,00	2,69
44F	1,46	1,13	11,31	2,43
46F	0,90	0,46	0,38	1,35
78F	1,09	0,75	0,72	1,01
86F	1,82	0,82	3,86	1,74
115F	0,34	0,74	0,68	0,31
116F	0,72	0,75	0,97	0,54
127F	0,51	0,55	1,30	0,58

Figura 65 Effetto del cloruro di benzalconio (riduzione logaritmica della conta vitale) e livelli di espressione (nFold) dei geni *sigB*, *lde*, *orfA* e *mdrL* negli isolati da alimenti

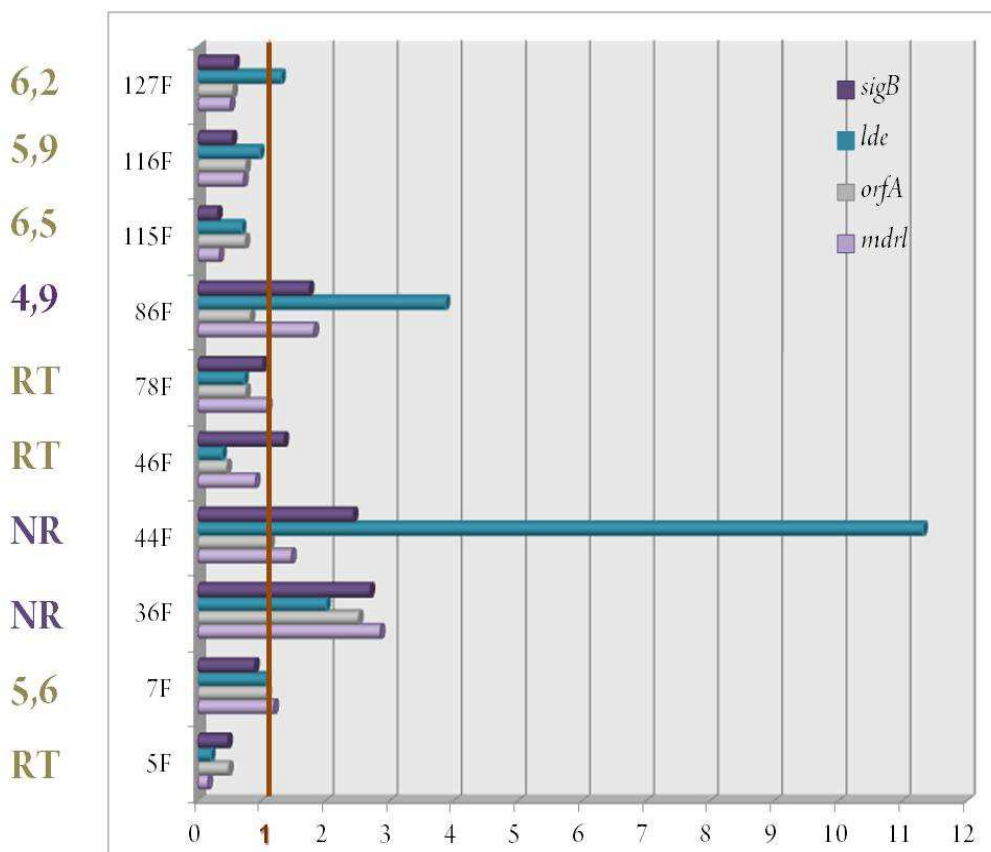
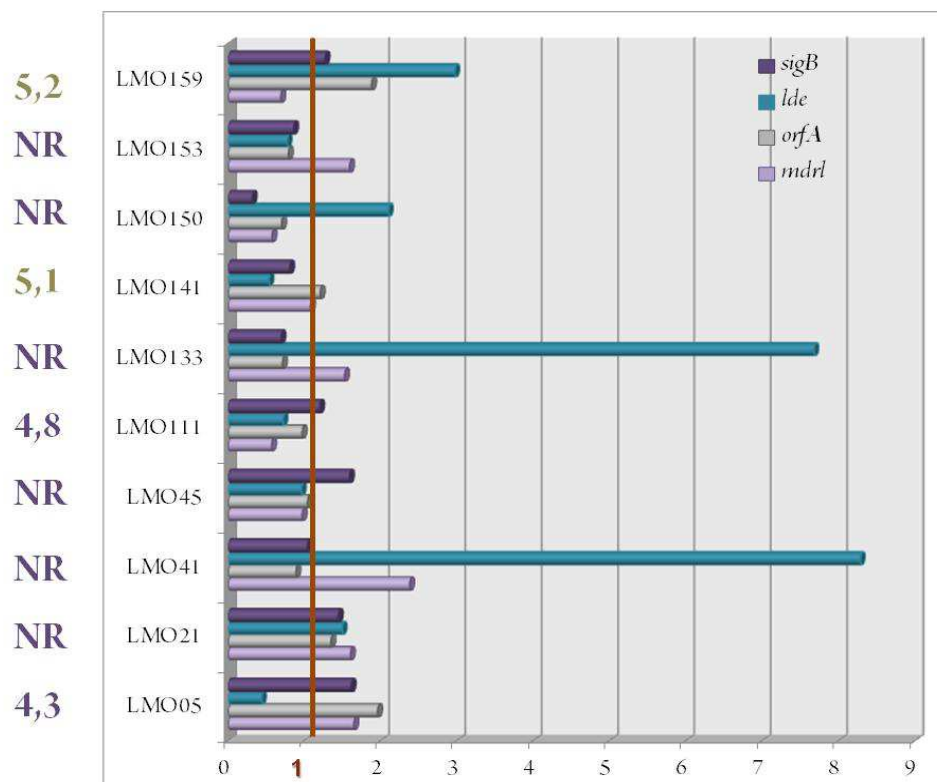


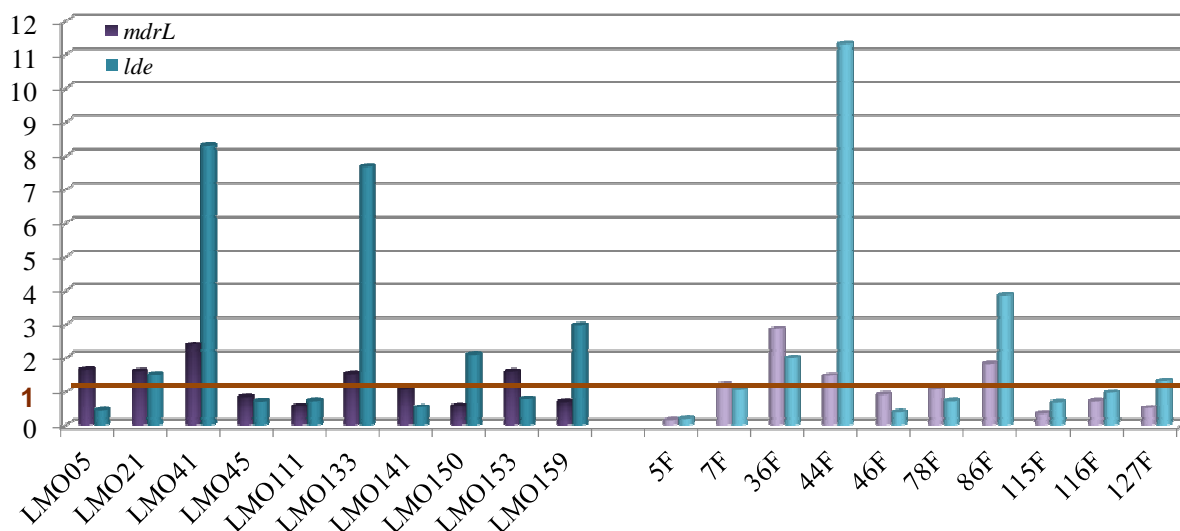
Figura 66 Effetto del cloruro di benzalconio (riduzione logaritmica della conta vitale) e livelli di espressione (nFold) dei geni *sigB*, *lde*, *orfA* e *mdrL* nei ceppi umani



Infatti, per alcuni ceppi si è osservato un notevole incremento dell'espressione di alcuni geni, per altri una marcata riduzione. Il diverso comportamento osservato nei profili di espressione dei geni di interesse è schematizzato nelle figura 65 e 66 insieme all'attività antibatterica del cloruro di benzalconio negli stessi ceppi analizzati.

Per i geni codificanti i due sistemi di efflusso MdrL e Lde (Fig. 67) è stato osservato un incremento nell'espressione di almeno uno di essi nel 60% dei ceppi.

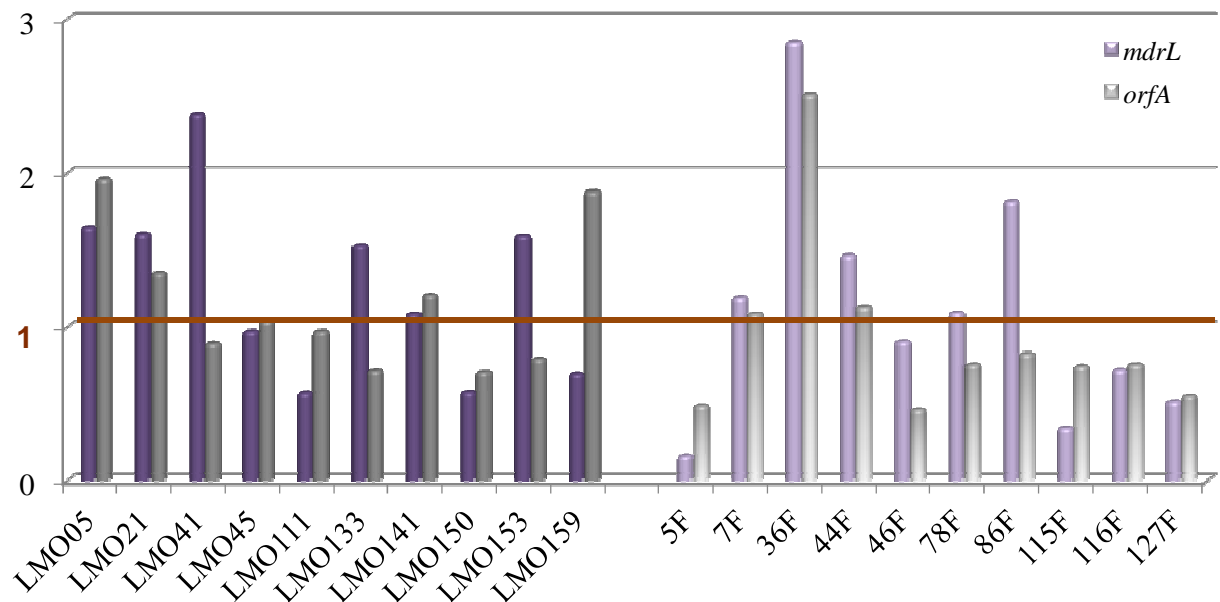
Figura 67 Espressione dei geni *mdrL* e *lde* nei ceppi umani e negli isolati da alimenti



I livelli più elevati sono stati registrati per il gene *lde*, che nel ceppo 44F, isolato da alimenti, è risultato circa 11 volte più espresso rispetto al controllo non sottoposto a trattamento disinfettante. Un incremento contemporaneo nell'espressione dei due geni si è verificato nel 30% dei casi, in particolare nei ceppi isolati da casi clinici LMO21, LMO41 e LMO133 e nei ceppi di origine alimentare 36F, 44F, 86F. Per quanto riguarda gli isolati da alimenti, la sovra-espressione ha coinvolto esclusivamente i ceppi in cui il trattamento con cloruro di benzalconio è stato inefficace ($\log R < 5$), mentre non è stata osservata in nessun ceppo in cui il trattamento ha provocato una riduzione della conta vitale superiore ad un fattore 5. Al contrario, nei ceppi umani, il notevole incremento nei livelli di espressione ha coinvolto anche ceppi (esempio, LMO159) in cui il trattamento era stato definito efficace secondo la norma di riferimento e spesso è stato associato a ceppi di sierotipo 4b (LMO41, LMO133).

L'analisi statistica mediante test ANOVA ha confermato un'associazione statisticamente significativa ($P < 0,05$) tra trattamento disinfettante e aumento dell'espressione del gene codificante il sistema di efflusso *MdrL*, mentre ciò non è emerso per il gene *lde*. Considerando i soli ceppi isolati da alimenti, invece, l'associazione è risultata significativa per entrambi i sistemi di efflusso. Inoltre, il trattamento con disinfettante ha prodotto una diminuzione del livello di espressione di *orfA* nel 60% dei ceppi, di cui 5 umani e 7 isolati da alimenti (Fig. 68).

Figura 68 Espressione dei geni *mdrL* e *orfA* nei ceppi umani e negli isolati da alimenti

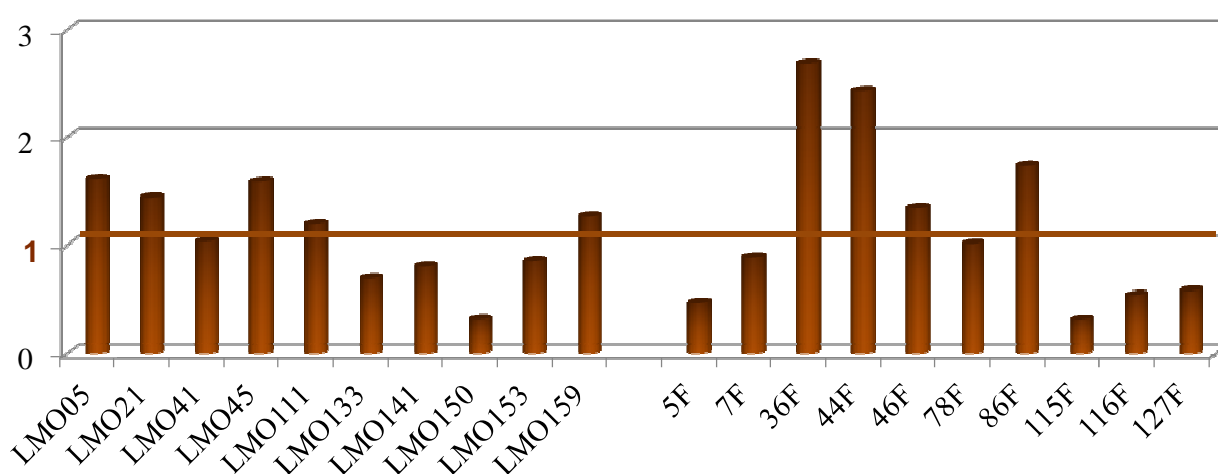


Mettendo a confronto i risultati di *mdrL* e *orfA*, suo ipotetico repressore, è stato osservato un andamento opposto nell'espressione in 6 ceppi (LMO41, LMO133, LMO 153, LMO159, 78F, 86F), soprattutto negli isolati da casi clinici, mentre nella maggior parte dei casi è stato evidenziato un andamento analogo, con un aumento dei livelli trascrizionali di mRNA per

entrambi i geni (LMO05, LMO21, LMO141, 7F, 36F, 44F) o una loro diminuzione (LMO45, LMO111, LMO150, 5F, 46F, 115F, 116F, 127F). L'associazione tra trattamento disinfettante ed espressione di *orfA* non è risultata statisticamente significativa. Analogamente a quanto osservato per il gene *lde*, è stato ottenuto un valore $P < 0,05$ solo restringendo l'analisi agli isolati da alimenti, escludendo i ceppi umani.

A seguito del trattamento con disinfettante, è stato osservato un incremento di espressione del gene *sigB* nel 45% dei ceppi, di cui quattro isolati da alimenti (36F, 44F, 46F, 86F) e cinque ceppi umani (LMO05, LMO21, LMO45, LMO111, LMO159) (Fig. 69).

Figura 69 Espressione del gene *sigB* nei ceppi umani e negli isolati da alimenti



L'incremento dell'espressione è stato verificato soprattutto per gli isolati da alimenti, in particolare i ceppi 36F, 44F e 86F in cui il gene è stato rispettivamente 2,7, 2,4 e 1,7 volte più espresso dopo l'esposizione a cloruro di benzalconio, rispetto allo stesso ceppo non sottoposto a trattamento. Per tali ceppi, inoltre, come già detto in precedenza, sono emersi anche i maggiori livelli di espressione dei sistemi di efflusso MdrL e Lde nell'ambito dei ceppi di origine alimentare. L'associazione fra trattamento disinfettante ed espressione di *sigB* è risultata statisticamente significativa, con valori $P < 0,001$ se l'analisi è condotta considerando i soli ceppi isolati da alimenti. Nei ceppi umani, i livelli di sovra-espressione di *sigB* sono risultati sempre inferiori ad un valore nFold pari a 2.

Applicando il coefficiente di correlazione di Pearson è emersa una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione di *mdrL* e *sigB* (0,665), tra *orfA* e *sigB* (0,662) e *mdrL* e *orfA* (0,549). In particolare, l'associazione tra *sigB* con *mdrL* e *orfA* è ad un livello di significatività $p < 0,01$. Invece, tra *mdrL* e *orfA* è $p < 0,05$.

6.5 Espressione dei geni *inlA*, *inlB*, *hly*, *prfA* e *bsh*

Per i 20 ceppi di *L. monocytogenes* selezionati sono stati studiati i profili di espressione dei geni di virulenza *inlA*, *inlB*, *hly*, *bsh* e *prfA*. Per ogni saggio di qRT-PCR, è stata ottenuta una curva standard per il gene di riferimento *tufA* e per ciascun gene target, mediante allestimento di cinque diluizioni seriali di cDNA a concentrazioni note.

Dall'analisi delle curve di amplificazione, è stato possibile calcolare per ogni campione le quantità di *tufA* e dei geni target a partire dal valore di Ct. Il livello di espressione di ciascun gene di interesse è stato ottenuto dal rapporto tra la concentrazione del gene target e quella del gene di riferimento.

Per ogni reazione, è stata valutata l'efficienza, che è risultata sempre compresa tra 0,98 e 1,03. La contaminazione da DNA genomico è stata considerata trascurabile, in quanto la differenza di Ct osservata tra ciascun campione analizzato ed il rispettivo controllo non retrotrascritto (NoRT) è risultata sempre >10, corrispondente ad un fattore di diluizione superiore a circa 1:1000. I valori di espressione ottenuti sono riportati in tabella 19.

Tabella 19 Livelli di espressione dei geni *inlA*, *inlB*, *hly*, *prfA* e *bsh* nei ceppi umani (codice LMO) e negli isolati da alimenti (codice F)

<i>Geni target</i>					
Ceppi	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>hly</i>	<i>prfA</i>	<i>bsh</i>
LMO05	0,22	0,18	1,42	0,19	0,12
LMO21	0,66	0,39	6,96	0,65	0,18
LMO41	28,20	8,32	13,14	1,37	1,13
LMO45	0,22	0,37	6,21	0,53	0,23
LMO111	0,34	0,28	4,88	0,54	0,20
LMO133	2,75	0,51	1,91	1,73	2,98
LMO141	1,23	0,89	28,21	1,55	0,42
LMO150	0,25	0,25	12,39	0,94	1,24
LMO153	1,28	1,15	1,12	1,63	2,16
LMO159	30,08	9,14	9,70	1,03	2,14
5F	1,43	0,41	2,67	0,24	0,35
7F	4,74	0,62	7,47	2,12	3,24
36F	0,23	0,31	0,69	0,13	0,02
44F	1,06	0,18	3,86	0,59	0,31
46F	0,25	0,29	1,55	0,81	0,03
78F	0,66	0,83	3,96	0,74	0,37
86F	0,61	0,20	12,87	2,96	0,08
115F	4,22	0,57	21,81	0,22	0,70
116F	2,83	1,02	11,87	0,20	0,40
127F	4,72	0,41	47,05	1,08	0,34

È stata riscontrata una notevole variabilità nei livelli di espressione di tutti i geni di virulenza studiati (Tab. 20), come evidenziato nelle figure 70 e 71, tuttavia, tali differenze non sono risultate significative ($p>0,05$) in relazione all'origine degli isolati (umani Vs alimenti).

Tabella 20 Livelli di espressione dei geni di virulenza nei ceppi umani e isolati da alimenti

Ceppi da alimenti	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>hly</i>	<i>prfA</i>	<i>bsh</i>
media±DS	2,07±1,87	0,48±0,28	11,38±14,13	0,91±0,93	0,58±0,96
mediana	1,24	0,41	5,71	0,67	0,34
min	0,23	0,18	0,69	0,13	0,02
max	4,74	1,02	47,05	2,96	3,24
Ceppi umani	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>hly</i>	<i>prfA</i>	<i>bsh</i>
media±DS	6,52±11,95	2,15±3,49	8,59±8,13	1,02±0,54	1,08±1,03
mediana	0,94	0,45	6,58	0,99	0,77
min	0,22	0,18	1,12	0,19	0,12
max	30,08	9,14	28,21	1,73	2,98

Figura 70 Livelli di espressione dei geni di virulenza negli isolati da alimenti

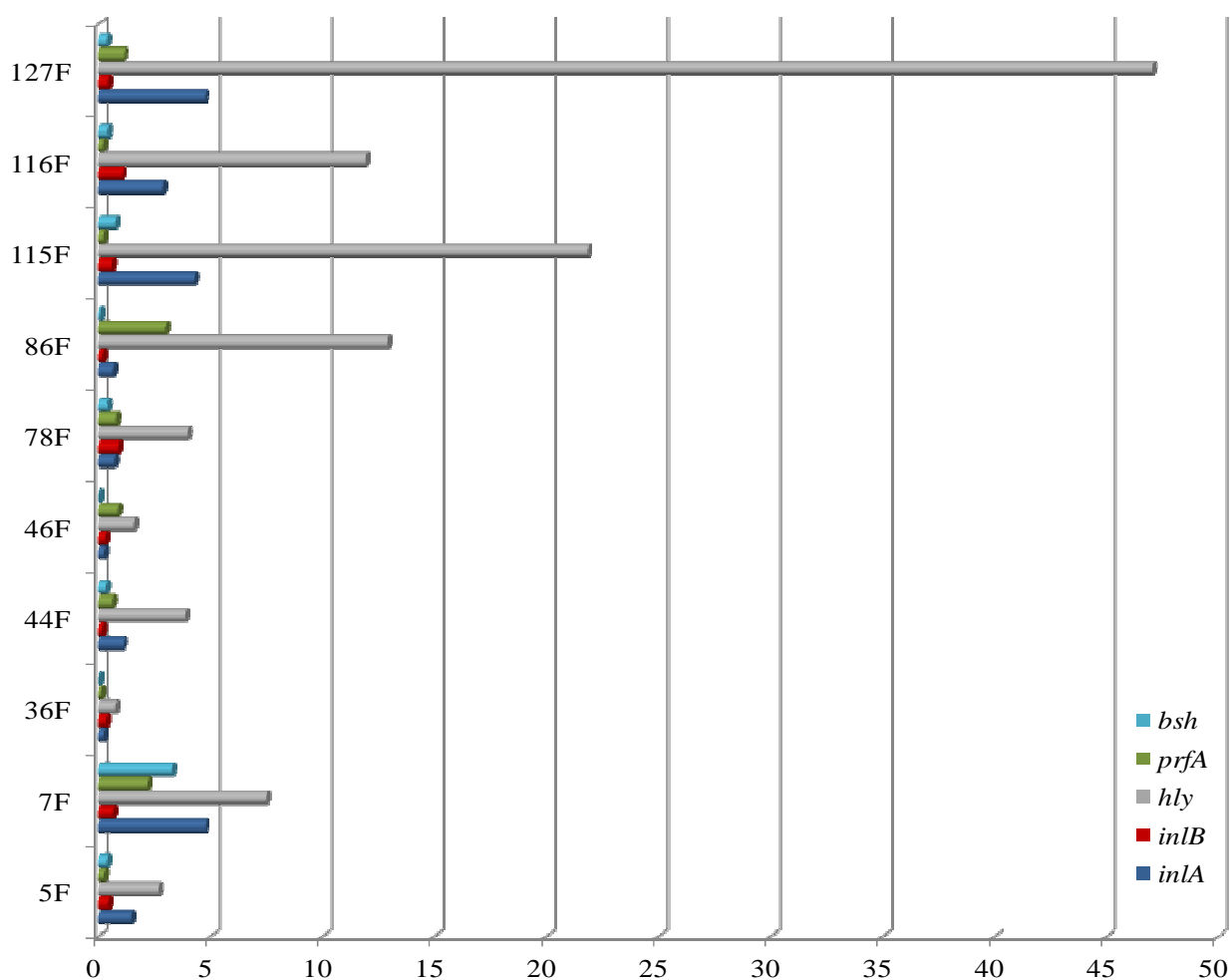
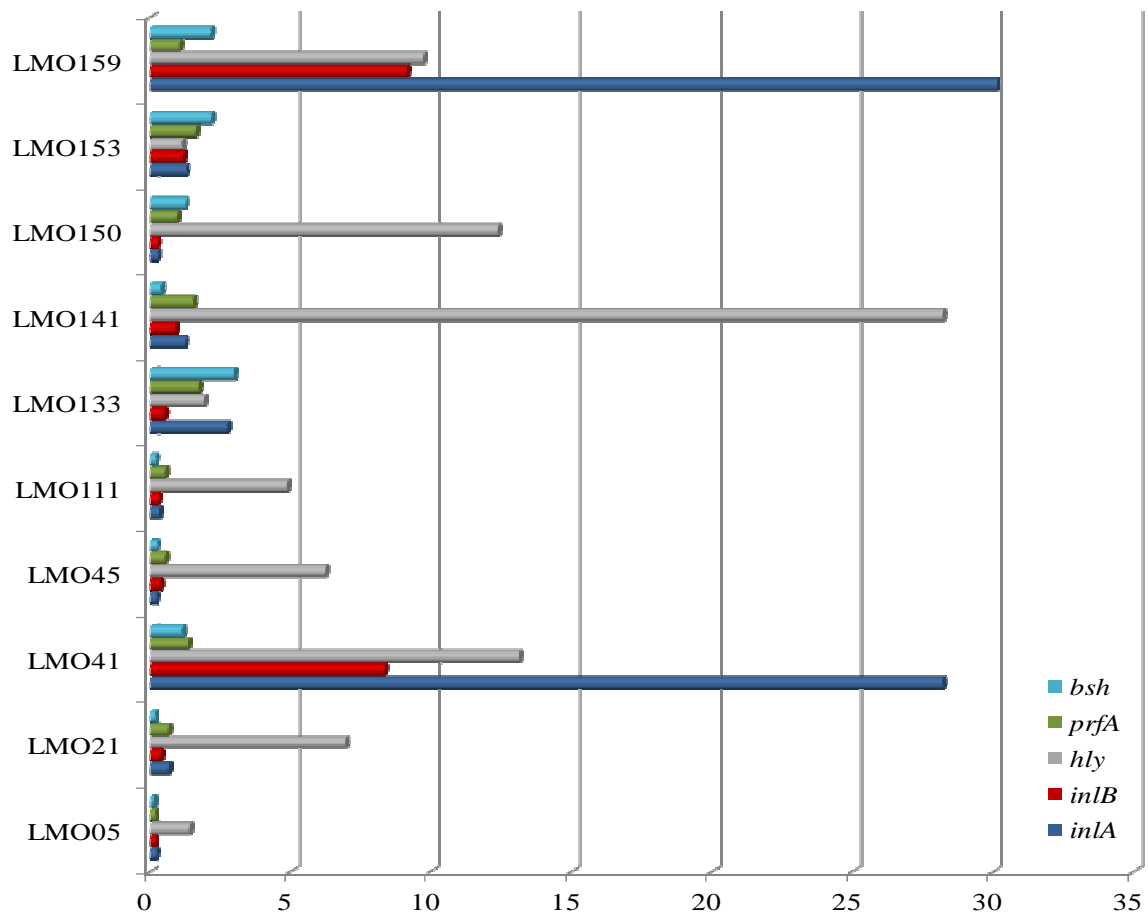


Figura71 Livelli di espressione dei geni di virulenza nei ceppi umani



Dall'analisi di tutti i fattori di virulenza in studio, i ceppi umani e gli isolati da alimenti hanno mostrato una maggiore espressione dei geni *hly* e *inlA*, mentre *inlB* e *bsh* sono risultati generalmente meno espressi. I più bassi livelli di espressione sono stati riscontrati per i ceppi 36F e LMO05, con valori rispettivamente di 0,22 e 0,23 per *inlA*, 0,13 e,0,19 per *prfA*, 0,02 e 0,12 per *bsh*. Per quanto riguarda il gene *inlB*, il livello minimo è stato pari a 0,18 nei ceppi 44F e LMO05.

I valori minimi di *hly* sono stati riscontrati nei ceppi LMO153 (1,12) e 36F (0,69).

I valori di espressione di *inlA* sono risultati generalmente più elevati negli isolati da alimenti (mediana 1,24) rispetto ai ceppi umani (mediana 0,94) Tab (med). In particolare, i ceppi 7F e 127F isolati da alimenti hanno presentato i valori più alti rispettivamente di 4,74 e 4,72. Tuttavia, i massimi livelli di trascrizione sono stati osservati nei ceppi umani LMO159 (30,08) e LMO41 (28,20).

Nei ceppi umani sono emersi livelli di trascrizione di *inlB* superiori rispetto a quelli isolati da alimenti, per i quali è stata osservata una minore variabilità (media $0,48 \pm 0,28$) e un valore

massimo di 1,02 nel ceppo 116F. Anche per *inlB*, i maggiori livelli di espressione sono stati osservati nei ceppi LMO159 (9,14) e LMO41 (8,32).

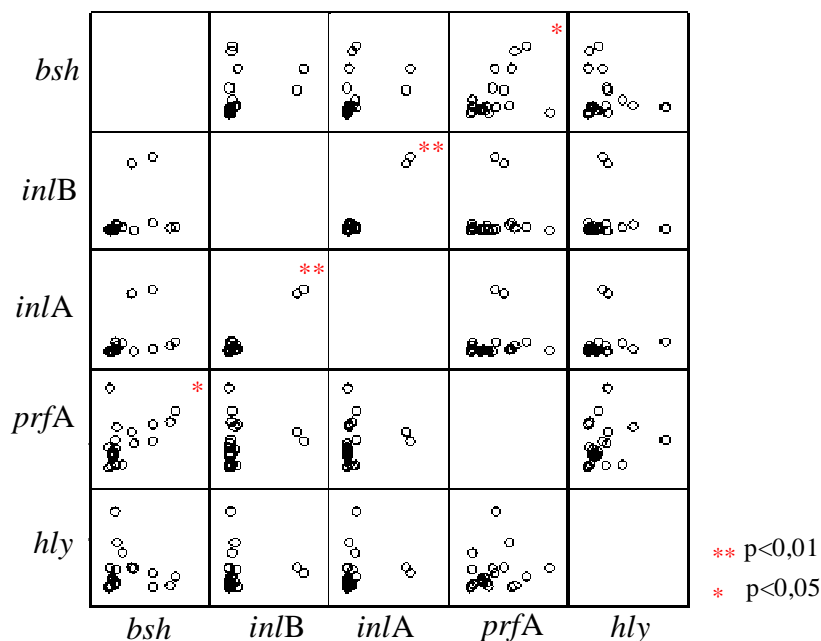
Il gene *hly* è stato quello maggiormente espresso rispetto agli altri fattori di virulenza nella totalità dei ceppi isolati da alimenti e solo per alcuni ceppi umani (n=5). La massima espressione si è avuta nei ceppi 127F (47,05) e 115F (21,81), mentre per i restanti isolati da alimenti si è osservata una notevole variabilità, facendo registrare la massima deviazione standard (Tab. 20). Tuttavia, *hly* è risultato generalmente più espresso negli isolati umani (mediana 6,58) rispetto agli isolati da alimenti (5,71). Tra i ceppi umani, i livelli più elevati sono stati associati a LMO141 (28,21), LMO41 (13,14) e LMO150 (12,39).

Per quanto riguarda il gene *prfA*, i ceppi clinici hanno mostrato valori mediamente superiori (mediana 0,99) rispetto agli isolati da alimenti (mediana 0,67), ad eccezione del ceppo 86F, in cui è stato osservato il valore massimo (2,96), seguito dal 7F (2,12). Tra i ceppi umani i livelli maggiori hanno riguardato LMO133 (1,73) e LMO153 (1,63).

I valori massimi di espressione del gene *bsh* sono stati osservati nei ceppi umani LMO133 (2,98), LMO153 (2,16) e LMO159 (2,14), mentre gli isolati da alimenti hanno mostrato valori medi di trascrizione inferiori (mediana 0,34 Vs 0,77). Tuttavia, nella totalità dei ceppi il livello di espressione più elevato (3,24) è stato osservato per il ceppo 7F.

Una correlazione statisticamente significativa è stata osservata nell'espressione dei geni codificanti le internaline A e B, con un coefficiente di Pearson pari a 98,5%. In misura minore (0,486), sono risultati correlati anche i livelli di espressione di *bsh* e *prfA*. (Fig. 72).

Figura 72 Correlazione nell'espressione dei geni di virulenza



6.6 Analisi delle curve di melting

In ciascuna prova, al fine di verificare la specificità dei primers nell'identificare la sequenza genica target, è stata prevista una fase post-PCR di melting per la valutazione delle temperature di dissociazione degli amplificati. I valori delle temperature di melting sono stati analizzati anche per verificare le differenze esistenti tra i ceppi appartenenti ai sierotipi 1/2a, 3a, 1/2c (lineage II) rispetto a quelli 1/2b e 4b (linea genetica I).

Le temperature di melting medie, minime e massime ottenute per il gene di riferimento e i geni target sono riportati in tabella 21. Dall'analisi delle curve di melting dei geni *mdrL*, *lde*, *orfA* e *sigB* tra campione sottoposto a trattamento disinfettante (T) e lo stesso ceppo non esposto a cloruro di benzalconio (NT) è stata osservata una differenza massima di 0,4°C; tuttavia, tali variazioni non sono risultate statisticamente significative.

Tabella 21 Temperature di melting dei geni analizzati

	<i>tufA</i>	<i>orfA</i>	<i>sigB</i>	<i>inlB</i>	<i>hly</i>
media±DS	82,81±0,11	79,45±0,26	79,76±0,25	78,08±0,19	79,06±0,19
mediana	82,81	79,425	79,825	78,1	79,1
min	82,64	79,1	79,4	77,7	78,8
max	82,99	80	80,25	78,5	79,4
	<i>mdrL</i>	<i>lde</i>	<i>inlA</i>	<i>prfA</i>	<i>bsh</i>
media±DS	84,02±0,74	83,83±1,60	79,26±0,49	80,46±0,52	80,50±0,29
mediana	83,75	84,7	79,4	80,6	80,45
min	83,2	80,95	78,4	79,4	80,1
max	85,4	85,2	79,9	81,1	81,2

Come atteso, per il gene di riferimento *tufA*, sono stati osservati valori simili per tutti i ceppi analizzati, senza differenze significative ($p>0,05$) in relazione ai differenti sierotipi e le due linee genetiche (Fig. 73). La massima differenza di T_m osservata è stata pari a 0,35°C.

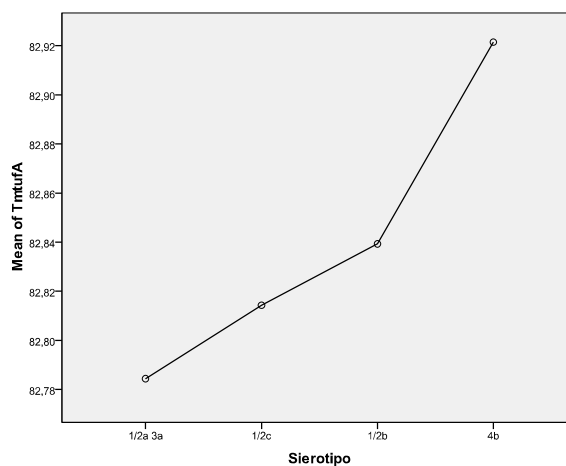


Figura 73 Variazione delle temperature di melting di *tufA* nei ceppi di diverso sierotipo

Differenze non significative ($p>0,05$) sono emerse anche per i geni *orfA*, *sigB*, *hly* e *inlB*, analizzando le temperature di melting per sierotipo e lineage di appartenenza dei ceppi (Fig. 74).

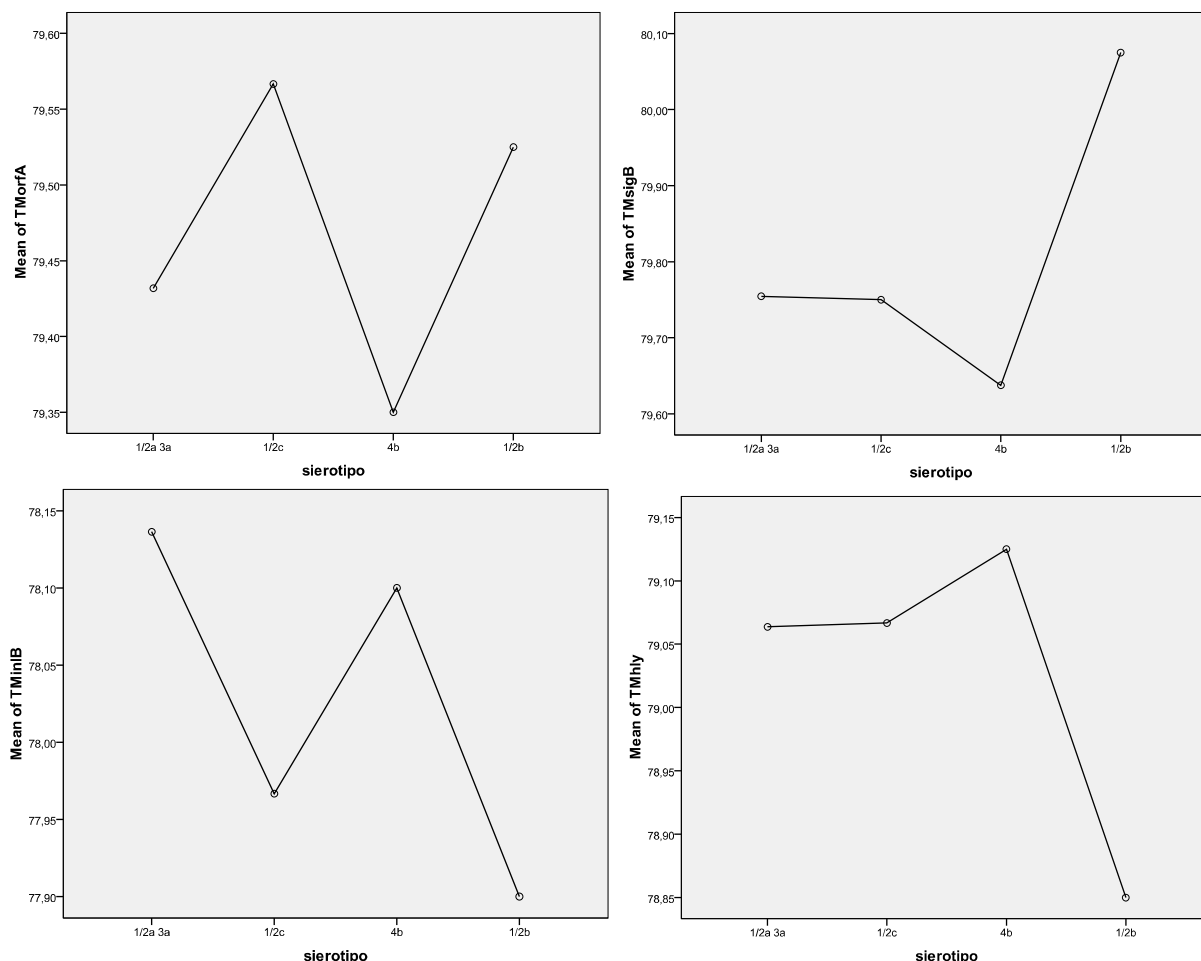


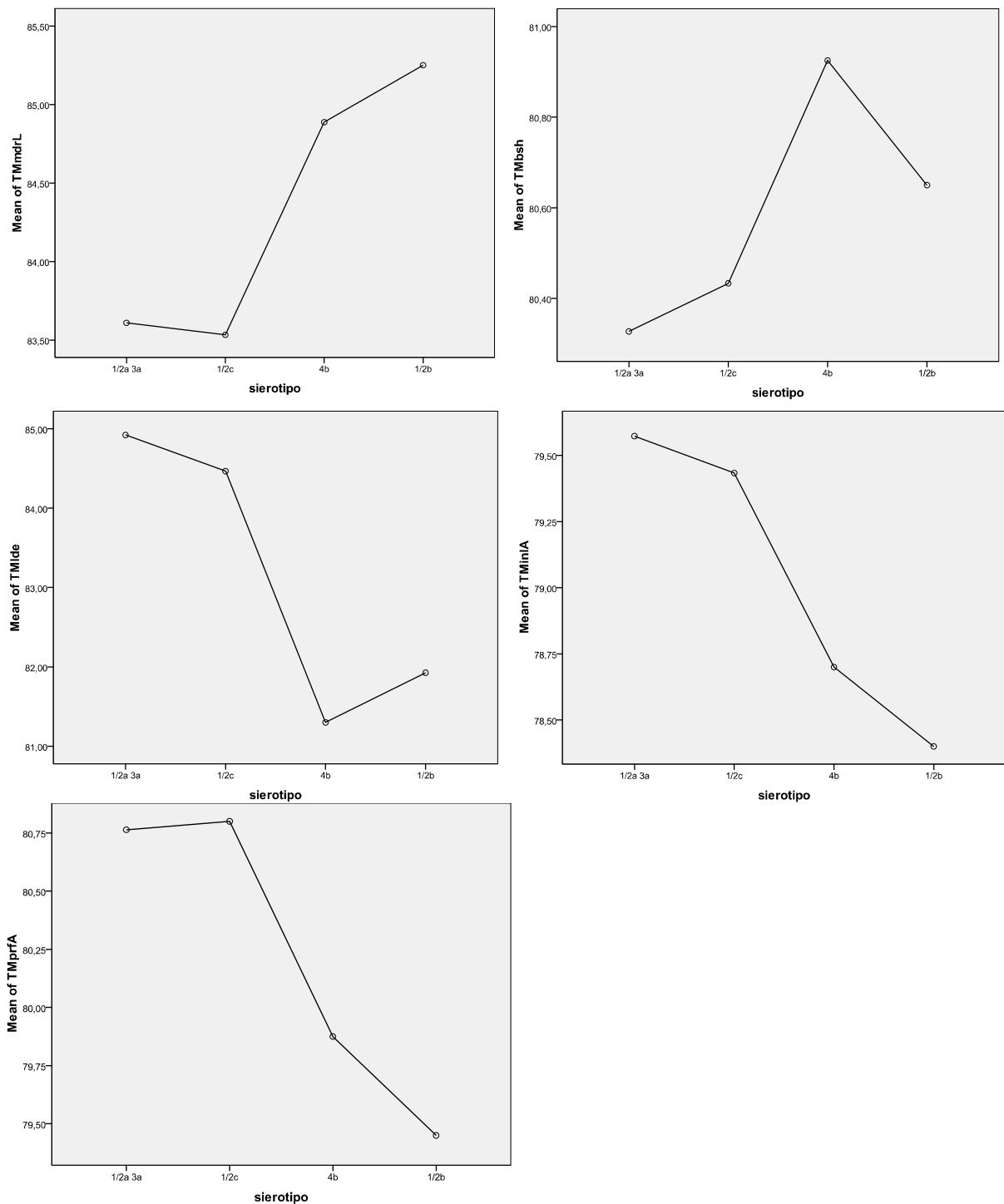
Figura 74 Variazione delle temperature di melting dei ceppi della lineage I (1/2b e 4b) e II (1/2a, 3a, 1/2c)

È stata osservata un'ampia variabilità nei valori di Tm relativi ai geni *mdrL* e *lde*, rispettivamente con valori medi di $84,02\pm 0,74$ e $83,83\pm 1,60$. Differenze statisticamente significative sono emerse nei valori medi di Tm di *mdrL*, *lde*, *bsh*, *inlA* e *prfA* per sierotipo e lineage di appartenenza, come rappresentato in figura 75. La differenza media tra i ceppi della linea genetica I e II è stata di circa $1,5^{\circ}\text{C}$ per *mdrL* e di circa $3,3^{\circ}\text{C}$ per *lde*. Inoltre, è stata osservata una differenza media di circa $0,5^{\circ}\text{C}$ per il gene codificante l'idrolasi dei Sali biliari BSH e di $0,9^{\circ}\text{C}$ e 1°C rispettivamente per i geni codificanti l'internalina A e il regolatore trascrizionale PrfA.

Le temperature di dissociazione dei geni codificanti i due sistemi di efflusso e del gene *bsh* sono risultate associate sia al sierotipo ($p<0,001$) che alla lineage ($p<0,05$). Inoltre, molto significative ($p<0,001$) sono risultate le differenze per i geni *inlA* e *prfA* tra i ceppi, sia per

sierotipo sia per linea genetica. I sierotipi 1/2a, 3a e 1/2c (lineage II) hanno mostrato valori medi di Tm superiori rispetto ai ceppi 1/2b e 4b (lineage I) per i geni *lde* (84,83°C vs 81,51°C), *inlA* (79,54°C vs 78,60°C) e *prfA* (80,77°C vs 79,73°C). Al contrario, gli isolati della lineage I hanno mostrato valori medi superiori per *bsh* (80,83°C) e *mdrL* (85,01°C) rispetto a quelli della lineage II (80,35°C e 83,59°C).

Figura 75 Variazione delle temperature di melting dei ceppi della lineage I (1/2b e 4b) e II (1/2a, 3a, 1/2c)



L'attenzione nei confronti delle infezioni sostenute da *L. monocytogenes*, sia in Sanità Pubblica che nell'industria alimentare, è aumentato fortemente negli ultimi anni. Tale microrganismo è l'agente eziologico della listeriosi, severa malattia infettiva che colpisce soprattutto soggetti con deficit del sistema immunitario, fasce di popolazione in aumento in tutti i Paesi industrializzati.

Inoltre, sia i casi epidemici sia quelli sporadici sono associati al consumo di alimenti contaminati; i prodotti maggiormente coinvolti nella trasmissione dell'infezione sono gli alimenti ready-to-eat (RTE), i quali sono sempre più richiesti per la praticità d'utilizzo e per i mutati stili di vita dei consumatori, occupando fasce di mercato sempre più ampie.

La continua evoluzione e l'applicazione dei metodi di biologia molecolare per lo studio epidemiologico di *L. monocytogenes* hanno contribuito a migliorare la conoscenza e la comprensione dei meccanismi alla base dell'infezione, attraverso lo sviluppo di procedure di laboratorio per una rapida identificazione e caratterizzazione dei ceppi batterici, permettendo un maggior controllo delle infezioni e l'implementazione di strategie di prevenzione.

In tale ottica, nel presente lavoro, 250 ceppi di *L. monocytogenes*, isolati da casi clinici, da alimenti e ambiente, sono stati sottoposti a genotipizzazione mediante single Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism (sAFLP) per valutare la correlazione genetica esistente tra gli isolati.

Al fine di semplificare e rendere più rapida ed accurata tale metodica, è stato realizzato un confronto tra elettroforesi tradizionale su gel di agarosio e separazione microfluidica automatizzata su un sottogruppo rappresentativo di 50 isolati.

È stato standardizzato, inoltre, un saggio in Real-time Multiplex-PCR per la sierotipizzazione molecolare di *L. monocytogenes*, che permette la classificazione dei ceppi in sierogruppi, consentendo la rapida identificazione dei principali sierotipi coinvolti nella maggior parte dei casi di listeriosi umana.

Infine, sono stati analizzati, mediante saggi di qRT PCR, 20 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da casi clinici e alimenti, per valutare l'espressione di geni implicati nella resistenza a stress in seguito all'esposizione a concentrazioni sub-letali di cloruro di benzalconio.

Negli stessi ceppi sono stati valutati i profili di espressione genica dei principali determinanti di virulenza implicati nell'invasione della cellula ospite, nel meccanismo patogenetico e nella resistenza ai sali biliari.

Capitolo 7

Discussione e conclusioni

7.1 Genotipizzazione di *L. monocytogenes* mediante single Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism (sAFLP)

In tale studio, 250 ceppi di *L. monocytogenes* sono stati tipizzati mediante sAFLP al fine di valutare le relazioni genetiche esistenti tra gli isolati, caratterizzati per linea genetica, sierogruppo, sierotipo e profilo RFLP di *inlA*. La diversità osservata tra i diversi profili di sAFLP ottenuti è attribuibile a variazioni nel genoma di ciascun ceppo batterico in molteplici siti di restrizione endonucleasica e/o a delezioni genomiche, inserzioni e riarrangiamenti. Inoltre, la distribuzione dei siti di restrizione è variabile nel genoma [139]. Di conseguenza, ciascun ceppo batterico è associato ad un profilo caratteristico. Mediante l'utilizzo del software Bionumerics sono stati generati alberi filogenetici (dendrogrammi) che rappresentano le relazioni genetiche che sussistono tra gli isolati. La validità della sAFLP ai fini dello studio epidemiologico e tassonomico di *L. monocytogenes* e altri microrganismi patogeni è stata precedentemente riportata in diversi studi [154; 155]. Il metodo mostra una notevole accuratezza e riproducibilità dei risultati ed è dotato di un elevato potere discriminante. Allo stesso tempo, tale metodica risulta meno complessa e laboriosa della PFGE, che allo stato dell'arte rappresenta il Gold Standard per la caratterizzazione molecolare di ceppi di *L. monocytogenes* nelle indagini epidemiologiche. I dendrogrammi ottenuti hanno permesso di identificare diversi cluster, che hanno evidenziato una consistente concordanza con la classificazione in linee genetiche. Infatti, i ceppi della linea genetica I sono stati divisi nettamente da quelli appartenenti alla lineage II. Nello studio, non sono stati analizzati ceppi appartenenti alla lineage III; tuttavia, solo l'1% di casi di infezioni umane è attribuibile ad essi, essendo isolati per lo più da casi di listeriosi negli animali [156]. Le lineage I e II sono, al contrario, frequentemente (>95%) associate all'isolamento da alimenti e casi sporadici e epidemici di listeriosi umana [1]. I cluster ottenuti hanno incluso sia isolati da casi umani di listeriosi invasiva e gastroenterica, sia provenienti da alimenti. Molti ceppi isolati da prodotti alimentari sono stati raggruppati con quelli provenienti da materie prime utilizzate per la loro produzione e da tamponi ambientali dell'industria alimentare. Ceppi isolati da alimenti carnei hanno generato raggruppamenti separati rispetto a quelli isolati da prodotti caseari. I ceppi provenienti dalla stessa regione e medesima fonte di isolamento sono stati raggruppati in cluster ben distinti, indicando che i casi di listeriosi umana possono essere geograficamente definiti. È noto, infatti, che i più importanti focolai infettivi sono causati da un ristretto gruppo di cloni epidemici caratterizzati da un elevato potenziale di virulenza e ampiamente distribuiti a livello mondiale. Allo stesso tempo, ceppi provenienti da diversi Paesi hanno generato un identico profilo. Dati di letteratura dimostrano, infatti, che i più importanti outbreak sono

causati da un ristretto gruppo di cloni epidemici caratterizzati da un elevato potenziale di virulenza, i quali sono largamente distribuiti a livello mondiale [157]. La sAFLP, quindi, permette di correlare isolati che presumibilmente appartengono allo stesso evento epidemico.

I risultati della tipizzazione molecolare mediante sAFLP hanno concordato pienamente con i dati epidemiologici sulla distribuzione dei sierotipi e sull'ecologia dei ceppi di *L. monocytogenes*. Il sierotipo è implicato nella notevole variabilità della virulenza del microrganismo, in quanto i quattro sierotipi 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b sono associati ad oltre il 96% di tutti i ceppi isolati da alimenti o coinvolti in casi di listeriosi nell'uomo e il solo sierotipo 4b è responsabile di circa il 40% dei casi sporadici ed epidemici di listeriosi sia in Europa che in Nord America [50; 132]. È stata osservata una stretta relazione tra sierotipo e profilo sAFLP, che ha permesso l'identificazione di specifici cluster. Sono stati, infatti, osservati raggruppamenti distinti per i ceppi di sierotipo 1/2c, isolati quasi esclusivamente da alimenti contaminati. Alcuni Autori suggeriscono che le nicchie ecologiche di tali ceppi sono differenti da quelle di isolati 1/2a, 1/2b e 4b e ciò potrebbe spiegare la minore frequenza di isolamento di ceppi 1/2c in casi umani [158]. Altri studi suggeriscono che la bassa prevalenza del sierotipo 1/2c in casi clinici, nonostante la sua diffusa presenza in alimenti contaminati, sia legata a prematuri codoni di stop nel gene *inlA*, che riducono il potenziale di virulenza [13; 137]. Tutti i ceppi 1/2c analizzati presentavano, infatti, un profilo troncato (tipo D) di RFLP di *inlA*. Nell'ambito della lineage II, isolati di sierotipo 1/2c, sebbene appartenenti a sottogruppi specifici, sono stati inclusi all'interno di un cluster più ampio insieme a sottogruppi di ceppi 1/2a. È stato ipotizzato, infatti, che il sierotipo 1/2c abbia avuto origine dal sierotipo 1/2a ed il ceppo di riferimento EGD-e rappresenta probabilmente un intermedio evolutivo [55]. Ceppi 1/2a con profilo troncato (tipo D) di RFLP di *inlA* hanno generato un cluster nettamente distinto dagli altri ceppi della lineage II. I profili di sAFLP di ceppi 1/2a hanno mostrato una notevole eterogeneità, in accordo con dati di letteratura, che hanno dimostrato un maggior tasso di ricombinazione genetica nella lineage II, il quale potrebbe favorire lo sviluppo di capacità di adattamento a differenti nicchie ambientali [13]. Al contrario, nei ceppi della lineage I è stata osservata una bassa prevalenza di plasmidi e di elementi genetici trasponibili, suggerendo l'esistenza di meccanismi che limitano l'acquisizione di materiale genetico attraverso il trasferimento orizzontale di geni [26; 123]. I profili sAFLP del cluster relativo alla lineage I sono risultati meno variabili rispetto a quelli generati da ceppi di sierotipo 1/2a, in accordo con altre metodiche di tipizzazione [55]. Non è stata osservata una precisa distinzione tra sierotipo 1/2b, 3b e 4b, anche se la maggior parte ha generato cluster definiti. Secondo alcuni modelli evolutivi, la popolazione di sierotipo 4b ha avuto origine dal sierotipo ancestrale 1/2b [159]. La sAFLP ha anche permesso di raggruppare molti ceppi di stesso sierotipo e profilo RFLP di

inlA in gruppi distinti, soprattutto per 1/2c e 1/2a con profilo troncato di tipo D isolati da casi clinici e alimenti. Al contrario, ceppi con profilo RFLP di tipo E non sono stati inclusi in cluster distinti, analogamente agli isolati per i quali non è stato possibile attribuire un definito profilo di *inlA* e che sono stati raggruppati in modo variabile con altri isolati dello stesso sierotipo. Attraverso la tecnica sAFLP è stato possibile confermare la distinzione delle due lineage principali con una precisa distribuzione dei sierotipi e i dati ottenuti hanno messo in evidenza la grande eterogeneità genetica esistente all'interno della specie. La sAFLP si rivela utile per studi tassonomici grazie alla capacità di stabilire le relazioni genetiche esistenti tra i ceppi. Data la diffusa presenza, la natura ubiquitaria e l'estrema variabilità nella virulenza del patogeno, la sAFLP può rivelarsi uno strumento di grande utilità per la tipizzazione molecolare dei ceppi, permettendo di correlare casi apparentemente indipendenti e di associare specifici profili molecolari a fonte d'infezione e provenienza. Può contribuire anche alla sorveglianza dei patogeni a trasmissione alimentare nella filiera di produzione degli alimenti, soprattutto in relazione a ceppi persistenti ai quali sono stati associati casi epidemici di listeriosi [155].

La sAFLP, nell'ambito della sorveglianza epidemiologica, si dimostra una metodica valida per il controllo di ceppi circolanti nel territorio nazionale e per definire il reale impatto delle infezioni di *L. monocytogenes*.

7.1.1 Elettroforesi tradizionale vs. separazione microfluidica automatizzata per la genotipizzazione di ceppi di *L. monocytogenes* mediante sAFLP

La metodica sAFLP si è rivelata utile per la caratterizzazione molecolare di *L. monocytogenes*, in accordo con altri studi [138; 139]. Tuttavia, analogamente ad altre tecniche basate su restrizione enzimatica, risulta piuttosto laboriosa e necessita di lunghi tempi di esecuzione. Per ovviare, in parte, a tali limitazioni è stata valutata la possibilità di sostituire la tradizionale elettroforesi con tecnologie innovative per la separazione degli acidi nucleici. Infatti, la sAFLP prevede una fase finale della durata di oltre 4 ore per l'ottenimento dei profili di restrizione, basata su separazione in gel di agarosio. Mediante l'utilizzo di chip per l'elettroforesi microfluidica, tale passaggio può essere realizzato in maniera automatizzata in circa 40 minuti ed è completamente evitato l'utilizzo di bromuro di etidio. Il risultato è infatti fornito sotto forma di elettroferogramma, convertito automaticamente dal software in gel virtuale.

L'indagine condotta su un sottogruppo rappresentativo di ceppi di *L. monocytogenes* ha evidenziato una totale congruenza nella struttura del dendrogramma dei profili di elettroforesi su gel virtuale e quello ottenuto dall'analisi su gel di agarosio. Entrambe le tecniche hanno, inoltre, mostrato un elevato potere discriminante. Tutti i ceppi appartenenti alla linea genetica I

sono stati separati da quelli della lineage II e i sottogruppi individuati in questi due grandi cluster hanno incluso esattamente gli stessi ceppi. È stata osservata una totale concordanza con i dati di sierotipizzazione, poiché sono stati ottenuti cluster distinti per ciascun sierotipo e gli isolati sono stati separati anche in accordo al profilo RFLP di *inlA*. I ceppi risultati geneticamente simili o che hanno mostrato un livello di similarità superiore al 90% sono stati gli stessi con entrambe le tecniche. L'elettroforesi microfluidica ha evidenziato una maggiore risoluzione nella visualizzazione di doppie bande (doppio picco nell'elettroferogramma), non visibili in gel di agarosio, o di bande di basso peso molecolare, per le quali è stata necessaria un'ulteriore colorazione del gel in soluzione di bromuro di etidio.

Quindi, l'utilizzo del sistema di elettroforesi microfluidica, oltre a ridurre i tempi di analisi, consente un'identificazione più accurata delle bande caratterizzanti il profilo sAFLP. La sostituzione del gel di agarosio con quello virtuale consente di ridimensionare l'errore nella clusterizzazione dei ceppi legato a fenomeni di distorsione della corsa elettroforetica su gel di agarosio. Infatti, per alcuni dei 250 ceppi analizzati mediante sAFLP è emersa un'incongruenza rispetto all'osservazione visiva dei profili e ceppi con pattern di restrizione identico sono stati inclusi in cluster differenti ed è stato necessario correggere l'errata interpretazione. Il gel virtuale, ottenuto in maniera automatizzata e standardizzata, non risente di tale difetto di interpretazione, anche grazie all'introduzione in ciascuna prova della miscela di 1K e 12K ladder, che migliora notevolmente l'allineamento delle bande mediante software Bionumerics [17]. Questo studio preliminare ha confermato la possibilità di combinare la sAFLP con chip per l'elettroforesi microfluidica. Il sistema automatizzato Experion™ si è rivelato altamente sensibile ed accurato, permettendo di utilizzare quantità inferiori di reagenti e di campione (1 µl di DNA). Inoltre, consente la riduzione del rischio chimico per gli operatori, in quanto evita l'impiego di reagenti tossici e/o cancerogeni. Infine, la completa automazione garantisce una maggiore riproducibilità dei risultati finali e la presenza di condizioni analitiche costanti. L'introduzione di tale sistema elettroforetico, per una più rapida ed accurata tipizzazione dei microrganismi, rappresenta un'evoluzione della metodica tradizionale con una sensibile riduzione dei tempi di analisi. In combinazione con la sAFLP costituisce, pertanto, un valido supporto per la tipizzazione molecolare di *L. monocytogenes*.

7.2 Standardizzazione di un saggio in Real-time Multiplex-PCR per la sierotipizzazione molecolare di *L. monocytogenes*

La tipizzazione dei ceppi di *L. monocytogenes* risulta fondamentale per la sorveglianza delle infezioni sostenute dal patogeno, a causa della differente rilevanza clinica dei sierotipi all'interno della specie. Attualmente, la caratterizzazione di *L. monocytogenes* viene condotta su due livelli, determinando il sierotipo attraverso sierotipizzazione convenzionale o con metodi molecolari alternativi denominati PCR-serogrouping e applicando il metodo di riferimento Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) [130; 131; 160; 161].

L'individuazione convenzionale dei sierotipi, basata su test di agglutinazione, è ancora necessaria come primo livello per la caratterizzazione di casi sospetti di *L. monocytogenes*. Tuttavia, recenti metodi molecolari permettono di superare i limiti di tale metodica, tra cui elevato costo dei reagenti, lunghi tempi di analisi e soprattutto complessità e soggettività nell'interpretazione dei risultati dovuta a fattori di confondimento, che rendono spesso difficile e non definita l'assegnazione del sierotipo. Essendo, inoltre, la PFGE molto laboriosa, le metodiche basate su PCR per l'individuazione dei sierogruppi possono rappresentare la strategia di elezione per un rapido screening iniziale nelle indagini epidemiologiche [132].

La procedura di identificazione dei sierogruppi in Real-time PCR, messa a punto e standardizzata in questo studio, ha fornito risultati concordanti con il precedente schema molecolare di Doumith et al. (2004) [131], che rappresenta uno dei metodi più utilizzati per la sorveglianza epidemiologica dei ceppi circolanti del patogeno. Il nuovo approccio sviluppato per la sierotipizzazione molecolare di *L. monocytogenes* ha permesso di classificare correttamente i ceppi nei rispettivi sierogruppi di appartenenza. In particolare, tutti gli isolati di sierotipo 1/2a e 3a sono stati raggruppati nel Gruppo I, i ceppi 1/2c e 3c nel Gruppo II, gli isolati 1/2b, 3b e 7 nel Gruppo III e i sierotipi 4b, 4d e 4e nel Gruppo IV. Inoltre, ha permesso di identificare anche gli isolati di sierotipo 4b caratterizzati da un profilo atipico, derivato presumibilmente dalla combinazione tra ceppi 1/2a e 4b, identificati nel 2007 in Francia e successivamente in altre aree geografiche di Stati Uniti, Cile e Australia, ai quali al momento non risulta associato nessun evento epidemico di listeriosi [132; 160].

A differenza della sierotipizzazione tradizionale, il metodo molecolare non permette l'individuazione del singolo sierotipo. Tuttavia, dal punto di vista epidemiologico, tale aspetto è di secondaria importanza, in quanto i sierotipi 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d e 7 risultano estremamente rari, al contrario dei ceppi 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b correntemente isolati nella maggior parte degli alimenti contaminati e nei casi clinici di listeriosi. Di conseguenza, l'individuazione dei sierogruppi mediante Real-time PCR può ragionevolmente sostituire la

sierotipizzazione convenzionale basata su reazione di agglutinazione, a vantaggio del risparmio economico e soprattutto della tempestività e dell'attendibilità del risultato finale.

Lo schema di tipizzazione proposto in questo studio permette un'ulteriore riduzione dei tempi di analisi rispetto al metodo molecolare di riferimento, non essendo richiesta la fase finale di separazione elettroforetica dei prodotti di PCR su gel di agarosio ed eliminando completamente l'eventuale impiego di reagenti tossici.

La sostituzione della tradizionale PCR *end point* prevista dal protocollo di riferimento, con un saggio in Real-time PCR, rappresenta un'evoluzione della sierotipizzazione, a cui si accompagna un significativo miglioramento delle performance del metodo. L'utilizzo di sonde TaqMan garantisce, un'aumentata specificità, con un minor rischio di prodotti di reazione aspecifici, in quanto l'emissione del segnale di fluorescenza da parte del fluoroforo reporter si verifica solo a seguito del legame contemporaneo degli inneschi oligonucleotidici e della rispettiva sonda ad ibridazione con la sequenza genomica target.

Alla maggiore specificità di reazione si aggiunge anche una maggiore sensibilità del metodo, in quanto il sistema di rilevamento e di misurazione in tempo reale del DNA amplificato consente di individuare anche minime quantità di DNA, con un intervallo di quantificazione più ampio.

Oltre alla classificazione in sierogruppi, la sierotipizzazione molecolare consente di discriminare tra ceppi di *L. monocytogenes* ed isolati appartenenti ad altre specie del genere *Listeria* spp., mediante l'amplificazione del gene *prs*. Tale gene risulta assente in *L. rocourtiae*, specie identificata solo nel 2010 e comunque non patogena per l'uomo [27]. Inoltre, l'utilizzo di primers e rispettiva sonda per l'identificazione del gene *plcA* permette di avere un'ulteriore conferma dell'appartenenza degli isolati alla specie *L. monocytogenes*.

Tale aspetto si dimostra utile dal punto di vista tecnico, in quanto il segnale di amplificazione di *prs* nella Triplex-PCR 2 risulta poco efficiente nel caso di ceppi di sierogruppo I, II o sierotipo 4b atipici. Tale difficoltà risulta trascurabile grazie alla contemporanea amplificazione del gene *plcA*, che assolve, in tal caso, alla stessa funzione del gene *prs*. L'introduzione di tale target nel saggio si rileva utile anche per evitare un'errata identificazione di specie non-*monocytogenes* che, tuttavia, presentano sequenze geniche in comune con i geni target della sierotipizzazione.

Ad esempio, è stato osservato che sia *L. monocytogenes* sia *L. seeligeri* condividono i sierotipi 1/2a, 1/2b, 3b, 4a, 4b, 4c e 6b, per cui la sierotipizzazione potrebbe in alcuni casi non identificare correttamente la specie [14]; oppure, come verificato in questo studio, altre specie potrebbero condividere sequenze geniche altamente simili ai target molecolari selezionati, come il gene ORF2110 in *L. seeligeri*. Inoltre, in alcuni isolati di *L. monocytogenes* è stato dimostrata la presenza del gene specie-specifico *Lin0464* di *L. innocua*, suggerendo che il

trasferimento orizzontale di geni e la ricombinazione genetica sono eventi probabili all'interno delle specie di *Listeria* spp. [132].

Unica limitazione del metodo proposto rispetto a quello di riferimento consiste nella mancata amplificazione del gene *prs* in *L. grayi*; ceppi appartenenti a questa specie risultano, quindi, classificati come non appartenenti a *Listeria* spp. Tuttavia, tale specie non è patogena per l'uomo ed è isolata raramente da prodotti alimentari. Inoltre, alcuni studi hanno messo in evidenza un'elevata distanza genetica di *L. grayi* rispetto alle altre specie, suggerendo l'ipotesi dell'appartenenza ad un nuovo genere denominato *Murraya* [26].

In conclusione, il nuovo approccio di sierotipizzazione molecolare, basato sulla combinazione di due Triplex-PCR con utilizzo di sonde TaqMan, potrebbe essere utilizzato di routine nella sorveglianza epidemiologica del patogeno, in quanto consente l'univoca identificazione di *L.monocytogenes* e contemporaneamente l'assegnazione del sierogruppo di appartenenza, in un unico saggio in Real-time PCR. Il metodo si dimostra altamente specifico, riproducibile, sensibile, semplice e rapido, per cui può contribuire ad un'accurata identificazione dei sierotipi circolanti e all'implementazione delle misure per il controllo delle infezioni.

7.3 Espressione dei geni *mdrL*, *lde*, *orfA* e *sigB* ed esposizione al cloruro di benzalconio

L. monocytogenes è un microrganismo dotato di una straordinaria capacità di sopravvivere in condizioni sfavorevoli dell'ambiente esterno, di colonizzare differenti matrici alimentari e di superare alcune condizioni ostili che incontra nell'attraversamento del tratto gastrointestinale dell'ospite o durante la vita da patogeno intracellulare opportunista [1]. Evidenze sperimentali dimostrano che all'interno della specie esiste una notevole variabilità nella risposta a stress e tale capacità di adattamento costituisce sicuramente un prerequisito per la virulenza, in quanto gli isolati resistenti hanno un vantaggio competitivo superiore rispetto a quelli meno resistenti [162; 163]. Il 99% circa dei casi sporadici ed epidemici di listeriosi è associato al consumo di prodotti contaminati, infatti *L. monocytogenes* è frequentemente isolato negli ambienti di produzione e lavorazione degli alimenti [114]. La natura ubiquitaria del patogeno, la resistenza a stress ambientali e la capacità di produrre biofilm sono alla base della persistenza di ceppi di *L. monocytogenes* nell'industria alimentare. In tali ambienti, il frequente uso di disinfettanti ha aumentato le problematiche sull'ipotetico sviluppo e sull'emergenza di ceppi resistenti in molti batteri Gram-positivi e negativi, per i quali è stata riscontrata una ridotta sensibilità a diversi disinfettanti, tra cui i composti dell'ammonio quaternario (QACs).

Il cloruro di benzalconio è utilizzato per la disinfezione di attrezzature e superfici nell'industria alimentare e come antisettico in ambito sanitario. È stato ipotizzato che alcune modifiche nella composizione della membrana cellulare in fosfolipidi e acidi grassi siano responsabili di un aumento aspecifico di resistenza verso tale composto e diversi studi hanno dimostrato la presenza di geni codificanti pompe di efflusso o di plasmidi, anche se pochi dati sono disponibili a riguardo [122; 120; 123].

In questo studio, è stato valutato l'effetto di concentrazioni sub-letali di cloruro di benzalconio in ceppi di diversa origine e dai risultati ottenuti è emersa una maggiore resistenza negli isolati clinici rispetto a quelli isolati da alimenti. In quest'ultimi, il trattamento è risultato efficace nel 70% dei casi. Altri Autori hanno riportato una resistenza in ceppi isolati da alimenti e ambienti di produzione variabile dal 10% al 46% e studi condotti su ceppi con stessa origine hanno evidenziato una maggiore resistenza nei sierotipi 1/2a (o 3a) e 1/2b (o 3b) [120].

I ceppi analizzati hanno mostrato una risposta molto eterogenea, senza nessuna evidente associazione tra la maggiore o minore resistenza al disinfettante con il sierotipo di appartenenza.

In *L. monocytogenes* sono state individuate due diverse pompe di efflusso, quali MdrL (multi drug resistance in *Listeria*) e Lde (*Listeria* drug efflux), implicate nell'espulsione di sostanze tossiche dalla cellula batterica. I sistemi di efflusso costituiscono un importante meccanismo di

resistenza e potrebbero essere specifiche per un substrato e/o consentire il trasporto di composti diversi per struttura chimico-fisica [164].

Il trattamento con cloruro di benzalconio è risultato statisticamente associato all'espressione di *mdrL*, suggerendo il suo coinvolgimento nella resistenza al disinfettante, in accordo con studi precedenti, da cui è emerso che ceppi naturalmente sensibili al disinfettante esprimono bassi livelli di MdrL [123; 165]. Nessuna associazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra esposizione al disinfettante e aumento dell'espressione della pompa di efflusso Lde, confermando i risultati di altri Autori [123]. Tuttavia, in alcuni ceppi si è avuto un notevole incremento dell'espressione di *lde* e, considerando i soli ceppi di origine alimentare, la loro resistenza è risultata associata ad una sovra-espressione contemporanea di *mdrL* e *lde*. Ciò non è stato osservato negli isolati clinici, per i quali si può ipotizzare, oltre a MdrL, il coinvolgimento di ulteriori e/o differenti meccanismi.

La pompa di efflusso Lde è implicata nella resistenza di *L. monocytogenes* ai fluorochinoloni [166]. Altri studi hanno, inoltre, osservato che essa coopera con sistemi di trasporto della cellula eucariotica riducendo l'effetto della ciprofloxacina sul patogeno [167]. Anche MdrL è associato alla resistenza a macrolidi e cefotaxima e recenti studi hanno osservato che ceppi selezionati resistenti sia a ciprofloxacina che al cloruro di benzalconio danno vita a discendenti più resistenti non solo verso tali composti, ma anche ad altre sostanze, tra cui gentamicina, bromuro di etidio e cloruro di tetrafenilfosfonio, farmaco chemioterapico [123; 168; 169]. Sebbene tale microrganismo sia generalmente sensibile agli antibiotici, le segnalazioni di ceppi resistenti, anche clinici, sono in aumento, rispecchiando l'incremento globale del fenomeno osservato in diverse specie batteriche [125]. Quindi, la pressione selettiva dovuta all'esposizione a concentrazioni sub-letali di disinfettanti potrebbe favorire lo sviluppo di ceppi antibiotico-resistenti attraverso un meccanismo di resistenza crociata, in cui i sistemi di efflusso, in particolare MdrL, potrebbero giocare un ruolo determinante [123].

In questo studio sono stati valutati anche i profili di espressione del gene *orfA*. Diversi open reading frames (ORF-X, -Y, -Z, -A e -B) sono stati individuati all'interno o in prossimità della regione cromosomica che codifica per la maggior parte dei geni di virulenza in *L. monocytogenes*, ma le funzioni dei prodotti per cui codificano non sono note [170]. Il gene *orfA* è considerato un ipotetico repressore trascrizionale di *mdrL*, in quanto è stato osservato che in un ceppo mutante con attività emolitica in presenza di cellobiosio, la mancata espressione di *orfA* ha determinato la sovra-espressione di *mdrL* [168]. I livelli di espressione di *orfA* e *mdrL* sono risultati statisticamente correlati, con un coefficiente di Pearson pari al 55%. Tuttavia, solo in un numero ridotto di ceppi, soprattutto umani, una sovra-espressione di uno dei due geni è stata accompagnata da sotto-espressione dell'altro, mentre sono emersi

risultati opposti nella maggior parte degli isolati analizzati. Inoltre, al contrario del sistema di efflusso MdrL, l'espressione di *orfA* non è risultata associata al trattamento con disinfettante. Restringendo l'analisi agli isolati da alimenti, per i quali l'esposizione al disinfettante ha significativamente influenzato l'espressione di entrambi i geni, in due dei tre ceppi resistenti è stato osservato un aumento dell'espressione sia di *mdrL* che di *orfA*, non confermando l'ipotesi dell'attività di repressore di quest'ultimo. Sebbene in *L. monocytogenes* sia stata dimostrata la presenza di elementi genetici per il controllo e l'espressione delle pompe di efflusso, poco è noto riguardo la regolazione di questi ipotetici meccanismi, sia a livello di espressione genica, sia a livello di attività. Tuttavia, è bene sottolineare che lo sviluppo della resistenza ai QACs potrebbe essere direttamente correlata all'efficienza di tali sistemi di efflusso, anche se attualmente pochi dati sono disponibili a riguardo.

La risposta a molteplici fattori di stress in batteri Gram-positivi, tra cui *Listeria* spp., è stata collegata al fattore sigma alternativo σ^B codificato dal gene *sigB*. In particolare, σ^B regola oltre 150 geni in *L. monocytogenes*, tra cui anche geni implicati nella virulenza e all'attraversamento del tratto gastrointestinale dell'ospite [171]. Alcuni Autori hanno riportato che l'esposizione a concentrazioni sub-letali di disinfettante è in grado di indurre stress cellulare, misurabile con una diminuzione del pH intracellulare e con una sovra-regolazione del gene in presenza di QACs [172]. È stato anche ipotizzato che la sovra-espressione di *sigB*, insieme ad altri meccanismi di riparazione del DNA, riducono la sensibilità al disinfettante in biofilm batterici di *L. monocytogenes* [173].

I dati relativi all'espressione di *sigB* hanno dimostrato un'associazione significativa con l'esposizione al cloruro di benzalconio e i livelli di espressione più elevati sono stati osservati nei ceppi di origine alimentare, plausibilmente dotati di una maggiore capacità di adattamento a condizioni ambientali avverse rispetto ai ceppi umani. In particolare, gli incrementi più significativi sono stati riscontrati negli stessi ceppi in cui sono stati osservati i maggiori livelli di espressione dei sistemi di efflusso MdrL e Lde. Tale osservazione suggerisce che l'attivazione di σ^B in seguito al trattamento può portare ad un'aumentata espressione di tali meccanismi di resistenza, ipotesi avvalorata dal fatto che sono stati individuati siti di legame per *sigB* nel gene *mdrL* [174]. L'associazione tra espressione di *sigB* e *mdrL*, così come tra *sigB* e *orfA* è risultata statisticamente significativa ($p < 0,01$), confermando l'importante ruolo di tale fattore sigma alternativo nel coordinare la trascrizione genica in situazioni ambientali avverse. L'attivazione del fattore di risposta a stress può determinare un conseguente aumento di altri fattori di resistenza regolati da *sigB*, tra cui quelli implicati nella sopravvivenza a basse temperature, a pH acido e basico, a stress osmotico, tolleranza ai sali biliari e anche agli antibiotici [69; 174]. Diversi studi hanno dimostrato fenomeni di protezione crociata dovuti

all'esposizione a differenti fattori di stress [175]. Ad esempio, durante l'attraversamento del tratto gastrointestinale, il primo fattore di stress che il patogeno incontra è il pH acido dello stomaco, seguito da condizioni di elevata osmolarità e dalla presenza di sali biliari nel piccolo intestino. La resistenza ai sali biliari è attribuibile ad una precedente esposizione a stress osmotico, che determina una sovra-espressione di *sigB* [5]. È stato anche evidenziato che σ^B è coinvolto indirettamente nell'antibiotico-resistenza, in quanto contribuisce al mantenimento dell'integrità della parete cellulare a seguito dell'esposizione a vancomicina e ceppi mutanti che non esprimono *sigB* risultano più sensibili a penicillina G e ampicillina, antibiotici utilizzati per il trattamento della listeriosi [129; 176]. L'esposizione a concentrazioni sub-letali di disinfettante può aumentare il potenziale di virulenza delle cellule sopravvissute e la capacità infettiva in caso di contatto con l'ospite [177]. Tale aspetto, insieme al maggiore tasso di ricombinazione genetica, potrebbe spiegare l'aumento osservato di recente nell'incidenza dei casi di listeriosi umana associati a ceppi di sierotipo 1/2a, i quali insieme agli altri isolati della stessa lineage erano maggiormente isolati da alimenti e ambiente [13; 51]. Alla luce dei dati ottenuti, si può affermare che il trattamento con cloruro di benzalconio ha influenzato l'espressione dei geni target, con una notevole variabilità dei profili di espressione, soprattutto per i ceppi di origine umana, mentre una maggiore relazione causa-effetto (sopravvivenza al trattamento-livelli di trascrizione) è stata osservata negli isolati da alimenti.

La variabilità riscontrata tra i ceppi di *L. monocytogenes* analizzati è stata confermata anche dall'analisi delle curve di melting. Infatti, è emersa una differenza significativa tra gli isolati appartenenti alla lineage I (sierotipi 1/2b e 4b) rispetto a quelli della lineage II (sierotipi 1/2a, 3a e 1/2c) nelle temperature di dissociazione; in particolare, la differenza media tra i due gruppi è stata di circa 1,5°C per *mdrL* e di circa 3,3°C per *lde*. Tali differenze fanno ipotizzare la presenza di mutazioni nelle sequenze geniche di riferimento, naturalmente da confermare mediante sequenziamento. Esse non sono risultate implicate nella resistenza dei ceppi al cloruro di benzalconio o ai diversi livelli di espressione genica osservati. Tuttavia, potrebbero contribuire alla comprensione delle differenze esistenti all'interno della specie o essere di supporto in metodi per la rapida identificazione delle linee genetiche mediante analisi di SNP di sequenza.

Le concentrazioni sub-letali di cloruro di benzalconio sono state responsabili dell'attivazione di sistemi di detossificazione/efflusso delle cellule batteriche e del fattore di risposta a stress σ^B per la maggior parte dei ceppi analizzati. L'applicazione di corrette procedure igieniche si dimostra, quindi, fondamentale per il controllo delle infezioni. Infatti, *L. monocytogenes* risulta sensibile alle formulazioni disinfettanti comunemente utilizzate in ambito industriale e ospedaliero. Tuttavia, diversi fattori possono ridurre l'effetto del disinfettante, tra cui l'utilizzo

di dosaggi inferiori a quelli raccomandati, la non completa eliminazione di sostanza organica o l'inadeguato risciacquo dopo le procedure di sanitizzazione [71]. Attrezzature e impianti adeguatamente progettati e ben mantenuti possono prevenire o minimizzare il rischio, in quanto la fonte di contaminazione principale è rappresentata da parti cave, giunzioni, guarnizioni, fessure nella pavimentazione o nastri trasportatori, zone corrose, ecc. in cui il patogeno è protetto dall'azione meccanica delle pulizie, anche per l'accumulo di sostanza organica, e il disinfettante è presente in concentrazioni sub-letali.

L'efficacia della sanitizzazione si riduce notevolmente in presenza di biofilm batterico, che proteggono fisicamente le cellule batteriche, aumentando la possibilità che sopravvivano e acquisiscano resistenza a concentrazioni di disinfettante che prima erano letali o fenomeni di resistenza crociata. I biofilm rendono estremamente difficile l'eradicazione del patogeno dagli ambienti di produzione degli alimenti e sono responsabili della cross-contaminazione degli stessi e dell'insorgenza di fenomeni di persistenza del microrganismo. Sono stati riportati casi di sopravvivenza di ceppi batterici negli stessi ambienti produttivi per 10 anni e ceppi persistenti e sono stati associati a casi epidemici di listeriosi [71; 155]. Alcuni Autori hanno evidenziato la capacità di *L. monocytogenes* di formare biofilm anche su dispositivi medici (shunt ventricolo peritoneale) rendendo talora necessaria la sostituzione dello stesso per risolvere l'infezione [178]. Garantire la sicurezza igienico-sanitaria degli alimenti è fondamentale, in quanto il 99% dei casi epidemici e sporadici di listeriosi è dovuta al consumo di alimenti contaminati. Comprendere la risposta del patogeno a diversi fattori di stress, tra cui l'esposizione a concentrazioni sub-letali di disinfettante, è di grande rilevanza per la stima del rischio associato a *L. monocytogenes*.

7.4 Profili di espressione dei geni di virulenza *inlA*, *inlB*, *hly*, *prfA* e *bsh*

In questo studio, sono stati valutati i livelli di espressione dei geni codificanti per i principali fattori di virulenza implicati nel ciclo di infezione intracellulare di *L. monocytogenes*, i quali sono presenti nella regione cromosomica denominata isola di patogenicità LIPI-1. Essa include i geni codificanti la Listeriolisina LLO, la proteina ActA, le fosfolipasi PlcA e PlcB, la metalloproteasi Mpl e il regolatore trascrizionale PrfA. La coordinata espressione dei fattori di virulenza è sotto il controllo positivo del PrfA, il quale controlla altri loci cromosomici, tra cui l'operone InlAB. L'entrata del patogeno nella cellula ospite è mediata dalle internaline A e B, proteine di superficie che interagiscono con specifici recettori presenti sulla cellula ospite, innescando la fagocitosi con formazione di un vacuolo fagocitico primario. Dopo l'internalizzazione, la sopravvivenza del patogeno è favorita da altri fattori di virulenza. In particolare, la fuga dal vacuolo fagocitico è mediata dall'azione combinata della tossina LLO e di PlcA e PlcB. La replicazione nel citoplasma della cellula ospite è favorita da Hpt (sugar phosphate permease), che permette di sfruttare gli esoso-fosfati come fonte di carbonio. La successiva diffusione alle cellule adiacenti è dovuta all'ActA che induce la polimerizzazione dell'actina, per cui il patogeno si ricopre di pseudopodi, con cui si muove nel citoplasma fino a raggiungere la cellula adiacente per invaderla. Tale processo è coadiuvato dalla secrezione dell'internalina C, che rilassa le tensioni alle giunzioni cellula-cellula. La fagocitosi degli pseudopodi da parte delle cellule adiacenti provoca la formazione di un vacuolo a doppia membrana, da cui il patogeno sfugge nuovamente grazie all'azione di LLO e della fosfolipasi (*plcB*), iniziando un nuovo ciclo di proliferazione [41; 66; 74]. Oltre ai geni implicati nell'invasione della cellula ospite e nel ciclo di replicazione intracellulare di *L. monocytogenes*, l'idrolasi dei sali biliari BSH è fondamentale per l'instaurarsi dell'infezione, rendendo possibile il superamento del tratto gastrointestinale umano [115; 116].

Nel presente lavoro sono stati valutati i livelli di espressione dei geni *inlA*, *inlB*, *hly*, *prfA* e *bsh* in 20 ceppi di *L. monocytogenes* in fase di crescita esponenziale isolati da alimenti e da casi umani. Dall'analisi dei dati, è emersa una notevole eterogeneità nell'espressione dei fattori di virulenza, in accordo con altri studi, in cui è stata anche osservata un'estrema variabilità nelle capacità di invasione e adesione di differenti ceppi di *L. monocytogenes* in linee cellulari umane [42; 147]. I ceppi clinici hanno mostrato livelli di espressione generalmente superiori per quasi tutti i geni e per alcuni isolati sono emersi valori elevati per tutti i determinanti di virulenza. Negli isolati da alimenti, i livelli di trascrizione sono stati elevati per alcuni geni, soprattutto per *hly*, tuttavia, l'espressione contemporanea di tutti i fattori di virulenza è risultata meno frequente. Nei ceppi analizzati, il gene maggiormente espresso è stato *hly*, responsabile

della risposta emolitica in *L. monocytogenes* e presente in tutti i ceppi, tanto da essere utilizzato come target molecolare per l'identificazione univoca della specie in diverse matrici alimentari o in campioni biologici [149]. La listeriolisina O rappresenta un importante fattore di virulenza di *L. monocytogenes*, e mutanti che non esprimono *hly* perdono l'attività emolitica, non riescono a sfuggire dal vacuolo fagocitario e risultano avirulenti. I ceppi umani hanno mostrato livelli di trascrizione generalmente superiori rispetto agli isolati da alimenti. Tuttavia, in questi ultimi, i livelli di espressione di *hly* sono stati maggiori rispetto agli altri geni target e in alcuni casi con valori molto elevati. In altri studi, è stata riportata una notevole variabilità nell'espressione di *hly*, anche tra ceppi geneticamente correlati, così come una differenza poco chiara tra isolati di diversa origine [179].

I livelli di trascrizione di *prfA*, codificante per il principale fattore di regolazione dei determinanti di patogenicità in *L. monocytogenes*, sono stati più elevati negli isolati umani, indicando un maggior grado di virulenza rispetto agli isolati da alimenti. Dati di letteratura riportano che ceppi mutanti con delezioni del gene sono completamente avirulenti per l'inefficiente espressione dei fattori di virulenza da esso regolati [74]. I livelli di espressione osservati sono stati molto bassi indipendentemente dall'origine degli isolati, dovuti presumibilmente alle condizioni sperimentali utilizzate (semina in Brain Heart Infusion, BHI; estrazione di RNA a temperatura ambiente). È noto, infatti, che l'espressione di *prfA* è inferiore in mezzi di coltura ricchi di nutrienti, come BHI o in condizioni di crescita a temperature inferiori a 30°C [180]. La trascrizione di *prfA* segna il passaggio da uno stile di vita extracellulare come saprofita a patogeno opportunisto nell'ambiente intracellulare. Infatti, viene attivato durante l'infezione dell'ospite, per evitare l'espressione di fattori di virulenza quando non è necessaria [74; 111]. Sono stati individuati tre diversi promotori di *prfA*: P1*prfA*, che a temperature al di sotto dei 30°C assume una forma non funzionale mentre a temperature superiori si denatura permettendo l'espressione di *PrfA*; P2*prfA*, sotto il controllo di σ^A e σ^B , che è implicato nel controllo negativo dell'espressione di *prfA* e attivato da stress ambientali; P*plcA*, che innesca la sintesi bicistronica di *plcA-prfA*, attivando il PrfA dopo l'entrata nell'ospite. I promotori P1*prfA* e P2*prfA* garantiscono solo la presenza di una minima quantità di trascritti di *prfA* monocistronico nel citoplasma della cellula batterica, sufficiente a stimolare la sintesi dei geni *hly* e *plcA*, ma non di *actA* [74]. Quindi, l'espressione di *prfA* è finemente regolata ed è richiesta in misura maggiore nell'ambiente intracellulare rispetto all'ambiente esterno, spiegando almeno in parte i bassi livelli di espressione osservati nelle condizioni sperimentali adottate [20]. Nessuna correlazione significativa è stata osservata tra espressione del gene *hly* e *prfA*. Tuttavia, l'espressione di *hly* dipende sia da *prfA* (per la presenza di una *prfA*-box a monte del sito di inizio della sua trascrizione) sia da un promotore indipendente da

esso. Quest'ultimo è sufficiente a fornire livelli di LLO necessari per la sopravvivenza extracellulare e per le interazioni con gli altri membri degli ecosistemi naturali [181].

Il gene *inlA* è stato il più espresso dopo *hly* e i ceppi a cui sono stati associati livelli maggiori hanno presentato contemporaneamente anche i valori più alti di *inlB*, in accordo con altri studi [147]. In particolare, l'espressione di *inlA* è risultata superiore negli isolati da alimenti, al contrario di *inlB*, maggiormente espresso nei ceppi umani. Nei ceppi LMO159 (1/2a), LMO41 (4b) e, in misura minore LMO133 (4b) e LMO153 (1/2a), sono stati osservati i massimi livelli di espressione per le due internaline, contemporaneamente a valori elevati per tutti i fattori di virulenza in studio, facendo ipotizzare un maggiore potenziale patogenetico di tali isolati umani.

Nessuna relazione è stata osservata tra livello di espressione di *inlA* e forma funzionale o troncata della proteina. Infatti, i differenti profili RFLP di *inlA* sono stati associati a livelli di espressione molto variabili sia tra i ceppi umani che tra gli isolati da alimenti. L'elevata frequenza di forme intere della proteina nei ceppi umani suggerisce l'importante ruolo di InlA nell'infezione, tuttavia, anche ceppi con forme troncate sono stati associati a casi di listeriosi umana, soprattutto in soggetti immunocompromessi [147]. Roche et al. (2009) hanno osservato che ceppi senza peculiari caratteristiche/proprietà di virulenza risultano comunque virulenti [49]. È stato riportato che ceppi con mutazioni nel gene *mpl*, che non esprimono InlA e con forme inattive di *inlB*, *plcA* e *plcB*, sono in grado di infettare il 100% di topi inoculati [49]. Infatti, nonostante la presenza di forme non funzionali di InlA, InlB e Plc, gli isolati riescono a invadere la cellula ospite e a lisare il vacuolo fagocitico, per l'attivazione di altri presunti meccanismi (es. maggior tasso di moltiplicazione cellulare, maggiore produzione di emolisina o fattori di virulenza sconosciuti) che compensano l'inefficienza di tali fattori di virulenza. Tali osservazioni sottolineano la complessità dei meccanismi evolutivi nella virulenza di *L. monocytogenes*, presumibilmente indotti dalla pressione selettiva a seguito dell'interazione con l'ospite e l'ambiente esterno. La trascrizione di *inlA* può avvenire da quattro promotori, uno dei quali è sotto il controllo di PrfA, responsabile anche dell'espressione di *inlB*. Tali geni sono organizzati in un operone e possono essere trascritti sia singolarmente (mediante meccanismo *prfA*-indipendente), sia contemporaneamente (*prfA*-dipendente), interagendo con specifici recettori della cellula ospite nel processo di invasione. In particolare, InlA interagisce con E-caderina, promuovendo l'invasione nelle cellule epiteliali, fondamentale per il superamento della barriera intestinale, ma anche nelle cellule del sistema nervoso centrale, citotrofoblasti e zone specifiche della membrana dei sinciotrofoblasti dell'embrione [75; 102]. InlB interagisce con tre recettori, quali Met, gC1q-R e glicosaminoglicani, mediando l'internalizzazione in diversi tipi cellulari, come epatociti, cellule epiteliali ed endoteliali,

fibroblasti ed è fondamentale per lo sviluppo dell'infezione in forma sistemica, mentre ha un ruolo marginale nelle prime fasi dell'infezione a livello intestinale [89; 96; 100].

Dallo studio è emersa una correlazione significativa tra l'espressione di *inlA* e *inlB*, in accordo con i dati di letteratura; infatti, la sola InlA è insufficiente a determinare l'invasione fetoplacentale probabilmente a causa di recettori non funzionali a livello dei sinziotrofoblasti, in accordo con altri studi che hanno dimostrato che sia InlA che InlB sono necessarie per l'attraversamento della barriera fetoplacentale [101]. Allo stesso modo, InlB è importante per l'internalizzazione in colture di cellule endoteliali di capillari cerebrali [96]. Inoltre, è stato ipotizzato che InlB agisca sinergicamente con InlA durante l'invasione della mucosa intestinale. Infatti, sebbene la sola InlA sia in grado di mediare l'invasione di *L. monocytogenes* in tale sito, InlB, interagendo con Met durante il processo di estrusione delle cellule senescenti, accelera l'endocitosi a livello locale e quindi contribuisce all'invasione della mucosa intestinale [182; 183].

Per l'instaurarsi dell'infezione, è fondamentale l'attività dell'idrolasi dei sali biliari BSH, che permette il superamento del tratto gastrointestinale. Alcuni Autori, infatti, associano l'incapacità di ceppi appartenenti alla linea genetica III di sopravvivere nell'ambiente gastrointestinale al raro isolamento di questi ceppi da casi di listeriosi umana [1]. Tale gene è risultato maggiormente espresso (circa il doppio) nei ceppi umani rispetto agli isolati da alimenti, aspetto che potrebbe contribuire significativamente alla minore virulenza di questi ultimi. L'espressione di *bsh* è risultata statisticamente correlata con quella di *prfA*, in accordo con altre evidenze sperimentali. In particolare, nel ceppo di riferimento *L. monocytogenes* EGD-e è emerso che l'idrolasi BSH è regolata dal PrfA e che nel promotore di *bsh* è presente un sito di legame per tale fattore di regolazione [113; 115]. Di conseguenza, i bassi livelli di espressione di *bsh*, riscontrati nello studio, potrebbero derivare dalla ridotta espressione di *prfA*. È stato osservato che, nonostante il promotore di *bsh* presenti sia una probabile PrfA-box sia un sito di legame per il fattore sigma B, a concentrazioni molto elevate di bile, σ^B svolge un ruolo determinante, probabilmente per meccanismi di cross-protezione a seguito dell'esposizione successiva a molteplici fattori di stress [128]. Infatti, dopo l'ingestione di alimenti contaminati, il primo fattore di stress che il patogeno incontra è il pH acido dello stomaco e successivamente l'elevata osmolarità e l'attività della bile nel piccolo intestino. L'abilità di tollerare concentrazioni letali di bile è attribuibile anche a una precedente esposizione a stress osmotico. Tale fattore, che determina una sovra-espressione di *sigB*, sembra sia al vertice della gerarchia delle risposte a stress dopo l'entrata nell'ospite e potrebbe costituire il segnale attraverso il quale il patogeno percepisce l'entrata nel tratto gastrointestinale e attiva i meccanismi necessari per le fasi successive dell'infezione [5]. Infatti,

è plausibile ipotizzare che i geni regolati dal fattore sigma B, coinvolti nella resistenza a stress che il patogeno incontra nell'attraversamento del tratto gastrointestinale, insieme a quelli responsabili della successiva invasione della cellula ospite, siano co-regolati per dirigere e controllare le diverse fasi dell'infezione.

Dall'analisi delle temperature di melting dei geni *prfA*, *inlA* e *bsh*, è emersa una differenza significativa tra gli isolati appartenenti alla lineage I (sierotipi 1/2b, 4b) rispetto a quelli della lineage II (sierotipi 1/2a, 3a, 1/2c). In particolare, la differenza media tra i due gruppi è stata di circa 0,5°C per il gene codificante l'idrolasi BSH e rispettivamente di 0,9°C e 1°C per quelli codificanti InlA e PrfA. Tali differenze sono associate in maniera specifica ai diversi sierotipi e fanno ipotizzare la presenza di mutazioni puntiformi nelle sequenze geniche, da confermare mediante sequenziamento.

In conclusione, i risultati ottenuti dall'analisi dei profili di espressione genica confermano la complessità dei meccanismi di virulenza e del processo di infezione di *L. monocytogenes*, in cui la fine regolazione nella trascrizione dei geni, la dose infettante e i fattori legati all'ambiente intracellulare e allo stato immunitario dell'ospite giocano un ruolo decisivo nella virulenza degli isolati. Sono, inoltre, fondamentali i meccanismi di adattamento all'ambiente extracellulare, in quanto prerequisiti per la virulenza dei ceppi. Importanti studi hanno evidenziato che la trascrizione indotta da σ^B è decisiva per l'adattamento ai parametri chimico-fisici che caratterizzano gli alimenti o legati alle tecniche di produzione/conservazione e per regolare l'espressione di geni implicati nell'adattamento all'ambiente gastrointestinale a seguito dell'entrata nell'ospite; invece, PrfA sembra venga attivato solo nell'ambiente intracellulare, segnando il passaggio da microrganismo saprofito a patogeno opportunisto [74; 127]. Tuttavia, esiste una stretta relazione tra σ^B e PrfA, per cui i fattori di stress ambientale influenzano in maniera significativa l'espressione dei geni di virulenza. Di conseguenza l'attivazione di *sigB* indotta dall'esposizione a concentrazioni sub-letali di cloruro di benzalconio, oltre ad attivare meccanismi di resistenza, tra cui i sistemi di efflusso, potrebbe influenzare anche l'attività di PrfA e, di conseguenza, aumentare il potenziale di virulenza delle cellule sopravvissute al trattamento disinfettante e la loro capacità infettiva in caso di contatto con l'ospite. La discriminazione di ceppi virulenti da quelli non virulenti è essenziale ai fini della valutazione del rischio e per stabilire le implicazioni della presenza del patogeno ai fini della sicurezza alimentare e in ambito sanitario. L'analisi di altri determinanti di virulenza e di un maggior numero di isolati potrà contribuire a definire in maniera più chiara le differenze esistenti tra i ceppi e di stabilire l'eventuale correlazione tra espressione genica e fonte di isolamento.

Riferimenti bibliografici

1. Deng X, Phillippy AM, Li Z, Salzberg SL, Zhang W. Probing the pan-genome of *Listeria monocytogenes*: new insights into intraspecific niche expansion and genomic diversification. *BMC Genomics*, 2010. 11:500
2. Renier S, Hébraud M, Desvaux M. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environ. Microbiol.*, 2011. 13(4):835–850
3. Belessi CE, Gounadaki AS, Schwartzman S, Jordan K, Skandamis PN. Evaluation of growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* growing on stainless steel surfaces, detached from biofilms or in suspension, in response to pH and NaCl. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011. 145:53-60
4. Nightingale K. *Listeria monocytogenes*: Knowledge Gained Through DNA Sequence-Based Subtyping, Implications, and Future Considerations. *J. AOAC International*, 2010. Vol. 93 NO 4
5. Sleator RD, Watson D, Hill C, Gahan CG. The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract. *Microbiol.*, 2009. 155:2463-75
6. Jiang Z, Neetoo H, Chen H. Control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using chitosan-based antimicrobial coatings and films. *J Food Sci.*, 2011. 76(1):22-6
7. Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJ. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods*. 2007; 71(2):133-40
8. Olino K, Wada S, Edil BH, Pan X, Meckel K, Weber W, Slansky J, Tamada K, Lauer P, Brockstedt D, Pardoll D, Schulick R, Yoshimura K. Tumor-Associated Antigen Expressing *Listeria monocytogenes* Induces Effective Primary and Memory T-Cell Responses Against Hepatic Colorectal Cancer Metastases. *Ann Surg Oncol*. 2011. [Epub ahead of print]
9. Wood LM, Pan ZK, Shahabi V, Paterson Y. *Listeria*-derived ActA is an effective adjuvant for primary and metastatic tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2010. 59(7):1049-58
10. Cossart P. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect*. 2007; 9(10):1143-6
11. Dowd GC, Joyce SA, Hill C, Gahan CG. Investigation of the mechanisms by which *Listeria monocytogenes* grows in porcine gallbladder bile. *Infect Immun*. 2011. 79(1):369-79
12. Gilmour MW, Graham M, Van Domselaar G, Tyler S, Kent H, Trout-Yakel KM, Larios O, Allen V, Lee B, Nadon C. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics.*, 2010.18;11:120
13. Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol.*, 2011.301(2): 79-96.
14. Snehal Jadhav, Mrinal Bhavne, Enzo A. Palombo Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 2012. 88(3):327-41
15. Cross LJ, Russell JE, Desai M. Examining the genetic variation of reference microbial cultures used within food and environmental laboratories using fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis. *FEMS Microbiol Lett.*, 2011. 321(2):100-6
16. Delibato E, Gattuso A, Minucci A, Auricchio B, De Medici D, Toti L, Castagnola M, Capoluongo E, Gianfranceschi MV. PCR experion automated electrophoresis system to detect *Listeria monocytogenes* in foods. *J Sep Sci.*, 2009. 32(21):3817-21
17. Sammarco ML, Vitullo M, Tamburro M, Pontello M, Ripabelli G. Amplified fragment length polymorphism analysis of *Listeria monocytogenes* by Experion™ automated microfluidic electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 2011. 87:119–124
18. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.*, 2009. 55(4):611-22
19. Aké FM, Joyet P, Deutscher J, Milohanic E. Mutational analysis of glucose transport regulation and glucose-mediated virulence gene repression in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.*, 2011. 81(1):274-93
20. Bruno JC Jr and Freitag NE. Constitutive activation of PrfA tilts the balance of *Listeria monocytogenes* fitness towards life within the host versus environmental survival. *PLoS One*, 2010. 5(12):e15138
21. van Schaik W and Abee T. The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria - targets for food preservation and safety. *Curr Opin Biotechnol.*, 2005. 16(2):218-24
22. Lamont RF, Sobel J, Mazaki-Tovi S, Kusanovic JP, Vaisbuch E, Kim SK, Ulbjerg N, Romero R. J Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *Perinat Med*. 2011 May; 39(3):227
23. Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol*, 1926. 29:407–439
24. di Jay J, Loessner Martin J, Golden David A. *Microbiologia degli alimenti*. Ed. italiana Andrea Pulvirulenti. Springer New York, 2009
25. Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SR, den Bakker HC, Wiedmann M, Swaminathan B, Saunders BD. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 2010. 60:1280-8
26. den Bakker HC, Cummings CA, Ferreira V, Vatta P, Orsi RH, Degoricija L, Barker M, Petrauskene O, Furtado M.R., Wiedmann M. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics*, 2010. 2:11-68
27. Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PA, Le Flèche-Matéos A, Roche SM, Buchrieser C, Cadet-Daniel V, Le Monnier A, Lecuit M, Allerberger F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 2010. 60:2210-4
28. Seeliger HPR, Rocourt J, Schrettenbrunner A, Grimont PAD, Jones D. "*Listeria ivanovii* sp. nov." *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1984. 34:336-337
29. Rocourt J, Boerlin P, Grimont F, Jacquet C, Piffaretti JC. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1992. 42: 171
30. Gouin E, Mengaud J, Cossart P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a non pathogenic species. *Infect. Immun.*, 1994. 62: 3550–3553
31. Hain T, Chatterjee SS, Ghai R, Kuenne CT, Billion A, Steinweg C, Domann E, Käst U, Jänsch L, Wehland J, Eisenreich W, Bacher A, Joseph B, Schär J, Krefit J, Klumpp J, Loessner J, Dorsch J, Neuhaus K, Fuchs TM, Scherer S, Doumith M, Jacquet C, Martin P, Cossart P, Rusniok C, Glaser P, Buchrieser C, Goebel W, Chakraborty T. Pathogenomics of *Listeria* spp. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2007. 297:541-57
32. Nightingale K, Lyles K, Ayodele M, Jalan P, Nielsen R, Wiedmann M. Novel method to identify source-associated phylogenetic clustering shows that *Listeria monocytogenes* includes niche-adapted clonal groups with distinct ecological preferences. *J Clin Microbiol*, 2006. 44, 3742–3751
33. Gardan R, Cossart P, Labadie J. Identification of *Listeria monocytogenes* genes involved in salt and alkaline-pH tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003. 69:3137-43
34. Liu D. *Handbook of Listeria monocytogenes*. CRS press Taylor and Francis group London, 2008
35. Schmid B, Klumpp J, Raimann E, Loessner MJ, Stephan R, Tasara T. Role of Cold Shock Proteins in Growth of *Listeria monocytogenes* under Cold and Osmotic Stress Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009. 75: 1621–1627

36. Vogel BF, Hansen LT, Mordhorst H, Gram L. The survival of *Listeria monocytogenes* during long term desiccation is facilitated by sodium chloride and organic material. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010. 140:192-200
37. Caly D, Takilt D, Leuret V, Tresse O. Sodium chloride affects *Listeria monocytogenes* adhesion to polystyrene and stainless steel by regulating flagella expression. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2009. 49:751-6
38. Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechaï F, Mamzer-Bruneel MF, Bielecka MK, Scortti M, Disson O, Berche P, Vazquez-Boland J, Lortholary O, Lecuit M. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010.16(1):136-8
39. Rocourt J, Hof H, Schrettenbrunner A, Malinverni R, Bille J. Acute purulent *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 1986. 116:248-251
40. Kumar R. Modern Trends to Investigate Food Borne Listeriosis. *J Food Technol*, 2011. 9(1):9-17
41. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin. Microbiol.*, 2001. 14:584-640
42. Olier M, Garmyn D, Rousseaux S, Lemar`tre JP, Piveteau P, Guzzo J. Truncated Internalin A and asymptomatic *Listeria monocytogenes* Carriage: In Vivo Investigation of Allelic Exchange. *Infection And Immunity*, 2005. 73: 644-648
43. Kocks C, Gouin E, Tabouret M, Berche P, Ohayon H, Cossart P. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell.*, 1992.68(3):521-31
44. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. EFSA J, 2011. 9:2090-2468
45. Amaya-Villar R, García-Cabrera E, Sulleiro-Igual E, Fernández-Viladrich P, Fontanals-Aymerich D, Catalán-Alonso P, Rodrigo-Gonzalo de Liria C, Coloma-Conde A, Grill-Díaz F, Guerrero-Espejo A, Pachón J, Prats-Pastor G. Three-year multicenter surveillance of community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. *BMC Infect Dis.*, 2010. 10:324
46. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses. Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. EFSA Journal 2012.10(3):2597 nuovo!
47. ECDC. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010. Stockholm: ECDC, 2010.
48. Gillespie IA, Mook P, Little CL, Grant KA, McLaughlin J. Human listeriosis in England, 2001-2007: association with neighbourhood deprivation. *Euro Surveill.*, 2010. 15(27):7-16
49. Roche SM, Grépinet O, Corde Y, Teixeira AP, Kerouanton A, Témoin S, Mereghetti L, Brisabois A, Velge PA. *Listeria monocytogenes* strain is still virulent despite nonfunctional major virulence genes. *J Infect Dis.*, 2009. 200(12):1944-8
50. O'Connor L, O'Leary M, Leonard N, Godinho M, O'Reilly C, Egan J, O'Mahony R. The characterization of *Listeria* spp. isolated from food products and the food-processing environment. *Lett Appl Microbiol*, 2010. 51:490-498
51. Parihar VS, Lopez-Valladares G, Danielsson-Tham ML, Peiris I, Helmersson S, Unemo M, Andersson B, Arneborn M, Bannerman E, Barbuddhe S, Bille J, Hajdu L, Jacquet C, Johansson C, Löfdahl M, Möllerberg G, Ringberg H, Rocourt J, Tjernberg I, Ursing J, Henriques-Normark B, Tham W. Characterization of human invasive isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden 1986-2007. *Foodborne Pathog Dis.*, 2008.5(6):755-61
52. Harvey J, Keenan KP, Gilmour A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiol.*, 2007. 24(4):380-92
53. Pan Y, Breidt F Jr, Kathariou S. Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Appl Environ Microbiol.*, 2009. 75(18):5846-52
54. Chen JS, Jiang LL, Fang WH. Virulence determinants and its evolution of the genus *Listeria*. *Wei Sheng Wu Xue Bao.*, 2007. 47(4):738-42
55. Ragon M, Wirth T, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A, Brisse S. A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution. *PLoS Pathogens*, 2008. 4(9):e1000146
56. Témoin S, Roche SM, Grépinet O, Fardini Y, Velge P. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. *Microbiology.*, 2008;154:939-48
57. Almualla NA, Laleye LC, Abushelaibi AA, Al-Qassem RA, Wasesa AA, Baboucarr J. Aspects of the microbiological quality and safety of ready-to-eat foods in Sharjah supermarkets in the United Arab Emirates. *J Food Prot.*, 2010. 73(7):1328-31
58. Gormley FJ, Little CL, Grant KA, de Pinna E, McLaughlin J. The microbiological safety of ready-to-eat specialty meats from markets and specialty food shops: a UK wide study with a focus on *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 2010.27(2):243-9.
59. (Centers for Disease Control and Prevention). Vital signs: incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food-foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 1996-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*, 2011. 60(22):749-55
60. Gottlieb SL, Newborn EC, Griffin PM, et al. Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. *Clin Infect Dis*, 2006; 42:29-36
61. Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L, Salmasso S. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med.*, 2000. 27. 342(17):1236-41
62. Koch J, Dworak R, Prager R, Becker B, Brockmann S, Wicke A, Wichmann-Schauer H, Hof H, Werber D, Stark K. Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006-2007. *Foodborne Pathog Dis.*, 2010. 7(12):1581-4
63. Rebagliati V, Philippi R, Rossi M, Troncoso A. Prevention of foodborne listeriosis. *Indian J Pathol Microbiol.*, 2009. 52:145-9
64. Fretz R, Pichler J, Sagel U, Much P, Ruppitsch W, Pietzka AT, Stöger A, Huhulescu S, Heuberger S, Appl G, Werber D, Stark K, Prager R, Flieger A, Karpisková R, Pfaff G, Allerberger F. Update: Multinational listeriosis outbreak due to 'Quargel', a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010. *Euro Surveill.*, 2010 22;15(16). pii: 19543.
65. Mioni R, Bordin P, Fornasiero E, Loriggiola F, Cecon M., Grimaldi M. *Listeria monocytogenes* in prodotti a base di carne freschi e stagionati prelevati al dettaglio nel veneto nell'anno 2003 nell'ambito del "piano sicurezza alimentare". *Atti del primo forum interlaboratorio su Listeria monocytogenes* 2004
66. Posfay-Barbe KM, Wald ER. Listeriosis. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2009. 14: 228-233
67. Mercanoglu Taban B, Halkman AK. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, 2011. 17(6):286-7
68. Kushwaha K, Muriana PM. Adherence characteristics of *Listeria* strains isolated from three ready-to-eat meat processing plants. *J Food Prot.*, 2009. 72(10):2125-31
69. Gandhi M, Chikindas ML. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol.*, 2007.113(1):1-15
70. Swaminathan B and Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.*, 2007. 9:1236-1243
71. Carpentier B and Cerf O. Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 2011. 145, 1-8
72. Vermeulen A, Devlieghere F, De Loy-Hendrickx A, Uyttendaele M. Critical evaluation of the EU-technical guidance on shelf-life studies for *L. monocytogenes* on RTE-foods: a case study for smoked salmon. *Int J Food Microbiol.*, 2011. 145(1):176-85
73. Schuppler M, Loessner MJ. The Opportunistic Pathogen *Listeria monocytogenes*: Pathogenicity and Interaction with the Mucosal Immune System. *International Journal of Inflammation*, 2010. *Int J Inflamm.* 2010:704321
74. de las Heras A, Cain RJ, Bielecka MK, Vázquez-Boland JA. Regulation of *Listeria* virulence: *PrfA* master and commander. *Curr Opin Microbiol.*, 2011. 14:118-27
75. Seveau S, Pizarro-Cerda J, Cossart P. Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion. *Microbes and Infection*, 2007. 9(10):1167-75

- 76.Allerberger F and Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clin. Microbiol. Infect., 2010. 16:16–23
- 77.Fayol L, Beizig S, Le Monnier A, Lacroze V, Simeoni U. Neonatal meningitis due to *Listeria monocytogenes* after 3 weeks of maternal treatment during pregnancy. Arch. Pediatr., 2009. 16:353-6
- 78.Laciar AL, Vaca Ruiz ML, Le Monnier A. Neonatal *Listeria*-meningitis in San Luis, Argentina: a three-case report. Rev. Argent. Microbiol., 2011. 43(1):45-7
- 79.Charlier-Woerther C, Leclercq A, Lortholary O, Lecuit M. Listeriosis, a rare but severe foodborne infection. Rev Prat., 2009. 59(7): 905-11
- 80.Lecuit M. Human listeriosis and animal models. Microbes Infect., 2007. 9:1216–1225
- 81.Suyemoto MM, Spears PA, Hamrick TS, Barnes JA, Havell EA, Orndorff PE. Factors associated with the acquisition and severity of gestational listeriosis. PLoS One. 2010 27.5(9): e13000
- 82.Van Stelten A, Simpson JM, Chen Y, Scott VN, Whiting RC, Ross WH, Nightingale KK. Significant shift in median guinea pig infectious dose shown by an outbreak-associated *Listeria monocytogenes* epidemic clone strain and a strain carrying a premature stop codon mutation in *inlA*. Appl Environ Microbiol., 2011.77(7):2479-87
- 83.Gebretsadik S, Kassa T, Alemayehu H, Huruy K, Kebede N. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in foods of animal origin in Addis Ababa, Ethiopia. J. Infect. Public Health, 2011. 4(1):22-9
- 84.Shakuntala I, Malik SV, Barbudde SB, Rawool DB. Isolation of *Listeria monocytogenes* from buffaloes with reproductive disorders and its confirmation by polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology, 2006. 117:229–234
- 85.Bundrant BN, Hutchins T, den Bakker HC, Fortes E, Wiedmann M. Listeriosis outbreak in dairy cattle caused by an unusual *Listeria monocytogenes* serotype 4b strain. J Vet Diagn Invest., 2011. 23(1):155-8
- 86.Cruz-Chamorro L, Puertollano E, de Cienfuegos GA, Puertollano MA, de Pablo MA. Acquired resistance to *Listeria monocytogenes* during a secondary infection in a murine model fed dietary lipids Nutrition, 2011. 27(10):1053-60
- 87.Wirth TC, Martin MD, Starbeck-Miller G, Harty JT, Badovinac VP. Secondary CD8+ T-cell responses are controlled by systemic inflammation. Eur J Immunol., 2011. 41(5):1321-33
- 88.Corr S, Hill C, Gahan CG. An in vitro cell-culture model demonstrates internalin- and hemolysin-independent translocation of *Listeria monocytogenes* across M cells. Microb Pathog., 2006. 41(6):241-50
- 89.Bonazzi M, Lecuit M, Cossart P. *Listeria monocytogenes* Internalin and E-cadherin: From Bench to Bedside. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. 1(4):a003087
- 90.O'Byrne C and Utratna M. *Listeria monocytogenes*: at the coalface of host-pathogen research., 2010. Bioeng Bugs., 2010. 1(6):371-7
- 91.Gouin E, Adib-Conquy M, Balestrino D, Nahori MA, Villiers V, Colland F, Dramsi S, Dussurget O, Cossart P. The *Listeria monocytogenes* *InlC* protein interferes with innate immune responses by targeting the I{ κ }B kinase subunit IKK{ α }. Proc Natl Acad Sci U S A., 2010. 107(40):17333-8
- 92.Cabanes D., Dehoux P., Dussurget O., Frangeul L., Cossart P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. Trends Microbiol., 2002. 10(5):238-45
- 93.Lecuit M, Dramsi S, Gottardi C, Fedor-Chaikin M, Gumbiner B, Cossart P. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. EMBO J., 1999.18(14):3956-63
- 94.Banerjee M, Copp J, Vuga D, Marino M, Chapman T, van der Geer P, Ghosh P. GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein *InlB* are required for potentiation of Met activation. Mol Microbiol., 2004. 52:257-71
- 95.Bonazzi M, Veiga E, Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for *InlA*-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* Cellular Microbiology, 2008. 10(11): 2208–2222
- 96.Ireton K. Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. Cell. Microbiol., 2007.9:1365–1375
- 97.Niemann HH, Jäger V, Butler PJ, van den Heuvel J, Schmidt S, Ferraris D, Gherardi E, Heinz DW. Structure of the human receptor tyrosine kinase met in complex with the *Listeria* invasion protein *InlB*. Cell., 2007. 130(2):235-46
- 98.Gavicherla B, Ritchey L, Gianfelice A, Kolokoltsov AA, Davey RA, Ireton K. Critical role for the host GTPase-activating protein ARAP2 in *InlB*-mediated entry of *Listeria monocytogenes*. Infect Immun., 2010. 78(11):4532-41
- 99.Bierne H and Cossart P. *InlB*, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. Journal of Cell Science, 2002. 115: 3357-3367
- 100.Braun L, Ghebrehiwet B, Cossart P. *gC1q-R/p32*, a C1q-binding protein, is a receptor for the *InlB* invasion protein of *Listeria monocytogenes* The EMBO Journal, 2000. 19 :1458–1466
- 101.Disson O, Grayo S, Huillet E, Nikitas G, Langa-Vives F, Dussurget O, Ragon M, Le Monnier A, Babinet C, Cossart P, Lecuit M. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. Nature, 2008. 455 (7216):1114-8
- 102.Lecuit M, Nelson DM, Smith SD, Khun H, Huerre M, Vacher-Lavenu MC, Gordon JI, Cossart P. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. Proc Natl Acad Sci U S A., 2004. 101:6152-7
- 103.Pentecost M, Otto G, Theriot JA, Amieva MR. *Listeria monocytogenes* invades the epithelial junctions at sites of cell extrusion. Plos Pathog, 2006.2:29–40
- 104.Ooi A, Hussain S, Seyedarabi A, Pickersgill RW. Structure of internalin C from *Listeria monocytogenes*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., 2006; 62(Pt 11):1287-93
- 105.Tweten RK. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. Infect Immun., 2005.73(10):6199-209
- 106.Jahangiri A, Rasooli I, Gargari SL, Owlia P, Rahbar MR, Amani J, Khalili S. An in silico DNA vaccine against *Listeria monocytogenes*. , 2011.16:29(40):6948-58
- 107.Forster BM, Bitar AP, Slepkov ER, Kota KJ, Sondermann H, Marquis H. The Metalloprotease of *Listeria monocytogenes* Is Regulated by pH. J Bacteriol., 2011.193(19):5090-7
- 108.Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Chakraborty T, Sasakawa C. *Listeria monocytogenes* ActA is a key player in evading autophagic recognition. Autophagy., 2009;5(8):1220-1
- 109.Lambrechts A, Gevaert K, Cossart P, Vandekerckhove J, Van Troys M. *Listeria* comet tails: the actin-based motility machinery at work. Trends Cell Biol., 2008.18(5):220-7
- 110.Chaturongakul S, Raengpradub S, Palmer ME, Bergholz TM, Orsi RH, Hu Y, Ollinger J, Wiedmann M, Boor KJ. Transcriptomic and phenotypic analyses identify coregulated, overlapping regulons among PrfA, CtsR, HrcA, and the alternative sigma factors sigmaB, sigmaC, sigmaH, and sigmaL in *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol., 2011.77(1):187-200
- 111.Scortti M, Monzó HJ, Lacharme-Lora L, Lewis DA, Vázquez-Boland JA. The PrfA virulence regulon. Microbes Infect., 2007.9(10):1196-207
- 112.Wemekamp-Kamphuis HH, Sleator RD, Wouters JA, Hill C, Abee T. Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. Appl Environ Microbiol. 2004.70(5):2912-8
- 113.Olier M, Rousseaux S, Piveteau P, Lemaitre JP, Rousset A, Guzzo J. Screening of glutamate decarboxylase activity and bile salt resistance of human asymptomatic carriage, clinical, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol., 2004.93(1):87-99
- 114.Wałęcka E, Molenda J, Karpíšková R, Bania J. Effect of osmotic stress and culture density on invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. Int J Food Microbiol., 2011.144(3):440-5

115. Dussurget O, Cabanes D, Dehoux P, Lecuit M, Buchrieser C, Glaser P, Cossart P. *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol Microbiol.*, 2002.45(4):1095-106
116. Begley M, Sleator RD, Gahan CG, Hill C. Contribution of three bile-associated loci, bsh, pva, and btlB, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.*, 2005.73(2):894-904
117. Hefford MA, D'Aoust S, Cyr TD, Austin JW, Sanders G, Kheradpir E, Kalmokoff ML. Proteomic and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* 568. *Can J Microbiol.*, 2005.51: 197-208
118. Saá Ibusquiza P, Herrera JJ, Cabo ML. Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.*, 2011. 28:418-25
119. Keto-Timonen R, Tolvanen R, Lunden J, Korkeala H. An 8-year surveillance of the diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in a chilled food processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism. *J. Food Prot.*, 2007. 70:1866-1873
120. Elhanafi D, Dutta V, Kathariou S. Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *Listeria monocytogenes* strain from the 1998-1999 outbreak. *Appl Environ Microbiol.*, 2010. 76(24):8231-8
121. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev.*, 1996. 60(4):575-608
122. Bisbiroulas P, Psylou M, Iliopoulou I, Diakogiannis I, Berberi A, Mastronicolis SK. Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride. *Lett Appl Microbiol.* 2011 Jan 19. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.02995.x.
123. Romanova NA, Wolffs PF, Brovko LY, Griffiths MW. Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006. 72:3498-3503
124. Huillet E, Larin S, Pardon P, Berche P.. Identification of a new locus in *Listeria monocytogenes* involved in cellobiose-dependent repression of hly expression. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999. 174:265-272
125. Granier SA, Moubareck C, Colaneri C, Lemire A, Roussel S, Dao TT, Courvalin P, Brisabois A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol.*, 2011.77:2788-90
126. Christensen EG, Gram L, Kastbjerg VG. Sublethal Triclosan Exposure Decreases Susceptibility to Gentamicin and Other Aminoglycosides in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2011.55(9):4064-71
127. Toledo-Arana A, Dussurget O, Nikitas G, Sesto N, Guet-Revillet H, Balestrino D, Loh E, Gripenland J, Tiensuu T, Vaitkevicius K, Barthelemy M, Vergassola M, Nahori MA, Soubigou G, Régnault B, Coppée JY, Lecuit M, Johansson J, Cossart P. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature*, 2009;459(7249):950-6
128. Zhang Q, Feng Y, Deng L, Feng F, Wang L, Zhou Q, Luo Q. SigB plays a major role in *Listeria monocytogenes* tolerance to bile stress. *Int J Food Microbiol.*, 2011. 145 :238-43
129. Shin JH, Kim J, Kim SM, Kim S, Lee JC, Ahn JM, Cho JY. sigmaB-dependent protein induction in *Listeria monocytogenes* during vancomycin stress. *FEMS Microbiol Lett.*, 2010. 308(1):94-100
130. Seeliger HP and Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods Microbiol.*, 1979.13:31-49
131. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.*, 2004. 42(8):3819-22
132. Huang B, Fang N, Dimovski K, Wang X, Hogg G, Bates J. Observation of a new pattern in serogroup-related PCR typing of *Listeria monocytogenes* 4b isolates. *J Clin Microbiol.* 2011.49(1):426-9
133. Piffaretti JC, Kressebuch H, Aeschbacher M, Bille J, Bannerman E, Musser JM, Selander RK, Rocourt J. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1989. 86,3818:3822
134. Nightingale K, Bovell L, Grajczyk A, Wiedmann M. Combined sigB allelic typing and multiplex PCR provide improved discriminatory power and reliability for *Listeria monocytogenes* molecular serotyping. *J Microbiol Methods.*, 2007.68(1):52-9
135. Ward TJ, Ducey TF, Usgaard T, Dunn KA, Bielawski JP. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol.*, 2008.74(24):7629-42
136. Dumas E, Meunier B, Berdagué JL, Chambon C, Desvaux M, Hébraud M. Comparative analysis of extracellular and intracellular proteomes of *Listeria monocytogenes* strains reveals a correlation between protein expression and serovar. *Appl Environ Microbiol.* 2008.74(23):7399-409
137. Tamburro M, Ripabelli G, Fanelli I, Grasso GM, Sammarco ML. Typing of *Listeria monocytogenes* strains isolated in Italy by inlA gene characterization and evaluation of a new cost-effective approach to antisera selection for serotyping. *J. Appl. Microbiol.*, 2010.108, 1602-1611
138. Guerra, M.M., Bernardo, F., McLauchlin, J., 2002. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 456-461
139. Ripabelli, G., McLauchlin, J., Threlfall, E.J., 2000. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 132-136
140. Guttman A, Szökő E. Capillary gel electrophoretic separation of DNA restriction fragments in a discontinuous buffer system. *Journal of Chromatography A*, 1996. 44:321-324
141. Zalewska M, Bizoń A, Milnerowicz H. Comparison of capillary electrophoretic techniques for analysis and characterization of metallothioneins. *J Sep Sci.*, 2011. 34(21):3061-9
142. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991.88: 7276-7280 . 1
143. Pfaffl MW. The ongoing evolution of qPCR. *Methods*, 2010. 50(4):215-6 42141142
144. Bustin SA and Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Sci*, 2005. 109(4):365-79
145. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol.*, 2005. 34(3):597-601
146. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.*, 2001. 25(4):402-8
147. Werbrouck H, Grijspeerd K, Botteldoorn N, Van Pamel E, Rijpens N, Van Damme J, Uyttendaele M, Herman L, Van Coillie E. Differential inlA and inlB expression and interaction with human intestinal and liver cells by *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Appl Environ Microbiol.*, 2006. 72(6):3862-71
148. Scialpi A and Mengoni A. La PCR e le sue varianti. *Quaderno di laboratorio.*, 2008. Ed. Firenze University Press
149. Nogva HK, Rudi K, Naterstad K, Holck A, Lillehaug D. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl Environ Microbiol.*, 2000.66(10):4266-71
150. Klein PG and Juneja VK. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.*, 1997. 63(11):4441-8
151. Werbrouck H, Vermeulen A, Van Coillie E, Messens W, Herman L, Devlieghere F, Uyttendaele M. Influence of acid stress on survival, expression of virulence genes and invasion capacity into Caco-2 cells of *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Int J Food Microbiol.*, 2009. 134(1-2):140-6.
152. Hunter PR and Gaston MA. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *J Clin Microbiol*, 1988. 2465-2466

153. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, 1995. 33:2233-2239
154. Keto-Timonen R, Heikinheimo A, Eerola E, Korkeala H. Identification of *Clostridium* species and DNA fingerprinting of *Clostridium perfringens* by amplified fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.*, 2006. 44(11):4057-65
155. Lomonaco S, Nucera D, Parisi A, Normanno G, Bottero MT. Comparison of two AFLP methods and PFGE using strains of *Listeria monocytogenes* isolated from environmental and food samples obtained from Piedmont, Italy. *Int J Food Microbiol.*, 2011. 149(2):177-82
156. Chen, Y., Knabel, S.J., Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007. 73, 6299-6304
157. Chenal-Francisque V, Lopez J, Cantinelli T, Caro V, Tran C, Leclercq A, Lecuit M, Brisse S. Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg Infect Dis.*, 2011. 17(6):1110-2
158. Ochiai Y, Yamada F, Batmunkh O, Mochizuki M, Takano T, Hondo R, Ueda F. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retail meat in the Tokyo metropolitan area. *J Food Prot.*, 2010. 73(9):1688-93
159. Zhang C, Zhang M, Ju J, Nietfeldt J, Wise J, Terry PM, Olson M, Kachman SD, Wiedmann M, Samadpour M, Benson AK. Genome diversification in phylogenetic lineages I and II of *Listeria monocytogenes*: identification of segments unique to lineage II populations. *J Bacteriol.*, 2003. 185(18):5573-84
160. K rouanton A, Marault M, Petit L, Grout J, Dao TT, Brisabois A. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *J Microbiol Methods.*, 2010. 80(2):134-7
161. Martin P, Jacquet C, Goulet V, Vaillant V, De Valk H. Pulsed-field gel electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathog Dis.*, 2006. 3(3):303-8
162. Arguedas-Villa C, Stephan R, Tasara T. Evaluation of cold growth and related gene transcription responses associated with *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Food Microbiol.*, 2010. 27(5):653-60
163. Augustin JC, Bergis H, Midelet-Bourdin G, Cornu M, Couvert O, Denis C, Huchet V, Lemonnier S, Pinon A, Vialette M, Zuliani V, Stahl V. Design of challenge testing experiments to assess the variability of *Listeria monocytogenes* growth in foods. *Food Microbiol.*, 2011. 28(4):746-54
164. Aase B, Sundheim G, Langsrud S, R rvik LM. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.*, 2000. 62(1-2):57-63
165. Meregghetti L, Quentin R, Marquet-Van Der Mee N, Audurier A. Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Appl Environ Microbiol.*, 2000. 66(11):5083-6
166. Godreuil S, Galimand M, Gerbaud G, Jacquet C, Courvalin P. Efflux pump Lde is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2003. 47(2):704-8
167. Lismond A, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP, Courvalin P, Van Bambeke F. Cooperation between prokaryotic (Lde) and eukaryotic (MRP) efflux transporters in J774 macrophages infected with *Listeria monocytogenes*: studies with ciprofloxacin and moxifloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2008. 52(9):3040-6
168. Huillet E, Velge P, Vallaeyts T, Pardon P, LadR, a new PadR-related transcriptional regulator from *Listeria monocytogenes*, negatively regulates the expression of the multidrug efflux pump MdrL. *FEMS Microbiol Lett.*, 2006. 254(1):87-94
169. Martínez B, Rodríguez A. Antimicrobial susceptibility of nisin resistant *Listeria monocytogenes* of dairy origin. *FEMS Microbiol Lett.*, 2005. 252(1):67-72
170. Busch DH, Bouwer HG, Hinrichs D, Pamer EG. A nonamer peptide derived from *Listeria monocytogenes* metalloprotease is presented to cytolytic T lymphocytes. *Infect Immun.*, 1997 Dec;65(12):5326-9
171. Palmer ME, Chaturongakul S, Wiedmann M, Boor KJ. The *Listeria monocytogenes* σ B regulon and its virulence-associated functions are inhibited by a small molecule. *MBio.*, 2011. 2(6). pii: e00241-11. doi: 10.1128/mBio.00241-11.
172. Kastbjerg VG, Larsen MH, Gram L, Ingmer H. Influence of sublethal concentrations of common disinfectants on expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.*, 201. 76(1):303-9
173. van der Veen S, Abee T. Importance of SigB for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. *Appl Environ Microbiol.*, 201. 76(23):7854-60
174. Begley M, Hill C, Ross RP. Tolerance of *Listeria monocytogenes* to cell envelope-acting antimicrobial agents is dependent on SigB. *Appl Environ Microbiol.*, 200. 72(3):2231-4
175. Bergholz TM, Bowen B, Wiedmann M, Boor KJ. *Listeria monocytogenes* shows temperature dependent and independent responses to salt stress, including responses that induce cross-protection to other stresses. *Appl Environ Microbiol.*, 2012. [Epub ahead of print]
176. Zhou Q, Wang L, Yin X, Feng X, Shang J, Luo Q. SigB-dependent tolerance to protein synthesis-inhibiting antibiotics in *Listeria monocytogenes* EGDe. *Curr Microbiol.*, 201. 64(3):234-41
177. Rodrigues D, Cerca N, Teixeira P, Oliveira R, Ceri H, Azeredo J. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* enteritidis biofilms susceptibility to different disinfectants and stress-response and virulence gene expression of surviving cells. *Microb Drug Resist.*, 2011. 17(2):181-9
178. Le Monnier A, Blanot S, Abachin E, Beretti JL, Berche P, Kayal S. *Listeria monocytogenes*: a rare complication of ventriculoperitoneal shunt in children. *J Clin Microbiol.*, 2011. 49(11):3924-7
179. Rudi K, Nogva HK, Naterstad K, Dr mtorp SM, Bredholt S, Holck A. Subtyping *Listeria monocytogenes* through the combined analyses of genotype and expression of the hlyA virulence determinant. *J Appl Microbiol.*, 2003. 94(4):720-32
180. Stoll R, Mertins S, Joseph B, M ller-Altrock S, Goebel W. Modulation of PrfA activity in *Listeria monocytogenes* upon growth in different culture media. *Microbiology.* 2008. 154(Pt 12):3856-76
181. Pushkareva VI, Ermolaeva SA. *Listeria monocytogenes* virulence factor Listeriolysin O favors bacterial growth in co-culture with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts. *BMC Microbiol.* 2010. 28;10:26
182. Pentecost M, Kumaran J, Ghosh P, Amieva MR. *Listeria monocytogenes* internalin B activates junctional endocytosis to accelerate intestinal invasion. *PLoS Pathog.*, 2010. 6(5):e1000900
183. Chiba S, Nagai T, Hayashi T, Baba Y, Nagai S, Koyasu S. Listerial invasion protein internalin B promotes entry into ileal Peyer's patches in vivo. *Microbiol Immunol.*, 2011. 55(2):123-9