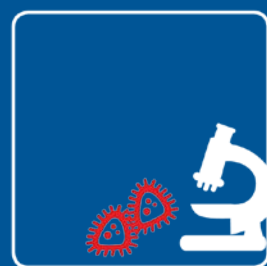


Nye strategier til vurdering af virulenspotentialiet af fødevarebårne patogener bestemt ved kvantitative gen-analyser (GeneQuant)





Skema 6

Slutrapport
for forskningsprojekt finansieret af
tilskudsbevillinger under
§24.33.02.10, § 24.33.02.30 og § 24.33.02.40

-
- 1. Forskningsprogram:** Fødevarerforskningsprogrammet
-
- 2. Journal nr.:** 3304-FVFP-09-F-013-1
-
- 3. Projekttitel:** Nye strategier til vurdering af virulenspotentialet af fødevarerbårne patogener bestem ved kvantitative gen-analyser (GeneQuant)
-
- 4. Projektets startår:** April 2010 **Projektets slutår:** December 2014
-
- 5. Projektleder** (*titel, navn, adresse, tlf., fax. og e-mail*)
- Prof. Lene Jespersen, Rolighedsvej 26, 1958 Frederiksberg C, tlf +45 35333230 , fax: +45 35333513, e-mail:lj@food.ku.dk
-
- 6. Deltagende institutioner:** (*navn, adresse, tlf., fax., og e-mail*)
- Institut for Fødevarervidenskab (IFV), Department of Food Science (FOOD), Det Natur og Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, Rolighedsvej 26, 1958 Frederiksberg C, tlf +4535 33 32 30, fax +45 35 33 35 13, e-mail: lj@food.ku.dk
- Institut for Veterinær Sygdomsbiologi (IVS), Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet (SUND), Københavns Universitet, Grønnegårdsvej 15, 1870 Frederiksberg C, Tlf: +45 35 33 27 73, e-mail:hi@sund.ku.dk
-
- 7. Kontaktpersoner:** (*titel, navn, adresse, tlf., fax., og e-mail. Der er udpeget én kontaktperson for hver deltagende institution*)
- Prof. Lene Jespersen, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, Tlf.: +45 35333230, fax: +45 35333513, e-mail: lj@ life.ku.dk
-

8. Øvrige projektmedarbejdere: (titel, navn, adresse, tlf., fax., og e-mail)

Line Thorsen (1/3 postdoc), Institut for Fødevarevidenskab, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C. Tlf.: 35333284, E-mail: lith@life.dk.dk

Nadja Larsen (2/3 postdoc i 1 år), Institut for Fødevarevidenskab, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C. Tlf.: 35333235, E-mail: nf@life.dk.dk

Ph.d.studerende Ida Bjerrum-Bohr, Institut for Fødevarevidenskab, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C. Tlf.: 35331039, E-mail: ijb@life.ku.dk

Pernille Johansen (videskabelig assistent 30 timer /uge). Institut for Fødevarevidenskab, Københavns Universitet, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C. Tlf.: 35320271, E-mail: pernillejohansen@food.dk.dk

Ph.d. studerende Dafni Katerina Paspaliari, Institut for Sygdomsbiologi, Københavns Universitet, Stigbøjlen 4, 1870 Frederiksberg C. Tlf.: 35332758, E-mail: dpas@life.ku.dk

Post doc Jette Kjeldgaard, Institut for Sygdomsbiologi, Københavns Universitet, Stigbøjlen 4, 1870 Frederiksberg C. Tlf.: 35 33 27 02, E-mail: jekje@sund.ku.dk

Ikke financerede:

Professor Hanne Ingmer, Institut for Sygdomsbiologi, Københavns Universitet, Stigbøjlen 4, 1870 Frederiksberg C. Tlf.: 35 33 27 73, E-mail: hi@sund.ku.dk

Lektor Marianne Halberg Larsen, Institut for Sygdomsbiologi, Københavns Universitet, Stigbøjlen 4, 1870 Frederiksberg C. Tlf.: 35 33 27 19, E-mail: mhl@sund.ku.dk

9. Slutrapport:

Projektets hovedformål: (*Fra ansøgning*) Formålet med GeneQuant er at udvikle nye metoder til forudsigelse af virulenspotentialer af den sygdomsfremkaldende bakterie *Listeria monocytogenes*. Resultaterne vil blive opnået ved brug af eksisterende molekylærbiologiske metoder, kommercielt tilgængelige microarrays, in vitro modeller i mave-tarm kanalen, eksisterende virulensassays (funktionel cellemodeller og infektionsmodeller med insekter) og prædiktive matematiske modeller. En forudsætning for at udvikle disse nye strategiske teknologier til forudsigelse af virulenspotentialer af fødevarebårne patogener er en grundig undersøgelse af, hvordan industrielt relevante mikrobielle stress-faktorer (fx salt, organiske syrer, lav pH, lav temperatur, begrænsede ilt forhold osv.) får indflydelse på transskriptionen af gener relateret til stress respons, adhæsion og virulens, samt at forstå de transkriptionelle ændringer af disse gener og deres relaterede proteiner ved passage af mavetarm kanalen. Det forventes, at de nye teknologier vil understøtte og i sidste ende erstatte konventionelle og omstændelige mikrobiologiske metoder, som i øjeblikket overvejende er baseret på antallet af levedygtige bakterieceller. GeneQuant vil især implementere og sikre fødevarerisikoen i dansk mejeribrug med råmælksost som eksempel. Det forventes, at de nye metoder kan overføres til andre sektorer af fødevareindustrien til at forbedre risikovurderingsprocedurer.

A Projektets forløb:

Resumé på dansk og engelsk af projektets hovedresultater og -konklusioner

Dansk: Virulenspotentialer af *Listeria monocytogenes* blev undersøgt i forhold til mejerirelevante faktorer, herunder, den naturlige ostemikroflora, mælkesyre og NaCl indhold. Virulenspotentialer blev vurderet ud fra, om *L. monocytogenes* vækst og ekspresionen af udvalgte virulensgener, blev påvirket af de nævnte faktorer. Der er udført screening af 58 *L. monocytogenes* stammer for lineage type, kitinolyse, hæmolyse, samt tilstedeværelse af listeriolysin genet. Den hæmolytiske aktivitet var afhængig af lineages type, således at lineage I stammer var mindre hæmolytiske end lineage II stammer.

Mælkesyre findes i høje koncentrationer i ost og er påvist at have en hæmmende effekt på vækst af *L. monocytogenes*. Ekspresionen af virulensgener blev påvirket i *L. monocytogenes* stammerne under vækst i BHI medie tilsat mælkesyre (0-20 mM), og der blev observeret forskelle mellem stammerne. Højere koncentration af mælkesyre medførte induktion af genet *clpC* og hæmning af *prfA* ved flere prøveudtagningspunkter. Det blev desuden vist at stamme 15675 var saltresistent og stamme 51779 var saltfølsom. Betydning af miljøets saltindhold på ekspresion af 12 virulensrelaterede gener blev undersøgt ved dyrkning af *L. monocytogenes* 51779 og 15675 på overfladen af Samsø ost uden saltning og ved normal saltning (0.15 og 3.6% w/w NaCl). Signifikante ændringer sås mere tydeligt på ost uden saltning, hvor transskription af generne *agrA*, *ami*, *gadC* og *opuC* blev reduceret markant i begge stammer. Stammen 51779 responderede i højere grad på osmotisk stress og viste opregulering af generne *prfA*, *hly*, *act* og *bsh* i modsætning til 15675. Disse resultater tyder på, at der er en sammenhæng mellem saltindhold, transskription af virulensgener og salttolerance hos *L. monocytogenes*. Resistens overfor saltstress vil gøre det lettere for stammen 15675 at kolonisere ost og forarbejdningstilbud. Samtidigt, indikerer den øgede ekspresion af virulensgener i stammen 51779, at saltstress i ostproduktion kan fremme frigivelsen af virulensfaktorer og dermed øge dens virulens i mennesker. Virulensfaktorerne *prfA*, *hly*, *plcA* og *inlA* hos *L. monocytogenes* blev ikke påvirket, hvis *L. monocytogenes* stammerne blev eksponeret for 26 mælkesyrebakterier og gær, isoleret fra kit fra overflademodnede oste eller deres metabolitter.

In vitro og *in vivo* modeller blev udviklet og afprøvet til at vurdere *L. monocytogenes* virulens. Én *in vitro* mave-tarm model var baseret på måling af transepitheliel elektrisk modstand (TEER) af inficerede Caco-2 celler. Ved brug af modellen blev det vist at eksponering til mælkesyre kan påvirke overlevelse af *L. monocytogenes* og integriteten af Caco-2 celler. En anden *in vitro* mave-tarm model blev udviklet til at studere ændringer i intracellulær pH (pHi) i enkelte *L. monocytogenes* celler, ved brug af fluorescence ratio imaging microscopy (FRIM). I modellen blev bakterieceller indfarvet med det fluorescerende farvestof, CDCFDA-se, og skyllet med medie svarende til spyt og mavesaft. FRIM målinger for *L. monocytogenes* bekræftede, at der er en sammenhæng mellem stammernes tolerance overfor salt og deres umiddelbare cellerespons. Ved brug af CellASIC® ONIX Microfluidic anaerobe flowkammer i modellen var det muligt at måle emissioner fra mere end 40 celler over hele forsøget. Endvidere, blev en *in vivo* ormemodel baseret på *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) implementeret for at studere *L. monocytogenes* virulens. Forsøgene har vist at *L. monocytogenes* kan kolonisere og opretholde kolonisering af *C. elegans*. Det blev påvist at virulensfaktorerne, kitinaserne ChiA og ChiB, har betydning for kolonisering af *C. elegans*. Kitinaserne kan være relevante for virulenspotentialer for *L. monocytogenes*, da de induceres af N-acetylglucosamin (GlcNAc) som findes i oste. Det kitinolytiske system hos *L. monocytogenes* er vist at have betydning for både virulens, overlevelse og spredning i miljøet. Teknikkerne og modellerne udviklet under GeneQuant vil muliggøre at mejeriindustrien kan forudsige vækst og virulens af relevante patogener, såsom *L.*

monocytogenes. Den viden som er opnået i GeneQuant vil specifikt kunne bidrage til udviklingen af en øget fødevarer sikkerhed og et risikovurderingsprogram.

English: The objective of GeneQuant was to investigate the effect of dairy factors such as starter cultures, lactic acid and sodium chloride (NaCl) on the virulence potential of *Listeria monocytogenes*. Virulence potential of *L. monocytogenes* was determined from the expression profiles of selected virulence genes as affected by the factors mentioned above. A collection of 58 *L. monocytogenes* strains was characterised for hemolysis, chitinolysis, listeriolysin gene and lineage type. It was observed that hemolytic activity of lineage I strains was less than of lineage II strains.

Lactic acid is produced by the natural cheese flora and is known to inhibit the growth of *L. monocytogenes*. Expression of virulence genes in *L. monocytogenes* strains 51779 and 15675 in BHI medium was affected by treatment with lactic acid (0-20 mM). Exposure to high concentrations of lactic acid resulted in induction of *clpC* and repression of *prfA* at several sampling points, depending on the strain. The same strains of *L. monocytogenes* were characterized by different tolerance to sodium chloride, as more salt resistant strain 15675 and less salt resistant strain 51779. The impact of osmotic stress on expression of 12 virulence genes was determined by qPCR during incubation of *L. monocytogenes* on cheese type Samsøe with low and high content of NaCl (0.15 and 3.6% (w/w)). Decreased transcription of *agrA*, *ami*, *gadC* and *opuC* in both strains was promoted by low NaCl content. Strain 51779 was most responsive, showing significant up-regulation of *prfA*, *actA*, *hly* and *bsh* at both conditions. Strain 15675 was less responsive, showing generally reduced or consistent gene transcription. The study indicated that virulence gene expression of *L. monocytogenes* in cheese was affected by NaCl content and that the effect was significant in strains sensitive to osmotic stresses. Different sensitivity to osmotic stress is probably linked to strains serotypes and suggests that the more resistant strain 15675 (serotype 4b) will more easily colonize cheese and processing environments. Increased expression of virulence genes in strain 51779 indicated that certain stress conditions might promote the release of virulence factors and consequently, stimulate the virulence power of *L. monocytogenes* in the human body. The study of 26 lactic acid bacteria and yeast strains isolated from cheese smear in this project did not show any significant effects of cheese flora and their metabolites on expression of virulence genes *prfA*, *hly*, *plcA* and *inlA* in *L. monocytogenes*.

In vitro and *in vivo* models were developed in the project to evaluate the virulence of *L. monocytogenes*. One of the gastro-intestinal (GI) models was based on the transepithelial electrical resistance (TEER) across the monolag of Caco-2 intestinal cells. It was demonstrated that exposure of listeria to lactic acid influenced bacterial survival and integrity of the Caco-2 cell barrier. Another *in vitro* GI model was developed to study survival of single cells by measurements of intracellular pH (pHi) with the use of fluorescence ratio imaging microscopy (FRIM). In the model the cells were stained with fluorescent color CDCFDA-se and treated with saliva and stomach juices. FRIM measurements of *L. monocytogenes* confirmed the relationship between strain salt sensitivity to osmotic stresses and cell pHi responses. With the use of CellASIC® ONIX Microfluidic Platform it was possible follow more than 40 cells throughout the experiment. Furthermore, *in vivo* model to study *L. monocytogenes* virulence based on nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) was implemented in the project. *L. monocytogenes* was able to colonize and maintain colonization of *C. elegans*. It was further confirmed that the virulence factors, chitinases ChiA and ChiB, were essential for *C. elegans* colonization. Chitinases are considered as important markers of virulence potential of *L. monocytogenes* in cheese, as they can be induced by N-acetylglucosamin (GlcNAc) found in cheeses. The techniques and models developed in GeneQuant will enable the dairy industry of predicting growth and virulence of relevant pathogens, such as *L. monocytogenes*, in dairy matrices, thus, contributing to the reliable assessment of food safety.

Diskussion af projektets forløb samt opnåede resultater

- **En vurdering af fremdrift i forhold til de oprindeligt opstillede milepæle samt opnåelsen af det oprindelige formål.**

WP1, M1.1: Der er blevet etableret en større stammesamling på 58 *L. monocytogenes* stammer som inkluderede mejeri stammer, stammer fra andre fødevarer og miljøet, samt kliniske- og reference stammer. Stammerne blev karakteriseret for hæmolyse, kitinolyse, tilstedeværelse af listeriolysin genet og lineage type. Denne milepæl blev opnået ifølge projektplanen.

WP2, M2.1: Kontakt til partnere på Food Science Department på University of Turino (UNITO, Italy) blev etableret, som følge af tidligere samarbejde i PatogenCombat. Denne forskningsgruppe (Luca Coccolin) har ekspertise i gentransskriptions analyser. Denne milepæl er opnået ifølge projektplanen.

WP2, M2.2 Da Congen (Berlin Germany) ikke længere arbejder på udvikling af listeria-specifikke microarrays (SureArray), var der ikke videnskabelig basis i projektet for at udføre mikroarray analyser. Gentransskriptionsanalyser er blevet udført på udvalgte virulensgener ved brug af real time qPCR. Milepælen er opnået ifølge projektplanen.

WP2, M2.3: Flere forskellige metoder til RNA ekstraktion fra ostematrixer blev afprøvet. Metoden som kan bruges til at ekstrahere RNA af tilstrækkelig kvalitet fra *L. monocytogenes*, dyrket på ost, er udviklet og implementeret. Metoden inkluderede mekanisk destruktion af osteprøverne ved brug af "bead beating" i Trizol reagent efterfulgt af flere trin til RNA oprensning i organiske stoffer og RNeasy mini kit (Qiagen). RNA kvaliteten blev vurderet egnet til brug i qPCR analyser. Milepælen er opnået med forsinkelse.

WP3, M3.1: Standardisering af metode til at måle intracellulær pH i enkelte mikrobielle celler ved fluorescence ratio imaging microscopy (FRIM) til *L. monocytogenes* ved passage af mave-tarm model er udført og M3.1 opnået. Metoden er dog yderligere optimeret, da det i forbindelse med anvendelsen af *in vitro* mave-tarm modellen viste sig at reproducerbarheden var lav og bakterier blev skyllet ud af systemet pga. dårlig fastholdelse til overfladen. Den optimerede *in vitro* mave-tarm model blev anvendt til forsøg uden mejerirelevante stressfaktorer til at vurdere overlevelsesevnen for enkeltceller af tre *L. monocytogenes* stammer, og viste sig egnet til at måle celleresponset for enkeltceller under påvirkning af mavetarm væsker. Denne milepæl er opnået med forsinkelse.

WP3, M3.2: Etablering af 2-D gel elektroforese metode for udvalgte proteiner var ikke relevant fordi mikroarray studiet ikke blev gennemført. Milepælen blev således udgået.

WP3, M3.3: Der er etableret funktionelle cellemodeller til brug i projektet. Cellelinjerne der anvendes er Caco-2 (differentierende tarm cellelinje) og HT29-MTX (mucinproducerende). Caco-2 cellerne er yderligere blevet anvendt i en mave-tarm model. Denne milepæl er opnået ifølge projektplanen.

WP3, M3.4: På baggrund af udførte forsøg, har vi konkluderet at *G. mellonella* ikke er et velegnet modelsystem til at vurdere effekt af mejerirelevante stressfaktorer på *L. monocytogenes* virulens. *C. elegans* er blevet undersøgt og etableret som en alternativ virulensmodel for *L. monocytogenes*. Milepælen er opnået ifølge projektplanen.

WP4, M4.4: Identifikation af matematiske modeller til evaluering af virulenspotentiale var vanskeligt at gennemføre. Dette skyldtes fravær af den PhD studerende pga. barsel frem til oktober 2013, hvorefter hun stoppede fra januar 2014. Denne milepæl måtte derfor udgå.

- **Skematisk oversigt over milepæle. Ændringer i forhold til oprindelige planer angives**

Skemaet med projektets milepæler er vist bagest i rapporten (side 12).

- **En vurdering af resultaternes aktuelle anvendelighed og resultaternes fremtidige perspektiver, herunder i relation til miljø, dyrevelfærd samt arbejdsmiljø.**

I GeneQuant er der opnået kendskab til de faktorer, som påvirker virulenspotentialet hos *L. monocytogenes* under mejeri-relevante forhold. Der er endvidere udviklet effektive metoder til bestemmelse af virulensen hos *L. monocytogenes*. Den opnåede viden gør det muligt at klarlægge smitteveje i ostemejerier og dermed specifikt bidrage til en forbedret risikovurdering, en øget fødevarer sikkerhed og bedre arbejdsmiljø på mejerierne.

- **En vurdering af resultaternes eventuelle erhvervsmæssige potentiale, herunder innovation m.v. og eventuelle bidrag til en positiv samfundsøkonomi.**

I GeneQuant er der blevet udviklet og etableret nye molekylærbiologiske teknikker og biologiske modeller, som kan anvendes af fødevarerindustrien til at vurdere virulenspotentialet af *L. monocytogenes* samt at forudsige hvilke miljøfaktorer, der har størst betydning for virulenspotentialet. De molekylærbiologiske teknikker inkluderede oprensning af bakteriel RNA fra ost, hvilket blev brugt til kvantitative bestemmelser af ekspressions-mønstre for virulensgener under påvirkning af mejeri-relevante stressfaktorer såsom lav pH, mælkesyre og natriumklorid. For at vurdere overlevelsen og virulenspotentialet af *L. monocytogenes* ved passagen gennem mave-tarm kanalen blev der udviklet og afprøvet modeller til *in vitro* test (funktionelle mammale cellemodeller samt FRIM baserede *in vitro* modeller) og en *in vivo* infektionsmodel (*C. elegans*). Det forventes at de nye teknikker og modeller udviklet i løbet af projektet vil understøtte og eventuelt erstatte tidligere anvendte og arbejdskrævende mikrobiologiske metoder, som er baseret på levende celler. Teknikkerne og modellerne udviklet under GeneQuant vil endvidere muliggøre at mejeriindustrien kan forudsige vækst og virulens af relevante patogener, såsom *L. monocytogenes*. Det forventes at de udviklede teknikker kan blive tilpasset til andre sygdomsfremkaldende bakterier og til andre sektorer i fødevarerindustrien. For såvel fødevarerindustrien som forbrugerne er det vigtigt at fødevarerprodukter, som udgør en sikkerhedsrisiko, ikke frigives til markedet og at sikre at fødevarerprodukter ikke bliver trukket tilbage.

- **En vurdering af resultaterne, nye kompetencer, m.v. på institutionen, dvs. fastholdelse af projektmedarbejdere, projektet som basis for nye projekter og aktiviteter på institutionen.**

Projektmedarbejderne fik styrket deres kompetencer indenfor molekylærbiologiske metoder og blev kvalificeret til videre ansættelse på KU. Nadja Larsen (NL) var ansat på GeneQuant som PostDoc. NL tog efterfølgende del i ansøgningen om bevilling til BioSyn projekt i Dansk-Brasiliansk strategisk samarbejde indenfor Food Science. Projektet blev bevilget fra Det Strategiske Forskningsråd og NL er ansat på projektet (FOOD, KU). PostDoc Line Thorsen har taget Universitetspædagogikum kurset og blev kvalificeret til adjunkt. Jette Kjeldgaard (JK) var ansat som PostDoc på GeneQuant og fik nye kompetencer indenfor metoden FRIM og cellemærkning. JK blev hermed kvalificeret til fortsat ansættelse (IVS, KU) på projektet 'Bekæmpelse af antibiotika resistens i stafylokokker' bevilget af Advokat Bent Thorberg Fonden. Forskningsassistent Pernille Johansen (PJ) fik opkvalificeret sine kompetencer indenfor udvikling af *in vitro* mave-tarm modeller. PJ er efterfølgende blevet ansat som akademisk medarbejder og PhD studerende på Danida projektet GreenGrowth (FOOD, KU).

Viden og ekspertise opnået i GeneQuant har bidraget til at forbedre undervisningen på flere kurser herunder, "Microbiology of Fermented Food and Beverages" (MSc kursus, Lene Jespersen - kursus ansvarlig), "Food Molecular Biology" (PhD kursus, Inger Olesen - undervisning), "From Gene to Function In Pathogenic Bacteria" (MSc kursus, Dafni Katerina Paspaliari - undervisning) og "Mikrobiel Fødevarerikkerhed" (MSc kursus, Jette Kjeldgaard - undervisning).

• ***En eventuel vurdering af resultaternes anvendelse set i forhold til institutionens myndighedsberedskab.***

Resultaterne som er opnået i projektet, især indenfor studierne af virulensgenekspression, er relevante i forhold til myndighedsberedskab. Det er blevet påvist at virulenspotentialet af den patogene bakterie *L. monocytogenes* er påvirket af miljøfaktorer på mejerier og at denne påvirkning er stammeafhængig. Konventionelle mikrobiologiske analyser til evaluering af fødevarerikkerhed er utilstrækkelige, fordi de er baseret på antallet af bakterieceller og ikke tager virulenspotentialet og biologiske variationer i betragtning. Molekylærbiologiske teknikker og biologiske modeller udviklet i projektet muliggør at mejeriindustrien kan forudsige vækst og virulens samt den fysiologiske tilstand, for forskellige serotyper af *L. monocytogenes*, under påvirkning af mejeri-relevante miljømæssige betingelser. Den opnåede viden vil kunne bidrage specifikt til udviklingen af en ny og forbedret fødevarerikkerhed i mejeriindustrien og forventes at kunne blive tilpasset til andre sygdomsfremkaldende bakterier og i andre sektorer af fødevarerindustrien.

B. Lister over publikationer mm., der er et direkte resultat af projektet:

Artikler i internationalt anerkendte tidsskrifter

Rantsiou, K., Mataragas, M., Jespersen, L. and Cocolin, L. 2011. Understanding the behavior of foodborne pathogens in the food chain: new information for risk assessment analysis. *Trends in Food Science & Technology*. 22:S21-S29.

Frederiksen RF, Paspaliari DK, Larsen T, Storgaard BG, Larsen MH, Ingmer H, Palcic MM, and Leisner JJ. 2013. Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. *Microbiology*. 159:833-47.

Paspaliari DK, Mollerup MS, Kallipolitis BH, Ingmer H and Larsen MH. 2014. Chitinase expression in *Listeria monocytogenes* is positively regulated by the agr system. *PLoS ONE*. Vol. 9, Nr. 4, e95385.

Frederiksen RF, Yoshimura Y, Storgaard BG, Paspaliari DK, Petersen BO, Chen K, Larsen T, Duus JØ, Ingmer H. 2015. A diverse range of bacterial and eukaryotic chitinases hydrolyze the LacdiNAc (GalNAc β 1-4GlcNAc) conjugate that is commonly found on vertebrate and insect cells. *J Biochem*. 290(9):5354-66.

Paspaliari DK, Loose JS, Larsen MH, Vaaje-Kolstad G. 2015. *Listeria monocytogenes* has a functional chitinolytic system and an active lytic polysaccharide monooxygenase. *FEBS J*. 282(5):921-36.

Larsen N, and Jespersen L. 2015. Expression of virulence related genes in *Listeria monocytogenes* grown on the Danish hard cheese as affected by NaCl content. *Foodborne Pathogens and Disease*. Manuscript accepted

Opnåede patenter; Indlæg ved kongresser, symposier o.l.

Bjerrum-Bohr, IJ, Thorsen, L, Christiansen, LE, Jespersen, L. Tolerance of dairy-related *Listeria monocytogenes* strains to lactic acid stress. Poster præsentation og abstract, CMC Symposium, 5. oktober, 2012, København.

Thorsen, L., Ryssel, M., Bjerrum-Bohr, I. J., Lacerda Ramos, C., Freitas Schwan, F., Nielsen, D.S., Jespersen, L. An in vitro gastro-intestinal system for real time monitoring of single cells of *Listeria monocytogenes*. Mundtlig præsentation, poster og abstract, CMC Symposium, 5. oktober, 2012, København.

Bjerrum-Bohr, IJ, Thorsen, L, Christiansen, LE, Jespersen, L. Tolerance of dairy-related *Listeria monocytogenes* strains to lactic acid stress. Poster præsentation og abstract. *Food Micro* 2012, September, 2012, Istanbul, Tyrkiet.

Thorsen, L., Ryssel, M., Bjerrum-Bohr, I. J., Lacerda Ramos, C., Freitas Schwan, F., Nielsen, D.S., Jespersen, L. An in vitro gastro-intestinal system for real time monitoring of

single cells of *Listeria monocytogenes*. Poster præsentation og abstract. Food Micro 2012, September, 2012, Istanbul, Tyrkiet.

Paspaliari DK, Halberg ML and Ingmer H. Hemolytic and chitinolytic activity of *Listeria monocytogenes* isolates. Poster at 6th International Conference on Gram-positive organisms, June 2011.

Thorsen L. Virulenspotentiale af fødevarebårne patogener bestemt ved kvantitative genanalyser. Mundtligt oplæg ved Mejeriforskningens Dag 17. marts 2011 på Hotel Legoland.

Johansen P, Larsen N, Arneborg N and Jespersen L. Effect of acidic and osmotic stress on survival of *Listeria monocytogenes* strains during passage through an in vitro model of the gastrointestinal tract. Poster præsentation og abstract. FOOD MICRO 2014, 1-4. September. Nantes, Frankrig.

Johansen P, Larsen N, Arneborg N and Jespersen L. Effect of acidic and osmotic stress on survival of *Listeria monocytogenes* strains during passage through an in vitro model of the gastrointestinal tract. Mundtlig præsentation, poster og abstract. CMC Symposium, 3. Oktober, 2014, København.

Faglige artikler; Anden formidling. F.eks. mødeindlæg, åbent hus m.m.

Bjerrum-Bohr, I. J., Thorsen, L. and Jespersen, L. 2010. Kvantificering af bakteriers virulens – GeneQuant: metode til kvantificering af patogene bakteriers virulens potentiale. Mælkeritidende, 123, 25-26, 8-10.

Olesen I og Jespersen, L., 2010. Fremtidens fødevarer vil fokusere på bakteriers virulens potentiale. Plus Process 5, s 16-17.

Hansen, Klaus. 2010. Bedre risikovurderinger af *Listeria monocytogenes*. Plus Process 1,2 s. 24.

Planlagte publikationer og artikler. Indsendes løbende, når de er accepteret.

Paspaliari DK, Kastbjerg VG, Ingmer H, Popowskaand P, Larsen MH. 2015. Chitinase expression in *Listeria monocytogenes* depends on lmo0327, encoding an internalin-likeprotein. Intended for Applied and Environmental Microbiology.

Paspaliari DK, Ingmer H, Wagner M, Leisner JJ and Larsen MH. 2015. Differential chitinase activity among *Listeria monocytogenes* isolates. Intended for Applied and Environmental Microbiology.

Redegørelse for forskeruddannelse (ph.d. og post doc.), herunder tilknyttede gæsteforskere og udstationering. Eventuelle afhandlinger vedlægges i ét eksemplar eller eftersendes, når de foreligger.

Dafni K. Paspaliari har gennemgået PhD uddannelsen (3 år) på IVS, KU og fik PhD grad i december 2013. PhD thesis: Investigation of the role and regulation of the chitinolytic system of *Listeria monocytogenes*.

Ida Bjerrum-Bohr har gennemgået PhD uddannelsen (3 år) på FOOD, KU.

Line Thorsen (LT) har gennemgået PostDoc uddannelse på FOOD, KU (2 år). LT har taget Universitetspædagogikum kurset og blev kvalificeret til adjunkt.

Nadja Larsen har gennemgået PostDoc uddannelse på FOOD, KU (2,5 år).

Jette Kjeldgaard har gennemgået PostDoc uddannelsen på IVS, KU (1 år).

Inger Olesen har gennemgået PostDoc uddannelse på FOOD, KU (1 år).

C. Redegørelse for tilknyttede speciale- og bachelorstuderende. Prem Krishnan

Raghupathi: *Listeria monocytogenes*: Study on Virulence Gene Expression.

Master thesis. August 2012.

Redegørelse for nationale og internationale samarbejdsrelationer til offentlige og private forskningsmiljøer, erhverv m.m.

Projektet blev udført i samarbejde mellem Institut for Fødevarevidenskab (FOOD, KU), Institut for Sygdomsbiologi (IVS, KU) og DTU COMPUTE (Institut for Matematik og Computer Science). Der blev holdt jævnlige møder om projektets forløb.

Samarbejdet med Luca Coccolin fra Food Science Department at the University of Turino (UNITO, Italy) blev etableret i forbindelse med EU-projektet PathogenCombat, og samarbejdet er fortsat i GeneQuant. Sammen blev der publiceret en peer-review artikel i "Trends in Food Science & Technology". Der blev holdt gensidige møder i forbindelse med PhD forsvar på de respektive institutioner.

Samarbejdet med Magdalena Popowska fra Department of Applied Microbiology, Institute of Microbiology, University of Warsaw, Poland blev etableret med formålet at identificere faktorer med betydning for chitinase ekspression i WP3.

Samarbejdet med Martin Wagner fra University of Veterinary Medicine, Vienna (Austria) om karakterisering af *Listeria* stammer der kommer fra mejeriindustrien og fra miljøet.

D. Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater

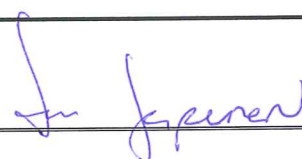
(maks. 10 A4-sider). Se Appendix

Oversigt over projektets samlede finansiering.

	Bevilget tilskud fra NaturErvervs tyrelsen	Forbrug af tilskud fra NaturErvervs tyrelsen	Institutionens med- finansiering	Støtte fra anden side	TOTAL
Lønudgifter	1.492.000	1.604.953	786.890	1.822.709	4.214.553
VIP:	1.492.000	1.604.953	683.857	1.822.709	4.111.519
TAP:			103.034		103.034
Øvrige driftsudgifter	462.000	346.265	0	370.980	717.251
Apparatur			0		
Andet (specificeret)	250.000	234.107	0	82.902	317.010
Direkte udgifter i alt	2.204.000	2.185.325	786.890	2.276.597	5.248.813
Indirekte udgifter (maks. 20 % af direkte udgifter)	942.000	961.543	346.231	455.319	1.763.095
I alt	3.146.000	3.146.869	1.133.123	2.731.916	7.011.908

Eventuelle bemærkninger til regnskabet:

10. Underskrift:

Navn	Institution	Dato	Underskrift
Projektleder: LENE JESPERSEN	KU-FOOD	25/3-2015	

Skema til angivelse af projektets milepæle, slutrapportens punkt B2.

Milepæl	Projekt år																				Status for milepæle	
	År 1/2010				År 2/2011				År 3/2012				År 4/2013				År 5/2014				Opnået	Opgivet
kvartal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
M1.1. Etablering og karakterisering af kultursamling af mejeri og kliniske L. monocytogenes isolater		x																			x	
M2.1. Implementering og etablering af kontakt til partnere og distributører af global gentranskriptions analyser		x																			x	
M2.2 Implementering og etablering af kontakt til partnere og distributører af virulens specifikke microarrays		x																			x	
M2.3. Etablere procedure for ekstraktion af L. monocytogenes RNA fra mælk og ostematricer		x									x										x	
M3.1. Standardisering af metode til måling af FRIM ved passage af L. monocytogenes i mavetarm model.						x													x		x	
M3.2 Etablering af 2D-gel elektroforese metode til udvalgte proteiner							x															x
M3.3 Etablering af Caco-2 og HT29_MTX funktionelle cellemodeller									x												x	
M3.4 Etablering af C. elegans og G. mellonella til at studere interaktioner mellem patogener og probiotiske bakterier						x													x		x	
M4.4. Identifikation af matematiske modeller for vurdering af virulenspotentiale										x												x

Oprindeligt tidspunkt for milepæl markeret med mørkegråt, justeret tidspunkt markeret med lysegråt

Appendix:

D. Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater

Formålet med GeneQuant var at udvikle nye metoder til forudsigelse af virulenspotentialer af den sygdomsfremkaldende bakterie *Listeria monocytogenes*, når den udsættes for miljøforhold i fødevarerindustrien. Miljøforholdenes indflydelse på virulens blev undersøgt ved brug af eksisterende molekylærbiologiske metoder såsom real time kvantitative PCR (qPCR), *in vitro* modeller af mave-tarmkanalen, *in vivo* modeller og funktionelle mammale cellemodeller. Følgende forskningsmæssige resultater blev opnået i projektets fire arbejdsplaner (WP).

WP1: Indsamling og karakterisering af mejerirelevante *L. monocytogenes* stammer

Formål: Forsøgene udført i WP1 har til formål indsamle og karakterisere mejerirelevante stammer af *L. monocytogenes* for derved at kunne udvælge 3-4 stammer til videre forsøg i WP 2 og WP3.

Resultater: En større stammesamling på 58 *L. monocytogenes* stammer er etableret, som inkluderer mejerirelevante stammer, samt stammer fra andre fødevarer og miljøet. *L. monocytogenes* stammer blev testet for hæmolyse, tilstedeværelse af listeriolysin gen og lineage type. Tolv stammer er yderligere undersøgt for overlevelse og vækst i BHI, samt i ostmodellsystemer under forskellige mejeri-relevante stressbetingelser herunder salt og mælkesyre. Yderligere, blev *L. monocytogenes* stammerne valgt ud fra hvordan mælkesyrestress påvirker væksten. Tilsyneladende er den hæmolytiske aktivitet afhængig af lineages type således at lineage I stammer var mindre hæmolytiske end lineage II stammer. Baseret på samtlige resultater adskilte *L. monocytogenes* stammerne 51779 og 15675 sig betydelig fra hinanden og blev valgt til videre undersøgelser sammen med typestammen EGDe. Stamme 15675, som er isoleret fra blød ost, tilhører serotype 4b og lineage 1 og indeholder genet, der koder for en nylig identificeret virulensfaktor listeriolysin S (LLS). Stamme 51779, der også er isoleret fra ost, tilhører serotype 1/2c og lineage 2 men indeholder ikke genet for LLS. Typestamme EGDe er et dyreisolat der tilhører serotype 1/2a, lineage 2 som ikke indeholder genet for LLS.

Konklusion: Stammesamling af karakteriserede *L. monocytogenes* isolater er etableret.

WP2: Transkription af virulensgener i *L. monocytogenes* ved udsættelse for mejerirelevante stressbetingelser

Hovedformålet med WP2 var at undersøge hvordan osterelevante miljøforhold påvirker ekspresion af virulensgener hos *L. monocytogenes*.

2.1. Effekt af mælkesyrebakterier på virulensgenekspresion i BHI-modellsystem

Formål: Naturlige mikroorganismer i fødevarer, eksempelvis visse mælkesyrebakterier (LAB), er vist at kunne hæmme væksten af *Listeria*. Men det kan også tænkes at de påvirker virulenspotentialer hos *L. monocytogenes* ved at influere på ekspresionen af virulensfaktorerne. Formålet med dette delprojekt er, at få viden om hvordan virulensgenekspresionen hos *L. monocytogenes* påvirkes af mikroorganismer, der er en naturlig del af mikrofloraen i mejeriprodukter.

Resultater: I projektet undersøges hvordan cellefri supernatanter fra 15 bakterieisolater og 9 gærisolater påvirker ekspresionen af udvalgte virulensgener hos *L. monocytogenes*. Ved brug af reporterstammerne fandt vi en forskellig ekspresion af virulensgenerne, afhængig af hvilken LAB stamme der blev testet, og hvilke vækstforhold den var dyrket under. Generelt så induktion af

virulensgenerne *prfA*, *hly*, *inlA* and *plcA* ved tilstedeværelse af supernatant fra mælkesyrebakterier, særligt to *Lactobacillus fermentum* stammer (4-57 og 1-72), når de var dyrket under mikroaerobe betingelser ved 25°C. Derimod sås kun en lille, hvis nogen, effekt efter aerob dyrkning. Endvidere sås en mindre induktion af *prfA* og *hly* fra de testede *B. linens* stammer. pH værdier for supernatanterne blev målt efter bakterievækst, hvilket viste at det ikke var muligt at afgøre om effekten skyldes pH eller de øvrige komponenter i supernatanter. Da væksthastigheden af *L. monocytogenes* kan have betydning for vurdering af genekspressionen, blev det undersøgt hvorvidt supernatanten påvirkede væksten af *L. monocytogenes*. Væksthastigheden og maksimal celletæthed af *L. monocytogenes* EGDe, indeholdende reporterfusionsplasmiderne, i BHI vækstmedie var ikke påvirket af tilsætning af supernatanter fra *L. fermentum* 4-57 eller vækstmedierne APT eller MRS. Dermed forventes forskelle i ekspression af virulensgener ikke at være afledt af ændrede vækstforhold eller væksthastigheder, men udelukkende at være et respons på metabolitter udtrykt af *L. fermentum*. Niveauet af transskriptionen af virulensgenerne efter tilsætning af *L. fermentum* 4-57 og 1-72 supernatanter blev undersøgt ved qPCR. Den relative ekspression af virulensgenerne i forhold til referencegenerne varierede kun marginalt, og kunne dermed betegnes ikke som signifikant.

Konklusion: Metabolitter produceret af *L. fermentum* 4-57 og 1-72, som har oprindelse i chili fra Malaysia, kan påvirke transskriptionen af virulensgener hos *L. monocytogenes*. Supernatanterne fra dyrkning af mælkesyrebakterierne og gæren påvirkede ikke væksten af *L. monocytogenes*. Ud fra de samlede resultater er der ikke påvist nogen effekt på ekspressionen af virulensfaktorerne *prfA*, *hly* eller *inlA* for nogen af de testede isolater fra starterkulturer eller de andre osteassocierede stammer.

2.2. Effekt af mælkesyre stress på vækst og gentransskription af *L. monocytogenes*

Formål: Mælkesyre findes i høje koncentrationer i ost, som følge af bakteriers omdannelse af laktose til mælkesyre. Selvom mælkesyre har en hæmmende effekt på vækst af *L. monocytogenes*, kan nogle stammer dog tilpasse sig bedre til høje mælkesyre koncentrationer end andre. Effekten af mælkesyre på vækst og virulensgenekspression er blevet undersøgt for 6 *L. monocytogenes* mejeristammer.

Resultater: Væksthastigheder af *L. monocytogenes* stammer i BHI tilsat 0-20 mM mælkesyre var ikke signifikant forskellige undtagen for stamme 51779 som voksede langsommere i 20mM mælkesyre. Genet *clpC* (ATPase, involveret i stress respons og adhesion) var betydeligt opreguleret, mens genet *prfA* (transskriptionel regulator) var nedreguleret i stammerne 15675 og 51779 med stigende mælkesyrekoncentration (15-20 mM). Udtryk af generne *inlA* (involveret i invasion) og *sigB* (transkriptionel regulator) var ikke ændret på de givne tidspunkter.

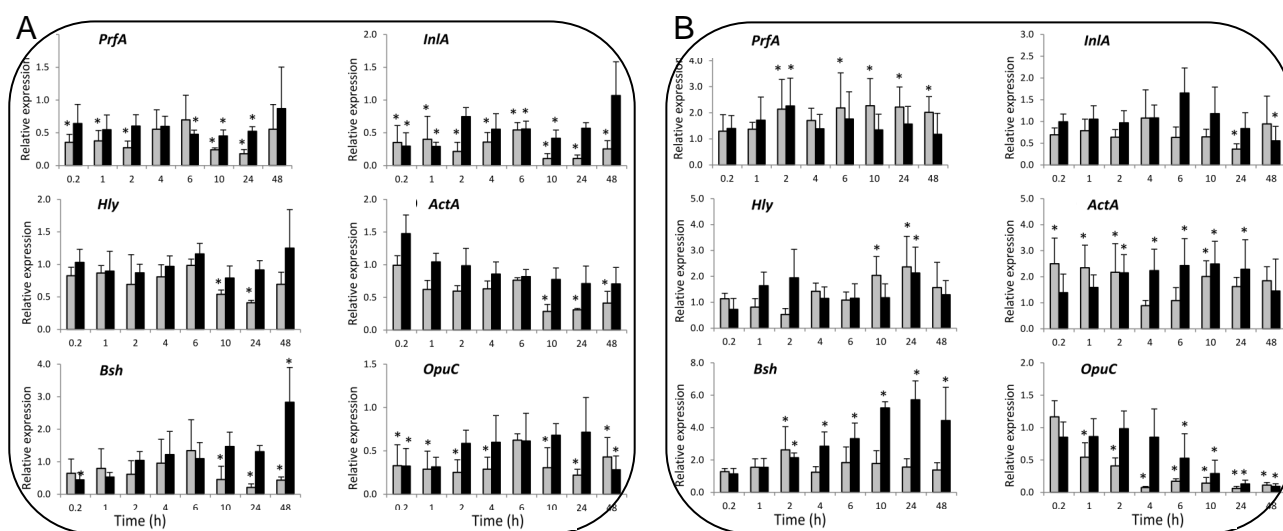
Konklusion: Væksthastigheden af *L. monocytogenes* in BHI mediet og transkription af virulensgener er stammeafhængig og påvirket af mælkesyrekoncentrationen.

2.3. Effekt af saltstress på vækst og genekspression af *L. monocytogenes*

Formål: Natrium klorid (NaCl) er en vigtig komponent ved fremstilling af oste. *L. monocytogenes* er udsat for både høje- og lave saltprocenter under saltning, lagring og opbevaring af ost og tilpasser sig saltstress ved at ændre ekspressionen af stress- og virulensgener. Effekten af NaCl koncentration på vækst og virulensgenekspression i *L. monocytogenes* er undersøgt i ostemodellsystemer og ved dyrkning på osteoverflader. Formålet med forsøget var få belyst hvorledes virulenspotentialiet påvirkes i forhold til stammernes salttolerance samt NaCl indhold i ost.

Resultater: Betydningen af saltindhold og stammevariation for vækst af *L. monocytogenes* 51779, 15675 og EGDe er undersøgt ved brug af et LB-modellsystem med 0-6% NaCl (w/v) saltkoncentrationer. Endvidere blev ekspressionsstudiet af virulensgener udført med qPCR ved

dyrkning på overfladen af Samsø ost ved lavt (mindre end 0,15% (w/w) NaCl) og højt (3,6% (w/w) NaCl) saltindhold. Som forventet blev *L. monocytogenes* vækst i LB-mediet formindsket med stigende saltkoncentration og uden salt som følge af osmotisk stress. Stammen 15675 var mest resistent over for osmotisk stress medens stammen 51779 udviste den laveste salttolerance. Forskellen på stammernes levedygtighed blev bekræftet ved osteforsøg. Tolv virulensgener hos *L. monocytogenes* blev kvantificeret vha. qPCR. Metoden for ekstraktion af total bakteriel RNA fra ost til qPCR analyse blev optimeret og indført. RNA havde et gennemsnitligt integritetsnummer på 7-9 (optimalt 10), rRNA ratios (23s /16s) på 0,8-1,2 og blev vurderet til at være egnede til qPCR. Som det fremgik af qPCR resultaterne fra osteforsøget, var genekspression i *L. monocytogenes* påvirket af saltindhold i ost (Fig. 1AB).



Figur 1. Ændringer af ekspressionsniveauer af virulensgener *prfA*, *inlA*, *hly*, *actA*, *bsh* og *opuC* hos *L. monocytogenes* bestemt ved qPCR. (A) *L. monocytogenes* 15675 (salt resistent) og (B) *L. monocytogenes* 51779 (salt sensitiv) var dyrket på Samsø ost med 0.15% (w/w) (grå søjler) and 3.6% (w/w) (sort søjler) NaCl. Gennemsnitsværdier og standard afvigelser af tre biologiske gentagelser er præsenteret. Signifikant forskellige værdier ($P < 0.05$) fra start (er markeret med stjerner).

Der blev også påvist signifikante forskelle i genekspression mellem *L. monocytogenes* 51779 og 15675, som muligvis var relateret til stammernes salttolerance. Stammen 51779 (mindre salt resistent) responderede mere på osmotisk stress sammenlignet med 15675 (mere salt resistent), hvilket kunne ses fra op- og nedregulering af gener hen over inkubationstiden. Gener der var betydeligt opreguleret i stammen 51779 var involveret i generel support af virulens (*prfA*, *hly* og *actA*) og overlevelse i tarmen (*bsh*). Transskriptionen af *inlA*, *opuC*, *gadC*, *clpP*, *agrA* og *ami* blev enten nedreguleret ved forskellige samplingstider eller reduceret konsekvent i begge stammer. Desuden blev *opuC*, *agrA* og *ami* nedregulering i højere grad efter 4 timers inkubation på ost med lavt saltindhold. Stamme 15675 tilhører serotype 4b og er impliceret i listeriosis udbrud mens stamme 51779 med serotype 1/2c sjældent er forbundet med sygdom. Større resistens for saltstress tyder på, at stammen 15675 lettere vil kunne kolonisere ost og forarbejdning miljø. Samtidigt, indikerer den øgede ekspression af virulensgener i stammen 51779, at saltstress i ostproduktion kan fremme frigivelsen af virulensfaktorer og dermed stimulere virulensen. Manuskript baseret på resultater af genekspressionsstudierne er accepteret for publikation i tidskriftet "Foodborne Pathogens and Disease".

Konklusion: Indhold af NaCl i ost påvirker ekspresion af de undersøgte virulensgener i *L. monocytogenes* 51779 og 15675, og dermed virulenspotentiel af *L. monocytogenes*. Denne effekt er afhængig af stammens salttolerance, således at induktion af virulensgener er mere markant i stammen som er mere følsom overfor osmotisk stress.

2.4. Ekspresion af virulensfaktorerne *ChiA* og *ChiB* i *L. monocytogenes*

Formål: Overlevelse af *L. monocytogenes* i miljøet menes at være påvirket af bakteriens kitinolytiske system, der består af to kitinaser *ChiA* og *ChiB*. Det er foreslået at dette system tillader bakterien at nedbryde kitin, som er en uopløselig polymer af N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc). Kitinaserne er derudover vist at have betydning for virulens af *L. monocytogenes*. Endvidere tænkes det, at kitinaserne bidrager til vækst og spredning i GlcNAc rige fødevarer og fødevarer miljøer. Dette kunne meget vel være i mælk eller oste matricer, da disse indeholder GlcNAc som del af mælkeglycokonjugaterne. I dette studie undersøgtes betydning af kitinaserne for interaktion mellem *Listeria* og rundormen *Caenorhabditis elegans*, som er en vært der indeholder kitin. Med det formål at opnå indsigt i hvorvidt kitinaseaktiviteten hidrører en bestemt livsstil hos *L. monocytogenes*, sammenlignedes kitinaseaktiviteten hos isolater med oprindelse i forskellige miljøer samt hos forskellige typer (lineages) af *L. monocytogenes* med vægt på isolater med relevans for mejeriindustrien.

Resultater: Sammenligning af kitinaseaktiviteten hos isolater med oprindelse i forskellige miljøer viste, at hovedparten af isolaterne havde kraftig kitinolytisk aktivitet. Der sås en lidt højere prævalens af stammer med høj aktivitet blandt fødevarerisolater og en lidt lavere blandt kliniske isolater. Dog blev der ikke påvist korrelation mellem stammernes lineage type og kitinolytiske aktivitet. Studier af oprenset *ChiA* og *ChiB* viste, at det især var den kitinolytiske effekt af *ChiB*, der havde betydning i det anvendte assay, hvorimod *ChiA* kun havde lav aktivitet. Forekomsten af *L. monocytogenes* og mutanter der ikke indeholder kitinaser blev undersøgt i *C. elegans*, efter at rundormen blev inficeret med bakterierne (se punkt 3.3). Det blev fundet at begge kitinaser og i særdeleshed *ChiB* har betydning for *L. monocytogenes* kolonisering og overlevelse i rundormen *C. elegans*. Forsøgene viste at *agr* systemet er involveret i reguleringen af *chiA* på det transskriptionelle niveau, da produktionen af begge kitinaser såvel som den kitinolytiske aktivitet var markant lavere i en mutant der manglede *agrD* end i vildtypen.

Konklusion: Det kitinolytiske system hos *L. monocytogenes* er vist at have betydning for både virulens og for overlevelse og transmission i miljøet. En bedre forståelse af de involverede proteins funktion og regulering kan have betydning for terapi såvel som forebyggelse af forekomst og transmission af *Listeria* gennem fødevarer kæderne herunder i mejeriproduktkæden.

WP3. Bestemmelse af sygdomsfremkaldende egenskaber som følge af stress påvirkninger i mejerisammenhæng ved brug af *in vitro* mave-tarm model og *in vivo* infektionsmodeller.

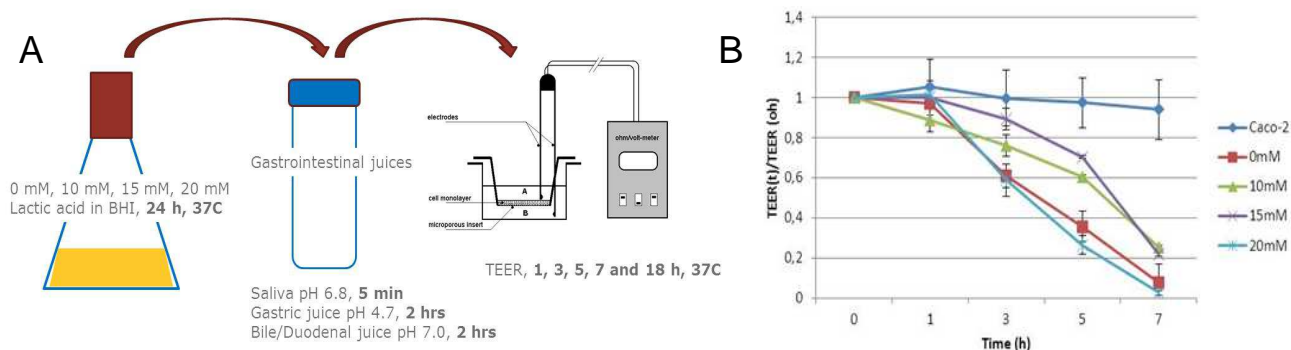
Formålet med arbejdsplan 3 (WP 3) var at bestemme overlevelses- og virulensegenskaber af *L. monocytogenes* som følge af stresspåvirkninger i mejerisammenhæng ved brug af en *in vitro* mave-tarm modeller og *in vivo* infektionsmodeller.

3.1. *In vitro* mave-tarm model (TEER)

Formål: At udvikle *in vitro* mave-tarm model til at vurdere *L. monocytogenes* overlevelse gennem mave-tarm passagen samt bakteriens virulens på populationsniveauet.

Resultater: Bakteriecernes overlevelsessevne blev bestemt i syntetiske medier svarende til spyt-, mave-, galde- og tarmvæske (Fig. 2A). Bakteriernes permeabiliseringssevne blev vurderet ved

måling af transepitelial elektrisk resistens (TEER) over et polariseret monolag af tarmceller (Caco-2). Et fald i TEER indikerede bakteriens evne til at beskadige tarmbarrieren og indirekte virulens. Modellen blev anvendt til at undersøge effekten af mejerirelevante stressbetingelser, herunder eksponering til mælkesyre, på overlevelse af *L. monocytogenes* 51779 og integritet af Caco-2 celler monolag.



Figur 2. (A) Forsøgsopstilling til *in vitro* mave-tarm modellen: Kolbe med mælkesyre, beholder til mave tarm safter og system til måling af trans epiteliel elektrisk resistens målinger gennem Caco-2 celle monolag. (B) Ændringer i TEER af polariserede Caco-2 tarmceller eksponeret til *L. monocytogenes* 51779. Før påsætning blev bakterieceller inkuberet med 0-20 mM mælkesyre efterfulgt af mave-tarm safter. Som kontrol haves Caco-2 celler uden *L. monocytogenes*.

Der blev observeret en svag tendens til at præeksponering til 15 og 20 mM mælkesyre gav en bedre overlevelse af *L. monocytogenes* 51779 i mave-tarm væsker sammenlignet med præeksponering til 0 og 10 mM mælkesyre. Ved efterfølgende infektion af Caco-2 celler ses det at permeabilisering af monolaget skete hurtigere hvis *L. monocytogenes* 51779 havde været præeksponeret til 0 og 20 mM sammenlignet ved 10 og 15 mM (Fig. 2B).

Konklusion: Den udviklede *in vitro* mave-tarm model kan anvendes til at undersøge overlevelse og virulens potentiale af *L. monocytogenes*. Forsøg udført i dette system vil bidrage med ny viden om *L. monocytogenes*, idet det er muligt at undersøge effekten af bakteriens forhistorie i mejerirelevante stressbetingelser såvel som betydningen af stammevariation for overlevelse og virulens potentiale.

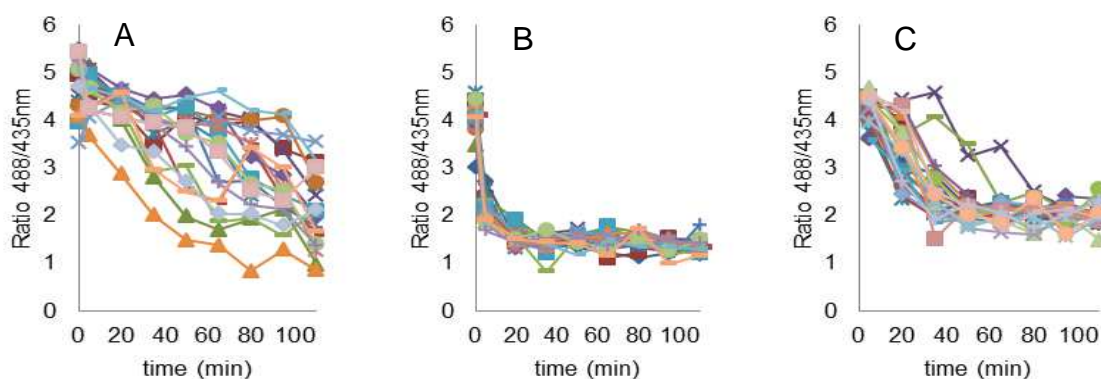
3.2. *In vitro* mave-tarm model (FRIM)

Formål: At udvikle *in vitro* model til at måle enkelte *L. monocytogenes* cellers respons i "real time" på mave-tarm modellens betingelser ved hjælp af Fluorescence Ratio Imaging (FRIM). Yderligere undersøges det om denne respons er stammeafhængig og knyttet til stammernes salttolerance.

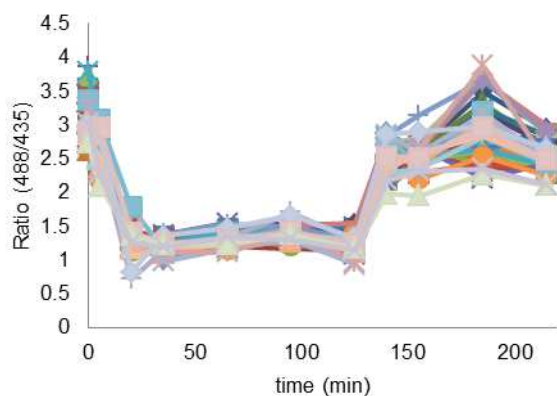
Resultater: *L. monocytogenes* celler blev indfarvet med CDCFDA-se og tilsat *in vitro* mave-tarm modellen, hvor de blev skyllet over med syntetiske medier svarende til spyt- og mavevæske. For at bestemme intracellulær pH (pHi) blev cellernes emission målt efter excitation med 2 forskellige bølgelængder (en mere pH afhængig (488 nm) og en pH uafhængig (435 nm) og ratioværdier ($R_{488/435}$) udregnet. Opretholdelse af pHi er et mål på cellelevedygtighed.

Når *L. monocytogenes* stammer 15675, 51779 og EGDe, opdyrket uden mejerirelevante stressfaktorer, blev udsat for betingelserne i *in vitro* mave-tarm modellen, reagerede cellerne forskelligt, og responset var stammeafhængigt (Fig. 3). Mens cellerne blev udsat for syntetisk spyt (de første 5 min), viste den mest saltfølsomme stamme (51779) det største fald i ratioværdi. Den mere salttolerante stamme (15675) viste både positive og negative hældningskoefficienter under

skylning med syntetisk spyt. Da skyllevæsken blev skiftet til blandingen af syntetisk spyt og mavesaft (pH 3.5), viste celler fra referencestammen (EGDe) det største fald i ratioværdier. Variationen i det umiddelbare respons på de syntetiske mavetarmvæsker, for de enkelte celler, var forskellig for de tre stammer. Det blev fundet at den mere salttolerante *L. monocytogenes* stamme (15675) havde den største variation i celle respons gennem hele forsøget. Cellerne fra den mere saltfølsomme *L. monocytogenes* stamme (51779) viste i modsætning de mest ensartede respons på mavetarmvæskerne, mens cellerne fra *L. monocytogenes* referencestammen (EGDe) viste et celle respons der lå mellem de to mejeristammer (15675 og 51779). Et anaerobt flow kammer (CellASIC® ONIX plader) er endvidere taget i brug og optimeret til *in vitro* mave-tarm model eksperimenter med *L. monocytogenes*. I det anaerobe flowkammer var det muligt at måle emissioner fra >40 celler over hele forsøget (Fig.4).



Figur 3. *In vitro* mave-tarmmodel passage af *L. monocytogenes* celler fra (A) 15675, (B) 51779, (C) EGDe. Graferne viser ratio-værdier af emissionsintensiteterne når cellerne bliver exciteret med 488 nm (pH afhængig) og 435 nm (pH uafhængig). Cellerne blev tilsat flow-kammeret og skyllet med syntetisk spyt (pH 6.5) i 5 min. Efterfølgende blev cellerne skyllet med en blanding af syntetisk spyt og mavesaft i 105 min (pH 3.5).



Figur 4. Anaerobt flowkammer forsøg med celler fra den salt tolerante *L. monocytogenes* (15675). Skyllet med PBS, 5 min (pH 6.5), 2 timer (pH 4.0), 2 timer (pH 6.5). Ratioemissioner for enkeltceller er baseret på 40 celler.

Konklusion: Det kunne således se ud som om, at der er en sammenhæng mellem stammernes tolerance overfor salt og deres umiddelbare cellerespons i *in vitro* mave-tarm modellen, når cellerne ikke er udsat for mejerirelevante stressfaktorer. Dette skal dog undersøges videre for at kunne blive endeligt fastlagt. I det anaerobe kammer ligger cellerne mere fast, og der er et stort potentiale i dette udstyr til måling af intracellulær pH under passage i *in vitro* mave-tarm modellen.

3.3. Udvikling af *in vivo* virulensmodeller.

***Caenorhabditis elegans* som model for *Listeria monocytogenes* infektion**

Formål: For at kunne studere virulenspotentialer hos *L. monocytogenes* er det nødvendigt med en *in vivo* model, der kan imitere det humane immunsystems respons overfor forskellige bakteriestammer. For at kunne vurdere miljøfaktorerens betydning for virulenspotentialer er det nødvendigt med en virulensmodel, der muliggør screeningen af en række stammer og miljøforhold på en praktisk, etisk og økonomisk overkommelig måde.

Resultater: *L. monocytogenes* kunne kolonisere *C. elegans* og denne kolonisering kunne også opretholdes efter at ormen blev flyttet til "foder" der ikke indeholdt *L. monocytogenes*. Det har tidligere været vist at infektion af *C. elegans* var afhængig af bakteriestamme og det vækstmedie ormen vokser på. Derfor undersøgte vi mediets betydning for brugen af ormemodellen *C. elegans* og observerede at LB mediet gør den ellers avirulente *E. coli* OP50 kontrol stamme virulent. *E. coli* OP50 bruges normalt som foder til *C. elegans*. Dette er derimod ikke tilfældet ved brug af Nematode Growth Medium (NGM). Dette indikerer at *C. elegans* kan bruges som model for *L. monocytogenes* med den forudsætning at de rette betingelser vælges. Det blev dog vurderet at der i projektet ikke var mulighed for at foretage yderligere undersøgelser af denne model i forhold til brug til screeningerne. I stedet testede vi betydningen af *L. monocytogenes* kitinaserne for virulens og kolonisering af *C. elegans* (se ovenfor pkt 2.4).

Konklusion: Vi konkluderede at *C. elegans* under visse betingelser kan være en brugbar model for *L. monocytogenes*. Det vil dog stadig være nødvendigt med flere test af modellen inden den kan benyttes som screeningsmodel af forskellige stammers patogenecitet.

WP 4. Modellering og forudsigelse af fødevarsikkerheden

Model for statistisk design af forsøg i WP2 og WP3 blev udført i samarbejdet med IMM (DTU). Test af den matematiske model på industrielt niveau var ikke muligt at opnå, grundet at den PhD studerende var på barsel og siden hen stoppede samt en langtidssygemelding pga. stress for en postdoc'en.