

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Facoltà di Medicina Veterinaria
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale
Servizio di Prova di Igiene e Tecnologie Alimentari

DOTTORATO DI RICERCA IN

METODOLOGIE ANALITICHE NELLA TECNOLOGIA ALIMENTARE E
NELL'ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

Ciclo **XXI** - Settore scientifico disciplinare di afferenza: **VET/04**

**Caratterizzazione biomolecolare di *Listeria monocytogenes*
in suini regolarmente macellati**

Presentata da: Dr.ssa Cristina Santoro

Coordinatore Dottorato
Chiar.mo Prof. Roberto Rosmini

Relatore
Chiar.mo Prof. Roberto Rosmini

Esame finale anno 2009

Indice

Introduzione	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	3
Listeriosi	5
Patogenesi	8
Fattori di virulenza	9
<i>Listeria monocytogenes</i> al macello	11
Materiali e metodi	12
Campionamento al macello	12
PCR	13
Risultati	17
Discussione	20
Bibliografia	21

Introduzione

Listeria monocytogenes è un batterio patogeno responsabile di una malattia potenzialmente molto grave per l'uomo. L'infezione avviene soprattutto tramite l'ingestione di alimenti di origine animale contaminati, e può propagarsi per via transplacentare al feto.

Nonostante l'incidenza della malattia sia bassa, notevole è l'interesse che suscita come problema di sanità pubblica in quanto si manifesta con sintomi piuttosto gravi ed anche con una mortalità fino al 20%. Fra i fattori che condizionano la malattia riferibili all'ospite, è soprattutto lo stato immunitario che condiziona l'evolvere dell'infezione in forme morbose diverse; i soggetti più a rischio sono le persone debilitate da patologie croniche o immuno-compromessi, anziani, bambini, gestanti (Vázquez-Boland e coll., 2001).

Il potenziale patogeno di *L. monocytogenes* è dovuto soprattutto a caratteristici fattori di virulenza con i quali alcuni ceppi sono in grado di attaccare la cellula dell'organismo ospite potendo aderire, invadere, moltiplicare e propagare alle cellule adiacenti.

Il presente studio è rivolto al rilevamento tramite reazione polimerasica a catena (PCR) di alcuni fattori di virulenza di ceppi di *L. monocytogenes* isolati da campioni prelevati presso macelli suini, mediante l'identificazione dei geni responsabili della sintesi delle proteine di superficie che intervengono nel processo patogenetico, allo

scopo di valutare la potenziale pericolosità di quelli isolati sia sulle carcasse, sia dal contenuto intestinale.

La presenza di *L. monocytogenes* nelle carni suine prevede infatti diverse possibili fonti di contaminazione a partire dalla gestione dell'allevamento da un punto di vista igienico e alimentare: ciò può comportare rischio di introdurre al macello animali già portatori dell'infezione, in grado di estendersi alle strutture con cui poi i suini e prodotti da loro derivati vengono in contatto.

Inoltre lungo la catena di macellazione ogni singola fase (sezionamento della carcassa, eviscerazione con l'asportazione della corata, e suddivisione in tagli commerciali) comporta dei rischi di contaminazione: dal passaggio della flora microbica cutanea sulla superficie della carcassa, al quasi inevitabile rischio di imbrattamento durante l'asportazione dei visceri; non si deve sottovalutare il ruolo che riveste lungo la catena di macellazione l'igiene delle operazioni condotte dal personale, la pulizia delle attrezzature, delle superfici di contatto.

Listeria monocytogenes

L. monocytogenes è un batterio ubiquitario appartenente alla Famiglia delle Corynebacteriaceae (Gualandi, 2005).

Il genere *Listeria* comprende 6 specie: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. whelshimeri*, *L. murray* (subsp. *grayi* e subsp. *murray*) e *L. innocua*. A parte *L. monocytogenes*, che è la più importante perché provoca la listeriosi, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. whelshimeri* raramente sono state causa di malattia per l'uomo (Poli e coll., 2001).

Morfologicamente è un Gram + di forma bacillare-coccobacillare (pleomorfo), acapsulato ed asporigeno, dotato di ciglia peritriche che conferiscono un movimento caratteristico definito rototraslatorio quando si trovano a 25°C. Il suo sviluppo può avvenire in condizioni ambientali molto variabili:

- temperatura: min. 1°C (psicrofilo), opt. 30-37°C, max. 45-50°C. E' sensibile alla pastorizzazione (71°C x 15"), rimane vitale in substrati sottoposti a congelamento

- umidità: Aw 0,90-0,99

A livello dei locali di produzione con valori di bassa temperatura ed alta umidità è favorita la sopravvivenza di *L. monocytogenes* con la costituzione di siti preferenziali di attecchimento rappresentati da superfici dove le operazioni di sanificazione sono più difficili; in queste nicchie si crea l'habitat ideale per la produzione di biofilm.

- pH: min. 4.8, opt. 6-7, max. 9.

- alofilia: fino al 10% di NaCl

E' aerobia-anaerobia facoltativa (microaerofila), ossidasi negativa, catalasi positiva, incapace di ridurre i nitrati a nitriti e capace di idrolizzare l'esculina ad esculetina.

L. monocytogenes, in aggiunta, fermenta il ramnosio ma non lo xilosio; è β -emolitica e mostra una reazione emolitica sinergica con *Staphilococcus aureus* nel cosiddetto Camp test, ma non con *Rhodococcus equi*. In realtà, non tutti i ceppi di *L. monocytogenes* risultano emolitici, in quanto non tutti producono una emolisina, chiamata listeriolisina-O (LLO).(8, 32)

E' sensibile ai più comuni disinfettanti, ma data la capacità di formare biofilm su molte superfici può risultare difficile eliminarlo dagli ambienti.

L. monocytogenes presenta un'eterogenità di Antigeni somatici O (15, da I a XV), di Antigeni H (5, indicati da lettere); dei 13 sierotipi identificati i più isolati da animali e uomo sono 1/2a, 1/2b, 4b e quest'ultimo è quello più coinvolto nei focolai epidemici.

Negli ospiti si comporta come parassita obbligato a localizzazione non soltanto macrofagica, ma anche a livello di tessuto linfatico (tonsille), epatico, intestinale, cerebrale, endometriale, endoteliale, dove attiva un ciclo replicativo peculiare che consente il passaggio diretto fra cellule contigue tramite la presenza di enzimi proteici specificatamente deputati. Dopo un'iniziale adesione alla cellula da infettare, tramite la formazione di un vacuolo viene trasportato internamente, si libera nel citoplasma e si riproduce; riesce quindi a porsi di nuovo a contatto con la membrana cellulare in una porzione di citoplasma che si incunea nella superficie della cellula adiacente, fino ad esserne totalmente inglobato. Da questo "vacuolo secondario" riparte nuovamente la fase replicativa.

Listeriosi

La malattia nell'uomo si può manifestare con diverse forme patologiche; molti degli individui che contraggono l'infezione, per via per lo più alimentare, possono risultare comunque portatori sani e ciò può accadere quando il livello di contaminazione è piuttosto basso o per un concomitante buono stato delle difese organiche, eventualmente indotto da probabili meccanismi di resistenza a livello genetico. Si possono avere quindi forme di malattia variabili: da sindromi simil-influenzali con febbre cefalea, a rare forme gastroenteriche piuttosto intense, a breve periodo di incubazione, ma autolimitanti. Più gravi i sintomi nei soggetti debilitati come anziani, malati cronici ed immunodepressi, che sviluppano una forma invasiva: possibili le localizzazioni neurologiche con meningiti, meningoencefaliti, setticemie, infezioni focali granulomatose a livello oculare, cardiaco, pleuro-polmonare, peritoneale, epatico, urinario.

Nella donna in gravidanza si hanno sintomi simil-influenzali, con faringite e/o diarrea, aborto; nel neonato leucocitosi, anomalie cardio-respiratorie, febbre, setticemie perinatale, natimortalità.

Non sono da escludere episodi d'infezione dovuti al contatto con animali, materiali pazienti infetti,

Essendo un microrganismo ubiquitario le fonti di contaminazione per foraggi, insilati ed alimenti può essere rappresentata da terreno agricolo, acque superficiali venuti a contatto con deiezioni animali, in un comune ciclo a trasmissione oro-fecale. La diffusione del batterio nell'ambiente spiega la probabilità di veicolarlo in ambito produttivo.

Il monitoraggio sanitario nei confronti della listeriosi è previsto da una serie di disposizioni legislative, come la "sorveglianza delle infezioni da *L. monocytogenes* nell'uomo" (nota del Ministero della Sanità del 14 marzo 1988); rientra inoltre nei campi di applicazione di:

- "Sistema informativo delle malattie infettive e diffusive" (Decreto del Ministero della Sanità 15 dicembre 1990 - e relativa circolare applicativa);
- "Sistema di sorveglianza delle meningiti batteriche";
- "Sistema di sorveglianza delle malattie trasmesse da alimenti".
- Direttiva 2003/99 CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003, sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonosici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio, Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 12/12/2003, Serie L, 325/331 (recepita dal Decreto Legislativo 4 aprile 2006, n. 191, "Attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti di zoonosici", Gazzetta Ufficiale n. 119, 24 maggio 2006).

In Italia è il Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e Rischi Alimentari (CNQARA) che ha funzioni di Centro di Riferimento Nazionale per la Listeria, e deve tipizzare ogni ceppo di *L. monocytogenes* pervenuto da strutture sanitarie .

All'interesse relativo alla salute pubblica, si aggiunge ovviamente anche l'attenzione che il settore produttivo deve rivolgere al controllo della contaminazione da *L. monocytogenes* per le ripercussioni economiche derivanti dalle restrizioni commerciali applicabili in caso di positività in prodotti pronti al consumo. Periodicamente il gruppo di

lavoro dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) che si occupa dei rischi biologici emana dei pareri, ed ha raccomandato l'approfondimento dell'analisi dei dati riguardanti il nesso fra Listeriosi e cibi pronti al consumo; ha ribadito la funzione degli operatori del settore alimentare nell'implementare le buone pratiche di produzione lungo la filiera, al fine di poter contenere il rischio di contaminazione dei prodotti sotto la soglia prevista dal Reg (CE) n.2073/2005. A tal proposito su richiesta della Commissione europea si deve compiere una revisione della letteratura scientifica soprattutto per RTE-Foods, e si dovrà pervenire ad un'analisi del rischio correlato ai livelli di *L. monocytogenes* nei diversi alimenti, includendo anche studi su modalità e condizioni di produzione, confezionamento, stoccaggio e formazione degli addetti.

Gli alimenti più a rischio come fonte di infezione sono rappresentati da latte non pastorizzato, carne cruda, verdura cruda, formaggi molli a crosta "fiorita".

Per quanto riguarda la presenza di *L. monocytogenes* nelle carni suine sono molteplici le possibili fonti di contaminazione a partire dall'allevamento; la gestione aziendale dal punto di vista dell'igiene ed il tipo di alimentazione costituiscono senz'altro aspetti da controllare. Lungo la filiera produttiva le fasi più critiche della macellazione sono rappresentate dal sezionamento della carcassa, dall'eviscerazione con l'asportazione della corata, e suddivisione in tagli commerciali: i rischi di contaminazione sono collegati al passaggio della flora microbica cutanea sulla superficie della carcassa, non escludendo il rischio di contaminazione crociata rappresentato dal passaggio in vasca di scottatura. Quasi inevitabile è il rischio d'imbrattamento durante l'asportazione dei visceri, e non si deve

sottovalutare il ruolo che riveste lungo la catena di macellazione l'igiene delle operazioni condotte dal personale, la pulizia delle attrezzature, delle superfici di contatto. Subentrano poi le condizioni di stoccaggio, trasformazione delle carni e le possibili post-contaminazioni dopo trattamenti termici dei prodotti derivati.

La malattia negli animali è caratterizzata da encefalite, mastite, aborti, soprattutto in bovini ed ovini. Sono da considerarsi serbatoi dell'infezione anche piccoli roditori, artropodi, uccelli ed anche pesci e crostacei.

Patogenesi

Dal momento dell'assunzione di *L. monocytogenes* con l'alimento, il batterio dopo aver superato l'ambiente acido gastrico si localizza a livello epatico. La moltiplicazione batterica attiva la risposta cellulomediata, tendente a tenere sotto controllo l'infezione; quando l'equilibrio ospite-parassita si rompe a scapito del primo si possono evidenziare episodi setticemici con manifestazioni febbrili e a localizzazioni secondarie.

A questo proposito è significativa la capacità di resistenza all'acidità gastrica ed alla presenza dei sali biliari presenti nell'intestino; queste facoltà sono correlate alla presenza di due sistemi enzimatici distinti rappresentati rispettivamente da glutammato-decarbossilasi (GAD) e idrolasi dei sali biliari (BSH), definita a volte come idrolasi degli acidi biliari coniugati (Gahan e coll., 2005).

Il primo sistema è in grado di utilizzare i protoni in eccesso per trasformare molecole di glutammato assunte dall'esterno in GABA (γ -aminobutirrato) che poi verrà scambiato con l'ambiente esterno; in questo modo *L. monocytogenes* ottiene l'alcalinizzazione

dell'ambiente circostante e la riduzione di cariche positive nel proprio citoplasma (Cotter e coll., 2001).

Il sistema BSH è un complesso enzimatico capace di deconiugare i sali biliari nella componente aminoacidica (glicina e/o taurina), potendola sfruttare come fonte di carbonio e azoto per la propria replicazione, ed in acidi biliari, che hanno una ridotta capacità battericida rispetto ai precursori, andando incrementare la tolleranza in ambiente enterico.

L. monocytogenes riesce ad insinuarsi fra gli enterociti tramite la rottura di gap junction e attraverso la rete vascolare della sottomucosa arriva al fegato, che è il primo organo di replicazione batterica (Southwick e coll., 1996).

Fattori di virulenza

A livello epatico iniziano ad agire i fattori di patogenicità. Le prime proteine coinvolte sono le **internaline A e B**; la prima si lega con un recettore della cellula ospite (E-caderina) e favorisce l'adesione, mentre la seconda interagisce con un sistema di recettori che provocano l'attivazione di filamenti di actina nell'epatocita: una porzione del citoplasma si muove a circondare il batterio che, inglobato in questo fagosoma, entra. Quindi subentra l'azione dell'enzima **listeriolisina O**, una fosfolipasi che promuove la lisi del fagosoma e la liberazione del batterio nel citoplasma. Qui oltre alla replicazione si verifica l'azione della proteina **actina**, che attiva le funzioni della proteina contrattile actina importante nella formazione del citoscheletro di ogni cellula. Nell'ambiente esterno a *L. monocytogenes* i filamenti di actina sono condizionati a disporsi ad

un'estremità della cellula batterica e poi con le tipiche contrazioni le conferiscono la capacità di spostarsi verso la membrana della cellula ospite. Questo stimolo comporta la protrusione della porzione di citoplasma verso la cellula adiacente, fino a che si completa il passaggio e quindi l'infezione; la ripetizione del ciclo coinvolge il tessuto epatico sempre più massivamente, in tempi piuttosto lunghi che ne spiegano il periodo di incubazione.

Tabella 1

Fattori di virulenza regolati da PrfA (T>30°C)	<i>bp - Peso molecolare</i>	<i>Geni</i>
EMOLISINA -LISTERIOLISINA O (LLO)		<i>hly</i>
ACTINA A		<i>actA</i>
FOSFOLIPASI C FOSFATIDIL-INOSITOLO SPECIFICA		<i>plcA</i> *
FOSFOLIPASI C FOSFATIDILCOLINA SPECIFICA		<i>plcB</i> *
PROTEINA P60 (IDROLASI DELLA PARETE CELLULARE)		<i>iap</i>
INTERNALINA A		
INTERNALINA B		
Caratteri metabolici		
IDROLASI DEI SALI BILIARI (BSH)		<i>bsh</i>
<ul style="list-style-type: none"> • GLUTAMMATO DECARBOSSILASI (GAD) 		<i>gad1, gad2, gad3</i>

La **proteina P60** è importante nella fase di invasione cellulare.

La **fosfolipasi** è coinvolta nella lisi del vacuolo con il quale *L. monocytogenes* viene trasportata da una cellula all'altra.

La sintesi di questi fattori è regolata da geni la cui trascrizione è condizionata a monte dal gene *PrfA* che è un gene di controllo trascrizionale capace di attivarsi ad una temperatura di almeno 30°C. (Dussurget e coll., 2004).

***Listeria monocytogenes* al macello**

La letteratura su *L. monocytogenes* contempla molti studi volti ad evidenziare la prevalenza di listerie in suino al macello. Secondo alcuni autori qualche ceppo di *L. monocytogenes* che entra al macello con gli animali riesce a contaminare attrezzature e superfici dei locali di macellazione fino a costituire una flora caratteristica di quell'ambiente, ipotizzando così che la presenza di *L. monocytogenes* nelle carni di suino al macello, e in particolare sulle carcasse, sia un problema principalmente di natura ambientale (Cantoni e coll., 2002). Altri studi hanno rilevato che le percentuali di detenzione sulle carcasse, aumentano con l'eviscerazione, oppure che possono anche risultare costanti confrontando prelievi fatti prima e dopo il sezionamento in mezzene.

Dato che i dati scientifici prodotti non sono univoci nell'indicare una prevalente fonte di contaminazione delle carcasse, e dato che l'eviscerazione rappresenta comunque uno dei momenti più critici della catena di macellazione, per avere informazioni sullo stato igienico è utile verificare le contaminazioni delle carcasse alla fine della macellazione, come pure poter valutare l'importanza degli animali portatori tramite il campionamento del contenuto intestinale e la valutazione della contaminazione fecale.

Materiali e metodi

Campionamento al macello

Al fine di poter isolare ceppi di *Listeria monocytogenes* nei suini al macello, si è svolta una serie di campionamenti in uno stabilimento ad alta capacità produttiva durante l'estate 2007. In ogni giornata i prelievi sono cominciati dopo almeno un'ora dall'inizio delle operazioni di macellazione.

Le carcasse sono state campionate con metodo non-distruttivo mediante spugne disidratate (35X75mm-Sponge-Bag PBI®), inumidite con soluzione salina isotonica (fosfato di Butterfield), a livello di torace, coscia e guanciale di una singola mezzena. Il prelievo, rappresentativo di circa di 300 cm², è stato effettuato alla fine delle operazioni di macellazione e bollatura.

Per il campionamento del contenuto intestinale sono stati prelevati segmenti della porzione distale del colon, dai quali poi sono stati estratti fino a 25 g di materiale fecale, presso il laboratorio.

I campioni, trasportati all'interno di frigoriferi a temperatura controllata (4±2°C) sono stati analizzati entro le 24 ore successive all'arrivo in laboratorio.

Come procedure di isolamento è stata seguita la metodica ISO 11290-1/Amendment 1, per ricerca di *L. monocytogenes*. Sinteticamente, l'ISO 11290-1 (ricerca) consiste di due passaggi in brodo di arricchimento (half-Fraser broth e Fraser broth) del campione da testare e la successiva semina da ciascuno di essi nei terreni selettivi ALOA ed uno scelto fra Oxford agar e Palcam agar. Quindi per l'identificazione di *L. monocytogenes*, le colonie risultate β-

emolitiche, in Columbia blood agar (Oxoid) addizionato con il 5% di sangue di pecora, sono state successivamente sottoposte alla colorazione di Gram, al test della catalasi, ossidasi, alle prove di fermentazione di D-xilosio e L-ramnosio, mobilità e al CAMP-test.

I campioni che su ALOA hanno sviluppato le tipiche colonie di colore blu-verde circondate o meno dall'alone opaco, dovuto all'azione dell'enzima fosfolipasi C (PIPLC), sono stati sottoposti a PCR per la ricerca dei geni associati alla virulenza.

PCR

Si sono seguite essenzialmente le metodiche descritte da Kaur (Kaur e coll., 2007), modificandole per il volume della miscela di amplificazione di ogni campione e per il tipo di Taq DNA polymerase utilizzata (JumpStart).

Preparazione del campione da coltura su piastra:

Si è prelevata singolarmente ogni colonia isolata (o patina ottenuta da colonia singola), per trasferirla in eppendorf sterile, contenente 300µl di CHELEX[®] 6% (resina d'estrazione del DNA) prelevato mentre è tenuto in agitazione; agitare con vortex ogni campione da analizzare. Quindi si sono incubate a 56°C x 25-30', ottenendo la rottura delle membrane cellulari, e poi bollite a bagnomaria per 8' (separazione delle catene di DNA all'interno della sospensione di cellule lisate). Per la raccolta del DNA si sono sottoposte a centrifugazione (10000 RPM x 5'). Prima di procedere con la preparazione della miscela dei componenti necessari alla PCR si sono fatte raffreddare le provette in ghiaccio.

Preparazione mix primers

Sono state eseguite tre tipi di PCR, di cui due multiplex ed una singola. La ricostituzione di ogni primer (Sigma-Aldrich®) è stata fatta con soluzione TE Buffer nella quantità indicata dal produttore per ottenere una concentrazione finale di 100µM di ciascun primer (f/r).

Per le multiplex nella prima reazione si sono ricercati i geni *plcA*, *actA*, *hlyA* e *iap*, mentre nella seconda *prfA*, *actA*, *hlyA* e *iap*. Pertanto in due distinte minieppendorf si sono messi 10 µl di ciascuno dei componenti delle quattro coppie di primers (forward e reverse) per reazione, per un totale di 80 µl di mix di primers per ciascuna. Agli 80 µl sono stati aggiunti 20 µl di double distilled apirogenic water (DDW). Si sono ottenute dunque due mix con una quantità di 10µM di ogni primer, adattando la quantità di primers al volume totale della Master Mix e quindi alla relativa concentrazione finale.

1° reazione	plc A Forward	5¢-CTGCTTGAGCGTTCATGTCTCATCCCC-3¢
	plcA Reverse	5¢-CATGGGTTTCACTCTCCTTCTAC-3¢
2° reazione	prf A Forward	5¢-CTGTTGGAGCTCTTCTTGGTGAAGCAATCG-3¢
	prf A Reverse	5¢-AGCAACCTCGGTACCATATACTAACTC-3¢
1° e 2° reazione	hly A Forward	5¢-GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA-3¢
	hly A Reverse	5¢- GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG-3¢
1° e 2° reazione	iap Forward	5¢-ACAAGCTGCACCTGTTGCAG-3¢
	iap Reverse	5¢-TGACAGCGTGTGTAGTAGCA-3¢
1° e 2° reazione	act A Forward	5¢-CGCCGCGGAAATTAAGAAAAAGA-3¢
	act A Reverse	5¢- ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG-3¢

La 3° reazione è stata una PCR singola che ha riguardato il solo gene *prfA* utilizzando però primers f/r differenti e diverse condizioni.

IAC LIP1 ACAGAAACATCGGTTGGCATCTATTAACACTGCTGC

IAC LIP2 TAACTTGATGCCATCAGGCCTCTCAGCTTATCCTG

Preparazione di mix di nucleotidi (dNTP)

Si è diluita ogni soluzione di nucleotide con acqua deionizzata sterile apirogena (ultrapura-DDW); in una minieppendorf sono messi 10 μ l di ogni nucleotide a 100 μ M, per un totale di 40 μ l di mix di dNTP. Ai 40 μ l sono aggiunti 60 μ l di double distilled apirogenic water (DDW). Si avrà dunque una mix con una quantità di 10 μ M di ogni dNTP.

Mix a 25 μ l (volume totale) per 1° e 2° reazione:

Sostanza	quantità	Concentrazione finale
10 x buffer	2,5 μ l	1 x buffer
10xMix dNTP	2.5 μ l	1mM*
Primers 10X	2.5 μ L	10 μ m*
MgCl	3.75 μ l	7,5 mM
JS <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.5 μ l	0.05 u
H2O	11.25 μ l	---
Template DNA	2 μ l	---

AMPLIFICAZIONE	cicli	temperatura	temp
Denaturazione iniziale	1	94 °C	
Denaturazione	35	94°C	30''
Annealing		60°C	30''
Extension		72°C	1', 30''
Final extension	1	72°C	10'
Hold	1	4°C	all

Mix a 25 μ l (volume totale) per 3° reazione

Sostanza	quantità	Concentrazione finale
10 x buffer	2 μ l	1 x buffer
10xMix dNTP	0.6 μ l	1mM*
Primers 10X	0.6 μ L	10 μ m*
MgCl	1 μ l	50 mM
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.2 μ l	0.05 u
H2O	12.6 μ l	---
BSA	1 μ l	20mg/ml
Template DNA	2 μ l	---



AMPLIFICAZIONE	cicli	temperatura	tempo
Denaturazione iniziale	1	94 °C	2'
Denaturazione	40	94°C	30''
Annealing		55°C	30''
Extension		74°C	1'
Final extension	1	74	5
Hold	1	10°C	all

Corsa elettroforetica: su di gel di agarosio 2% con aggiunta di bromuro di etidio 1% 110V x 20'-25'.

Lettura del gel: transilluminatore UV

Risultati

Dai campionamenti svolti sono stati isolati su ALOA con 61 campioni con colonie tipiche; alcuni ceppi presentavano l'alone di precipitazione (32) ed altri ne erano privi (29). L'origine di questi ceppi è rappresentata da carcasse (55), feci (4) e tonsille (2).

Tabella n.2

Matrice	Ceppi su ALOA	Colonie tipiche		Senza alone	
Carcasse	55	29	52.7%	26	47.27%
Feci	4	3	75%	1	25%
Tonsille	2	0	-	2	100%
totale	61	32	52.45%	29	47.54%

Inizialmente si è eseguita la prima PCR Multiplex, per la ricerca dei geni *plcA*, *actA*, *hlyA* e *iap*, alla quale sono stati sottoposti solo 4 ceppi, provenienti tutti da carcassa, e si è evidenziata la presenza in tutti gli amplificati dei geni considerati (Fig. 1).

Successivamente si sono sottoposti gli stessi ceppi alla seconda PCR Multiplex che prevedeva la ricerca dei geni *prfA*, *actA*, *hlyA* e *iap*; in questo caso i ceppi hanno amplificato tutti i geni fuorché *prfA*. La ripetizione dell'esame ha ribadito questo risultato.

FIG. 1 Prima PCR Multiplex



FIG. 2 a Seconda PCR Multiplex

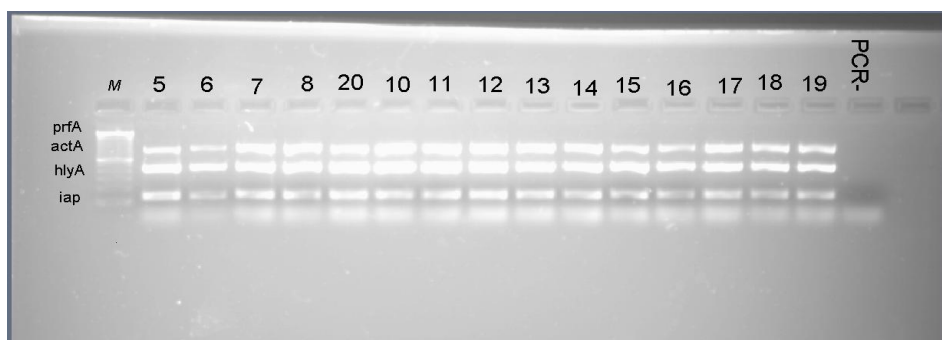
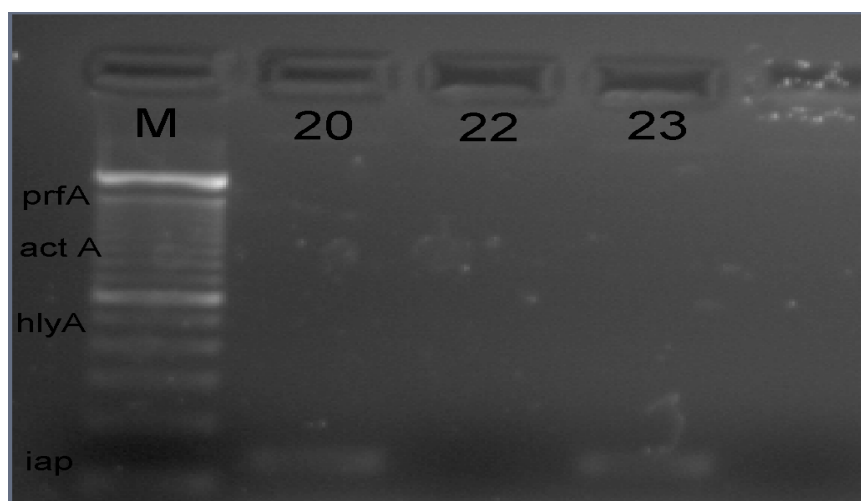
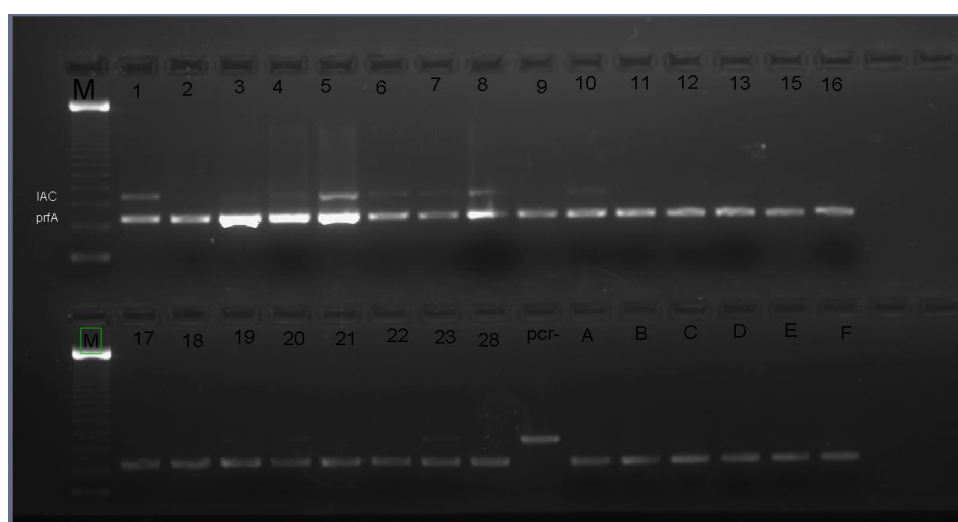


FIG. 2 b Seconda PCR Multiplex



Infine abbiamo sottoposto tutti e 32 i ceppi alla PCR singola per poter evidenziare il gene relativo al fattore trascrizionale PrfA utilizzando un primer diverso: LIP-IAC, preparato cioè con IAC, indicatore interno di amplificazione: tutti hanno rilevato positività per questo gene (fig. 3).

FIG. 3 PCR Singola



Discussione

La maggioranza dei ceppi isolati ha come matrice di provenienza le carcasse suine e, nella serie di campionamenti effettuata per questa ricerca, questo dato corrisponde ad oltre il 90%.

Ad esclusione di 2 ceppi, tutti gli altri hanno manifestato la presenza dei geni di virulenza considerati, quindi sono da ritenersi tutti potenzialmente patogeni.

Questi dati suggeriscono che il controllo del grado di contaminazione delle carni suine è molto importante nelle varie fasi della filiera produttiva. Infatti già al macello il rigoroso rispetto di norme sanitarie e di corretti comportamenti igienici deve contribuire a ridurre l'imbrattamento di carcasse durante il sezionamento e l'eviscerazione, ed a preservare il più possibile le contaminazioni di ambiente, attrezzature e superfici che possono rappresentare un habitat ideale per *L. monocytogenes*, molto probabilmente patogena.

Se nelle successive fasi produttive si dovranno applicare metodologie tendenti alla riduzione del rischio di contaminazione e all'abbattimento delle cariche batteriche per avere tipologie di alimenti che rispettino i criteri microbiologici; non si dovrebbe sottovalutare la possibilità che a livello di consumatore finale si tengano comportamenti, sia a livello di conservazione che di preparazione, che consentono la replicazione di *L. monocytogenes*, e magari proprio di ceppi così pericolosi.

Bibliografia

- **Cantoni C., Arcidiacono M., Stella S.**, Localizzazione di *Listeria monocytogenes* in macelli per suini, *Industrie Alimentari*, XLI, 2002, 17-24
- **Cotter P.D. Gahan C.G.M., Hill C.**, A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid, *Molecular microbiology*, 2001, 40, 2, 465-475
- **Decreto Legislativo 4 aprile 2006, n. 191**, “Attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti di zoonotici”, *Gazzetta Ufficiale* n. 119, 24 maggio 2006
- **Direttiva 2003/99 CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003**, sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio, *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, 12/12/2003, Serie L, 325/331
- **Doumith M., Cazalet C., Simoes N., Frangeul L., Jacquet C., Kunst F., Martin P., Cossart P., Glaser P., Buchrieser C.** 2004. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infection and Immunity* 72, 1072-83.
- **Dussurget O., Pizarro-Cerda J., Cossart P.**, Molecular Determinants of *Listeria monocytogenes* virulence, *Annual Review of Microbiology*, 2004, 58, 587-610
- **European Food Safety Authority (EFSA)**, The Community Summary Report of Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005, *The EFSA Journal* (2006), 94 (<http://www.efsa.europa.eu/it.html>)
- **European Food Safety Authority (EFSA)**, The Community Summary Report of Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and

Antimicrobial Resistance in the European Union in 2004, The EFSA Journal, (2005), 310 (<http://www.efsa.europa.eu/it.html>)

- **Gahan C.G.M., Hill C.**, Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection, A Review, Journal of Applied Microbiology, 2005, 98, 1345-1353
- **Gualandi G.**, Listeria, Cap.22, in Trattato di Malattie Infettive degli animali – seconda edizione, a cura di Renato Farina, Franco Scamozza, UTET, 2004, Torino, 285-293
- **Jallewar P.K., Kalorey D.R., Kurkure N.V., Pande V.V., Barbuddhe S.B.** 2007. Genotypic characterization of *Listeria* spp. isolated from fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology* 114, 120-3
- **International Standard - ISO 11290-1/amd1**, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method, First edition 15-12-1996
- **International Standard - ISO 11290-2/amd1**, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Enumeration method, First edition 01-07-1998
- **Istituto Superiore di Sanità** – EpiCentro, Argomenti di Salute, Listeria, (<http://www.epicentro.iss.it/problemi/listeria/listeria.htm>)
- **Kaur S.**, *Listeria monocytogenes* in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103, 1889-1896
- **Ministero della Salute**, Dati del bollettino epidemiologico in linea, (<http://www.ministerosalute.it/promozione/malattie/datidefcons.jsp>)
- **Organisation Mondiale de la Santé Animal (OIE)**, (http://www.oie.int/fr/normes/nmanual/a_summry.htm) *L. monocytogenes*, Chapter 2.10.14, in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2004
- **Poli G., Cocilova A.**, Microbiologia e immunologia veterinaria, UTET Torino, 2001, 261-262

- **Rizzo Caterina, Luzzi Ida, Caprioli Alfredo, Ciofi degli Atti Marta Luisa**, Disamina dei dati nazionali disponibili in materia di zoonosi, con particolare attenzione ai focolai di tossinfezione alimentare (TA), (http://www.epicentro.iss.it/temi/veterinaria/pdf/zoonosi_tossinf.pdf)
- **Southwick F.S., Purich D.L.**, Intracellular pathogenesis of listeriosis, The New England Journal of Medicine, 1996, Vol. 334, No. 12, 770-776
- **Vázquez-Boland J.A.**, Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal, Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J., *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants Clinical Microbiology Reviews, 2001, Vol. 14, No. 3, 584-640