



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

Listeria monocytogenes: meccanismi molecolari del processo d'infezione

Listeria monocytogenes: molecular mechanisms of the infection process

Tesi di Laurea di:
Giulia Ravicini

Sessione Autunnale (Dicembre 2024)

Anno Accademico 2023/2024

Relatore:
Prof.ssa Carla Vignaroli

Listeria monocytogenes



- Batterio patogeno Gram +
- Morfologia bastoncellare
- Flagelli peritrichi
- Ubiquitario
- Anaerobio facoltativo
- Psicrotrofo
- Termoresistente

LISTERIOSI

Con il termine «listeriosi» intendiamo una **malattia infettiva** causata dal batterio *Listeria monocytogenes* e può interessare sia l'uomo sia numerose specie di animali.

- Classificata tra le **tossinfezioni alimentari**, in quanto contratta soprattutto attraverso l'ingestione di cibo contaminato (in particolare ortaggi crudi, latticini, carne poco cotta).
- Condizioni quali cancro, trapianti d'organo, terapie immunosoppressive e infezioni da HIV che indeboliscono la risposta immunitaria, predispongono ad una maggiore suscettibilità.
- Le **categorie maggiormente a rischio** sono: soggetti immunocompromessi, anziani, neonati e donne in gravidanza.
- Può manifestarsi sotto varie **forme cliniche**:

Forma lieve (non invasiva)

Definita dai sintomi caratteristici di una **gastroenterite acuta febbrile**; si manifesta dopo poche ore dall'ingestione ed è autolimitante nei soggetti sani.

Forma sistemica (invasiva)

Si manifesta nel momento in cui il batterio attraversa la mucosa intestinale e **diffonde mediante il flusso sanguigno verso gli organi bersaglio**.

- A seguito della prima epidemia alimentare verificatasi in Canada nel 1980, diversi alimenti sono stati coinvolti in focolai di piccole e grandi dimensioni. Studi di casi sporadici di listeriosi, in assenza di forme epidemiche, riportano diversi prodotti alimentari, tra cui salumi e alimenti di tipo gastronomico, implicati nello sviluppo di listeriosi invasive sporadiche nell'uomo. Le attuali conoscenze sulla listeriosi umana suggeriscono che l'ingestione di piccole quantità di *Listeria monocytogenes* si verifica frequentemente nelle popolazioni umane (in uno studio prospettico è stato stimato un tasso di 5-9 esposizioni per persona/anno).
- Il tasso annuale di listeriosi sporadica in Europa e Nord America è solitamente $< 1/100.000$ abitanti all'anno.

Dairy products	Fruits and vegetables	Meat products	Fish products
Pasteurized whole milk	Coleslaw (cabbage)	Delicatessen foods (deli meats)	Tuna salad
Chocolate milk	Lettuce	Pâté	Smoked fish
Mexican-style cheese	Corn	Uncooked hot dogs	Shrimp salad
Soft cheese (different types)	Rice salad	Turkey franks	
Hard cheese	Strawberries	"Rillettes"	
Goat cheese	Cantaloupes	Pork tongue in aspic	
Ice cream	Nectarines	Pork pie	
Fresh cream	Salted mushrooms	Beef	
	Alfalfa tablets	Jellied pork	
	Apples	Cooked ham	
	Blueberries	Foie gras	
	Stone fruit	Ox tongue	
	Sprouts	Undercooked chicken	

Tabella 1: Alcuni alimenti implicati nella listeriosi alimentare.

MANIFESTAZIONI CLINICHE

INFEZIONE SISTEMA NERVOSO	<p>Meningite batterica subacuta: febbre, cefalea, rigidità del collo.</p> <p>Romboencefalite: febbre, nausea, disfunzioni cerebrali (atassia).</p>
LISTERIOSI IN GRAVIDANZA	<p>Listeriosi neonatale a esordio precoce: prematurità, sepsi, eruzione cutanea maculo papulare diffusa, ittero; <u>tasso di mortalità elevato</u>.</p> <p>Listeriosi neonatale a esordio tardivo: associata principalmente a meningite.</p>
GASTROENTERITE	<p>Sintomi gastrointestinali (dolore addominale o diarrea), febbre, affaticamento, brividi e mialgie si manifestano tipicamente 24h dopo esposizione alla fonte d'infezione.</p>
EPATITE	<p>Insorgenza acuta di febbre e ittero. I fattori predisponenti includono: cirrosi e trapianto di fegato; <u>tasso di mortalità del 50%</u>.</p> <p>Inoltre, la <u>resistenza del batterio alla bile</u> può avere un ruolo nella patogenesi della malattia biliare.</p>
SEPSI	<p>Sintomi aspecifici che di solito includono febbre e brividi.</p> <p>Particolarmente riscontrata in pazienti affetti da neoplasie, trapianti d'organo o altri stati di immunocompromissione.</p>

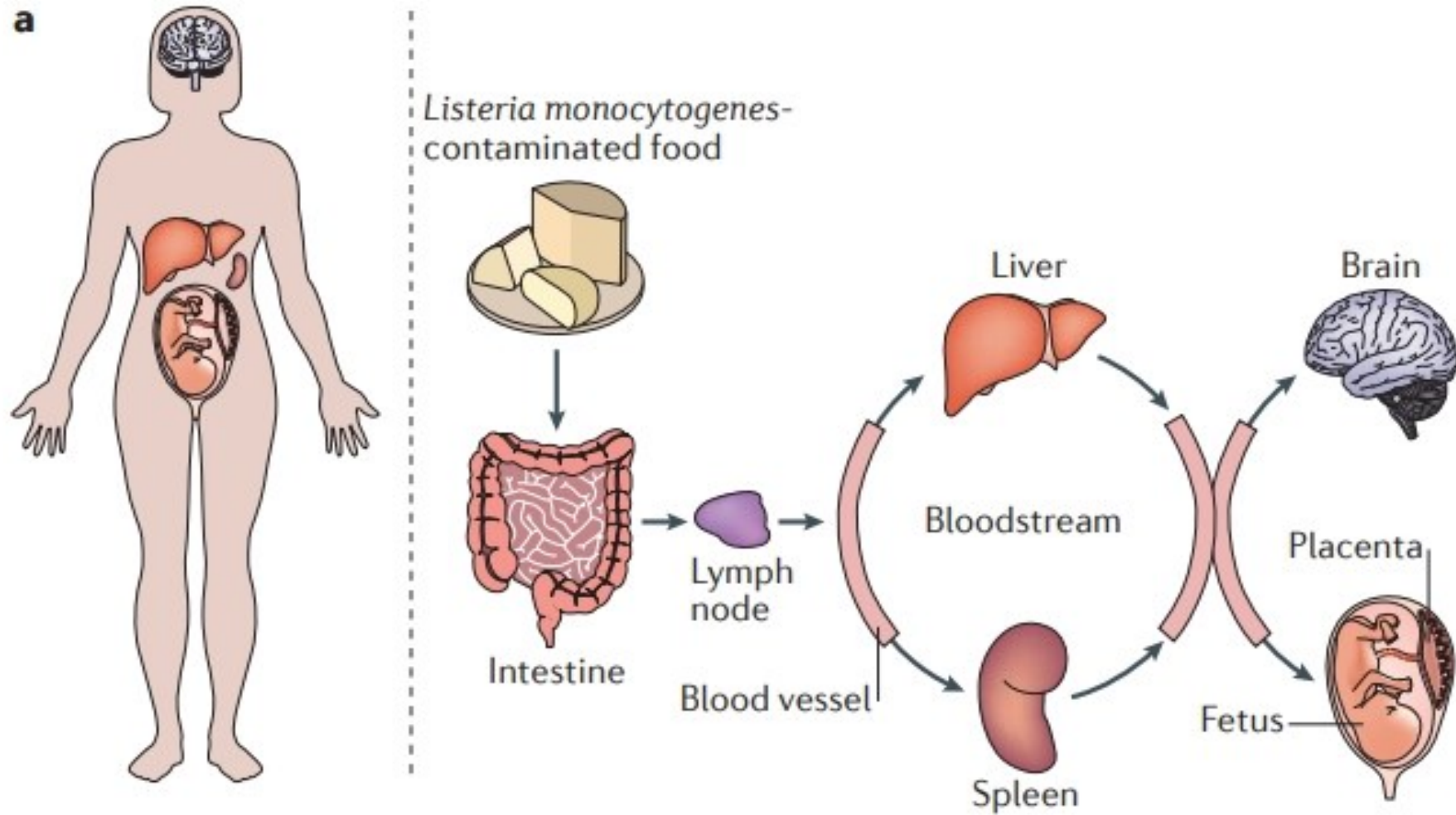


Figura 2: Schema dell'infezione da *Listeria monocytogenes* in un ospite umano.

PATOGENESI

- Uno dei tratti distintivi del batterio *Listeria monocytogenes* è la capacità di invadere cellule non-fagocitiche, come le cellule epiteliali, grazie ad un meccanismo di endocitosi mediata da recettore.
- I meccanismi di invasione cellulare sono indotti da potenti **fattori di virulenza**:

- INTERNALINE (InlA e InlB)
- LISTERIOLISINA O (LLO)
- FOSFOLIPASI C (plcA e plcB)
- ActA («Actin assembly-inducing protein»)

L'attività dei fattori di virulenza è co-regolata da una singola proteina: **PrfA** («**P**ositive **R**egulatory **F**actor **A**»)

1. INGRESSO NELLA CELLULA OSPITE

- Mediato dalle proteine **InIA** e **InIB**, membri di una famiglia di 25 proteine chiamate «Internaline», localizzate sulla superficie cellulare. In particolare, nelle cellule non-fagocitiche, InIA si lega al rispettivo recettore di membrana (**E-Caderina**) inducendo il «clustering», la fosforilazione e l'ubiquitinazione (aggiunta di monomeri di ubiquitina) di quest'ultimo.
- L'invasività è correlata ad un meccanismo di tipo «Zipper» («**meccanismo a cerniera**») attraverso cui il batterio provoca delle modificazioni della membrana cellulare: vengono a formarsi delle estroflessioni, dovute alla riorganizzazione del citoscheletro, che permettono di inglobare la cellula batterica.
- Lo studio dei meccanismi molecolari alla base dell'ingresso di *Listeria monocytogenes* nelle cellule ospiti ha portato alla scoperta di un ulteriore ruolo della **Clatrina**, proteina coinvolta nel meccanismo di invasione cellulare (endocitosi), nel dirigere i riarrangiamenti dell'Actina, necessari per favorire l'ingresso del batterio all'interno della cellula.

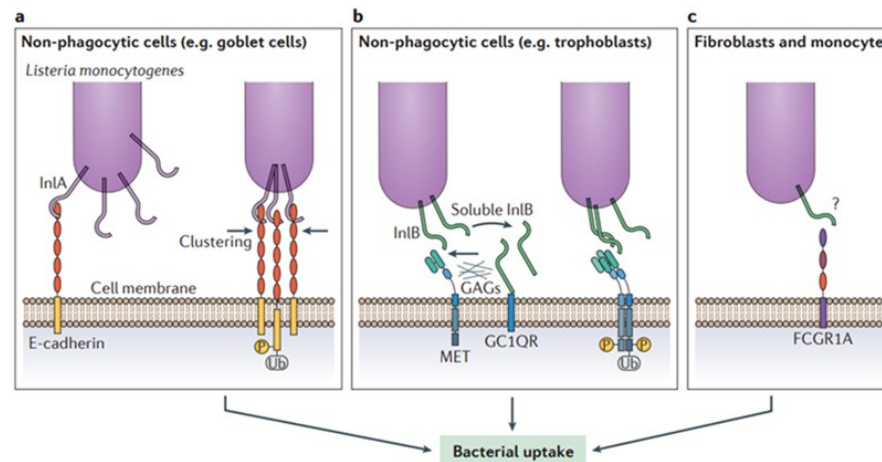


Figura 3: Ingresso di *Listeria monocytogenes* nelle cellule.

2. LISI VACUOLARE

- Una volta internalizzato nel **vacuolo**, il batterio utilizza la **listeriolisina O (LLO)** e due **fosfolipasi C (plcA e plcB)** per indurne la lisi e determinare la «fuga dal vacuolo» → fasi cruciali della patogenesi.

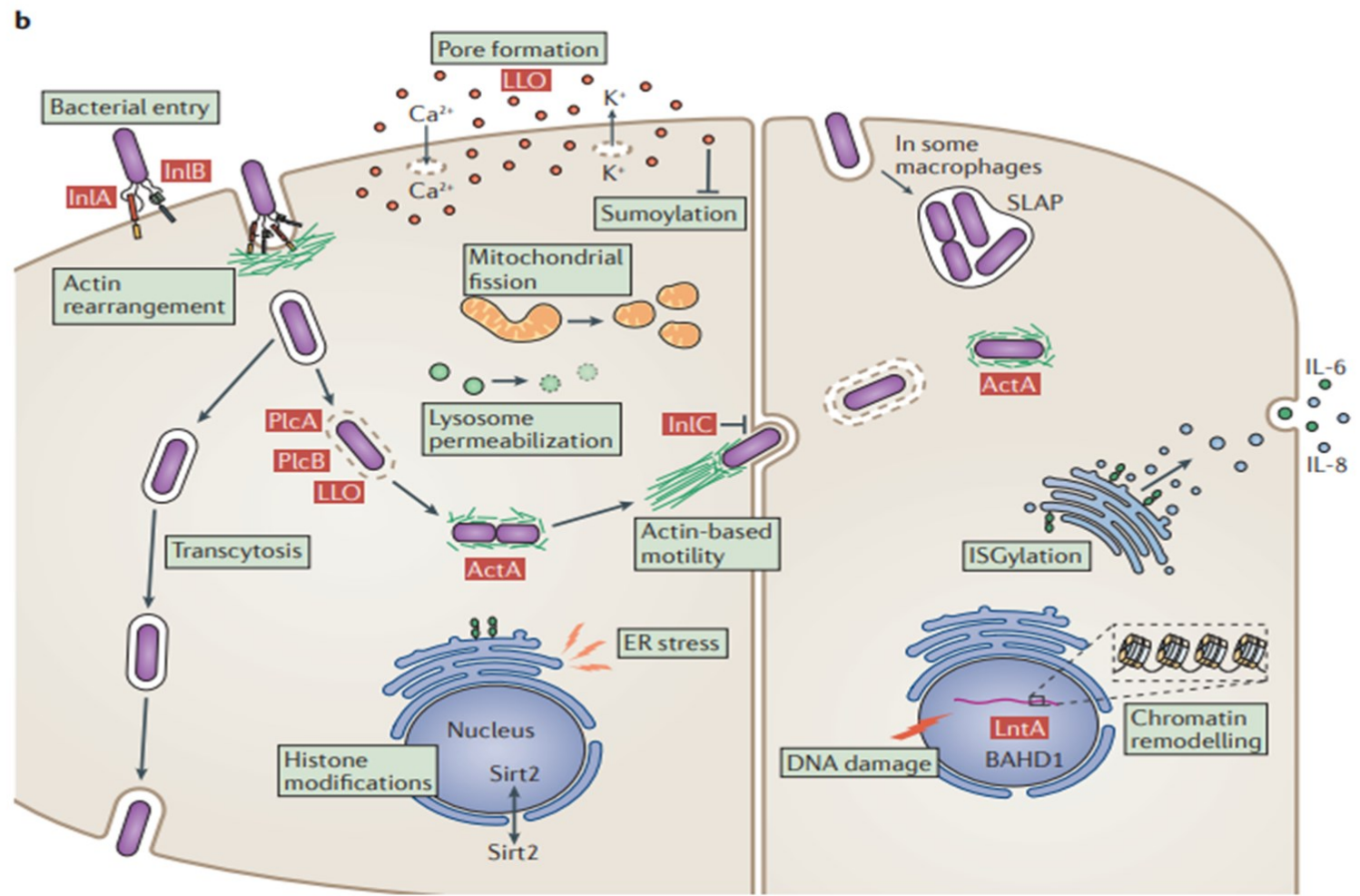


Figura 4: Panoramica dell'infezione da *Listeria monocytogenes*.

3. MOTILITÀ INTRACELLULARE

- Un altro segno distintivo del batterio *Listeria monocytogenes* è la capacità di **polimerizzare l'Actina**.
- **La motilità basata sull'Actina permette al batterio non solo di spostarsi all'interno della cellula ospite ma anche di invadere cellule adiacenti.**
- Questa tipologia di movimento è indotta da una proteina di superficie: **ActA** («Actin assembly-inducing protein»), la quale interagisce con il complesso proteico **ARP2/3** che regola la polimerizzazione dell'Actina (nucleazione) per generare una forza sufficiente, tale da permettere al batterio di muoversi e diffondere da una cellula all'altra.
- Analisi sull'architettura tridimensionale delle «code a cometa» dell'Actina hanno evidenziato l'importanza delle **formine**, proteine necessarie per il mantenimento della stabilità e della lunghezza dei filamenti di Actina, dirigendone la formazione.

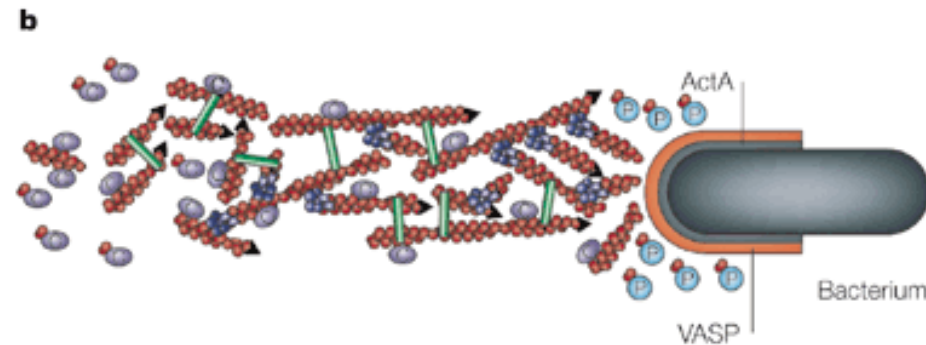


Figura 5: Diagramma dei componenti molecolari necessari per la motilità basata sull'Actina di *Listeria monocytogenes*.

INFEZIONE IN VIVO

- Nell'**intestino**, *Listeria monocytogenes* invade le cellule epiteliali della mucosa intestinale (in particolare enterociti e cellule caliciformi) che presentano sulla loro superficie il recettore E-Caderina. Il legame tra la proteina batterica InlA e il relativo recettore favorisce l'ingresso del batterio, la sua replicazione e diffusione cellulare. La sintomatologia è correlata ad una gastroenterite febbrile acuta che si manifesta nell'arco di 24 ore.
- In seguito alla disseminazione nel sangue, *Listeria monocytogenes* raggiunge i rispettivi organi bersaglio (**fegato e milza**). A livello epatico, le cellule di Kupffer (macrofagi specializzati) fagocitano e distruggono la maggior parte dei batteri patogeni, attivando una risposta immunitaria. Tale risposta non è però risolutiva: permette di ridurre le dimensioni della popolazione batterica, ma non la elimina del tutto. Alcuni batteri, sfuggiti all'azione distruttiva dei macrofagi, raggiungono gli epatociti, dove iniziano a moltiplicarsi, e da questi ultimi possono diffondere nel circolo ematico raggiungendo ulteriori distretti corporei: possono attraversare la barriera placentare nelle donne in gravidanza o quella ematoencefalica (specialmente nei pazienti immunocompromessi).
- A livello del **sistema nervoso centrale**, l'infezione porta all'insorgenza di meningite batterica subacuta o romboencefalite. In quest'ultimo caso, la patologia è accompagnata da disfunzioni cerebellari, tra cui atassia, e il tasso di mortalità è prossimo al 50%.
- Uno studio prospettico condotto in Francia ha evidenziato che più dell'83% dei casi di listeriosi contratta durante la gravidanza ha esiti avversi per il feto: anomalie neurologiche, prematurità o meningite neonatale. L'invasione dello **strato sinciziotrofoblastico placentare** sembra essere promossa dal legame delle proteine batteriche InlA e InlB ai rispettivi recettori E-Caderina e Met. Inoltre, la proteina ActA svolge un ruolo fondamentale nel processo, promuovendo la diffusione del batterio all'interno delle cellule.

TERAPIA ANTIBIOTICA

- *Listeria monocytogenes* è un batterio **sensibile** alla maggior parte degli antibiotici β -lattamici (ad eccezione delle cefalosporine, alle quali il batterio è resistente).
- L'attuale terapia antibiotica prevede una combinazione di **Ampicillina** (antibiotico β -lattamico) e **Gentamicina** (antibiotico aminoglicosidico), il cui sinergismo è sufficiente per il trattamento delle principali forme di listeriosi.

L'Ampicillina non è battericida nei confronti di *Listeria monocytogenes*. Tuttavia, dati *in vitro* e *in vivo* suggeriscono che un effetto additivo o sinergico con la Gentamicina potrebbe migliorare questo risultato.

- Per l'infezione a carico del SNC sono stati suggeriti Desametasone e Fenitoina come possibili coadiuvanti del trattamento.
- Un ulteriore farmaco, Trimetoprim-sulfametossazolo, sembra essere efficace nel proteggere dalle infezioni da *Listeria monocytogenes*, costituendo un regime di trattamento alternativo con o senza l'aggiunta di Rifampicina.
- In uno studio retrospettivo, la combinazione di Amoxicillina e Cotrimoxazolo è risultata più efficace della combinazione Ampicillina-Gentamicina.

CONCLUSIONI

- *Listeria monocytogenes* può essere definito un **patogeno opportunist**a, dal momento che la listeriosi colpisce in particolare soggetti le cui difese sono debilitate, mentre è meno frequente nei soggetti immunocompetenti e in buono stato di salute.
- La diminuzione dell'incidenza della malattia può essere dovuta alla promozione di linee guida per incrementare la consapevolezza del problema, specialmente nell'industria alimentare.
- La Food and Drug Administration (FDA) statunitense ha una politica di tolleranza zero per *Listeria monocytogenes* nei suoi programmi di campionamento industriale. Altri Paesi, invece, hanno adottato linee guida meno severe, consentendo una piccola quantità di contaminazione per trovare un equilibrio tra la protezione della salute pubblica e l'inutile condanna di prodotti alimentari altrimenti commestibili.
- L'isolamento di *Listeria monocytogenes* a partire da campioni alimentari e campioni clinici (sangue e liquido cerebrospinale) può essere effettuato mediante metodiche diverse (es. colorazione di Gram, utilizzo di terreni di coltura selettivi). I nuovi terreni cromogenici possono offrire alcuni vantaggi nell'individuazione di alimenti contaminati.
- La listeriosi può essere trattata attraverso l'utilizzo di antibiotici specifici, quali Ampicillina e Gentamicina, spesso combinati.

RIASSUNTO ESTESO

Listeria monocytogenes è un patogeno alimentare responsabile di una malattia infettiva chiamata «listeriosi», potenzialmente letale nei soggetti immunocompromessi. La prima epidemia si verificò in Canada nel 1980 e, successivamente, molti alimenti furono coinvolti in focolai di piccole e grandi dimensioni. La sintomatologia associata all'infezione può variare da una forma più lieve, simil-influenzale, ad una forma più severa che si osserva in particolar modo nei soggetti immunocompromessi, nei quali, anche bassi livelli di contaminazione possono portare a sepsi, meningite, romboencefalite e complicazioni durante la gravidanza.

In seguito all'ingestione di alimenti contaminati da parte dell'ospite, il batterio invade le cellule epiteliali e, grazie a potenti fattori di virulenza, induce una serie di cambiamenti nella fisiologia cellulare. Inoltre, la particolare modalità di movimento basata sull'Actina permette al batterio non solo di spostarsi all'interno della cellula ospite (motilità intracellulare) ma anche di diffondersi da una cellula all'altra (motilità intercellulare). Studi recenti hanno evidenziato una nuova classe di fattori di virulenza chiamati «nucleomoduline», secreti dal batterio nel citoplasma della cellula ospite, che possono raggiungere il nucleo e alterare lo stato della cromatina.

Determinate caratteristiche come l'adattabilità, la capacità di attraversare le barriere dell'ospite e uno stile di vita intracellulare unico, hanno permesso di impiegare *Listeria monocytogenes* come modello di studio della regolazione batterica, delle interazioni ospite-patogeno e, più recentemente, delle interazioni con il microbiota intestinale.

La terapia attualmente utilizzata per il trattamento della listeriosi è una combinazione di Ampicillina e Gentamicina (antibiotici a cui il batterio è sensibile).

BIBLIOGRAFIA

- Schleich WF. 2019. Epidemiology and Clinical Manifestations of *Listeria monocytogenes* Infection. *Microbiol Spectrum* 7(3):GPP3-0014-2018. doi:10.1128/microbiolspec. GPP3-0014-2018
- Radoshevich, L., Cossart, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 16, 32–46 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>
- Figura 1: <https://stock.adobe.com/search/images?k=%22listeria+monocytogenes%22>
- Tabella 1: <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0014-2018>
- Figura 2-3-4: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>
- Figura 5: <https://www.nature.com/articles/35040061>
- <https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/listeria-monocytogenes/>
- <https://www.microbiologiaitalia.it/patologia/listeriosi/>
- «Cell biology and infection»: <https://youtu.be/HwnUgqZ7Y74>

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!